مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

مقایسه ساختارهای ژنتیکی جایگاه های DGAT1 و SCD1 در بین جمعیت هلشتاین و سیمنتال

مصطفی رضایی[1]، قدرت الله رحیمی[1]، زربخت انصاری[1]، ربیع رهبر*[2]

[1]به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

[2]دستیار علمی، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰٤/۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۱۲

چکیده

ارتباط چند شکلی ژن های دی آسیل گلیسرول آسیل کوآنزیمآ ترانسفراز ۱ و استروئیل کوآنزیم آ دی استراز با ارزش غذایی شیر به اثبات رسیده است. هدف از پژوهش حاضر، مقایسه ساختارهای ژنتیکی جایگاه های DGAT1 و SCD1 در بین جمعیت هلشتاین و سیمنتال می باشد. ۱۰۲ راس گاو نژاد هلشتاین و سیمنتال مازندران به طور تصادفی انتخاب و خونگیری از سیاهرگ گردنی انجام گرفت. در هضم محصولات PCR جایگاه SCD1 (قطعه ۷۲۵ جفت بازی) با آنزیم *Alu1*، دو آلل V و A با فراوانی های ۷۹ و ۲۱ درصد و ۹۲ و ۸ درصد به ترتیب در نژادهای هلشتاین و سیمنتال شناسایی شد. در هضم قطعه ۳۲۵ جفت بازی این ژن با آنزیم *Nco1*، دو آلل C و T هر یک با فراوانی به ترتیب ٤۰ و ٦۰ درصد در نژاد هلشتاین و ٤٥ و ٥٥ درصد در نژاد سیمنتال مشاهده شد. از تکثیر جایگاه DGAT1، دو آلل A و K با فراوانی ٦۰ و ٤۰ درصد و ٥۷ و ٤۳ درصد به ترتیب در نژادهای هلشتاین و سیمنتال شناسایی شد. نتیجه مقایسه آماری وفور آللی و ژنوتیپی جایگاه های مورد مطالعه در بین دو نژاد نشان داد که جایگاه DGAT1 و جایگاه دوم ژن SCD1 از لحاظ فراوانی ژنی در بین دو نژاد یکسان و از لحاظ فراوانی ژنوتیپی در جایگاه DGAT1 متفاوت و در جایگاه SCD1 یکسان هستند. با توجه به تنوع مشاهده شده، می توان نتیجه گرفت که جایگاه های مورد مطالعه برای انتخاب دام های دارای ژنوتیپ مطلوب برای افزایش تولید اسیدهای چرب مفید شیر، مناسب می باشند.

واژه های کلیدی: DGAT1، SCD1، PCR، هلشتاین، سیمنتال.

* نویسنده مسئول: ربیع رهبر تلفن: ۰۹۱۱۱۲۸۵۱۲۰ Email: rahbarrabie@gmail.com

مقدمه

از آنجا که عوامل محیطی در بروز صفات، به ویژه صفات اقتصادی موثرند، لذا شناسایی ژن های مرتبط با آن ها، برای ایجاد تغییرات مطلوب، افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی و انتخاب مستقیم موجودات برای این گونه صفات ضروری است (Weller *et al*., 1990). شناخت ژن های مرتبط با صفات اقتصادی، تنها به کمک نشانگرهای ژنتیکی امکان پذیر است که به طور چشم گیری می توانند سرعت پیشرفت ژنتیکی حیوانات اهلی را افزایش دهند (Yangerman *et al*., 2003; Li *et al*., 2004). ژن دی آسیل گلیسرول آسیل کوآنزیمآ ترانسفراز ١[1] آنزیمی را کد می‌کند که جزء اصلی واکنش تشکیل چربی یعنی تری‌گلیسیریدها را کاتالیز می‌کند. لذا، به عنوان یک ژن کاندیدا برای درصد چربی شیر می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در اثر فقدان این آنزیم، نقص در سنتز تری‌گلیسیریدها در غده پستان به وجود می‌آید (Pareek *et al*., 2005). دی آسیل‌گلیسرول آسیل کوآنزیم آترانسفراز ١ در گاو شامل ١٧ اگزون و ١٦ اینترون است، که روی کروموزوم ١٤ قرار دارد. این ژن در گاو پروتئینی با ٤٨٩ اسید آمینه را کد می‌کند. همچنین مشخص شد که آنزیم استروئیل کوآ دی استراز١[2] در بین چندین آنزیم شناخته شده موثر بر لیپیدها در غدد پستانی، یک نقش کلیدی در اضافه کردن یک باند دوگانه در موقعیت Δ:9 در طیف وسیعی از اسیدهای چرب بازی می‌کند و بیشترین نقش را در تبدیل سوبستراهای اسیدهای چرب acyle-coA ,C14 ,C16 ,C18 ,c18:1 trans 11 که به ترتیب تبدیل به C 14:1 C16:1 ,C18:1 cis9 ,C18:2 cis9trans11 می‌شوند را به عهده دارد (Ntambi *et al*., 2002; Corl *et al*., 2001). اسید لینو لئیک کانژوکه که در فرآیندهای ضد سرطانی نقش دارد توسط ژن استروئیل کوآ دی استراز ساخته می‌شود و در شیر نشخوارکنندگان به وفور وجود دارد (Bauman *et al*., 2006). اگر فعالیت استروئیل کوآ دی استراز در غدد پستانی افزایش یابد مقدار کل اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دوگانه افزایش و در نتیجه میزان اسید چرب اشباع در شیر کاهش می‌یابد. این ژن همچنین یک جزء کلیدی در مسیر سیگنالی ژن لپتین به حساب می آید و برای تنظیم آن نیز بسیار مهم است (Chen *et al*., 2005). این ژن از اولین ژن های کاندیدایی بود که برای تغییر نسبت اسیدهای چرب اشباع به غیر اشباع در شیر و همچنین در افزایش اسید چرب لینو لئیک کانژوگه مورد توجه محققین قرار گرفت (Islas-Trejo *et al*., 2006). جایگاه استروئیل کوآ دی استراز روی کروموزوم ٢٦ گاو قرار دارد که طو ل آن ١٧٠٨٨ جفت باز است. توالی کامل mRNA استروئیل کوآ دی استراز در گاو طولی برابر ٥/١ کیلو جفت بازدارد که یک پروتین با ٣٥٥ اسید امینه را تولید می‌کند (Kaupe *et al*., 2007). ارتباط دی آسیل گلیسرول آسیل کوآنزیمآ ترانسفراز ١ با

[1] Di acyl Glycerol Acyl coA Transferase1(DGAT1)
[2] Stearoyl CoA Desturase1(SCD1)

درصد چربی شیر در گاو به اثبات رسیده است (Winter *et al*., 2002). جایگزینی لیزین ۲۳۲ توسط آلانین (K233A) در اگزون ۸ به عنوان یک چندشکلی در این ژن شناخته شده که با تولید و ترکیبات شیر در گاوهای هلشتاین کشورهای نیوزلند، آلمان مرتبط بوده است (Thaller *et al*., 2003; Hori-Oshima *et al*., 2003). در تحقیقی Winter *et al. (2002)*، مشخص کردند که بین چند شکلی های ژن دی آسیل گلیسرول آسیل کوآنزیمآ ترانسفراز ۱ و درصد چربی شیر رابطه معنی دار وجود دارد. همچنین گزارش شده است که آلل لیزین با افزایش درصد چربی و آلل آلانین با کاهش درصد چربی و افزایش تولید شیر در ارتباط است (Hori-Oshima *et al*., 2003). برای ژن استروئیل کوآنزیم آ دی استراز ۸ چند شکلی تک نوکلئوتیدی در گاوهای هلشتاین، جرسی و بران سوئیس گزارش شده است (Medrano *et al*., 2003). سه چند شکلی تک نوکلئوتیدی در اگزون پنج و پنج چند شکلی تک نوکلئوتیدی دیگر در ناحیه غیر قابل ترجمه این ژن شناسایی شده است (Friedman., Taniguchi *et al* .(2002; Stone *et al*., 2004 (2004) نشان دادند که سه چند شکلی تک نوکلئوتیدی در اگزون پنج باعث به و جود آوردن دو هاپلوتیپ A و B می‌شود که در سومین چند شکلی تک نوکلئوتیدی جایگزین شدن والین (الل T) با آلانین (الل C) را به دنبال دارد. آنها دریافتند که افزایش والین در زنجیره پروتئین باعث تغییر فعالیت کاتالیزوری آنزیم در مقایسه با آلانین می‌شود. گزارش شده است که در گاوهای سیاه ژاپنی آلل C بیشترین فراوانی را در ارتباط با افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع با یک پیوند دوگانه در لاشه را به دنبال داشته و لذا نتیجه گیری شده است که این ژنوتیپ می تواند ابزار مفیدی برای انتخاب‌های ژنتیکی در رابطه با کیفیت مطلوب لاشه باشد. Kharati *et al. (2011)* ، به بررسی تنوع ژنتیکی جایگاه ژن DGAT1 و میزان ارتباط آن با تولید شیر در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران پرداختند. آنها میزان اثر این ژن را روی تولید شیر ۳۰۵ روز در سطح ۰/۱ درصد معنی دار گزارش کردند. در تحقیق دیگری Kharati *et al. (2012)* به بررسی ارتباط چندشکلی آللی ژن *DGAT1* با بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین ایران پرداختند. آنها دریافتند که هیچ گونه ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ های مشاهده شده و سلول های بدنی شیر وجود ندارد. هدف از این پژوهش توجه به اهمیت چند شکلی آللی در دو جایگاه ژنی دی آسیل گلیسرول آسیل کوآنزیمآ ترانسفراز ۱ و استروئیل کوآنزیم آ دی استراز با صفات اقتصادی و صفات مرتبط با ارزش غذایی شیر، شناسایی چند شکلی آللی در این دو جایگاه در جمعیت گاوهای هلشتاین و سیمنتال بود.

مواد و روشها

نمونه گیری،استخراج DNA و انتخاب آغازگرهای اختصاصی

در این پژوهش، به طور تصادفی از ورید زیر دمی ٦٧ راس گاو هلشتاین و ۳۵ راس گاو

سیمنتال موجود در شرکت شیر و گوشت مهدشت مازندران و گاوداری سیمنتال شهرستان آمل خون گیری انجام شد. نمونه های خون در ظرف حاوی یخ قرار داده شد و به آزمایشگاه انتقال یافت و تا زمان استخراج DNA در ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شد. استخراج DNA به روش نمکی بهینه یافته که توسط Miller *et al.* (1988) ارائه شد، انجام گرفت. یک قطعه از ناحیه اگزون ٨ ژن DGAT-1 به طول ١٧٦ جفت باز و دو قطعه از اگزون ٥ ژن SCD1 به طول ٧٢٥ و ٣٩٥ جفت باز توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر شدند (جدول١).

جدول ١- توالی آغازگر ها مورد استفاده برای ژن هایDGAT1 وSCD1.

Table1. Sequence of used primers for SCD1 and DGAT1 genes.

منبع Reference	موقعیت روی ژن Position on gene	اندازه قطعه (جفت باز) Fragment size(bp)	توالی آغازگر ها Sequence of primers	نام ژن Gene
18	اگزون 8	176	F:5'-cttgctcgtagctttggcagg-3' R:5'-cgaagaggaagtagtagagatc-3'	DGAT1
12	اگزون 5	725	F: 5'- cagtccttgctccaccactt-3' R: 5'- agcatttgtggcttgctctt -3'	SCD1
	اگزون 5	395	F: 5'- cccattcgctcttgttctgt-3' R: 5'-gtcttgctgtggactgctga-3'	

تکثیر جایگاه های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز

واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ٢٥ میکرولیتر شامل ٢٠٠ نانوگرم نمونه DNA، ١٠ پیکومول بر میکرولیتر از هر آغازگر، ٢٠٠ میکرو مول از هر یک از نوکلئوتید تری فسفات، ١ واحد آنزیم پلی مراز، ٢/٥ میلی مولار $MgCl_2$ و بافر PCR (١x) انجام شد. تکثیر قطعات مورد نظر در دو ژن در ٣٥ چرخه با شرایط دمایی ٩٤ درجه سانتی گراد در ٥ دقیقه برای واسرشته سازی اولیه، ٩٤ درجه سانتی گراد در ٢ دقیقه برای واسرشته سازی، ٥٦ درجه سانتی گراد در ١ دقیقه برای اتصال، ٧٢ درجه سانتی گراد در ٢ دقیقه برای بسط و ٧٢ درجه سانتی گراد در ٧ دقیقه برای بسط نهایی انجام شد. در بررسی چند شکلیِ ژن دی آسیل گلیسرول آسیل کوآنزیمآ ترانسفراز ١ از آنالیز SSCP روی ژل پلی آکریلامید ١٠ درصد و برای دو جایگاه مختلف ژن SCD1 از آنزیم های محدود کننده *Alu*I و *Nco*I استفاده شد. برای انجام هضم آنزیمی در حجم نهایی واکنش ١٤ میکرولیتر، میزان محصول PCR و آنزیم مورد استفاده به ترتیب ٧ و ٠/٧ میکرولیتر در نظر

گرفته شد (نسبت ۱۰ به ۱). همچنین ۲ میکرولیتر از بافر آنزیم به حجم نهایی واکنش اضافه شد و سرانجام توسط آب مقطر حجم نهایی به ١٤ میکرولیتر افزایش یافت. نمونه‌ها در بن‌ماری و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت قرار گرفت. سپس نمونه‌ها از بن‌ماری خارج و روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و بعد از رنگ‌آمیزی، محصولات هضم مورد شناسایی قرار گرفتند.

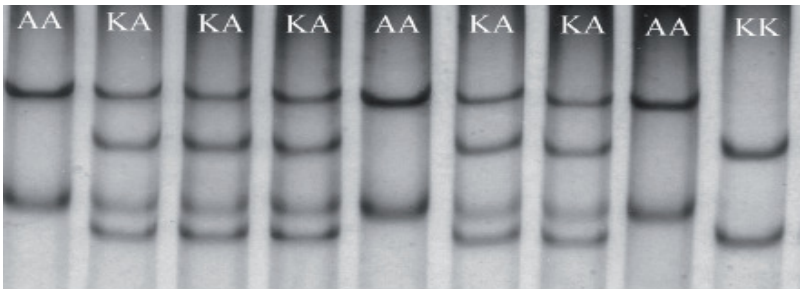
آنالیز آماری

در این تحقیق به منظور محاسبه فراوانی های ژنی و ژنوتیپی در جایگاه های مورد مطالعه و همچنین برای بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در هر یک از جایگاه ها در دو جمعیت، از نرم افزار POPGENE32 و برای مقایسه وفور ژنی و ژنوتیپی در بین دو نژاد به ترتیب از روش دقیق فیشر و آزمون مربع- کای و از بسته نرم افزاری SAS استفاده شد.

نتایج

تعیین ژنوتیپ

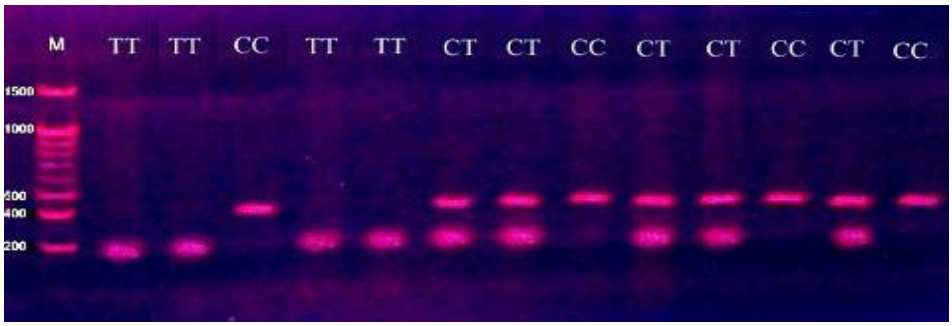
قطعه تکثیر شده در جایگاه دی اسیل گلیسرول اسیل ترانسفراز که قسمتی از اگزون ۸ و شامل ۱۷٦ جفت باز بود، با استفاده از روش PCR-SSCP آنالیز شد. در این تحقیق با ایجاد الگوهای متفاوت باندی دو آلل A و K و سه ژنوتیپ AA، AK و KK مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- نمونه ای از ژنوتیپ های مشاهده شده در جایگاه DGAT1.

Figure 1-Sample of observed genotypes in DGAT1 locus.

برای هضم آنزیمی قطعه ۷۲۵ جفت بازی ژن استروئیل کوآ دی استراز، از آنزیم برشی *Alu*I استفاده شد. در آلل V با یک جایگاه برش دو قطعه ٤٧٨ و ٢٤٧ جفت بازی و در آلل A بدون جایگاه برش یک قطعه ۷۲۵ جفت بازی روی ژل آگارز مشاهده شد. در شکل ۲ نمونه هایی از محصولات هضم برای این قطعه ژن SCD1 مشاهده می شود.



شکل ۲- نمونه هایی از محصولات هضم برای قطعه ۷۲۵ جفت بازی ژن SCD1.

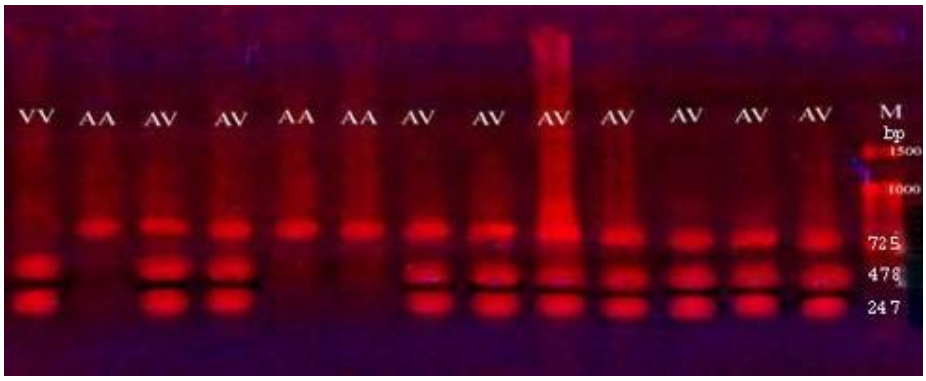
Figure 2- Samples of digested productions for 725bp fragment of SCD1 gene.

برای هضم آنزیمی قطعه ۳۹۵ جفت بازی ژن استروئیل کوآ دی استراز، از آنزیم برشی *Nco*I استفاده شد. در آلل T با یک جایگاه برش دو قطعه ۱۹۰ و ۲۰۵ جفت بازی و در آلل C بدون جایگاه برش برای آنزیم، یک باند ۳۹۵ جفت بازی روی ژل آگارز مشاهده شد. در شکل ۳ نمونه هایی از محصولات هضم برای این قطعه مشاهده می شود.

فراوانی ژنی و ژنوتیپی

جایگاه ژن دی‌آسیل‌گلیسرول‌آسیل کوآنزیم آ ترانسفراز

با توجه به الگوی مشاهده شده روی ژل پلی اکریل آمید پس از تک رشته ای کردن محصول PCR و با شمارش مستقیم، فراوانی های ژنی و ژنوتیپی محاسبه شد (جدول ۲). آنالیز داده‌ها نشان داد که جایگاه ژنی مورد نظر در هر دو جمعیت در تعادل هاردی-واینبرگ قرار ندارد.



شکل ۳- نمونه هایی از محصولات هضم برای قطعه ۳۹۵ جفت بازی ژن SCD1.

Figure 3- Samples of digested productions for 395bp fragment of SCD1 gene.

جدول ۲- درصد فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه ژن DGAT1.

Table 2- Frequency percent of gene and genotype for DGAT1 gene locus.

فراوانی آللی Allelic frequency		فراوانی ژنوتیپی Genotype frequency			نژاد Breed	
A	K	AA	AK	KK		
0.57	0.43	0.35	0.44	0.21	Simmental	سیمنتال
0.6	0.4	0.48	0.34	0.18	Holstein	هلشتاین

جایگاه اول استروئیل کوآ دی استراز

با توجه به الگوی مشاهده شده روی ژل اگارز پس از هضم آنزیمی محصول PCR و با شمارش مستقیم، فراوانی های ژنی و ژنوتیپی محاسبه شد (جدول ۳). این جایگاه ژنی در دو جمعیت نژاد هلشتاین و سیمنتال در تعادل هاردی- واینبرگ قرار داشته است.

جایگاه دوم ژن استروئیل کوآ دی استراز

با توجه به الگوی مشاهده شده روی ژل اگارز پس از هضم آنزیمی محصول PCR و با شمارش مستقیم، فراوانی های ژنی و ژنوتیپی محاسبه شد (جدول ٤). جایگاه ژنی مورد نظر در دو جمعیت نژاد هلشتاین و سیمنتال در تعادل هاردی- واینبرگ قرار داشته است.

جدول ۳- فراوانی ژنی و ژنوتیپی به دست آمده از جایگاه اول ژن SCD1.

Table 3- Resulted gene and genotype frequency of first locus of SCD1 gene.

فراوانی آللی Allelic frequency		فراوانی ژنوتیپی Genotype frequency			نژاد Breed	
A	V	AA	AV	VV		
0.08	0.92	0	0.16	0.84	Simmental	سیمنتال
0.21	0.79	0.23	0.43	0.34	Holstein	هلشتاین

مقایسه وفور آللی و ژنوتیپی جایگاه های مورد مطالعه در بین دو نژاد

مقایسه آماری وفور آللی و ژنوتیپی جایگاههای مورد مطالعه در بین دو نژاد نشان می دهد که جایگاه DGAT1 و جایگاه دوم ژن SCD1 از لحاظ فراوانی ژنی در بین دو نژاد یکسان و از لحاظ فراوانی ژنوتیپی در جایگاه DGAT1 متفاوت و در جایگاه SCD1 یکسان هستند. در حالی که در جایگاه اول ژن SCD1 فراوانی ژنی و ژنوتیپی در دو نژاد مختلف، متفاوت می باشد.

جدول ٤- فراوانی ژنی و ژنوتیپی به دست آمده از جایگاه دوم ژن SCD1.

Table -4 Resulted gene and genotype frequency of second locus of SCD1 gene.

فراوانی آللی Allelic frequency		فراوانی ژنوتیپی Genotype frequency			نژاد Breed
C	T	CC	CT	TT	
0.44	0.56	0.22	0.44	0.34	Simmental سیمنتال
0.4	0.6	0.2	0.4	0.4	Holstein هلشتاین

بحث

جایگاه دی‌آسیل‌گلیسرول‌آسیل کوآنزیم آ ترانسفراز

در پژوهشی Joanna Nowacka *et al.* *(2008)*، با دو روش PCR-SSCP وPCR-RFLP تعداد ۸۹ گاو نر هلشتاین فریزین لهستانی را در ژن دی‌آسیل‌گلیسرول‌آسیل کوآنزیم آ ترانسفراز مورد بررسی قرار دادند. دو آلل A و K را با فراوانی به ترتیب ٥٤ و ٤٦ درصد شناسایی کردند که ژنوتیپ KK نسبت به دو ژنوتیپ دیگر AA و AK با نسبت بالای پروتئین و محصول شیر در ارتباط بود. انجام SSCP در آزمایش این محققین نتایج آزمونRFLP را تایید کرد. در آزمایشات Ripoli *et al. (2006)*، با روش PCR-SSCP فراوانی ژنوتیپی AA، AK وKK به ترتیب ۱۸، ٥٥ و ۲۷ بود که با نتایج Kaupe *et al. (2007)*، با روش PCR-RFLP که فراوانی ژنوتیپی به ترتیب ۲۳،٥۰ و ۲۷ درصد را در قسمتی از اگزون ۸ جایگاه دی اسیل گلیسرول اسیل ترانسفراز برآورد کرده بودند یکسان بود. Kaupe *et al.* *(2007)*، نتوانستند آلل K را در قسمتی از اگزون ۸ جایگاه دی اسیل گلیسرول اسیل ترانسفراز در نژاد گاوهای گوشتی بلژیکی، گلبوه، هرفورد، پینزگارو سلاونین سیمین آشکار سازند. در چندین گزارش آمده است که فراوانی آلل K دامنه ای از ۲۷ تا ٦٥ درصد را در گاوهای هلشتاین فریزین دارد. همچنین آنالیز چند شکلی در دو گروه از گاوهای نر هلشتاین فریزین آلمانی که بین سال‌های ۱۹۹۳ تا ۱۹۹۸ و ۲۰۰۱ به دنیا آمده بودند، نشان داد که احتمالا این پیوستگی در افزایش آلل A در گاوهای نر در طول این سال ها به دلیل انتخاب پیوسته برای افزایش مقدار پروتئین در شیر بوده است. Hori-Oshima *et al.* (2003)، در پژوهشی در گاوهای مکزیکی فراوانی ژنوتیپی AA را ٦٦ و AK را ۳۲ و KK را ۲ درصد را در قسمتی از اگزون ۸ جایگاه دی اسیل گلیسرول اسیل ترانسفراز برآورد کردند. Kharati *et al. (2011)*، به بررسی تنوع ژنتیکی جایگاه ژن DGAT1 و میزان ارتباط آن با تولید شیر در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران پرداختند. آنها میزان اثر این ژن را روی تولید شیر ۳۰٥ روز در سطح ۰/۱ درصد معنی دار گزارش کردند. در

تحقیق دیگری Kharati *et al. (2012)*، به بررسی ارتباط چندشکلی آللی ژن *DGAT1* با بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین ایران پرداختند. آنها دریافتند که هیچ گونه ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ های مشاهده شده و سلول های بدنی شیر وجود ندارد.

جایگاه استروئیل کوآ دی استراز آغازگر اول و دوم

در پژوهشی Mele *et al. (2007)*، سه الگوی متفاوت باندی را در اگزون ۵ ژن استروئیل کوآ دی استراز توسط روش PCR- SSCP نشان دادند. تک باندهایی که در بالاترین و پایین ترین قسمت قرار داشتند به ترتیب ژنوتیپ هموزایگوس‌های VV و AA و دو باند نزدیک به هم ژنوتیپ هتروزایگوس (AV) بوده است. این ژنوتیپ ها با توالی یابی DNA نیز دقیقا مشخص و تائید شده است. در گاوهای هلشتاین ایتالیایی فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده با این روش به ترتیب ۲۷ درصد (AA) ، ٦٠ درصد (AV) و۱۳ درصد (VV) برآورد شده بود به طوریکه این ژنوتیپ‌ها در تعادل هاردی وینبرگ قرار نداشتند. این نتایج با نتایج بدست آمده در تحقیق Taniguchi *et al. (2004)* در اگزون ۵ ژن استروئیل کوآنزیم آ دی استراز مطابقت اما با نتایج بدست آمده در مطالعه ما در هر دو نژاد سیمنتال و هلشتاین مغایرت داشت. دلیل آن می-تواند به عوامل متفاوتی از جمله میزان خلوص نژادی، شدت انتخاب، صفات تحت انتخاب، اندازه و یا تعداد نمونه‌ها بستگی داشته باشد. طی مطالعاتی که Komisarek *et al. (2009)* در اگزون ۵ ژن استروئیل کوآ دی استراز در جایگاه دوم با روش PCR-RFLP انجام دادند یک قطعه ۳۳۳ جفت بازی را تکثیر و با آنزیم برشی Hin6I دو قطعه ۳۰٦ و۲۷ جفت بازی ایجاد که یک جایگزینی C/T را نشان داد. در مطالعات انجام گرفته توسط Milanesi *et al. (2009)* روی چند شکلی استروئیل کوآ دی استراز در گاوهای ایتالیایی سه هاپلوتیپ آشکار ساختند که یکی از آنها صرفا در نژاد بومی ایتالیایی وجود داشت و ارتباط معنی‌داری بین این هاپلوتیپ‌ها و اهداف انتخاب در این نژاد مشاهده نمودند. آنها با تکثیر یک قطعه ۵۵۲ جفت بازی از اگزون ۵ ژن استروئیل کوآ دی استراز در نژادهای مختلف ایتالیایی سه SNP را گزارش کردند که بیشترین فراوانی آلل A مربوط به نژاد گری آلپاین (۸۹ درصد) و کمترین فراوانی مربوط به نژاد گوشتی مارچیگیانا (۳۳ درصد) بود. در نژاد هلشتاین ایتالیایی در اگزون ۵ ژن استروئیل کوآ دی استراز در جایگاه اول (۲۸ نمونه) فراوانی آلل A (۰/۷۱) برآورد شد که با نتایج بدست آمده در تحقیق ما (۰/۵۷) در نژاد هلشتاین و (۰/۸۰) در نژاد سیمنتال مغایرت داشت. Moioli *et al. (2007)*، با تکثیر یک قطعه ۲۱۲ جفت بازی در اگزون ۵ استروئیل کوآ دی استراز در جایگاه دوم و بررسی چند شکلی آن در سه نژاد گاو ایتالیایی شامل جرسی، پدمونتس و والدوستانا فراوانی آلل C را به ترتیب ۹٤، ٤۲ و ٦۵ درصد بدست آوردند. فراوانی این آلل با نژاد سیمنتال و هلشتاین در

تحقیق حاضر تقریبا همانند نژاد پدومونتس ایتالیایی بود.

نتیجه گیری

مطالعات مختلف نشان می دهد که در سالیان متمادی در کشور، به دلیل اهداف اصلاح نژادی و واردات وسیع اسپرم به منظور پیشرفت سریع ژنتیکی، هدف افزایش مقدار شیر بوده و به ترکیبات بسیار مهم آن از قبیل اسیدهای چرب مفید توجهی نشده است. در صورتی که می‌توان طی یک برنامه منظم و بلند مدت، دام های دارای ژنوتیپ‌های مطلوب برای دیگر صفات مورد نظر را هم شناسایی و با انتخاب آن ها، میانگین گله را برای صفات مورد نظر در دوره‌های بعد بهبود بخشید. بنابراین با توجه به تنوع مشاهده شده در این مطالعه می توان نتیجه گرفت که جایگاه های مورد مطالعه برای انتخاب دام های دارای ژنوتیپ مطلوب برای افزایش تولید اسیدهای چرب مفید شیر، مناسب می باشند.

منابع

Bauman DE, Mather IH, Wall RJ, Lock AL (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. Journal of Dairy Science 89: 1235–1243.

Chen N, Liu L, Zhang Y, Ginsberg HN, Yu YH (2005). Whole-body insulin resistance in the absence of obesity in FVB mice with overexpression of Dgat1 in adipose tissue. Diabetes 54: 3379

Corl BA, Baumgard LH, Dwyer DA, Griinari JM, Phillips BS, Bauman DE (2001). The role of Δ9-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. Journal of Nutrition Biochemistry 12: 622–630.

Friedman J (2002). Fat in all the wrong places. Nature 415: 268–269.

Hori-Oshima S, Barreras-Serrano A (2003). Relationship between DGAT1 and Pit1 genes polymorphism and milk yield in Holstein cattle. Proceeding of western section, American society of animal science 54.

Islas-Trejo A, Fragment Johnson A, Medrano JF (2002). Genomic structure and expression of the bovine stearoyl-CoA desaturase gene. Plant, Animal and Microbe Genomes Conference, San Diego, pp.766

Joanna Nowacka WA, Marek switonski T (2008). An effect of the *DGAT1* gene polymorphism on breeding value of Polish Holstein-Friesian sires. Animal Science. Papers and Reports 1: 17-23.

Kaupe B, Brandt H, Prinzenberg EM, Erhardt G (2007). Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle. Journal of Animal Science 85: 11-21.

Kharati Kopaei H, Mohammadabadi M, Ansari Mahyari S, Esmaeilizadeh Kashoyeh A, Torang A, Nikbakhti M (2011). Study of polymorphism of DGAT1 gene and its association with milk production in Iranian Holstein cow's population. Journal of Iran Animal Science Researches 3: 185-192.

Kharati Kopaei H, Mohammadabadi M, Torang A, Kharati Kopaei M, Esmaeilizadeh Kashoyeh A, (2012). Study of polymorphism association of DGAT1 gene with mastitis disease in Iranian Holstein cow's population. Journal of Modern Genetics 7:101-104.

Komisarek Z, Dorynek *et al* (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 pp. 125–132.

Li C, Basarab J, Snelling WM, Benkel B, Murdoch B, Mansen C, Moore SS (2004). Assessment of positional candidate genes MYF-5 and IGF-1 for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of Bos Taurus. Journal of Animal Science 82: 1-7.

Medrano JF, Islas-Trejo AD, Johnson AM, De Peters EJ (2003). Genomic structure and expression of the bovine stearoyl- CoA desaturase gene. GenBank accession, number AY241933. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html Sept. 2006.

Mele M, Conte G, Castiglioni B, Chessa S, Macciotta NPP, Serra A, Buccioni A, Pagnacco G, Secchiari P (2007). Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Gene Polymorphism and Milk Fatty Acid Composition in Italian Holsteins. Journal of Dairy Science 90: 4458–4465.

Milanesi E, Nicoloso L, & Crepaldi P *et al* (2009). Stearoyl CoA desaturase (SCD) gene polymorphisms in Italian cattle breeds. Journal of Animal Breed Genetics pp 2668.

Miller SA, Dykes DD, Paletsky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research 16: 1214-1215.

Moioli B, Contarini G, Avalli A, Catillo G, Orru L, De Matteis G, Masoero G, Napolitano F (2007). *Short Communication:* Affect of Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Polymorphism on Fatty Acid Composition of Milk. Journal of Dairy Science 90: 3553–3558.

Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD (2002). Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. Proceeding of the National Academy of Sciences. USA 99: 11482–11486pp.

Pareek CS, Czarik U, Zabolewicz T, Pareek RS, Walawski K (2005). DGAT K232A quantitative trait nucleotide polymorphism in Polish Black-and- White cattle. Journal of Applied Genetics 46: 85.

Ripoli MV, Corva P, Giovambattista G (2006). Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. Journal Research Veterinary Science 80: 287-90.

Stone SJ, Myers H, Brown BE, Watkins SM, Feingold KR, Elias PM, Farese RV (2004). Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2- deficient mice. The Journal of Biological Chemistry 279: 11767–11776.

Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S (2004). Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. Mammalian Genome 14: 142–148.

Thaller G, Kramer W, Winter A, Kaupe B, Erhart G (2003). Effect of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. Journal of Animal Science 81: 1911.

Weller JI, Kashi Y, Soller M (1990). Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. Journal of Dairy Science 73: 2525-2537.

Winter A, Kramer W, Werner FAO, Kollers S, Kata S, Durstewitz G, Buitkamp J (2002). Association of a lysine-232/ alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diaylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. Proceedings of the National Academy of Sciences 14: 93-*99*.

Yangerman SM, Oliver SP, Saxton AM, Edwards JL, Schrick FN, Davies CJ Pighetti GM (2003). A novel candidate genetic marker for mastitis resistance in jersey cattle. Journal of Animal Science 160: 69-73.

Comparison of Genetic Structure of DGAT1 and SCD1 Loci between Holstein and Simmental Population

Rezaei M.[1], Rahimi G.[1], Ansari Z.[1], Rahbar R.[*2]

[1] Laboratory for Molecular Genetics and Animal Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran.
[2] Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Abstract

The association of genes polymorphism of DGAT1 and SCD1 has proved with milk nutritive value. The aim of the present study was the comparison of genetic structure of DGAT1 and SCD1 loci between Holstein and Simmental population. 102 Mazandaran Simmental and Holstein cows were randomly selected and done blooding of neck vein. In digestion of SCD1 PCR products (725bp) with *Alu*I enzyme, two alleles V and A were revealed with the frequency of 79 and 21 percent and 92 and 8 percent in Holstein and Simmental breeds, respectively. In digestion of the 325bp fragment of this gene with *Nco*I enzyme, two alleles of C and T were detected with the frequency of 40 and 60 percent and 45 and 55 percent in Holstein and Simmental breed, respectively. Two alleles of A and K were detected from amplification of DGAT1 locus with the frequency of 60 and 40 percent and 57 and 43 percent in Holstein and Simmental population, respectively. The result of statistical comparison of genotype and allele frequency in studied loci between two breeds indicates that DGAT1locus and second locus of SCD1 gene are same as gene frequency between two breeds and are different as genotype frequency in DGAT1 locus and are same as genotype frequency in SCD1 locus. According to observed polymorphisms, we can result that studied loci are fit for selection of animals with favorite genotype for increasing of production of milk useful fatty acids.

Key words: DGAT1, SCD1, PCR, Holstein, Simmental.

[*] Corresponding Author: Rahbar R. Tel: 09111285120 Email: rahbarrabie@gmail.com