مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تاثیر تغییرات تک نوکلئوتیدی در ژن‌های کاپاکازئین، استئوپونتین و*PPARGC1α* روی صفات تولید شیر و کیفیت تولید پنیر نژاد براون سوئیس

سونیا زکی زاده*[1]، میرجلال هاشمی[2]، هادی غلامی[2]، محسن قدس روحانی[3]، رضا وکیلی[4]

[1 و 3] استادیاران گروه علوم دامی و صنایع غذایی موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی

[2، 4] فارغ التحصیلان کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کاشمر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۲۳

چکیده

شیر از دیرباز به عنوان غذای کامل و تامین کننده بخشی از نیازهای تغذیه‌ای روزانه انسان مورد توجه بوده است. یکی از ترکیبات مهم شیر پروتئین‌ها می‌باشند که در صنایع فرآوری شیر و تکنولوژی تولید محصولات شیری مانند پنیرسازی، فاکتور مهمی بشمار می‌آیند. عوامل متعددی از جمله ژنتیک می‌توانند بر مقدار و ترکیبات شیر و نهایتا کمیت و کیفیت پنیر تاثیر گذارند. در این راستا، از طریق تکنیک‌های ژنتیک مولکولی نواحی متعددی روی ژنوم گاو از جمله کروموزوم ٦ شناسایی شده است. در این پژوهش تاثیر ۳ ژن کاپاکازئین، اوستئوپونتین و *PPARGC1α* از کروموزوم فوق روی صفات تولیدی شیر و راندمان تولید پنیر بررسی شد. استخراج DNA به روش استخراج نمکی از نمونه خون ۱۰۰ راس گاو براون سوئیس انجام شد. ژنوتیپ‌ها به روش PCR-RFLP و با استفاده از آنزیم‌های *HinfI*، *BsurI*،*NheI* و *BsrI* تعیین شدند. ارزش‌های اصلاحی با نرم افزارِ DFREML برآورد و چهار فاکتور راندمان، درصد چربی و پروتئین و ماده خشک پنیر اندازه‌گیری شدند. همچنین، ارتباط چندشکلی‌ها با ارزش اصلاحی صفات و کیفیت محصول پنیر در سطح معنی‌داری ۵٪ با رویه GLM بررسی گردید. فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی محاسبه شد و نتایج نشان داد که بجز کاپاکازئین بقیه جایگاه‌ها در حالت تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشتند. در این تحقیق ژنوتیپ روی محصول پنیر اثر معنی‌دار نداشت اما تاثیر همزمان ژنوتیپ *PPARGC1α -T19C* و کاپاکازئین روی ارزش‌های اصلاحی تولید شیر معنی‌دار بود. ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی با صفات تولید شیر، راهکار مناسبی جهت بهبود ارزیابی‌های گاو شیری است. استفاده از روش‌های شناسایی تک نوکلئوتیدهای متراکم در پژوهش‌های تکمیلی، توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: صفات تولیدی شیر، راندمان تولید پنیر، کاپاکازئین، اوستئوپونتین، *PPARGC1α*.

*نویسنده مسئول: سونیا زکی زاده تلفن: ۰۵۱۱۳۸۷۱۷۰۷۱ Email: Sonia_zaki@yahoo.com

مقدمه

امروزه اهمیت وجود شیر و فراورده های آن در سبد غذایی خانوارها بر کسی پوشیده نیست. در نژادهای مختلف، ترکیبات اصلی شیر متفاوت است. بدون شک تمام پدیده‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی که ترکیب خون را تحت تاثیر قرار می‌دهند، بر ترکیب شیر نیز موثرند. پروتئین‌ها از ترکیبات مهم شیر هستند که در صنایع فرآوری شیر و تکنولوژی تولید محصولات شیری از جمله پنیرسازی اهمیت به سزایی دارند. پروتئین اصلی شیر کازئین نام دارد که در فرآیند تولید پنیر نقش اساسی دارد. کازئین حدود ۸۰٪ از پروتئین‌های شیر را به خود اختصاص داده و دارای اشکال متفاوتی است. گزارش‌های متعددی راجع به تاثیر مشخص تفاوت‌های ژنتیکی پروتئین‌های شیر بر پایداری حرارتی، ویژگی‌های انعقادی و غلظت و توزیع ترکیبات شیر وجود دارد (Kűbarsep *et al.*, 2005; Wdholm *et al.*, 2006; Buchberger and Dovc, 2000; Bonfatti *et al.*, 2010). تاکنون نواحی متعددی روی ژنوم گاو شناسایی شده‌اند که روی مقدار و ترکیبات شیر موثرند. از این میان می‌توان به ژن‌هایی روی کروموزوم ٦ اشاره نمود. کروموزوم ٦ دارای ۱۱ میلیون جفت باز است که ژن‌های مربوط به پروتئین شیر در ناحیه غیرقابل ترجمه ۳ کروموزوم قرار دارند. مهمترین ژنی که در این خوشه روی مقدار و درصد پروتئین شیر تاثیر می‌گذارد، ژن کاپاکازئین است. پروتئین کاپاکازئین با ۱۷۹ اسیدآمینه از مهم‌ترین پروتئین‌های شیر می‌باشد که توسط سلول‌های اپی تلیال غدد پستانی سنتز شده و نقش عمده‌ای در فرآیندهای انعقاد شیر و پنیرسازی دارد. در بررسی کل ژنوم گاو بیان شده است که نقاط عمده‌ای از کروموزوم‌های ٥، ٦، ۱۱ و ١٤ با صفت درصد پروتئین شیر در ارتباط هستند که در این رابطه کروموزوم ٦ به طور معنی‌داری با هر ٦ نوع پروتئین مهم شیر (کازئین-ها و پروتئین‌های آب پنیر) مرتبط است (Schopen *et al.*, 2011). ژن کاپاکازئین در منطقه ۳´ مجموعه کازئین و در فاصله‌ی ٥/٦ سانتی مورگان از کازئین αS1 قرار گرفته و با طول ۱۳ کیلوباز، دارای ٥ اگزون و ٤ اینترون است. تاثیر معنی‌دار چندشکلی‌های این ژن روی تولید شیر، مقدار و درصد پروتئین و مقدار و درصد چربی گزارش شده است (Tsiaras *et al.*, 2005؛ Schopen *et al.*, 2011).

از طرف دیگر، ژن *PPARGC1A* نیز روی کروموزوم ٦ قرار گرفته و نقش کلیدی در فعال-سازی گیرنده‌های هورمونی هسته‌ای و رونویسی فاکتورهای تنظیم کننده هموستازی انرژی دارد (Weikard *et al.*, 2004). این ژن در تعادل محیط داخلی بدن، متابولیسم اکسیداتیو و سوخت و ساز چربی و گلوکز تاثیر گذار است و در اندام-های فعال متابولیکی به میزان زیادی بیان می‌شود (Pasandide *et al.*, 2010, a, b; Komisarek *et al.*, 2009). از تعداد ۱۱ چندشکلی که تاکنون برای این ژن شناسایی شده است، مشخص شده که جهش نقطه‌ای T/C در موقعیت ۱۸۹۲ اینترون

٩ تاثیر معنی‌دار روی شیر و ترکیبات آن در نژادهای مختلف گاو دارد (Weikard *et al*, 2004; Komisarek and Dorynek, 2009; Pasandideh *et al*., 2011).

اوستئوپونتین (OPN) که قبلا به نام‌های سیالوپروتئین استخوانی[1]، فسفوپروتئین ترشحی-١[2] و فعال کننده-١ سلول‌های T[3] نامیده می‌شد، گلیکوپروتئینی اسیدی و فاکتور مهمی در تغییر حالت استخوان و محکم شدن استئوکلاست، چسبیدگی سلولی، تنظیم شیمیایی بدن، حفظ سلول‌ها، تغییر حالت بافت‌ها، تنظیم التهاب، تولیدمثل (Kilian *et al*., 2010)، لقاح و باروری (Khatib *et al*.,2009) و رشد و نمو جنین است (Leonard *et al*.,2009). بیان این ژن در غدد پستانی از هنگام زایمان شروع می‌شود و در تمام طول شیردهی افزایش پیدا می‌کند (Cohen-Zinder *et al*., 2005). ژن اوستئوپونتین روی کروموزوم ٦ واقع بوده و با دارا بودن حدود ٧٠٠٠ جفت باز و ٦ اگزون، پروتئینی با ٢٧٨ اسیدآمینه را کد می‌کند (شماره شناسایی NW_255516). مشخص شده است که چندشکلی تک نوکلئوتیدی درناحیه اینترون ٤ و موقعیت باز ٨٥١٤ روی تولید شیر و شمارش سلول‌های بدنی شیر تاثیر دارد (Leonard *et al*.,2009؛ Nasiri *et al*., 2010a؛ Schnabel *et al*., 2005). طبق پژوهش‌های انجام شده آلل C بیشتر روی ترکیبات، پروتئین وچربی شیر وآلل T غالباً روی رشد بدن تأثیرگذار است (Khatib *et al*., 2007; Pasandideh *et al*, 2011; Leonard *et al*.,2009).

ژن‌های کاپاکازئین، *PPARGC1A* و استئوپونتین (OPN) از جمله ژن‌های کاندیدا برای صفات مربوط به ترکیبات شیر هستند و به دلیل موقعیت قرارگیری آنها روی کروموزوم ٦ گاو (شکل ١) و تاثیری که از آنها روی صفات تولیدی و ترکیب شیر گزارش شده است، هدف از این پژوهش مطالعه تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی در جایگاه‌های اگزون ٤ کاپاکازئین، اینترون ٩ و ناحیه ٣′ ژن *PPARGC1A* و اینترون ٤ ژن OPN و بررسی تاثیر همزمان هاپلوتیپ‌های این ٣ ژن روی مقدار و ترکیبات شیر و همین طور کیفیت و راندمان تولید پنیر، درصد پروتئین، چربی و ماده خشک پنیر به دست آمده از شیر گاوهای نژاد براون سوئیس است.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه و خونگیری

در این آزمایش به صورت تصادفی از تعداد ١٠٠ راس گاو شیری نژاد براون سوئیس مجتمع آموزش جهادکشاورزی خراسان رضوی که دارای ثبت مشخصات و شجره، رکورد تولید، چربی و پروتئین شیر بودند، استفاده شد.

نمونه خون کامل ورید دمی، از هر گاو و با استفاده از ونوجکت‌های خلادار حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع آوری شد. نمونه‌ها روی یخ به آزمایشگاه منتقل و سپس در دمای ٢٠- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. استخراج DNA از ٣ میلی‌لیتر خون کامل و به روش

[1] bone sialoprotein I (BSP-1 or BNSP)
[2] secreted phosphoprotein 1 (SPP1)
[3] T-lymphocyte activation (ETA-1)

استخراج نمکی تغییر یافته (Javanrouh *et al.*, 2006) انجام گرفت. کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۱٪ تعیین شدند.

اجزای واکنش و شرایط PCR

اجزای واکنش برای تکثیر تمام ژن‌ها شامل ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA ژنومی، بافر 1XPCR، $Mgcl_2$ ۲/۵ میلی مولار، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۰/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز، ۵ پیکومول بر میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت و مابقی حجم تا ۲۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. تنها تفاوت این بود که برای کاپاکازئین از ۰/٦ واحد آنزیم Taqپلی مراز و برای *PPARGC1α* نیز از ۱ پیکومول بر میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت استفاده گردید.

شرایط دمایی در نظر گرفته شده و تعداد سیکل‌های تکثیر به تفکیک هر جایگاه در جدول ۱ آورده شده است. آغازگرهای مورد استفاده به صورت لیوفیلیزه (شرکت Generay Biotech، آلمان) تهیه و طبق دستور سازنده آماده شد. مشخصات پرایمرها، محل و طول قطعه تکثیری به همراه آنزیم برش دهنده هر جایگاه در جدول ۲ آورده شده است.

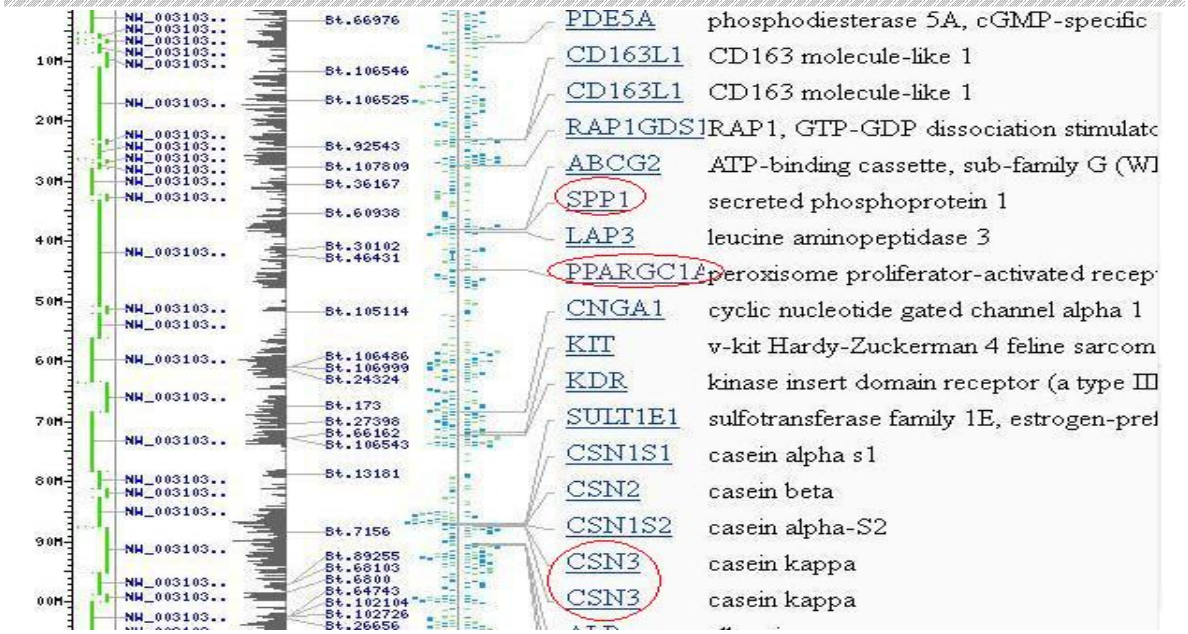
هضم آنزیمی با استفاده از روش RFLP

تمامی آنزیم‌های برشی مورد استفاده در این پژوهش ساخت شرکت Fermentas (آلمان) بودند. واکنش هضم آنزیمی طبق توصیه شرکت سازنده و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر مخصوص و ۰/٦ میکرولیتر آنزیم مربوطه و مابقی حجم آب دوبار تقطیر، انجام شد. فرآیند هضم برای تمامی آنزیم هادر دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در طول شب انجام شد. تنها هضم فرآورده PCR ژن OPN در دمای ٦۵ درجه سانتیگراد و به مدت ١٦ ساعت انجام شد.

تعیین ژنوتیپ، فراوانی آللی و ژنوتیپی

برای تعیین ژنوتیپ گاوها مقدار ٤ میکرولیتر از محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۳ درصد مدت ۵۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ الکتروفورز شد. پس از رنگ آمیزی ژل‌ها با رنگ اتیدیوم بروماید و مشاهده توسط دستگاه ژل داک، ژنوتیپ هر فرد به طور مستقیم از روی ژل تعیین شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار PopGen نسخه ۱/۳۱، فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی به ازاء هر جایگاه و به روش شمارش مستقیم محاسبه شدند. همچنین، با استفاده از نرم‌افزار مذکور جمعیت مورد مطالعه از نظر تعادل هاردی واینبرگ در سطح معنی‌داری ۹۵٪ بررسی شد.

.



شکل ١- موقعیت قرارگیری ژن‌های کاپاکازئین، OPN (یا SPP1) و PPARGC1A روی کروموزوم ٦ (منبع سایت ncbi).

Figure 1- The location of kappa casein, OPN (or SPP1) and PPARGC1A on chromosome 6 (reference: ncbi site).

جدول ١- شرایط واکنش به تفکیک هر جایگاه ژن.

Table 1- PCR conditions of each locus.

تعداد چرخه (از مرحله ٢ (٤ Cycle	بسط نهایی* Final extention	بسط Extention	اتصال آغازگر (به روش Touchdown* (Anealing	واسرشته سازی Denaturation	واسرشته سازی اولیه* Initial Denaturation	جایگاه Gene
35	72° 30 sec	72° 30 sec	60° 30 sec	94° 30sec	95° 10 min	کاپاکازئین CSN3
30	72° 5min	72° 40 sec	62° 30 sec	94° 30sec	95° 5 min	PPARGC1α – T19C
30	72° 5min	72° 40 sec	62° 30 sec	94° 30 sec	95° 5 min	PPARGC1 α - A968C
32	72° 7min	72° 45 sec	50-63°§	94° 45 sec	95° 5 min	اوستئوپونتین (OPN)

* این دو مرحله فقط یک بار انجام می‌شوند و جزء چرخه نیستند. § کاهش دمای اتصال آغازگر به میزان ٢ درجه سانتیگراد در هر چرخه بود.

جدول ۲- مشخصات پرایمرها، توالی آغازگرها، طول قطعه تکثیر شده و آنزیم برشی مورد استفاده برای هر جایگاه.

Table 2- Characters of the primers, length of amplification and desirable restriction enzymes.

نام جایگاه Locus	توالی آغازگرهای رفت و برگشت Forward and backward primers-	محل و طول قطعه تکثیر Region and length of product	آنزیم برشی Restriction Enzyme	شماره دستیابی Acc #
کاپاکازئین CSN3	F:5' ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG 3' R:5' GCCCATTTCGCCTTCTCTGTAACAGA 3'	Exon 4 350 bp	Hinf I	X14908
PPARGC 1α – T19C	F:5' CATAGCCGGCGGCCCAGGTAATGATGCACGTTGGC 3' R:5'TGGAGCCTTTCGTGCTGGTACTCCTCGTAGCTGTC 3'	Intron 9 250 bp	*Bsur I*	AY547554
PPARGC 1α - A968C	F:5'GCGAGCACGGTGTTACATTACTAAGGAGAGTTGGCTAG3' R:5'GAAAATCAGAAGTGTGATAGAC 3'	*UTR-3` 191 bp	*Nhe I*	AY321517
OPN	F5´- GCAAATCAGAAGTGTGATAGAC -3´ R5´- CCAAGCCAAACGTATGAGTT -3´	Intron 4 290 bp	*Bsr I*	NW_255516

* **Untranslated region**

پیش‌بینی ارزش‌های اصلاحی و ارتباط آنها با انواع ژنوتیپ در جایگاه‌های مورد بررسی

ارزش اصلاحی صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین شیر دوره اول شیردهی۱۰۲٤ گاو حاصل از ۵۵ پدر و ۲۲۰ مادر، با استفاده از مدل ۱ نرم افزار DFREML پیش‌بینی شد. مدل شامل اثرات ثابت سال–فصل زایش و متغیر کمکی تعداد روزهای شیرواری و اثرات تصادفی شامل اثر حیوان و باقیمانده بودند.

$Y = Xb + Za + e$ (مدل ۱)

Y: بردار صفات مشاهده شده؛ b: بردار عوامل اثرات ثابت (سال–فصل زایش، تعداد روزهای شیردهی)؛ X: ماتریسی که b را به Y ارتباط می-دهد؛ a: بردار ارزش اصلاحی برای اثرات ژنتیک افزایشی مستقیم؛ Z : ماتریسی که اثرات ژنتیکی افزایشی مستقیم را به Y ارتباط می‌دهد.

از ارزش‌های اصلاحی تعداد ۱۰۰ گاو گله که تعیین ژنوتیپ شده بودند، برای بررسی ارتباط بین ارزش اصلاحی صفات با چندشکلی در جایگاه‌های مورد مطالعه، استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SAS (2000) و با استفاده از روال مدل خطی تعمیم یافته[1] (GLM) و بر اساس مدل خطی زیر، در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد انجام شد. همواره ژنوتیپ کاپاکازئین به عنوان اثر ثابت جهت تصحیح تاثیر ژن عمده در مدل گذاشته شد و عامل دیگر لحاظ شده در مدل، ژنوتیپ در جایگاه *OPN* یا *PPARGC1A*

[1] Generalized Linear Model (GLM)

بود. در مورد *PPARGC1A* هاپلوتیپ دو جایگاه اینترون ۹ و 3`-UTR نیز بررسی شد.

$$Y_{ijk} = \mu + KCN_i + B_j + e_{ijk}$$

Y_{ijk}= ارزش اصلاحی برآورده شده برای صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین؛ μ= میانگین جامعه؛ KCN_i= اثر ثابت ژنوتیپ iام در جایگاه چندشکلی کاپاکازئین؛ Bj= اثر ثابت ژنوتیپ jام در یک جایگاه چندشکلی از ژن‌های اوستئوپونتین یا *PPARGC1A*.

برای بررسی هاپلوتیپ‌های ژن *PPARGC1A* و محاسبه مقدار عدم تعادل پیوستگی، از نرم افزار Haploview 4.04 (Barrett *et al*, 2005) استفاده شد.

کیفیت و راندمان تولید پنیر

جهت بررسی اثر چندشکلی هاپلوتیپ‌های شناسایی شده روی چهار فاکتور مهم پنیرسازی (راندمان تولید پنیر، ماده خشک پنیر، درصد چربی و درصد پروتئین پنیر) تعداد ۵ راس از گاوهایی که ژنوتیپ‌های مشاهده شده را پوشش می‌دادند، انتخاب و در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار و ۳ تکرار از شیر نمونه گرفته و پنیرسازی انجام شد. نحوه انتخاب این گاوها، پس از مشخص شدن ژنوتیپ‌ها و در بخش نتایج توضیح داده شده است.

پنیرسازی مشابه فرآیند متداول صنعت و در پایلوت تحقیقاتی شیر مجتمع آموزش جهاد کشاورزی خراسان رضوی انجام شد. با توجه به ظرفیت کارخانه، روزانه از تعداد ۳ نمونه شیر متعلق به ۳ گاو به مقدار وعده شیردوشی کامل (حدود ۷ کیلوگرم شیر)، جهت تولید پنیر استفاده شد که این روند به مدت ۵ روز کاری ادامه داشت. پس از تعیین ترکیبات شیر (پروتئین، چربی و مواد جامد)، جهت سالم سازی آن از روش پاستوریزاسیون ٦۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده گردید (Ghods Rohani, 2006). شیر پس از پاستوریزاسیون، تا دمای حدود ۳۵ درجه سانتی‌گراد سرد شد و مقدار ۱٪ استارتر مخلوط (ترموفیل و مزوفیل) به تیمارها افزوده شد. پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه و تولید اسید (زمان پیش رسی) pH به ٤/٦ رسید. سپس مایه پنیر به میزان ۰/۰۰۱ درصد لیتر و کلرید کلسیم به میزان ۰/۰۱ درصد لیتر به شیر اضافه گردید. شیر تلقیح شده در ظروف هفت کیلویی پرگردید و در انکوباتور در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا دلمه تشکیل گردد.

پس از اطمینان از آمادگی لخته، دلمه‌ها به آرامی توسط ابزارهای مخصوصی به مکعب‌های حدود ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متری برش داده شد. به منظور آبگیری لخته‌ها، محتویات درون قالب‌های سوراخ‌داری که روی صفحات مشبک قرار داشت ریخته شد و عمل آبگیری به تدریج انجام گرفت. سپس قطعات پنیر در آب نمک ١٤ درصد قرار گرفت و نمونه‌ها به سردخانه منتقل و در دمای زیر ۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تاثیر هاپلوتیپ‌ها روی صفات راندمان پنیرسازی و کیفیت پنیر تولیدی

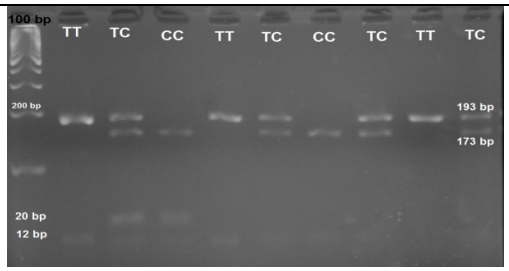
نحوه محاسبه راندمان تولید پنیر، به صورت اندازه‌گیری وزن شیر و پنیر تولید شده هر تکرار به صورت جداگانه بود. مقدار کمی از پنیر تولید شده هر نمونه برای محاسبه ماده خشک، درصد چربی و درصد پروتئین آن، به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد و خوراک دام و طیور استان خراسان رضوی فرستاده شد و مابقی آن در آب نمک ۱۵ درصد نگهداری گردید. آنالیز آماری تاثیر هاپلوتیپ‌ها روی صفت عملکرد تولید پنیر و شاخص‌های مربوط به کیفیت آن، در نرم افزار SAS به طور جداگانه برای هر یک از صفات مورد نظر در قالب طرح کاملا تصادفی آنالیز و در سطح معنی‌داری ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

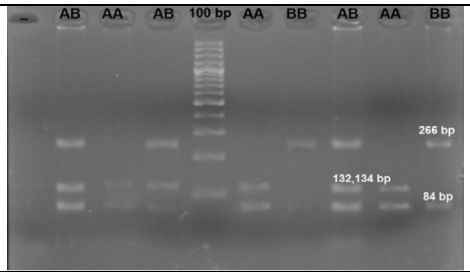
تعیین ژنوتیپ و محاسبه فراوانی ژنی و ژنوتیپی

نمونه‌های DNA استخراجی از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار بودند. همچنین تکثیر قطعات مورد نظر در هر جایگاه و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با موفقیت انجام شد. پس از هضم قطعات تکثیر شده، ژنوتیپ هر جایگاه تعیین گردید (شکل ۲). برآورد فراوانی آللی، ژنوتیپی، هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار و نیز تعادل هاردی واینبرگ در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود به جز در جایگاه ژن کاپاکازئین، در سایر جایگاه‌ها جامعه در حالت تعادل بود. در پژوهش حاضر فراوانی آلل T و C ژن اوستئوپونتین (OPN) به ترتیب ۰/۵٤ و ۰/٤٦ برآورد شد. در سایر تحقیقات در نژاد هلشتاین نیز حد متوسط این دو ژن گزارش شده است (Leonard *et al*., 2009؛ Nasiri *et al*., 2010؛ Khatib *et al*., 2007; Pasandideh *et al*., 2011a). اما در دو نژاد گاو بومی ترکیه مقدار آلل C کمتر بود (۰/۱٦ و ۰/۲٦) (Oztabak *et al*., 2008). فراوانی آللی A و C جایگاه *PPARGC1A-A968*C ۰/۷۸٦ و ۰/۲۱٤ برآورد گردید. بیشترین فراوانی ژنوتیپی مربوط به AA و کمترین فراوانی مشاهده شده مربوط به ژنوتیپ CC بود، به طوری که تنها دو گاو دارای این ژنوتیپ بودند. بیشتر بودن فراوانی آلل A نسبت به C در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش شده است (Komisarek *et al*., 2009؛ Kowalewska *et al*., 2010؛ Pasandide *et al*., 2011b) که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت اما با نتایج Khatib و همکاران (2007) همسو نبود. فراوانی آللی T و C در جهش T19C موقعیت ۱۸۹۲ اینترون ۹ ژن *PPARGC1A* به ترتیب ۰/۳۷۹ و ۰/٦۲۱ برآورد گردید. بیشتر بودن فراوانی آلل C در این مطالعه با نتایج برخی از پژوهش‌ها مطابقت داشت (Pasandide *et al*., 2011a؛ Schennink *et al*., 2009؛ Khatib *et al*.–2007 ؛ Komisarel and Dorynek, 2009) و با برخی دیگر موافق نبود (Kowalewska, 2010). خطیب و همکاران (۲۰۰۷) دلیل خارج بودن جامعه مورد مطالعه از تعادل هاردی–وینبرگ را بیشتر بودن فراوانی ژنوتیپ CC ذکر کردند. این نکته در مورد جمعیت هلشتاین اطراف استان‌های

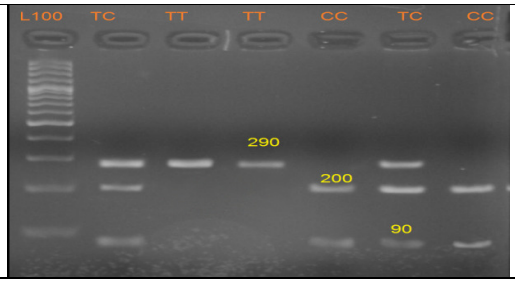
تهران و اصفهان نیز مشاهده شد (Pasandide *et al*, 2010b).



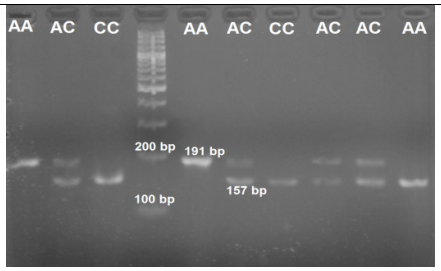
B) *PPARGC1α-T19C* (ب)



A) Kappa Kasein (الف) کاپاکازئین



D) Osteopoetin د)اوستئوپونتین



C) *PPARGC1α - A968C* (ج)

شکل ٢- انواع ژنوتیپ ٤ جایگاه ژنی موردمطالعه.

Figure 2- Genotypes of 4 studied loci.

جدول ٣- فراوانی آللی، ژنوتیپی، هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار و تعادل هاردی واینبرگ.

Table 3- Allele and genotype frequencies (Freq.), observed (Obs) and expected (Exp.) heterozygosity (Het) and Hardy-Weinberg equilibrium.

کای مربع K-square	فراوانی آللی allelic freq.	هموزیگوت Hom.	هتروزیگوت Het.	هموزیگوت Hom.	فراوانی Freq.	ژن Gene
6.004*	A=0.365 B=0.635	BB=0.460	AB=0.350	AA=0.190	مشاهده شده Obs.	کاپاکازئین CSN3
		BB=0.440	AB=0.460	AA=0.130	مورد انتظار Exp.	
0.7313ns	T=0.379 C=0.621	CC=0.407	TC =0.428	TT=0.164	مشاهده شده Obs.	*PPARGC1α – T19C*
		CC=0.365	TC=0.471	TT=0.144	مورد انتظار Exp.	
0.8399ns	A=0.786 C=0.214	CC=0.022	AC=0.385	AA=0.593	مشاهده شده Obs.	*PPARGC1α -A968C*
		CC=0.046	AC=0.337	AA=0.617	مورد انتظار Exp.	
0.5487ns	T=0.540 C=0.460	CC=0.310	TC=0.460	TT=0.230	مشاهده شده Obs.	اوستئوپونتین
		CC=0.290	TC=0.490	TT=0.210	مورد انتظار Exp.	

(p<0.05)*

در مطالعه حاضر فراوانی آللی B کاپاکازئین از آلل A بیشتر بود و به ترتیب برابر ۰/٦٤٨ و ۰/۳۵۲ محاسبه شد که با نتایج پژوهش‌های انجام شده روی نژاد هلشتاین مطابقت ندارد (Tsiaras *et al*., 2005؛ Alinaghizadeh *et al*., 2007؛ Rajesh *et al*., 2007؛ Daniela *et al*., 2010؛ Mohammadi *et al*., 2009; Dogru and Ozdemir, 2009). فراوانی آلل B در نژادهای بوس ایندیکوس گلپایگانی ۰/۳۲ (Zakizadeh *et al*., 2006) ، مازندرانی ۰/۳۵ (Zakizadeh *et al*., 2006) و سیستانی ۰/۳٦ (Alinaghizadeh *et al*., 2007) و در نژادهای بوس تائوروس سیمنتال ۰/۲٤ (Trakovicka *et al*., 2012)، براون سوئیس ۰/٤۹۵ (Dogru and Ozdemir, 2009) و سرابی ۰/۵۷ (Zakizadeh *et al*., 2006) گزارش شده است. فراوانی این آلل در گاوهای محلی کرمان ۰/۳۰ (Mohammadi *et al*., 2009) و در آمیخته‌های بوس تائوروس و بوس ایندیکوس برابر ۰/۳٤ و کمتر از آلل A گزارش شده است (Rajesh *et al*., 2007). در پژوهش دیگری که روی پنج نژاد گاو روسی انجام شد، فراوانی آلل B از ۰/۱٦ تا ۰/۵ گزارش گردید (Sulimova *et al*., 2007).

تفاوت‌های مشاهده شده در فراوانی آللی جایگاه‌ها می‌تواند به دلیل محتوای ژنتیکی متفاوت نژادها و یا تعداد نمونه بررسی شده در تحقیقات مختلف باشد. جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش از نظر جایگاه‌های اوستئوپونتین و *PPARGC1A* در حالت تعادل بودند اما فراوانی آللی کاپاکازئین متعادل نبود. دلیل این امر می‌تواند به دلایل نمونه‌گیری از جمعیت، تلاقی‌های غیرتصادفی و یا فشار انتخاب روی تولید شیر باشد.

تاثیر ژنوتیپ روی صفات تولیدی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در بررسی تاثیر جایگاه‌های اوستئوپونتین و پروموتور ژن *PPARGC1α-A968C* با کاپاکازئین روی صفات تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین هیچگونه ارتباط معنی‌داری بین ارزش اصلاحی صفات و ژنوتیپ‌ها یافت نشد، در حالی که هاپلوتیپ *PPARGC1A-T19C* و کاپاکازئین با ارزش‌های اصلاحی صفت تولید شیر، ارتباط معنی‌داری را نشان داد، اگرچه روی سایر صفات تاثیر نداشت ($P<0.05$). بیشترین و کمترین ارزش اصلاحی مقدار تولید شیر به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های هموزیگوت *CSN1S3-AA/PPARGC1-TT* و *CSN1S3-AB/PPARGC1-CC* بود (جدول ٤). تاثیر سایر جایگاه‌ها روی ارزش اصلاحی صفات مورد بررسی معنی‌دار نبود (اطلاعات آورده نشده است)

.

جدول ٤- میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های *PPARGC1α-T19C* و کاپاکازئین با ارزش‌های اصلاحی صفت تولید شیر.

Table 4- Least square means of *PPARGC1α-T19C* and k-casein with breeding values of milk.

احتمال P-value	خطای استاندارد SE	میانگین ارزش اصلاحی Mean of B.V.	ژنوتیپ Genotype	ردیف Row
0.791	158.8	42.3	AACC	1
0.493	125.6	-97.0	AATC	2
0.0002**	**355.3**	**1359.2**	**AATT**	3
0.0001**	**91.7**	**-147.4**	**ABCC**	4
0.934	102.6	-135.9	ABTC	5
0.829	205.1	-86.1	ABTT	6
0.649	94.9	17.1	BBCC	7
0.880	86.2	36.6	BBTC	8
0.967	118.4	42.7	BBTT	9

**معنی‌دار در سطح احتمال ١٪.

مطالعات گذشته بیانگر این مطلب است که آلل C ژن استوپونتین با افزایش درصد چربی (Khatib *et al*., 2007؛ Leonard *et al*., 2007) و درصد پروتئین (Leonard *et al*., 2007؛ Khatib *et al*., 2007؛ Schnabel *et al*., 2005) مرتبط است اما برخی گزارشات نیز حاکی از عدم وجود ارتباط بین ژنوتیپ‌های این ژن با مقدار تولید شیر (Leonard *et al*., 2007)، مقدار چربی (Khatib *et al*., 2007؛ Leonard *et al*., 2007)، درصد چربی (Cohen-Zinder *et al*., 2005)، مقدار پروتئین (Leonard *et al*., 2007؛ Khatib *et al*., 2007)، درصد پروتئین (Cohen-Zinder *et al*., 2005) و تعداد سلول‌های سوماتیک (Khatib *et al*., 2007؛ Leonard *et al*., 2007) است. در تحقیقی گزارش شده است اگرچه تاثیر آلل C روی مقدار تولید شیر معنی‌دار نبود اما تمایل به کاهش مقدار شیر با توجه به همبستگی منفی بین این صفت با درصد پروتئین شیر، منطقی به نظر می‌رسد (Leonard *et al*., 2005). گزارش شده است که افراد هتروزیگوت با ژنوتیپ CT نسبت به دو ژنوتیپ دیگر درصد چربی تصحیح شده برای دو بار دوشش و درصد پروتئین تصحیح شده ٣٠٥ روز بیشتری تولید کرده‌اند (Pasandideh *et al*., 2011a).

گزارش شده است که آلل A کاپاکازئین بر خلاف آلل B با افزایش تولید شیر (Matejicek *et al*., 2007؛ Nijole *et al*., 2007؛ Tsiaras *et al*., 2005)، درصد پایین پروتئین شیر (Matejicek *et al*., 2007؛ Tsiaras *et al*., 2005) و افزایش چربی (Nijole *et al*., 2007؛ Tsiaras *et al*., 2005) در ارتباط است، اگرچه روی تولید و درصد لاکتوز شیر تاثیر ندارد (Tsiaras *et al*., 2005). از طرف دیگر، آلل B با کیفیت بالای شیر (Matejicek *et al*., 2007) مرتبط می‌باشد. اثر مشابه ژن کاپاکازئین روی اکثر پارامترهای تولیدی، کیفی، انعقادی شیر و اجزای

ماده خشک معنی‌دار گزارش شده است (Matejicek *et al*., 2007)، اگرچه در برخی پژوهش‌ها چنین تاثیر مشاهده نشده است (Trakovicka *et al*., 2012).

در تحقیق دیگر ژنوتیپ BB کاپاکازئین با تولید بالای شیر با چربی کم و تولید متوسط پروتئین در ارتباط بود (Rajesh *et al*., 2007). در مجموع گاوهای با ژنوتیپ BB در مقایسه با ژنوتیپ AA از نظر تولید شیر سودمندتر بوده و میانگین پروتئین و چربی مناسب‌تری دارند. علیرغم تاثیر منفی که ژنوتیپ BB روی تولید شیر دارد اثر اصلی آن روی چربی و پروتئین شیر و همچنین ترکیب پروتئین شیر است (Nijole *et al*., 2007). اگرچه بررسی‌های گذشته (Matejicek *et al*., 2007؛ Alinaghizadeh *et al*., 2007؛ Rajesh *et al*., 2007؛ Nijole *et al*., 2007؛ Daniela *et al*., 2010؛ Dogru and Ozdemir, 2009) ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ-های کاپاکازئین و به خصوص آلل B با تولید شیر و ترکیبات آن نشان داده است، در این پژوهش ارتباط معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد اطمینان بین ژنوتیپ با ارزش اصلاحی صفات تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین بدست نیامد اما در بررسی هاپلوتیپ کاپاکازئین و اینترون ۹ ژن *PPARGC1α* با ارزش‌های ارثی صفت تولید شیر، ارتباط معنی‌دار بود ($P<0.01$). بیشترین و کمترین ارزش اصلاحی تولید شیر برای هاپلوتیپ‌های AATT و ABCC به ترتیب معادل ۱۳۵۹/۲ و ۱٤۷/٤- مشاهده شد.

پژوهش حاضر با نتایج برخی تحقیقات در رابطه با تاثیر چندشکلی A968C ژن *PPARGC1α* روی تولید شیر (Khatib *et al*., 2007؛ Komisawrek *et al*., 2009؛ Weikard *et al*., 2004)، درصد چربی (Khatib *et al*., 2007؛ Komisawrek *et al*., 2009؛ Weikard *et al*., 2004) و درصد پروتئین (Komisawrek *et al*., 2009) و همچنین، در مورد ارتباط چندشکلی T19C این ژن با تولید شیر (Khatib *et al*., 2007؛ Komisawrek *et al*., 2009؛ Schennink *et al*., 2009)، درصد چربی (Khatib *et al*., 2007؛ Komisawrek *et al*., 2009؛ Weikard *et al*., 2004؛ Schennink *et al*., 2009) و درصد پروتئین (Khatib *et al*., 2007؛ Weikard *et al*., 2004؛ Schennink *et al*., 2009) مشابهت داشت. در حالی که در تحقیقی دیگر، ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی T19C و تولید چربی شیر یافت شد، اگرچه روی درصد چربی شیر تاثیری نداشت (Weikard *et al*., 2004). همچنین، نتایج معنی‌داری از ارتباط بین چندشکلی‌های A968C و T19C و میزان عدم برگشت در تلیسه‌ها و اثر کم‌تری از تاثیر این جایگاه روی تولید پروتئین گزارش شده است (Komisawrek *et al*., 2009).

تعیین هاپلوتیپ‌ها

از میان ۸ نوع هاپلوتیپ‌های (آلل‌های) محتمل در بررسی توام دو جایگاه چندشکل *PPARGC1α* و کاپاکازئین (۲×۲×۲)، مشخص

شد که ٣ هاپلوتیپ (*CSN3*A-*PPARGC1α19*C-*PPARGC1α* 968A/ *CSN3*B-*PPARGC1α19*-C-*PPARGC1α968*A/ *CSN3*B-*PPARGC1α19*T-*PPARGC1α968*A) وجود دارد. برای دو جایگاه اوستئوپونتین و کاپاکازئین، هر ٤ نوع هاپلوتیپ (آلل) (*CSN3*A-*OPN*C/ *CSN3*A-*OPN*T/ *CSN3*B-*OPN*C/ *CSN3*B-*OPN*T) مشاهده شد. سایر هاپلوتیپ‌های *CSN3*A- *PPARGC1α19*C- *PPARGC1α 968*C/ *CSN3*A- *PPARGC1α19*T-*PPARGC1α968*A/ *CSN3*A-*PPARGC1α19*T-*PPARGC1α968*C / *CSN3*B- *PPARGC1α19*C-*PPARGC1α968*C/ *CSN3*B-*PPARGC1α19*T-*PPARGC1α968*C مشاهده نشدند؛ اگرچه احتمال وجود آنها به دلیل هتروزیگوت بودن برخی از گاوها رد نمی‌شود، اما قابل تشخیص نمی‌باشند. بیشترین فراوانی هاپلوتیپی مربوط به KCN-B/c.3359C (٠/٤٥٨) بود، اما نمونه‌ای با هاپلوتیپ KCN-A/c.3359A دیده نشد (جدول ٥).

با توجه به این موضوع که تاثیر ژن‌های *PPARGC1α* و اوستئوپونتین هرکدام جداگانه به همراه ژن کاپاکازئین بررسی شدند، این امکان وجود داشت گاوی که برای هاپلوتیپ *PPARGC1α*/کاپاکازئین انتخاب می‌شود، برای هاپلوتیپ اوستئوپونتین/کاپاکازئین نیز انتخاب شود. این امر باعث کم شدن تعداد نمونه‌های مورد نیاز شد. به همین علت و با توجه به اینکه برخی از هاپلوتیپ‌ها در نمونه گرفته شده وجود نداشت، از تعداد ٥ راس گاو که دارای ژنوتیپ-های مشاهده شده بود، نمونه شیر گرفته شد و پنیر تهیه گردید (جدول ٥).

جدول ٥- انواع حالت‌های ممکن و/یا مشاهده شده آللی در بررسی توام ژن‌های *PPARGC1α* و اوستئوپونتین با ژن کاپاکازئین.

Table 5- Different kinds of possible and/or observed alleles in combined investigation of *PPARGC1α* and osteopontin with kappa casein.

جایگاه *PPARCG1α* و کاپاکازئین *PPARCG1α* and CSN3*		جایگاه اوستنوپونتین و کاپاکازئین OPN and CSN3
ACA		AC
ACC	چنین گاوی وجود نداشت No such a haplotype	AT
ATA	چنین گاوی وجود نداشت No such a haplotype	BC
BCA		BT
BCC	چنین گاوی وجود نداشت No such a haplotype	
BTA		

* از چپ به راست: جایگاه‌های کاپاکازئین، T19C و A968C ژن *PPARCG1α*. Left to right: CSN3, A968C, *PPARCG1α*

با توجه به بررسی جهش موقیت‌های اینترون و انتهای ٣′ ژن *PPARGC1α* در این پژوهش، احتمال پیوستگی این دو جایگاه با یکدیگر و همچنین پیوستگی بین هاپلوتیپ آنها با ژن کاپاکازئین، فراوانی هریک از این هاپلوتیپ‌ها و مقدار لینکاژ بین آنها جداگانه

بررسی گردید. عدم تعادل پیوستگی بین تک شکلی‌های نوکلئوتیدی، با استفاده از آماره r^2 یا ضریب همبستگی دو جایگاه ژنی، برابر ۰/۲۸۲ محاسبه شد که بیانگر عدم تعادل پیوستگی (LD) ضعیف است (جدول ٦). با توجه به مقدار r^2 و بیشتر بودن فراوانی آلل B کاپاکازئین، بالاتر بودن فراوانی هاپلوتیپ‌های دارای این آلل، دور از انتظار نخواهد بود. در تحقیق دیگری، ضریب r^2 برای نژاد هلشتاین ۰/۸٦ محاسبه شده است (Pasandideh *et al*., 2011a).

جدول ٦- فراوانی انواع هاپلوتیپ‌های محتمل و بررسی لینکاژ دو جایگاه *PPARCG1α* و کاپاکازئین.

Table 6- Haplotypes frequencies and linkage of *PPARCG1α* and CSN3.

کاپاکازئین	c.3359A>C		c.1892T>C		c.3359A>C/c.1892T>C		
CSN3	A=0.75	C=0.25	C=0.542	T=0.458	AT=0.458	AC=0.292	CC=0.250
CSN3-A (0.375)	0	0.250	0.295	0.164	0.165	0.155	0.053
CSN3-B (0.635)	0.292	0.458	0.330	0.211	0.291	0.139	0.195

عدم تعادل گامتی بین دو جایگاه ژن *PPARGC1A* Linkage disequilibrium between two loci of *PPARGC1A* gene

بلوک اول First block	بلوک دوم Second block	D'	LOD	r^2
PPARCG1A-A/C	*PPARCG1 α -C/T*	1.0	0.76	0.282
CSN3	*PPARGC1α* (2 loci)	0.19	-	-

تاثیر ژنوتیپ روی کیفیت پنیر

فاکتورهای اندازه‌گیری شده راندمان تولید و کیفیت پنیر در هر هاپلوتایپ در جدول ۷ و نتایج آنالیز واریانس تاثیر هاپلوتیپ‌ها روی صفات کیفیت پنیر در جدول ۸ آورده شده است. همچنین مشخص شد که اثر ژنوتیپ‌ها روی صفات مورد مطالعه کیفیت پنیر، از نظر آماری در سطح ۹۵ درصد اطمینان، معنی‌دار نبود (جدول ۸).

خواص لخته شدن تاثیر بسزایی روی تولید و کیفیت پنیر دارد، به طوریکه در شیر با خواص مطلوب پنیرسازی، مدت زمان انعقاد و تشکیل لخته کوتاهتر و استحکام لخته نیز بیشتر است. این مرحله از آن جهت اهمیت دارد که بسیار حساس بوده و اولین مرحله در ساخت پنیر است و روی مراحل بعدی پنیرسازی تاثیر می‌گذارد (Comin *et al*., 2008؛ Kubarsep *et al*., 2005). در تحقیق حاضر، ژنوتیپ جایگاه‌های مورد مطالعه تاثیر معنی‌دار روی راندمان تولید پنیر و ویژگی‌های کیفی پنیر تولیدی نشان نداد اما سایر پژوهش‌ها حاکی از این مطلب است که انواع ژنوتیپ بتاکازئین، کاپاکازئین و بتالاکتوگلوبولین روی زمان لخته شدن مایه پنیر (Comin *et al*., 2008؛ Penasa *et al*., 2010؛ Kubarsep *et al*., 2005) و استحکام دلمه تاثیر دارد (Penasa *et al*., 2010). گزارش شده است که بهترین ژنوتیپ از نظر زمان لخته شدن هنگامی است که حداقل یک آلل B در این دو

جایگاه وجود داشته باشد (Comin *et al.*, 2008). در تحقیقی روی گاوهای استونی گزارش شده است که خواص لخته شدن با آنزیم مایه پنیر در ژنوتیپ BB از ژن کاپاکازئین بسیار بهتر از ژنوتیپ AA بود و درصد نمونه‌های شیر لخته نشده کمتری وجود داشت، همچنین با بالا رفتن فراوانی آلل B کاپاکازئین در نژادهای بومی، خواص لخته شدن مایه پنیر بهتر شد (Kubarsep *et al.*, 2005).

جدول ٧- میانگین فاکتورهای اندازه گیری شده هر هاپلوتیپ در آزمایشات پنیرسازی.

Table 7- Mean of cheese parameters measured for haplotypes (Hap.).

شماره گاو Cow	هاپلوتیپ Ŧ Hap.	٪چربی شیر Milk %F	٪پروتئین شیر Milk %P	وزن شیر Milk weight	وزن پنیر Cheese weight	راندمان پنیرسازی efficiency	ماده خشک Dry matter	٪ چربی پنیر Cheese %F	٪پروتئین پنیر Cheese %P
402	AT	3.32	3.44	7.29	1.09	6.68	49.51	46.07	35.24
459	AC	3.15	3.33	7.19	1.18	6.07	46.03	42.83	32.99
447*	BC BTA	2.77	3.17	7.36	1.10	6.66	42.31	35.43	40.77
515*	BT BCA	3.77	3.68	7.10	1.19	6.05	44.03	41.47	35.21
461	ACA	3.67	3.82	6.66	1.13	5.94	46.05	43.50	36.07

Ŧهاپلوتیپ‌های دوحرفی بیانگر دو ژن اوستئوپونتین و کاپاکازئین و ٣ حرفی‌ها برای دو جهش مربوط بـه *PPARGC1α* و کاپاکـازئین درنظـر گرفته شده اند. ترتیب حروف هاپلوتیپ‌ها از چپ به راست به ترتیب کاپاکازئین، موقعیت T19C و 968AC می‌باشد.

ŦTwo alphabetic haplotypes means OPN and CSN3 genes and 3-alphabetic considered for 2 mutations of PPARGC1A and CSN3. The orders of haplotypes are CSN3, T19C and 968AC, respectively.

*** این گاو دارای هر دو نوع هاپلوتیپ مورد نظر در جایگاه‌های PPARGC1Aو اوستئوپونتین بودند.**

*** These cows carry both of the desirable haplotypes in *PPARGC1A* and osteopontin.**

جدول ٨- تجزیه واریانس (ANOVA) صفات مربوط به پنیرسازی.

Table 8- Analysis of variance for cheese traits.

منبع تغییر S.O.V.	درجه آزادی df	مجموع مربعات (Least square)			
		راندمان efficiency	ماده خشک Dry matter	درصد چربی %F	درصد پروتئین %P
تیمار Treatment	4	1.565	86.816	188.369	98.934
باقیمانده Residual	10	1.891	360.595	330.027	188.704
احتمال P-value	---	0.160	0.670	0.295	0.331

بهبود ژنتیکی خواص انعقادی شیر، راه شناخته شده‌ای است که راندمان تولید پنیر را بهبود می‌دهد، اما به دلیل فقدان تجهیزات مناسب برای تعیین و رکوردبرداری منظم این صفات، امکان استفاده مستقیم از آنها در انتخاب دام‌ها برای این صفات محدود است. لذا یک راه

غیرمستقیم می‌تواند انتخاب به نفع ژنوتیپ‌های مطلوب و در نتیجه بالا بردن فراوانی آلل‌های مطلوب در جایگاه‌های موثر بر پروتئینهای شیر باشد که با پارامترهای موثر بر پنیرسازی مرتبط هستند.

نتیجه گیری و پیشنهادات

گزارشات متعددی از تاثیر چندشکلی در نواحی مختلف ژن، اعم از جایگاه‌های اینترون، اگزون و یا سایر نواحی غیرقابل ترجمه بالا دست یا فرودست ژن، روی محصول ژنتیکی و یا فراورده‌های آن وجود دارد. به همین علت، در بررسی‌های همزمان تاثیر چند جایگاه روی صفات تولیدی و به دلیل احتمال پیوستگی که بین برخی از جایگاه‌ها به دلیل قرارگیری روی یک کروموزوم وجود دارد، مبحث توارث همزمان آنها و/یا وقوع کراسینگ اور مطرح می‌شود. در این رابطه می‌توان تاثیر جایگاه‌های چندشکلی شناخته شده در داخل یک ژن روی صفات را به دلیل بالا بودن عدم تعادل پیوستگی بین آنها و یا عدم تعادل پیوستگی احتمالی این جایگاه‌ها با نواحی شناخته نشده داخل ژن نسبت داد (Pasandideh *et al.* 2011). در پژوهش حاضر، مقدار عدم تعادل پیوستگی بین جایگاه‌های بررسی شده کم بود، لذا احتمال وقوع کراسینگ اور و پیدایش ترکیبات جدید ژنی وجود داشت. در چنین شرایطی، بالا بودن تعداد نمونه مورد بررسی می-تواند منجر به مشاهده شدن تمام ترکیبات ژنوتیپی شود. همچنین استفاده از روش‌های پیشرفته شناسایی SNPهای متراکم، جهت شناسایی دقیق-تر ژن‌های موثر بر صفات مطلوب خواهد بود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله محققین بر خود لازم می‌دانند تا از مسوولان محترم مجتمع آموزش جهاد کشاورزی خراسان رضوی به ویژه آقای مهندس زرقی بابت تهیه نمونه‌های خون و آقای مهندس زارع به جهت همکاری در تهیه پنیر در پایلوت تحقیقاتی شیر، کمال تشکر و قدردانی را بنمایند. مراحل ژنتیک ملکولی پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر انجام شد که بدینوسیله از همکاری حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشکده سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S (2007). Kappa-casein Gene study in Iranian Sistani Cattle Breed (Bos indicus) Using PCR-RFLP. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 4291-4294.

Barrett, J C, Fry b, Mller J, Daly M J (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps, Bioinformatics. 21: 263-265.

Bonfatti, V., Di Martino G., Cecchinato A., Degano L., Carnier P (2010). Effects of β-κ-casein (*CSN2-CSN3*) haplotypes, β-lactoglobulin (*BLG*) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. J. Dairy Sci. 93:3809-3817.

Buchberger, J., Dovc, P (2000). Lactoprotein Genetic Variants in Cattle and Cheese Making Ability.Food technol. biotechnol. 38: 91–98.

Cohen-Zinder, M, Seroussi E, Larkin DM, Loor JJ, Evertsvan der Wind A, Lee JH, Drackley JK, Band MR, Hernandez AG, Shani M, Lewin HA, Weller JI, Ron M (2005). Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. Genome Research 15: 936–944.

Comin M, Cassandro S, Chessa M, Ojala R, Dal Zotto M, De Marchi P, Carnier L, Gallo G, Pagnacco, Bittante G. (2008). Effects of Composite β- and κ-Casein Genotypes on Milk Coagulation, Quality, and Yield Traits in Italian Holstein Cows. J. Dairy Sci. 91: 4022–4027.

Daniela E. Ilie, Aurelia Sălăjeanu, Anuţa Magdin, Radu Neamţ, I. Vintila. (2010). Early Determination of Animals with Favorable Genes in Milk Production for Profitable Private Farms. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies. 43: 279- 282.

Dogru U, Ozdemir M. (2009). Genotypin of Kappa casein Locus by PCR-RFLP in Brown Swiss cattle Breed. Journal of Animal and Veterinary Advances 8: 779-781, 2009.

Ghods Rohani M (2006). The principle of milk processing and dairy products. Agricultural research, Education and Extension Organization (AREEO). Iran.

Ghods Rohani M (2008). Principle of milk chemistry. Sanabad Publisher. Iran.

Javanrouh A, Banabazi M.H, Esmaeilkhanian S, Amirinia C, H.R. Seyedabadi and H. Emrani. (2006). Optimization on salting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. Proc. of 57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. August 21-25, 2006. Antalya, Turkey.

Khatib H, Huang W, Wang X, Tran A. H., Bindrim A B, Schutzkus V, Monson R L, Yandell B S (2009). Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. J. Dairy Sci. 92: 2238–2247.

Khatib H, Zaitoun I, Wiebelhaus-Finger J, Chang YM, Rosa GJM. (2007). The association of bovine *PPARGC1A* and *OPN g*enes with milk composition in two independent Holstein Cattle populations. J. Dairy Science. 90: 2966–2970.

Killian, G. (2010). Physiology and endochrinology symposium: Evidence that oviduct secretions influence sperm function: A retrospective view for livestock. J Animal Science 89: 1315-1322.

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. J Applied Genetics 50: 125–132.

Kowalewska IV, Kulig H, Kmiec M (2010). Associations between the bovine PPARGC1A gene and milk production traits. Czech J. Animal Science, 55: 195-199.

Kűbarsep I, Henno M, Viinalass H, Sabre D (2005). Effect of κ-casein and β-lactoglobulin genotypes on the milk rennet coagulation properties. Agronomy Research. 31: 55-64.

Leonard S, Khatib H, Schutzkus V, Chang YM, Maltecca C (2005). Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. J. Dairy Science 88: 4083–4086.

Matejicek A, Matejickova J, Němcova E, Jandurova OM, Stipkova.M, Bousk J, Frelich J (2007). Joint effects of *CSN3* and *LGB* genotypes and their relation to breeding values of milk production parameters in Czech Fleckvieh.Czech J. Animal Science 52: 83–87.

Mohammadi A., Mohammadabadi M. R., Mirzaei H. R., Baghizadeh A, Dayani O, Asadi M, Bahrampour V (2009). Study of Kappa-Casein gne in local and Holstein in Kerman provinc by PCR-RFLP. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. 16: 125-132.

Nasiri K, Salehi A, Aminafshar M, Sayaadnezad MB, Namvar Z, Sobhani R (2010). Polymorphism of OPN Gene in the Iranian Holstein Bulls. Proc. of 4th congress of Iranian animal science. Sep. 3-5, 2010. Karaj, Iran. pp. 2870-2874.

Nijolė P, Miceikienė I, Mišeikienė R, Krasnopiorova N, Kriauzienė J (2007). Genetic factors influencing milk production traits in Lithuanian dairy cattle breeds. Žemesukiomokslay. 14: 32–38.

Oztabak K, Un J, Tesfaye D, Akis I, Mengi A (2008). Genetic polymorphisms of osteopontin (OPN), prolactin (PRL) and pituitary-specific transcript factor-1 (PIT-1) in South Anatolian and East Anatolian red cattle. Acta Agriculturae Scand Section A. 58: 109-112.

Pasandideh M., Mohammadabadi M.R., Tarang A., Esmaili A (2011, a). Association of singel nucleotide polymorphism C>T of OPN gene and milk production and composition in Iran Holstein cattle. Iranian J. Anim. Sci. 42: 199-205.

Pasandideh M., Mohammadabadi M.R., Tarang A., Esmaili A., Sayghalani R., Ansari S., Pasandideh R (2011, b). An association between T/C and A/C single nucleotide polymorphisms of PPARGC1A gene and milk production and composition in Iran Holstein cattle. Modern Genetics Journal 6: 15-23.

Pasandideh M (2010). A Analysis of bovine PPARGC1A gene polymorphism (to position 1892T>C) in Iran Holstein cattle populations. Proc. of 4th congress of Iranian Animal Science. Sep. 3-5, 2010. Karaj, Iran. pp. 2843-2847.

Penasa, M., Cassandro M, Pretto D, De Marchi M, Comin A, Chessa A, Dal Zotto R, Bittante G (2010). Influence of composite casein genotypes on additive genetic variation of milk production traits and coagulation properties in Holstein-Friesian cows. J. Dairy Science 93: 3346–3349.

Rajesh K Patel, Jenabhai B. chauhan, Krishna M. singh, Kalpesh J. Soni (2007). Allelic Frequency of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin in Indian Crossbred (Bos taurus × Bos indicus) Dairy Bulls. Turkish Journal Veterinary Animal Science 31: 399-402.

SAS (2002). Statistical Analysis System Institute. Users Guide Version 9 for Windows. Cary North Carolina USA.

Schaar, J., Hansson B, Pettersson H-E (1985). Effects of genetic variants of κ-casein and β-lactoglobulin on cheesemaking. J. of Dairy Research 52: 429-437.

Schennink, A, Bovenhuis H, Le´on-Kloosterziel KM, Van Arendonk JAM, Visker MHPW (2009). Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. Animal Genetics 40: 909-916.

Schnabel RD, Kim JJ, Ashwell MS, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Connor EE, Taylor JF (2005). Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: Analysis of the bovine osteopontin gene. Proceeding of the National Academy Science 102: 6896–6901.

Schopen GCB, Visker MHPW, Koks PD, Mullaart E, Van Arendonk JAM, Bovenhuis H (2011). Whole-genome association study for milk protein composition in dairy cattle. J. Dairy Science 94 :3148–3158.

Sulimova G.E., Ahani Azari M, Rostamzadeh J, Mohammad Abadi M.R., Lazebny O.E (2007). κ-casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. Russian Journal of Genetics 43: 73-79.

Trakovicka A, Moravcikova N, Navratilova A (2012). Kappa-Casein gene polymorphism (CSN3) and it effect on milk production traits. Acta fytotechnica et zootechnica. 3: 61-64.

Tsiaras AM, Bargouli GG, Banos G, Boscos CM. (2005). Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows. J. Dairy Science 88: 327–334.

Wedholm, A., Larsen, L.B., Lindmark-Månsson H, Karlsson, A.H., Andrén, A (2006). Effect of Protein Composition on the Cheese-Making Properties of Milk from Individual Dairy Cows. J. Dairy Sci. 89: 3296-3305

Weikard R, Kűhn C, Goldammer T, Freyer G, Schwerin M (2004). The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. Physiological Genomics 21: 1-13.

Zakizdeh S, Rahimi G, Nejati-Javaremi A, Reissmann M, Miraee-Ashtiani S M, Moradi M, Reinecke P (2006). Analysis of Kappa casein polymorphism in three Iranian native cattle and Holstein breeds by PCR-RFLP. 2006. Proc. of the British Society of Animal Science. March 2006. York, UK. pp. 89.

Association of the *SNPs on CSN3*, *PPARGC1α* and *OPN* genes with milk production traits and efficiency of cheese in Brown Swiss breed

Zakizadeh S.*[1], Hashemi M.J.[2], Gholami H.[2], Ghods Rohani M.[3], Vakili R.[4]

[1,3]Assistant Professors of Animal Science and Food Science Departments, Higher Applied Science Technology Institute
[2,4] Graduated students and Assistant Professor of Islamic Azad University, Branch of Kashmar.

Abstract

Milk is considered as a complete food to meet parts of human daily requirements for a long time. Proteins are one of the most important ingredients of milk and play a critical role in processing technology such as cheese factory. Several factors such as genetics influence on quantity and quality of milk as well as cheese. Several genes on BTA6 are recognized to be related to milk and cheese related traits. In the current study the genetic association of three candidate genes of the region including; Osteopontin, *PPARGC1α,* and Kappa casein with milk and cheese related traits, were investigated in Brown Swiss cattle. Total DNA was extracted from 100 cattle by salting out procedure. Genotypes frequencies were estimated by PCR-RFLP and using specific enzymes. Four factors of efficiency fat, protein and dry matter of cheese were measured. Association between polymorphisms and breeding values and cheese quality were analyzed by GLM procedure at 5% of significant level. The results showed that the population was in Hardy-Weinberg equilibrium, except Kappa Casein locus. Significant effect was observed only in combined genotype of *PPARGC1A-T19C* and kappa casein with breeding values of milk production. Because of the limited samples or missing of some haplotypes, genotypes had no effect on cheese production. The increasing of the samples to demonstrate other genetic combination and using modern techniques such as dense SNPs are strongly recommended.

Key words: *Milk and cheese production traits, Polymorphisms, Association, CSN3, PPARGC1α, OPN.*

* Corresponding Author: Zakizadeh S. Tel: 051138717071 Email: Sonia_zaki@yahoo.com