تاثیر تنوع ژنتیکی ژن دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز ۱(K232A DGAT1) بر امتیاز سلول‌های بدنی و عملکرد تولید شیر

ملیحه پیرزاد[۱]، سعید انصاری مهیاری[۲]، محمد علی ادریس[۳] . بهاره اعتصام[٤].

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان۲- استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان ۳-استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. ٤- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، دانشگاه صنعتی اصفهان.

*نویسنده مسول : ملیحه پیرزاد (nahavand14@yahoo.com)

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی ارتباط بین چند شکلی K232A DGAT1 با امتیاز سلول‌های بدنی و عملکرد تولید شیر در گاو-های هلشتاین انجام گرفت. ژن DGAT1 درانتهای سانترومریک کروموزم ١٤ گاوی وجود دارد که آنزیم آسیل کوآ: آسیل ترانسفراز۱ را کد می‌کند. این آنزیم درآخرین مرحله ساخت تری گلیسرید شیر در غده پستانی نقش دارد و در این رابطه یک آنزیم کلیدی است. چند شکلی K232A باعث ایجاد تنوع در میزان چربی شیر می‌گردد. چند شکلی مورد نظر از جایگزین شدن دو نوکلئوتید AA بجای GC در اگزون ۸ ژن DGAT1 ایجاد می‌شود. بنابراین باعث تغییر اسید آمینه آلانین به لایزین در محصول پروتئینی ژن می‌شود. جمعیت مورد مطالعه، شامل ٤٠٨ گاو هلشتاین، با تکنیک RFLP-PCR ژنوتایپ شدند که هر سه ژنوتیپ در جمعیت مشاهده شد. فراوانی آلل K و آلل A به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/٦۳ بود. اثرمتوسط جایگزینی آللی در حالت جایگزین شدن آلل K به جای آلل A در این مطالعه برای تولید شیر، چربی، پروتئین وSCS به ترتیب ۱۱۵/٥٦- ، ۰/۱۹۷۸، ۰/۰٤٥۲ و ۰/۰۸٤۸- برآورد شد که با بسیاری از نتایج مطالعات قبلی هم جهت است. این نتایج نشان می‌دهند که آلل K در افزایش چربی شیر و آلل A در افزایش تولید شیر اثر دارد. درنتیجه فراوانی پایین‌تر آلل K نسبت به آلل A در این پژوهش احتمالا ناشی از روند انتخاب گاوها برای تولید شیر در سال‌های اخیر باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که چند شکلی جایگاه K232A ژن DGAT1 می‌تواند بیانگر پیوستگی با QTL شناسایی شده بر صفت درصد چربی شیر روی کروموزم ١٤ باشد.

کلمات کلیدی: ژن DGAT1، چند شکلی K232A، امتیاز سلول‌های بدنی، اثر جایگزینی آللی، گاوهای هلشتاین

مقدمه

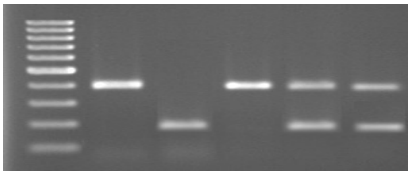
.ژن DGAT1[٦٤]، کد کننده آنزیم دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز ۱است که درآخرین مرحله ساخت تری گلیسرید در غدد پستان نقش کلیدی دارد. در کل، مطالعات کمی در رابطه با ارتباط این چند شکلی صفت امتیاز سلول‌های بدنی شیر(SCS[٦٥]) انجام شده است. با توجه به تاثیر منفی SCS بر تولید و کیفیت شیر(۳) از اهداف این تحقیق علاوه بر مطالعه ارتباط این چند شکلی با عملکرد صفات تولیدی، همچنین مطا لعه ارتباط این چند شکلی با میزان SCS شیر نیز در نظر گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش به منظور استخراج DNA و بررسی چندشکلی ژن DGAT1، ٤٠٨ نمونه خون از پنج گله دراستان اصفهان به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. استخراج DNA ژنومی از گلبول‌های سفید به روش استخراج نمکی میلر انجام گرفت. تکثیر قطعه‌ای به طول ٤١١ جفت باز در بر گیرنده چند شکلی K232A ژن DGAT1 با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[٦٦](PCR) انجام

[64] Diacylglycerol acyle transferase 1
[65] Somatic cell score
[66] Polymerase Chain Reaction

گرفت. دمای اتصال در این واکنش ٦٠درجه سانتی گراد بود. توالی آغازگرهای مورداستفاده به صورت آغازگررفت: '۵-GCACCATCCTCTTCCTCAAG-3' وآغاز گربرگشت: '۵-GGAAGCGCTTTCGGATG-3' می‌باشد. از روش چند شکلی طول قطعات محدود شده[67](RFLP)، باآنزیم برشی Cfr1، ژنوتیپ نمونه‌ها تعیین شد. آنزیم برشی، قطعه‌ی ٤١١ جفت بازی را به دو قطعه‌ی ۲۰۳ و ۲۰۸ جفت باز ی برش می‌دهد. قطعه PCR برش نیافته، نشان دهنده آلل لایزین(آللK) و دو قطعه‌ی حاصل از هضم نشان دهنده آلل آلانین(اللA) بود(شکل ۱).



شکل۱-انواع ژنوتیپ های حاصل از هضم آنزیمی: ستون ۱ از سمت چپ نشانگر DNA، ستون ۲ و٤ژنوتیپ KK، ستون ۳ ژنوتیپAA و ستون۵ و٦ ژنوتیپ KA .

ابتدا به منظور برآورد اثرات افزایشی و اثرات غالبیت برای صفات مورد مطالعه در شکم اول از مدل آماری زیر از نرم افزار SAS و رویه رگرسیون استفاده شد.

$$\mathbf{y = Xb + e}$$

اجزا در این مدل عبارتند از y : رکورد تولید شیر تصحیح شده (بر اساس ۳ بار دوشش در روز و همچنین دوره شیردهی ۳۰۵ روز)، میانگین تولید روزانه درصد چربی یا پروتئین شیر، امتیاز سلول‌های بدنی شیر و یا ارزش اصلاحی تولید شیر و تولید چربی. X. : ماتریس ضرایبی اثر افزایشی (صفر برای AA، ۱ برای KA و ۲ برای KK) و اثر غالبیت (۱ برای KA و صفر برای KK و AA). b : مقدار برآوردی برای اثرات افزایشی و اثرات غالبیت. e : اثر تصادفی باقی مانده در مشاهدات.بعد از برآورد اثرات افزایشی (a) و غالبیت (d) اثر متوسط جایگزینی آللی K به جای A برای صفات مورد نظر از رابطه $\alpha = a + d(q - p)$ محاسبه شد. (اجزا این روابط عبارتند از a : ارزش ژنوتیپی KK ، d : ارزش ژنوتیپی KA، p : فراوانی آلل K ، q : فراوانی الل A).

نتایج

هرسه نوع ژنوتیپ AA , KA و KK برای چند شکلی مورد نظر در جمعیت مشاهده شد که فراوانی آنها به ترتیب ۰/۳۵۷۸ ، ۰/۵۵۱۵ و ۰/۰۹۰۷ فراوانی آلل K ۰/۳۷ و آلل A ۰/٦۳ می‌باشد.

اثرات افزایشی و غالبیت

در مطالعه حاضر اثر افزایشی ژنوتیپ KK در رابطه با تولید شیر ، درصد چربی شیر، در سطح احتمال ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) معنی دار بود. ژنوتیپ KK در رابطه با صفت تولید شیر اثر افزایشی منفی و برای صفات درصد چربی شیر اثر افزایشی مثبت داشت(جدول ۱). بنابراین از مطالعه حاضر می‌توان این طور نتیجه گرفت که افرادی با ژنوتیپ KK باعث کاهش تولید شیر و باعث افزایش تولید چربی و درصد چربی شیر می‌شوند. اثر غالبیت برای تمام صفات از نظر آماری معنی‌دار نشد(جدول ۱) که می‌توان این طور تفسیر کرد که از نظر آماری تغییر معنی داری به واسطه اثر غالبیت در فنوتیپ‌ها ایجاد نمی‌شود.

جدول (۱) برآورد اثر افزایشی ژنوتیپ KK و اثر غالبیت ژنوتیپ KA در صفات مورد مطالعه در شکم اول

صفات	برآورد اثر افزایشی (اشتباه معیار)	برآورد اثر غالبیت (اشتباه معیار)

[67] Restriction Fragment Length Polymorphism

تولید شیر تصحیح شده(Kg	(□۱۲۸/۸۶) -۲۸۶/٤٤ *	(□□□۱۵۹) -۲۵۸/۷۵ ns
(		
درصد چربی	(□□۰/۰٤) ۰/۱٤۰□ *	(□□□۰/۰۵) -۰/۰۰۳ ns
درصد پروتئین	(□□□۰/۰۷۱) ۰/۰۲۳۷□ ns	(□۰/۰۲) ۰/۰۲٦ ns
امتیاز سلول‌های بدنی	(□□□۰/۰۸) -۰/۱۰۷□ ns	□□□۰/۰۱□ ۰/۰۲۷ ns

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد(p<۰/۰۵)

اثرات ns : عدم معنی داری(p>۰/۰۵)

در مطالعه انجام شده، اثر جایگزین شدن آلل K به جای آلل A (α) برای تولید شیر و امتیاز سلول‌های بدنی منفی و برای سایر صفات مثبت بود (جدول ۲). بنابراین این طور می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به رابطه عکسی که بین تولید چربی و تولید شیر وجود دارد، آلل K با افزایش تولید چربی و در نتیجه کاهش تولید شیر و آلل A با کاهش تولید چربی و افزایش تولید شیر همراه است.

جدول (۲) برآورد اثر متوسط جایگزینی آللی آلل K به جای آلل A در صفات مورد مطالعه در شکم اول

صفات	α_1
تولیدشیر تصحیح شده (Kg)	-۱۱۵/۵٦
درصد چربی شیر	۰/۱۹۷۸
درصد پروتئین شیر	۰/۰٤۵۲
امتیاز سلول‌های بدنی	-۰/۰۸٤۸

تحقیقات بسیاری اثر متوسط جایگزینی آللی را مشابه مطالعه حاضر بررسی کرده‌اند، هرچند که میزان این اثر در نژادها و جمعیت‌های خاص هر کشورمتفاوت گزارش شده‌است، زیرا این اثر به فراوانی ژنی و میانگین هر جمعیت بستگی دارد، ولی جهت و

جدول (۳) اثر متوسط جایگزینی آللی در سایر پژوهش‌ها در صفات مورد بررسی در شکم اول

منبع	نژاد	اثر جایگزینی آللی آلل K به جای آلل A (α)			
		امتیاز سلول-های بدنی شیر	درصد چربی	درصد پروتئین	تولید شیر (کیلوگرم)	تولید چربی (کیلوگرم)

کاپ و همکاران [۲]	هلشتاین آلمانی	۰/۰۶^{ns}	۰/۵۸	۰/۱٤	-۵۷٦	۸/۳
وینیکیوس و همکاران [٤]	هلشتاین آمریکای شمالی	-۰/۰٤٦**	۰/۱۲٦	۰/۰۲٤	-۱٦۲/۲	۷/٤
بری و همکاران [۱]	هلشتاین فریزین ایرلندی	۰/۰۰۰۸^{ns}	۲/٦	۰/۵٦	-۱۵٤/۱٦	۸/٤٤
پژوهش حاضر	هلشتاین ایرانی	-۰/۰۸٤۸	۰/۱۹۷	۰/۰٤۵	-۱۰۲/۹۷	۳/۹۳

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد (p>۰/۰۱)

ns : عدم معنی داری

اثر جایگزینی آللی برای امتیاز سلول‌های بدنی در تحقیق‌های مختلف انجام شده، نتایج متفاوتی نشان می‌دهد که نتیجه تحقیق حاضراز این نظر بیشتر مشابه و هم جهت با نتیجه ونیکیوس و همکاران [٤] است.

منابع

[1]Berry, D.P., D. Howard, P. O'Boyle, S. Waters, J.F. Kearney and M. McCabe .2010. Associations between the K232A polymorphism in the diacylglycerol-O-transferase 1 (DGAT1) gene and performance in Irish Holstein-Friesian dairy cattle. Irish J. Agr. Food Res. 49: 1–9.

[2]Kaupe, B., A.Winter, R. Fries, G. Erhardt. 2004. DGAT1 polymorphism in Bos indicus and Bos taurus cattle breeds. J.Dairy Res. 71: 182-187.

[3]Morek-Kopeć, M., A. Żarnecki,W. Jagusiak. 2009. Associations between somatic cell score of milkv and fertility traits in Polish Holstein-Friesian cows. Animal Science Papers and Reports. 27: 15-22.

[4]Vinicius, M., T. Sonstegard, R. Thallman, E. Connor, R. Schnabel, C. Van Tassell. 2010. Characterization of DGAT1 allelic effects in a sample of North American Holstein cattle. Anim. Biotech. 21: 88–99.

Influence of the bovine acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1(DGAT1)K232A genetic variation on somatic cell score and milk performance

malihe pirzad[1]. Saeid Ansari Mahyari[2]. Mohammad-Ali Edriss[3] . Bahare etesam[4].
1- M. Sc of genetic and animal breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technolgy.

2 - Assistant Professor College of Agriculture, Isfahan University of Technolgy . 3-Professor, College of Agriculture, Isfahan University of Technolgy. 4- M. Sc of animal physiologiy, Isfahan University of Technolgy

* Corresponding E-mail address : nahavand14@yahoo.com

Abstract:

The study aimed at estimating the association between of the DGAT1 K232A whit somatic cell score (SCS)and milk performance Holstein cattle.The gene diacylglycerol-O-transferase1 (DGAT1)is mapped to the centromeric end of The bovin BTA14 and encodes the acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1enzyme which catalyses the final step in triglyceride synthesis . K232A polymorphism proved to significantly affect the percent fat content in milk. Genotyping population, was performed using RFLP-PCR technique. A 411 bp fragment including was amplified and digested with the enzyme CfrI to determine the genotypes of 408 Holstein cows. Three types genotype KK, KA and AA were detected. Frequency of K and A allels were estimated 0.37 and 0.63, respectively. The statistical analyses showed positive and significant effects of the genotype for milk production and fat percent traits in first lactations but haven't significant effect for scs. Estimated average effects of substituting the lysine allele for the alanine variant on record milk production, fat percent, protein percent and somatic cell score of milk -155.56, -1.5, 0.1978, 0.0452 and -0.0848 respectively. These results can be showed that allele K is effect on increase fat of milk and decrease milk production. Also allele A is effect on increase milk production and decrease fat milk. The relatively lower frequency of the K allele than the A allele may be due to selection for milk yield in recent years. Results showed that the DGAT1 K232A polymorphism can be a source that underlies the reported quantitative trait loci for fat content trait in the proximal region of bovine chromosome 14.

Keywords: DGAT1 gene, K232A polymorphism, RFLP-PCR, somatic cell score, Holstein Cattle.