

# ارتباط آلل‌های ژن‌های *OPN* و *PPARGCIA* با تعداد سلول‌های بدنی شیر در گاوهای هلستاین ایران

## Association of the *OPN* and *PPARGCIA* Alleles with Milk Somatic Cell Count in Iranian Holstein cattle

مجید پسندیده<sup>۱\*</sup>، حامد خراتی کوپایی<sup>۲</sup>، محمدرضا محمد آبادی<sup>۳</sup>، علی اسمعیلی زاده کشکوئی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دوره دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشجوی دوره دکتری زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۳- دانشیار، استاد، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

Pasandideh M<sup>1\*</sup>, Kharrati Koopae H<sup>2</sup>, Mohammad Abadi MR<sup>3</sup>, Esmailzadeh Koshkoieh A<sup>3</sup>

1- PhD Candidate of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Animal Science and Fishery, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran.

2- PhD Candidate of Biotechnology, Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran.

3- Associate Professor, Professor, Department of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Majidpasandideh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۵)

### چکیده

سلول‌های بدنی یکی از اجزای شیر هستند که در اثر بازسازی طبیعی بافت غده‌ای پستان تولید می‌شوند. تعداد این سلول‌ها در شیر هم بیانگر سلامت دام و هم شیر تولیدی گاوها است، از این رو تعداد سلول‌های بدنی موجود در شیر شاخص مهمی برای به‌نژادی دام می‌باشد. در این مطالعه ارتباط بین ژنوتیپ‌های ژن‌های واقع روی کروموزوم شش گاوی (*OPN* و *PPARGCIA*) و تعداد سلول بدنی در شیر بررسی شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از ۳۹۸ راس گاو هلستاین از استان‌های تهران و اصفهان به روش نمکی انجام شد. چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌ها با روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. تجزیه مدل‌های خطی با در نظر گرفتن ژنوتیپ‌های مورد بررسی به‌عنوان اثرات ثابت نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های موقعیت ۳۳۵۹ از ژن *PPARGCIA* و موقعیت ۸۵۱۴ از ژن *OPN* با تعداد سلول بدنی شیر وجود دارد ( $P < 0.05$ ). بیش‌ترین میانگین تعداد سلول‌های بدنی مربوط به ژنوتیپ‌های AC و CC به‌ترتیب در جایگاه‌های *PPARGCIA* (3359) و *OPN* (8514) بود. اگرچه مطالعات پیش‌تری برای تایید نتایج تحقیق حاضر نیاز است، اما این مناطق ژنومی می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی برای بهبود ورم پستان در گاوهای شیری مورد استفاده قرار گیرند.

### واژه‌های کلیدی

تعداد سلول‌های بدنی شیر

گاو هلستاین

ورم پستان

*OPN*

*PPARGCIA*

اغلب از این صفت در برنامه‌های انتخاب و بهبود گله‌های شیری استفاده می‌شود (Anderson et al. 2010).

تشخیص ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی، برای درک سازوکار ورم پستان و شناسایی نشانگرهای ژنتیکی بالقوه برای مقاومت به آن ضروری می‌باشد. نتایجی که آل‌های مطلوب مقاومت به عفونت را از والدین دریافت کرده‌اند نیاز کمتری به آنتی بیوتیک خواهند داشت. معمولاً تولید شیر بالا با افزایش بروز ورم پستان همراه است، از این رو تصور می‌شود که تعدادی از QTL‌های مسئول ورم پستان در نزدیکی QTL‌های موثر بر صفات تولیدی شیر قرار گرفته باشند (Klungland et al. 2001). با توجه به اثبات ارتباط ژن *OPN* با صفات تولید و ترکیب شیر (Leonard et al. 2005; Khatib et al. 2007; Pasandideh et al. 2015; Weikard et al. 2005; Khatib et al. 2007; Komisarek and Dorynek 2009; Pasandideh et al. 2015) بررسی این ژن‌ها برای احتمال وجود همبستگی با صفت ورم پستان حائز اهمیت می‌باشد. پروتئین  $OPN^3$  یا فسفوپروتئین ترشحی ( $SPP1^4$ ) یک سایتوکین است که توسط ماکروفاژها و سلول‌های T فعال شده تولید می‌شود. این پروتئین به‌عنوان یک جزء اولیه در مکانیسم فعال‌سازی سلول T شناخته شده است (Anderson et al. 2010). افزایش تعداد سلول‌های T باعث تجمع ماکروفاژها در محل عفونت شده و در نتیجه ایمنی باواسطه سلولی ( $Th1$ ) از طریق القای ترشح سایتوکینین‌های  $Th1$  بهبود داده می‌شود. بیان ژن *OPN* در سطح رونویسی در هنگام ورم پستان افزایش یافته و پروتئین آن با به‌کارگیری و فعال‌سازی ماکروفاژها، باعث مقاومت در مقابل چندین عفونت ناشی از پاتوژن‌های درون سلولی می‌شود (Weber et al. 2002). نوتروفیل‌ها، سلول‌های غالب در غدد پستانی سالم می‌باشند و وظیفه حذف نهایی پاتوژن‌ها را برعهده دارند. در هنگام عفونت‌های داخل پستانی، توسط ماکروفاژها یک‌سری میانجی‌گرهای تحریکی آزاد می‌شوند که باعث تجمع نوتروفیل‌ها از جریان خون به داخل کارتی‌های عفونی می‌شود. در این موقع تعداد این سلول‌ها بیش‌تر از ۹۰ درصد سلول‌های شیر می‌شود.

ورم پستان یک عفونت مربوط به غدد پستانی است که به‌طور عمده توسط عوامل باکتریایی ایجاد می‌شود. این بیماری روی کمیت و کیفیت شیر اثر نامطلوب گذاشته و باعث حذف گاوهای شیری پرتولید از گله می‌شود (Seegers et al. 2003). این بیماری می‌تواند به‌همراه نشانه‌های موضعی و سیستماتیک (ورم پستان بالینی) و یا بدون نشانه‌های قابل رویت (ورم پستان تحت بالینی) باشد. در صورت عدم وجود نشانه‌های بالینی، تشخیص ورم پستان از طریق افزایش تعداد سلول‌های بدنی در شیر امکان پذیر است. عوامل متعددی مانند پاتوژن‌ها، عوامل ژنتیکی، مدیریت ضعیف و سلامت گاو شیری سبب ورم پستان هستند (Verbeke et al. 2014). فاکتورهای ژنتیکی همان شکل‌های مختلف آللی برای ژن‌ها هستند که باعث مقاومت حیوان به این بیماری می‌شوند. به‌عنوان مثال برای ژن *BoLA-DRB3* بیش از ۹۰ آلل شناسایی شده‌است که تعدادی از این آلل‌ها با ورم پستان در گاو ارتباط دارند و می‌توانند در شناسایی حیوانات حساس به ورم پستان کمک کنند (Ruzina et al. 2010; Mohammadi et al. 2009). برنامه‌های به‌نژادی در گاوهای شیری در جهت افزایش صفات تولیدی می‌باشد که این امر باعث کاهش مقاومت حیوان به بیماری‌ها از جمله ورم پستان شده‌است.

آزمون کالیفرنایی ورم پستان (CMT)<sup>۱</sup> روشی ساده و ارزان برای تخمین کیفی تعداد سلول‌های بدنی (SCC)<sup>۲</sup> موجود در شیر گاو می‌باشد. این معیار (CMT) اغلب به‌عنوان یک شاخص غیرمستقیم از ورم پستان استفاده می‌شود اما SCC شاخص استاندارد برای میزان ورم پستان می‌باشد. معیار SCC یک ابزار تحلیلی معتبر و سریع به شمار می‌آید و از سال ۱۹۶۰ به‌طور گسترده به‌عنوان شاخصی برای عفونت‌های درون پستانی استفاده شده‌است (Rodriguez et al. 2000). این شاخص با وضعیت ایمنی شناسی پستان مرتبط است و مقدار آن در پاسخ به محرک‌هایی مانند باکتری‌ها افزایش می‌یابد. به‌دلیل وجود همبستگی ژنتیکی و فنوتیپی مثبت بین تعداد سلول‌های بدنی و ورم پستان،

<sup>3</sup> Osteopontin

<sup>4</sup> Secreted phosphoprotein 1

<sup>1</sup> California mastitis test

<sup>2</sup> Somatic cell count

ژنوتیپ‌های ژن *PPARGC1A* با این صفت مشاهده نشد (Kowalewska-Luczak et al. 2013). به دلیل اهمیت ورم پستان در گله‌های گاوهای شیری کشور، در این مطالعه ارتباط دو ژن *OPN* و *PPARGC1A* با تعداد سلول‌های بدنی، که صفت همبسته با ورم پستان می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۳۹۸ نمونه خون از ۱۰ گله هلشتاین فعال از استان‌های اصفهان و تهران جمع آوری شد. تعداد ۳۷۲ رکورد SCC مربوط به دوره اول شیردهی این جمعیت از مرکز اصلاح نژاد دام کشور تهیه شد. استخراج DNA به روش نمکی انجام گرفت (Miller et al. 1988). برای انجام واکنش PCR از آغازگرهای رفت و برگشت زیر استفاده شد (Weikard et al. 2005). برای انجام واکنش PCR از مخلوط واکنش استاندارد و دماهای اتصال ۵۳ درجه سانتی‌گراد برای ژن *OPN* و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای هر دو جایگاه از ژن *PPARGC1A* استفاده شد. از روش RFLP برای تعیین ژنوتیپ نشانگرهای SNP استفاده شد. در این مرحله پنج میکرولیتر از محصول PCR با دو واحد از آنزیم‌های برشی مورد هضم قرار گرفتند. برای تعیین ژنوتیپ در موقعیت‌های c.8514 از ژن *OPN*، c.3359 از ژن *PPARGC1A* و c.1892 از ژن *PPARGC1A* به ترتیب از آنزیم‌های برشی *BsrI*، *NheI* و *HaeIII* در دماهای به ترتیب ۶۵، ۳۷ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های به ترتیب ۵، ۳ و ۳ ساعت استفاده شد.

تجمع نوتروفیل‌ها در غده پستانی عفونی باعث افزایش تعداد سلول‌های بدنی به بیش‌تر از  $10^6$  سلول بر میلی‌گرم شیر می‌شود. این در حالی است که در غدد پستانی سالم تعداد این سلول‌ها کمتر از  $10^5$  سلول بر میلی‌گرم شیر می‌باشد (Lahouassa et al. 2007). بنابراین به نظر می‌رسد ژن *OPN* نقش کلیدی در تعداد سلول‌های بدنی شیر ایفا می‌نماید.

ژن *PPARGC1A* نقش واسطه در بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم اکسیداتیو، سنتز چربی و گلوکونئوژنز دارد. این ژن وظیفه قابل توجهی در بافت‌های محل متابولیسم چربی، گلوکز و تعادل انرژی دارد و در انسان و موش قادر به هماهنگ کردن پروسه‌های متابولیکی در کبد و بافت‌های چربی و ماهیچه‌ای می‌باشد (Liang and Ward 2006). نقش بالقوه *PPARGC1A* در متابولیسم غدد پستانی می‌باشد. با توجه به نقش اساسی ژن *PPARGC1A* در متابولیسم گلوکز، چربی و انرژی، احتمالاً این ژن پروسه‌های متابولیکی را در طول دوره شیردهی در گاوهای شیری تنظیم می‌کند و توانایی فراهم آوردن نیازهای متابولیکی حیوان را در دوره شیردهی دارد (Weikard et al. 2005).

در تحقیقی، ارتباط چندین SNP از ژن *SPP1* با SCS در گاوهای هلشتاین کانادا مطالعه شده است. ارتباط معنی‌دار چندشکلی تک نوکلئوتیدی  $1301G>A$  و  $40A>C$  با ارزش اصلاحی SCS در تمام دوره‌های شیردهی مشاهده شد (Alain et al. 2009). در پژوهشی دیگر روی گاوهای جرسی، ارتباط ژنوتیپ TT از ژن *OPN* با SCC گزارش شد. این محققان نشان دادند دام‌ها با ژنوتیپ ترکیبی TT/GT (بین *OPN* و *FAM13A*) دارای SCC بالاتری هستند، اما در این پژوهش، هیچ ارتباط معنی‌داری بین

جدول ۱- توالی آغازگرهای رفت و برگشت

جایگاه	آغازگرهای رفت و برگشت (۳'→۵')
<i>OPN</i> (8514)	F-GCAAATCAGAAGTGTGATAGAC- R-CCAAGCCAAACGTATGAGTT-
<i>PPARGC1A</i> (3359)	F-GCGAGCACGGTGTACACTAAGGAGAGTTGGCTAG- R-GTTGTGTTGCACTCAATGGAC-
<i>PPARGC1A</i> (1892)	F-CATAGCCGGCGCCCCAGGTAAGATGCACGTTGGC- R-CTGGTACTCCTCGTAGCTGTC-

جایگزینی با کدگذاری عدد یک برای یکی از آلل‌ها و صفر برای آلل دیگر به دست آمد. برای تعیین واریانسی از صفت تعداد سلول‌های بدنی شیر که توسط ژن‌های *OPN* و *PPARGCIA* کنترل می‌شود، از رابطه  $1-MS_{full\ model}/MS_{reduced\ model}$  استفاده شد (Knott et al. 1996). در این رابطه  $MS_{full\ model}$  و  $MS_{reduced\ model}$  به ترتیب میانگین مربعات مدل کامل (مدل با وجود اثر ژن) و مدل کاهش یافته (مدل بدون اثر ژن) می‌باشد.

### نتایج و بحث

جهت ارزیابی کیفیت DNA، از الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. وجود باندهای واضح، پررنگ و بدون شکستگی مشخص کرد که عمل استخراج DNA به خوبی انجام شده است. به منظور تأیید تکثیر قطعه مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز دو درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تعیین ژنوتیپ نشانگرهای SNP، محصولات PCR تحت شرایط بهینه آنزیمی، مورد برش قرار گرفتند. نتایج حاصل از هضم آنزیمی در شکل ۱ ارائه شده است.

نتایج حاصل از تنوع ژنتیکی جایگاه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. در این مطالعه، بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی ژنوتیپی در موقعیت *PPARGCIA* (1892)، به ترتیب برای ژنوتیپ‌های TC و TT مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های Khatib et al. (2007) مطابقت دارد. هم‌چنین در موقعیت *PPARGCIA* (3359)، بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی ژنوتیپی به ترتیب برای ژنوتیپ‌های AC و CC محاسبه شد. دو تحقیق گذشته، بیش‌ترین فراوانی ژنوتیپی را در این موقعیت، برای ژنوتیپ AC (Weikard et al. 2005; Khatib et al. 2007) و تحقیقی دیگر کمترین فراوانی ژنوتیپی را برای ژنوتیپ CC گزارش کردند (Kowalewska-Luczak et al. 2010). از این نظر، نتایج تحقیق حاضر با مطالعات قبلی مطابقت دارد. در این مطالعه، بیشترین فراوانی ژنوتیپی در موقعیت *OPN* (8514)، برای ژنوتیپ CT و کمترین فراوانی برای ژنوتیپ CC محاسبه شد. این نتایج با یافته‌های مطالعات قبلی مطابقت دارد (Khatib et al. 2007; Pareek et al. 2008).

محاسبه فراوانی‌های آللی، ژنوتیپی، تعادل هاردی وینبرگ، و شاخص‌های شانون و نئی با استفاده از نرم‌افزار PopGene (Yeh et al. 1999) انجام شد.

برای انجام آزمون نرمال بودن داده‌های SCC از نمودار Q-Q پلات استفاده شد و در نهایت نرمال‌سازی با استفاده از نرم‌افزار MINITAB نسخه ۱۳/۲ و تبدیل Box-Cox انجام شد.

در این پژوهش به دلیل جمع‌آوری نمونه‌ها از گله‌های متفاوت در ایران و با توجه به وابستگی زیاد صفت SCC به شرایط محیطی و مدیریتی گله‌ها، برای مطالعه بهتر رفتار ژن‌های کاندید، اثرات متقابل ژن و گله نیز در نظر گرفته شد.

$$Y_{ijmn} = \mu + P_i + A_j + O_m + S_o + H_p + (P \times H)_{ip} + (A \times H)_{jp} + (O \times H)_{mp} + e_{ijmn} \quad (\text{مدل ۱})$$

در این مدل،  $y$  بردار مشاهدات شامل تعداد سلول‌های بدنی در شیر،  $\mu$  اثر میانگین،  $P$ ،  $A$  و  $O$  اثر ژنوتیپ‌های *PPARGCIA* (3359)، *PPARGCIA* (1892) و *OPN*،  $S$  و  $H$  به ترتیب اثر والد نر و گله،  $(P \times H)$  اثر متقابل *PPARGCIA* (3359) و گله،  $(A \times H)$  اثر متقابل *PPARGCIA* (1892) و گله،  $(O \times H)$  اثر متقابل *OPN* و گله و  $e_{ijmn}$  اثر باقی‌مانده هر مشاهده می‌باشد. در صورت معنی‌دار بودن اثرات متقابل، اثرات ژن‌های کاندید در گله‌ها به صورت جداگانه و با استفاده مدل زیر مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

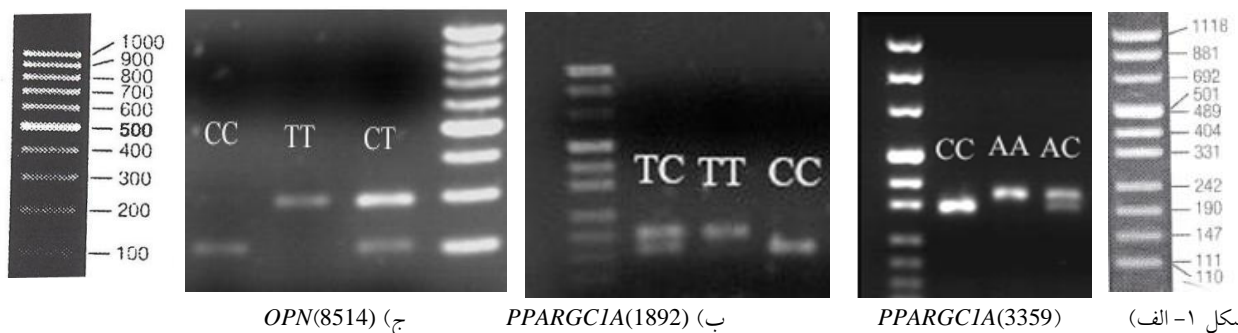
$$y_{ijm} = \mu + P_i + A_j + O_m + e_{ijm} \quad (\text{مدل ۲})$$

در این مدل،  $y$  بردار مشاهدات شامل تعداد سلول‌های بدنی در شیر؛  $\mu$  اثر میانگین،  $P$ ،  $A$  و  $O$  اثر ژنوتیپ‌های *PPARGCIA* (3359)، *PPARGCIA* (1892) و *OPN* و  $e_{ijm}$  اثر باقیمانده هر مشاهده می‌باشد.

برازش مدل‌های مطرح شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و انجام مقایسات میانگین به روش توکی انجام گرفت. برای تعیین اثرات جایگزینی آللی و غالبیت از روش رگرسیون خطی استفاده شد. برای این منظور، ژنوتیپ‌ها کدبندی شدند و رگرسیون مشاهدات بر کدها به عنوان اثرات جایگزینی آللی و غالبیت در نظر گرفته شدند. به منظور محاسبه اثرات غالبیت، به هتروزیگوت‌ها کد یک و هموزیگوت‌ها کد صفر تعلق گرفت. اثرات

داده‌ها به حالت نرمال است. از شکل ۲، که توزیع داده‌ها را قبل از نرمال سازی نشان می‌دهد، می‌توان دریافت که داده‌ها دارای توزیع نرمال نمی‌باشند و داده پرت نیز در رکورد ها وجود دارد. در شکل ۳ پس از نرمال سازی، داده‌های پرت حذف شده و توزیع داده‌ها به حالت نرمال می‌باشد. نتایج حاصل از برازش مدل شماره یک در جدول ۳ نمایش داده شده است. اطلاعات مربوط به عوامل غیر معنی دار مدل در جدول تجزیه واریانس نمایش داده نشده است.

با استفاده از آزمون مربع کای ( $\chi^2$ )، انحراف ژنوتیپ‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ، در تمامی جایگاه‌ها مشخص شد. از دلایل احتمالی این انحراف از تعادل، می‌توان به تلاقی‌های غیر تصادفی (تلقیح مصنوعی) اشاره کرد که از عوامل بر هم زننده تعادل می‌باشد. برای نرمال سازی داده‌ها ابتدا لگاریتم داده‌ها در مبنای ده محاسبه شد و سپس به توان ۳- رسیدند. نتایج حاصل از نمودار های Q-Q پلات در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. هر چه پراکنش داده در اطراف خط شاخص کمتر باشد نشان دهنده نزدیک بودن



شکل ۱- الف) محصولات هضم آنزیمی ژن‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. الف) ژنوتیپ‌های (۳۵۷ جفت‌باز) AA، (۳۸ و ۳۱۹ جفت‌باز) CC، (۳۸ و ۳۱۹ جفت‌باز) AC، (ب) ژنوتیپ‌های (۱۹۵ جفت‌باز) TT، (۳۲ و ۱۶۳، ۱۹۵ جفت‌باز) TC، (ج) ژنوتیپ‌های (۲۹۰ جفت‌باز) TT، (۹۰ و ۲۰۰ جفت‌باز) CC، (۹۰ و ۲۰۰، ۲۹۰ جفت‌باز) CT. قطعات ۳۲ و ۳۸، ۹۰ جفت‌بازی به دلیل خارج شدن از ژل مشاهده نمی‌شوند.

جدول ۲- نتایج حاصل از تنوع ژنتیکی جایگاه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

SNP	فرآوانی آلی		فرآوانی ژنوتیپی			هتروزیگوسیتی		شاخص		آماره
c.1892T>C	T	C	TT	TC	CC	Obs <sup>1</sup>	Exp <sup>2</sup>	Nei	Shannon	$\chi^2$
	۰/۴۴	۰/۵۶	۰/۱۲	۰/۶۵	۰/۲۳	۰/۶۵	۰/۴۹	۰/۴۹	۰/۶۸	۸/۵۱*
c.3359A>C	A	C	AA	AC	CC	Obs	Exp	Nei	Shannon	$\chi^2$
	۰/۶۴	۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۵۲	۰/۱۰	۰/۴۶	۰/۴۶	۰/۵۲	۰/۶۵	۶/۰۱*
c.8514C>T	C	T	CC	CT	TT	Obs	Exp	Nei	Shannon	$\chi^2$
	۰/۴۷	۰/۵۳	۰/۱۹	۰/۵۷	۰/۲۴	۰/۵۷	۰/۴۹	۰/۴۹	۰/۶۹	۷/۵۰

<sup>1</sup> هتروزیگوسیتی مشاهده شده، <sup>2</sup> هتروزیگوسیتی مورد انتظار

جدول ۳- نتایج حاصل از تجزیه واریانس مدل شماره یک را نشان می‌دهد

منابع تغییرات	ارزش F	ارزش P
اثر متقابل <i>OPN</i> و گله	۱/۶*	۰/۰۵
گله	۳/۳**	۰/۰۱
اثر متقابل <i>PPARGC1A(3359)</i> و گله	۲/۲**	۰/۰۰۷
<i>PPARGC1A(3359)</i>	۳/۵*	۰/۰۳

\* (P<0.05) \*\* (P<0.01)

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس حاصل از مدل شماره دو را نشان می‌دهد

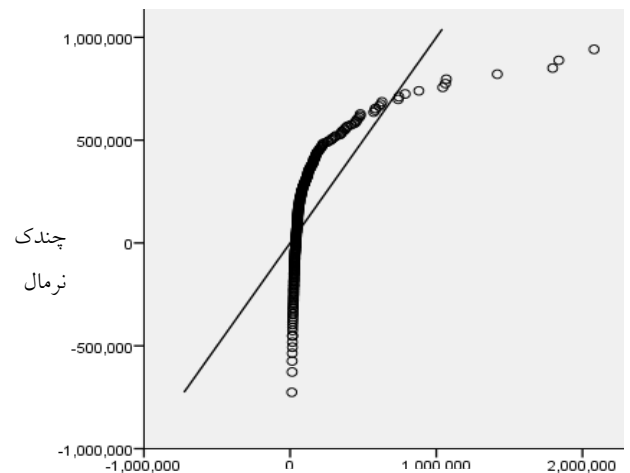
کد گله	جایگاه	تعداد نمونه	ارزش F	ارزش P
۸	<i>OPN</i>	۸۲	۳/۴۸*	۰/۰۴
۸	<i>PPARGCIA(3359)</i>	۸۲	۵/۴۶**	۰/۰۱
۱۰	<i>PPARGCIA(3359)</i>	۹۵	۸/۵**	۰/۰۰۱

\* $(P<0.05)$  \*\* $(P<0.01)$

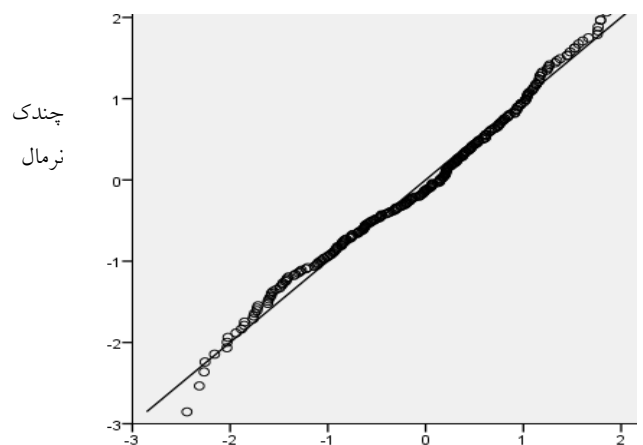
تجزیه واریانس اول را به‌خوبی توجیه کرده و اثرات متقابل بین ژنوتیپ و محیط را نمایش می‌دهد.

نتایج تجزیه واریانس دوم نشان داد که اثر ژن *OPN* در گله شماره ۸ و اثر ژن *PPARGCIA (3359)* در گله‌های شماره ۸ و ۱۰ معنی‌دار می‌باشد. نتایج در جدول ۴ خلاصه شده‌است. به‌دلیل معنی‌دار نشدن اثر والد نر و ژن *PPARGCIA (1892)* این فاکتورها در مدل دوم برای تجزیه واریانس وارد نشدند.

نتایج آزمون مقایسات میانگین نشان داد که بیش‌ترین میانگین *SCC* مربوط به ژنوتیپ *AC* در جایگاه *PPARGCIA (3359)* و ژنوتیپ *CC* در جایگاه *OPN (8514)* می‌باشد (جدول ۵). نشان داده شده که *QTL* های مسئول ورم پستان با تولید شیر بیش‌تر مرتبط هستند (Klungland et al. 2001). هم‌چنین در این مطالعه، در مورد کروموزوم ۶ گاوی، قطعه محتوی *QTL* مسئول ورم پستان در نزدیکی نشانگرهای *BM143* و *FBN12*، موقعیت یابی شد. مطالعات قبلی، تفرق حداقل یک *QTL* مرتبط با تولید شیر را در نزدیکی این نشانگرها گزارش کرده‌اند (Nadesalingam et al. 2005; Ron et al. 2001; Olsen et al. 2001). در پژوهشی، ارتباط *PPARGCIA (3359)* با دو صفت از ترکیب شیر گزارش شده‌است. با این که این ناحیه از ژن ارتباط معنی‌داری با صفات تولید شیر نشان نداد، اما مشاهده شد که افراد با ژنوتیپ *AC* دارای میانگین تولید شیر بالاتری هستند (Pasandideh et al. 2015). این نتایج می‌تواند تاییدی برای ارتباط جایگاه‌های کنترل کننده ورم پستان و صفات تولیدی شیر با یکدیگر باشد. اطلاعات مربوط به اثرات افزایشی و غالبیت در جدول شماره ۶ نشان داده شده‌اند. نتایج حاصل نشان داد که اثرات افزایشی برای هیچ‌کدام از جایگاه‌ها معنی‌دار نمی‌باشند. تنها اثر غالبیت برای جایگاه *OPN* معنی‌دار شد که با توجه به نقش فیزیولوژیک آن توجیه پذیر می‌باشد. در این تحقیق، واریانسی از صفت تعداد سلول‌های بدنی شیر که توسط جایگاه‌های *PPARGCIA (3359)* و *OPN* کنترل می‌شود به‌ترتیب برابر با ۴ و ۳/۵ درصد محاسبه شد. به‌دلیل عدم ارتباط معنی‌دار جایگاه *PPARGCIA (1892)* با صفت *SCC*، نیازی به محاسبه واریانس ناشی از ژن برای این جایگاه نمی‌باشد.

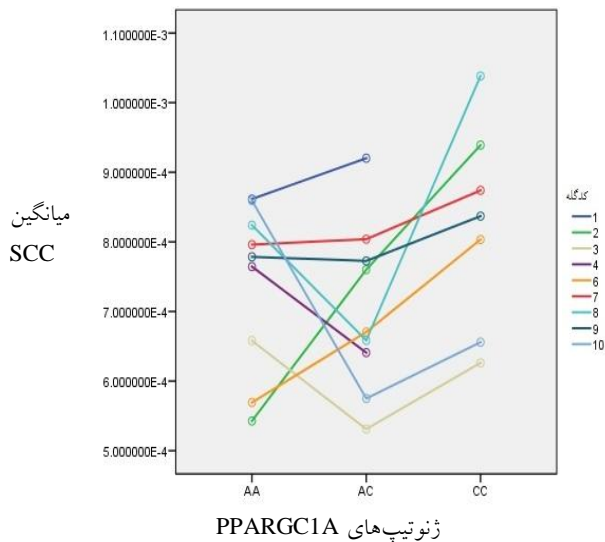


شکل ۲- توزیع داده‌ها قبل از نرمال سازی

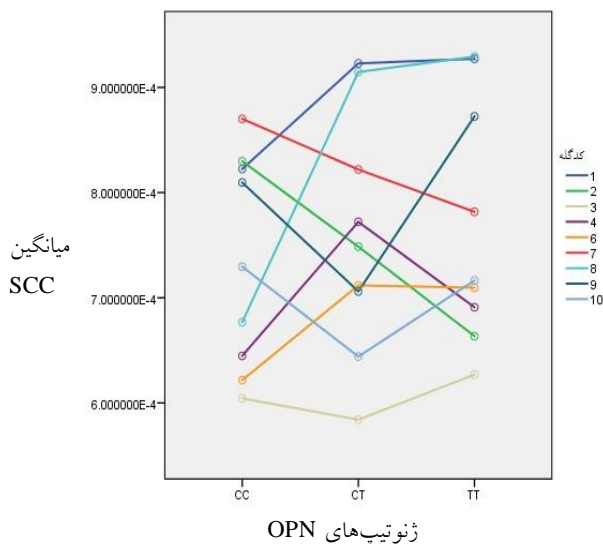


شکل ۳- توزیع داده‌ها بعد از نرمال سازی

با توجه به معنی‌دار بودن اثرات متقابل، اثرات ژن‌های کاندید در گله‌ها به‌صورت جداگانه و با استفاده مدل شماره دو مورد بررسی قرار گرفت. نمودارهای شکل‌های شماره ۴ و ۵ نتایج حاصل از



شکل ۴- اثرات متقابل بین ژنوتیپ‌ها و گله‌ها



شکل ۵- اثرات متقابل بین ژنوتیپ‌ها و گله‌ها

در این تحقیق، بین ژنوتیپ‌های *PPARGC1A* با ارزش SCC هیچ ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (Kowalewska-Luczak et al. 2013). نتایج پژوهش حاضر عدم وجود ارتباط بین چند شکلی ژن *PPARGC1A* (1892) و صفت SCC را نشان داد. نتایج مشابهی در این زمینه در دسترس است. نانی و همکاران (۲۰۱۵) ارتباط ژن *PPARGC1A* را با صفت SCS در سه موقعیت ۱۸۹۲، ۲۳۰ و ۳۳۷ در جمعیتی متشکل از ۶۷۷ گاو هلشتاین و ۲۶۴ گاو آمیخته (جرسی و هلشتاین) مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان از عدم ارتباط معنی‌دار بین جایگاه‌های ژنی مطالعه شده و صفت SCS بود. علاوه بر این (Komisarek et al. 2009) نیز نشان دادند

جدول ۵- آزمون مقایسات میانگین برای ژنوتیپ‌های معنی‌دار را نشان می‌دهد

<i>PPARGC1A</i> (3359)	میانگین SCC	<i>OPN</i>	میانگین SCC
AC	۶۳۲۷۹ <sup>a</sup>	CC	۸۵۵۲ <sup>a</sup>
AA	۳۸۲۰۴ <sup>ab</sup>	CT	۴۵۹۹۹ <sup>b</sup>
CC	۲۰۹۱۵ <sup>b</sup>	TT	۴۱۸۴۱ <sup>b</sup>
کد گله	۸	۱۰	۱۰

حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد. سطح معنی‌داری پنج درصد

جدول ۶- برآورد اثرات جایگزینی آللی و غالبیت را نشان می‌دهد

جایگاه	اثر جایگزینی آللی	اثر غالبیت
<i>OPN</i> <sup>T</sup>	-۱۹۶۸۹ ± ۲۵۵۱۴	-۹۳۰۵۶ ± ۳۵۸۵۸ <sup>**</sup>
<i>PPARGC1A</i> (3359) <sup>A</sup>	۵۱۹۵۰ ± ۳۶۴۲۶	-۱۱۳۶۴ ± ۲۹۷۶۵

(P<0.01)<sup>\*\*</sup>

قابل ذکر است که تحقیقات کمی در مورد بررسی ارتباط این دو ژن با ورم پستان انجام شده‌است. با این حال، در ارتباط اثر ژن *OPN* با ورم پستان، نتایج مشابهی با پژوهش حاضر، گزارش شده‌است. در پژوهشی مشخص شد که ارتباط ژن *OPN* با صفت SCS در جمعیت گاوهای Multiparous معنی‌دار می‌باشد. همچنین اندازه‌گیری میزان *OPN* ترشح شده در شیر و پلاسما نشان داد که برخی هاپلوتیپ‌های ژن *OPN* با میزان کم یا زیاد بودن SCS شیر ارتباط معنی‌داری دارند (Dudemaine et al. 2014). همین مطالعه نشان داد که ژن *OPN* در ایجاد پاسخ‌های ایمنی مؤثر است به طوری که این ترکیب به میزان ۱۸ میلی‌گرم در لیتر در غدد پستانی ترشح می‌شود و کم شدن سطح این پروتئین در پلاسما باعث افزایش تعداد ماکروفاژها خواهد شد. در پژوهشی دیگر ارتباط چند شکلی ژن *OPN* در دو موقعیت ۸۵۱۴ و ناحیه غیر قابل ترجمه ۳' با بیماری ورم پستان بررسی و مشخص شد که ژنوتیپ‌های هتروزیگوت موجب افزایش میزان SCS می‌شوند (Nani et al. 2015). مطالعات نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین ژن *OPN* و SCC در گاوهای نژاد جرسی وجود دارد به طوری که افراد با ژنوتیپ TT دارای بالاترین میزان SCC بودند. همچنین این مطالعه نشان داد که آنالیز ترکیبی ژنوتیپ‌های ژن *OPN* و *FAM13A* بر صفت SCC معنی‌دار می‌باشد.

فعالیت یک‌سری میانجی‌گرهای تحریکی، تجمع نوتروفیل‌ها در غده پستانی افزایش می‌یابد. نوتروفیل‌ها که وظیفه حذف نهایی پاتوژن‌ها را برعهده دارند با افزایش تعداد سلول‌های بدنی شیر مرتبط هستند (Weber et al. 2002). هم‌چنین نقش اساسی ژن *PPARGCIA* در متابولیسم گلوکز، چربی و انرژی است و این ژن پروسه‌های متابولیسمی را در طول دوره شیردهی در گاوهای شیری تنظیم می‌نماید (Weikard et al. 2005). بنابراین، با توجه به نقش فیزیولوژیک ژن‌های *OPN* و *PPARGCIA*، ارتباط این ژن‌ها با *SCS* منطقی می‌باشد.

به دلیل افزایش نگرانی‌ها در مورد سلامت شیر و وجود آنتی‌بیوتیک در آن، جلوگیری و کنترل ورم پستان از طریق بهبود مکانیسم‌های دفاعی طبیعی، نه تنها برای تولید کنندگان شیر بلکه برای مصرف کنندگان نیز مهم است. یکی از راهکارها در این خصوص، انتخاب ژنتیکی برای افزایش سهم صفات مرتبط با سلامت در برنامه‌های به‌نژادی است. سیستم ایمنی ذاتی دارای تعدادی مکانیسم‌های ایمنی محافظت شده در مقابل عوامل محیطی می‌باشد. این سیستم ایمنی توسط خانواده‌های ژنی خاص کنترل می‌شوند. با شناسایی این ژن‌ها و انتخاب حیواناتی که حامل آلل‌های مطلوب برای مقاومت به عفونت هستند، می‌توان فراوانی آن آلل‌ها را در نسل بعد افزایش داد. از این رو یک راهکار برای افزایش مقاومت به ورم پستان، انتخاب گاوهایی است که *SCC* کمتری دارند و در ضمن از تولید مناسبی برخوردار هستند. تشخیص اثر مفید آلل‌های ژن‌های *OPN* و *PPARGCIA* بر *SCC*، امکان استفاده از این ژن را در برنامه‌های اصلاحی مقاومت به عفونت میسر خواهد کرد.

که ارتباط معنی‌دار بین چند شکلی‌های ژن (*PPARGCIA* 1892) و صفت *SCS* در گاو هلشتاین وجود ندارد.

در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌دار ژنوتیپ‌های *PPARGCIA* (3359) و صفت *SCC* مشاهده شد. اما در این زمینه نتایج متفاوتی گزارش شده است. (Komisarek et al. 2009). نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین این جایگاه ژنی و صفت *SCS* در گاوهای نر هلشتاین کشور لهستان وجود ندارد. علاوه بر این پژوهشگران نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی سه SNP مختلف ژن *PPARGCIA* و صفت *SCC* در جمعیت گاوهای *Simmental* ایتالیا وجود ندارد (Chessa et al. 2015). دلایل اختلاف در نتایج این پژوهش با مطالعات دیگر را می‌توان در چند مورد بیان کرد: ۱- متفاوت بودن فراوانی‌های آللی محاسبه شده در جمعیت‌های مورد مطالعه که در نهایت منجر به تغییر فراوانی ژنوتیپ‌ها می‌شود. ۲- ساختار ژنتیکی و نژادهای متفاوت جمعیت‌های مورد مطالعه ۳- تفاوت در نوع مدل‌های برازش یافته و ۴- شرایط نگهداری و مدیریتی دام‌ها می‌تواند در میزان *SCC* رکوردبرداری شده و در نهایت تفاوت میانگین ژنوتیپ‌ها موثر باشد (Berry et al. 2010).

اساساً غده پستانی یک محیط استریل می‌باشد، بنابراین ورود هر میکروب خارجی به داخل پستان باعث تحریک پاسخ ایمنی می‌شود. سلول‌های ایمنی ذاتی در غدد پستان شامل ماکروفاژها، گرانولوسیت‌ها، سلول‌های کشنده نوتروفیل و سلول‌های اپیتلیال پستانی می‌باشند. مشخص شده است که در طول عفونت باکتریایی، بیان ژن *OPN* در سطح رونویسی افزایش یافته و پروتئین آن باعث فعال‌سازی ماکروفاژها می‌شود. در این هنگام با

#### منابع

Alain K, Karrow NA, Thibault C, St-Pierre J, Lessard M, Bissonnette N (2009) Osteopontin: an early innate immune marker of *Escherichia coli* mastitis harbors genetic polymorphisms with possible links with resistance to mastitis. *BMC Genomics* 10: 444.  
Anderson KL, Correa MT, Allen A, Rodriguez RR (2010) Fresh cow mastitis monitoring on day 3 postpartum and its relationship to subsequent milk production. *Journal of Dairy Science* 93: 5673-5683.  
cattle.

Berry DP, Howard D, Boyle PO, Water S, Kearney JF, McCabe M (2010) Associations between the K232A polymorphism in the diacylglycerol-Otransferase 1 (DGAT1) gene and performance in Irish Holstein-Friesian dairy cattle. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 49: 1-9.

Chessa S, Nicolazzi EL, Nicoloso L, Negrini R, Marino R, Vicario D, Marsan PA, Valentini A, Stefanon B (2015) Analysis of candidate SNPs affecting milk and functional traits in the dual-purpose Italian *Simmental* cattle. *Livestock Science* 173: 1-8.



- Dudemaine PL, Thibault C, Alain K, Bissonnette N (2014) Genetic variations in the *SPP1* promoter affect gene expression and the level of osteopontin secretion into bovine milk. *Animal Genetics* 45: 629-640.
- Khatib H, Zaitoun I, Wiebelhaus-Finger J, Chang YM and Rosa GJM (2007) The association of bovine *PPARGC1A* and *OPN* genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. *Journal of Dairy Science* 90: 2966-2970.
- Klungland H, Ayman S, Bjorg H, Olsen HG, Gomez-Raya L, Vage DI, Olsaker I, Odegard J, Klemetsdal G, Schulman N, Vilkki J, Ruane J, Aasland M, Ronningen K, Lien S (2001) Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. *Mammalian Genome* 12: 837-842.
- Knott SA, Elsen JM, Haley CS (1996) Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 71-80.
- Komisarek J, Dorynek Z (2009) Effect of *ABCG2*, *PPARGC1A*, *OLR1* and *SCD1* gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics* 50: 125-132.
- Kowalewska-Luczak I, Kulig H (2013) Polymorphism of the *FAM13A*, *ABCG2*, *OPN*, *LAP3*, *HCAP-G*, *PPARGC1A* genes and somatic cell count of Jersey cows. *Research in Veterinary Science* 94: 252-255.
- Kowalewska-Luczak I, Kulig H, Kmiec M (2010) Associations between the bovine *PPARGC1A* gene and milk production traits. *Czech Journal of Animal Science* 55: 195-199.
- Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollot C (2007) Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine* 38: 12-21.
- Leonard S, Khatib H, Schutzkus V, Chang YM, Maltecca C (2005) Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 88: 4083-4086.
- Liang H, Ward W (2006) *PGC-1 $\alpha$* : a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education* 30: 145-151.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215-1220.
- Mohammadi A, Nassiry MR, Mosafer J, Mohammadabadi MR, Sulimova GE (2009) Distribution of *BoLA-DRB3* allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian Journal of Genetics* 45: 198-202.
- Nadesalingam J, Plante Y, Gibson JP (2001) Detection of QTL for milk production on chromosomes 1 and 6 of Holstein cattle. *Mammalian Genome* 12: 27-31.
- Nani JP, Raschia MA, Carignano H, Poli MA, Calvinho LF, Amadio AF (2015) Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and their relation with somatic cell scores in Argentinean dairy. *Journal of Applied Genetics*. DOI 10.1007/s13353-015-0278-5
- Olsen HG, Lien S, Gautier M, Nilsen H, Roseth A, Berg PR, Sundsaasen KK, Svendsen M, Meuwissen TH (2005) Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6. *Genetics* 169: 275-283.
- Pareek CS, Czarnik U, Pierzchala M, Zwierzchowski L (2008) An association between the C>T single nucleotide polymorphism within intron IV of osteopontin encoding gene (*SPP1*) and body weight of growing Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports* 26: 251-257.
- Pasandideh M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Tarang A (2015) Association of bovine *PPARGC1A* and *OPN* genes with milk production and composition in Holstein cattle. *Czech Journal of Animal Science* 60: 97-104.
- Rodriguez Z, Gianola SLD, Shook GE (2000) Evaluation of models for somatic cell score lactation patterns in Holsteins. *Livestock Production Science* 67: 19-30.
- Ron M, Kliger D, Feldmesser E, Seroussi E, Ezra E, Weller JI (2001) Multiple quantitative trait locus analysis of bovine chromosome 6 in the Israeli Holstein population by daughter design. *Genetics* 159: 727-735.
- Ruzina MN, Shtyfurko TA, Mohammadabadi MR, Gendzhieva OB, Tsedev T, Sulimova GE (2010) Polymorphism of the *BoLA-DRB3* gene in the Mongolian, Kalmyk, and Yakut cattle breeds. *Russian Journal of Genetics* 46: 456-463.
- Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F (2003) Production effects related to mastitis cell counts. *Veterinary Research* 34: 579-596
- Verbeke J, Poucke MV, Peelman L, Piepers S, Vliegheer SD (2014) Associations between *CXCR1* polymorphisms and pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis, test-day somatic cell count, and test-day milk yield. *Journal of Dairy Science* 97: 7927-39.
- Weber GF, Zawaideh S, Hikita S, Kumar VA, Cantor H, Ashkar S (2002) Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *Journal of Leukocyte Biology* 72: 752-761.
- Weikard R, Kuhn C, Goldammer T, Freyer G, Schwerin M (2005) The bovine *PPARGC1A* gene: Molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiological Genomics* 21: 1-13.
- Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999) Pop Gene version 1.31, Microsoft windows-based free ware for population genetic analysis, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.

## Association of the *OPN* and *PPARGCIA* Alleles with Milk Somatic Cell Count in Iranian Holstein cattle

Pasandideh M<sup>1\*</sup>, Kharrati Koopae H<sup>2</sup>, Mohammad Abadi MR<sup>3</sup>, Esmailzadeh Koshkoieh A<sup>3</sup>

1. PhD Candidate of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Animal Science and Fishery, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran.

2. PhD Candidate of Biotechnology, Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran.

3. Associate Professor, Professor, Department of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

\* Corresponding Author, Email: Majidpasandideh@gmail.com

### ABSTRACT

Somatic cells are one of the milk components produced as a result of natural regeneration of the glandular tissue of mammary gland. The count of these cells in milk reflects the health state of cows; hence their level is an important indicator for improvement of livestock. In this study association between genotypes of genes located on BTA6 (*OPN*, *PPARGCIA*) and somatic cell count (SCC) in milk was investigated. Therefore, DNA was isolated from blood samples collected from 398 Holstein cows of Tehran and Esfahan provinces by salting out method. PCR-RFLP method was used for genotyping SNPs in genes. Linear models analysis with fixed effects of genotypes indicated significant associations between c.3359 genotypes of *PPARGCIA* gene and c.8514 genotypes of *OPN* gene with SCC ( $P < 0.05$ ). So that, the highest mean of SCC was for AC and CC genotypes in *PPARGCIA*(3359) and *OPN*(8514) loci, respectively. Although more studies are needed to confirm the present results, but these genomic regions can be used as genetic markers to improve bovine mastitis in dairy cows.

### Key Words

Holstein cattle, Mastitis, *OPN*, *PPARGCIA*, Somatic cell count