دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد سوم، شماره چهارم، ۱۳۹۴
http://ejrr.gau.ac.ir

بررسی چندشکلی اینترون دوم ژن پرولاکتین و ارتباط آن با تولید شیر در گوسفند کردی شیروان

فاطمه کاظمی برزل‌آباد[۱]، *سعید حسنی[۲]، فیروز صمدی[۲]، مجتبی آهنی آذری[۲] و داوود علی‌ساقی[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و [۲]دانشیار دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار بخش علوم دامی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۰۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۰۹

چکیده

سابقه و هدف: این پژوهش به‌منظور بررسی ارتباط چند شکلی ژن پرولاکتین با تولید شیر گوسفند کردی شیروان انجام گرفت. پرولاکتین یک هورمون لاکتوژنیک است که نقش قابل توجهی در تولید شیر دارد و کاهش آن باعث کاهش شدید تولید شیر می‌شود. ژن پرولاکتین به‌عنوان یک ژن کاندید مؤثر بر تغییرات عملکرد تولید شیر مطرح است. بر اساس تحقیقی که بر روی چندشکلی ژن پرولاکتین در گوسفند چویز انجام شد، یک منطقه ۲۳ جفت باز ایندل (حذف- اضافه) در موقعیت ۲۱۳ شناسایی شد و مشخص شد که آلل B از حذف bp ۲۳ از آلل A به‌دست آمد. فراوانی آلل‌های A و B به‌ترتیب ۰/۷۱ و ۰/۲۹ برآورد شد و نشان داده شد که آلل B در تولید شیر بیشتر مؤثر است. تحقیق حاضر به منظور بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده در ژن پرولاکتین با رکوردهای روز آزمون تولید شیر میش‌های کردی ایستگاه پرورش و اصلاح‌نژاد حسین‌آباد شیروان انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از ۱۰۰ رأس میش رکوردگیری شده در ایستگاه پرورش و اصلاح‌نژاد گوسفند کردی شیروان به‌طور تصادفی خونگیری شد و رکوردگیری تولید شیر به روش شیردوشی دستی توأم با وزن‌کشی بره هر ۱۴ روز و از اردیبهشت تا مرداد سال ۱۳۹۱ انجام شد. ژنوتیپ‌های حیوانات از روی تعداد باندها و جایگاه تشکیل باندها بعد از PCR تعیین گردید؛ به‌منظور محاسبه فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی و

*مسئول مکاتبه: saeedh_2000@yahoo.com

همچنین آزمون کای مربع و برای بررسی تعادل هاردی- واینبرگ، از نرم‌افزار POP Gene 1.32 استفاده شد. پس از تشخیص ژنوتیپ‌ها، تجزیه آماری به‌منظور تشخیص ارتباط ژنوتیپ‌های مذکور با رکوردهای روز آزمون تولید شیر در دو رویه INBREED و MIXED نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات با آزمون توکی- کرامر در سطوح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

یافته‌ها: ۲۳ جفت باز ایندل (حذف- اضافه) در ژن پرولاکتین شناسایی و ژنوتیپ‌ها در مرحله PCR مشخص گردید. ارتباط بین چندشکلی ژن مورد بررسی با رکوردهای تولید شیر روزآزمون با استفاده از یک مدل مختلط مورد بررسی قرار گرفت. ژنوتیپ AA بیشترین فراوانی ژنوتیپی (۰/۶۰) را در گله مورد مطالعه داشت. همچنین میزان فراوانی آلل‌های A و B به‌ترتیب ۰/۷۶۵ و ۰/۲۳۵ به‌دست آمد. نتایج مشخص نمود که رابطه معنی‌داری بین چند شکلی ژن پرولاکتین و تولید شیر در جمعیت مورد مطالعه وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: در تحقیق حاضر چون اثر ژنوتیپ‌های ژن پرولاکتین بر تولید شیر معنی‌دار نشده است، نمی‌توان اظهار داشت که کدام ژنوتیپ مطلوب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گوسفند، تولید شیر، ژن پرولاکتین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

شیر یکی از محصولات با ارزش گوسفند در تأمین بخشی از نیازهای پروتئینی جامعه است. علاوه‌بر این، شیر اولین و مهمترین منبع غذایی بره‌ها به‌ویژه در سنین اولیه است. تأثیر تولید شیر بر روی وزن از شیرگیری ناشی از تنوع در توانایی تولید شیر ژنوتیپ‌های قابل دسترس در شرایط منطقه می‌باشد.

تعیین مقدار تولید شیر میش‌ها اطلاعاتی را در مورد بهبود مدیریت مناسب و استراتژی‌های تغذیه‌ای برای میش‌ها و بره‌ها در اختیار قرار می‌دهد (۵). تجربه در گاو شیری نشان داد که تولید شیر یک صفت محدود به جنس می‌باشد که با وراثت‌پذیری متوسط پس ازبلوغ بیان می‌شود و می‌توان آن را در طی یک انتخاب کلاسیک بهبود بخشید، اما در صنعت پرورش گوسفند شیری عدم استفاده از تکنیک‌های تلقیح مصنوعی و فقدان یک سیستم ثبت رکوردگیری استاندارد شده دو محدودیت عمده می‌باشد. با توجه به این محدودیت‌ها نیاز به استفاده از نشانگرهای مولکولی به‌عنوان یک ابزار ژنومی برای افزایش تولید شیر گوسفند امری حیاتی است (۱۷).

پرولاکتین یک هورمون لاکتوژنیک است که نقش قابل توجهی در تولید شیر دارد و کاهش آن باعث کاهش شدید تولید شیر می‌شود (۹). ژن پرولاکتین به عنوان یک ژن کاندید مؤثر بر تغییرات عملکرد تولید شیر است به علاوه، این ژن در ناحیه‌ای از کروموزوم ۲۰ گوسفند قرار گرفته است (۱۳) و دارای ۵ اگزون و ۴ اینترون می‌باشد. طول آن از کدون شروع ترجمه تا کدون پایانی ترجمه ۸ کیلو باز می‌باشد (۱۲). یکی از جایگاه‌های مهم این ژن در گوسفند اینترون ۲ می‌باشد. اینترون‌ها طی مراحل رونویسی حذف می‌گردند در واقع در ساخت پروتئین این نواحی حذف می‌گردند. حال می‌توان نقش این نواحی حذف شده را در پروتئین‌سازی این‌طور توجیح کرد که حذف‌های اینترونی در ترکیب ژنوم پستانداران امری معمولی است و عامل اصلی تنظیمی، تسهیل کننده شروع یا مانع فعالیت رونویسی می‌باشد (۴). چند شکلی قطعه اینترونی (ILP) به‌عنوان نشانگرهای مولکولی شناخته شده است. نکته کلیدی در توسعه یافتن نشانگرهای ILP، تشخیص اینترون مناسب است (۱۰). در این میان ژن پرولاکتین در ترشح شیر حائز اهمیت می‌باشد و چندشکلی اینترونی ژن پرولاکتین به علت حذف مناسبی است که صورت گرفته است (۱۳).

وینسنت و راتسچیلد (۱۹۹۷) چندشکلی ژن پرولاکتین را در اینترون ۲ به روش PCR_RFLP در گوسفندان سافولک شناسایی کردند (۱۸). راموس و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی روی میش‌های سرادا استریلا و مرینوس‌های سیاه و سفید پرتغالی در اینترون ۲ ژن پرولاکتین اعلام نمودند که فراوانی آلل

A در هر سه نژاد بیشتر از آلل B می‌باشد. در نژاد سرادا استریلا، ژنوتیپ AB تولید شیر بیشتری نسبت به بقیه داشت اما در نژادهای مرینوس تفاوت معنی‌داری بین ژن پرولاکتین و صفات تولید شیر و ترکیبات وجود نداشت (۱۴).

استایگر و همکاران (۲۰۱۰) بر روی میش‌های فریزین شرقی دریافتند میش‌هایی که حامل آلل A هستند ۱۱۰ گرم شیر بیشتری نسبت به میش‌های دارای آلل B تولید می‌کنند (۱۷). ارفورد و همکاران (۲۰۱۰) چندشکلی ژن پرولاکتین را در گوسفند چویز به روش PCR بررسی کردند، آن‌ها یک منطقه ۲۳ جفت باز ایندل (حذف- اضافه) در موقعیت ۲۱۳ شناسایی کردند که آلل B از حذف bp ۲۳ از آلل A به‌دست می‌آیند و فراوانی آلل A و B را به‌ترتیب ۰/۷۱ و ۰/۲۹ اعلام کردند و نشان دادند که آلل B در تولید شیر بیشتر مؤثر است (۱۳).

ژن پرولاکتین در پستانداران دیگر همچون گاو و بز نیز در صفات تولید شیر مؤثر می‌باشد البته در بز علاوه‌بر تولید شیر در چرخه رشد مو هم مؤثر می‌باشد (۱۰) و چیو و همکاران (۲۰۰۸) تأثیر این ژن را بر روی صفت دوقلوزایی در گوسفند نژاد هان گزارش کردند (۶). مریوانی و رستم‌زاده (۲۰۱۲) با چندشکلی ژن پرولاکتین را در بزهای مرخز کردستان بررسی کردند آن‌ها فروانی آلل‌های A را ۰/۰۱۹۵ و آلل C ۰/۹۸۰۵ گزارش کردند و این ژن را به‌عنوان ژن کاندید مؤثر بر صفت موهر معرفی کردند (۱۱). علی‌پناه و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی ارتباط ژن پرولاکتین بر روی صفات تولید شیر بر روی گاو رد پید روسی تأثیر معنی‌داری بین مقدار تولید، چربی و پروتئین شیر دریافتند (۱). قاسمی و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی ارتباط این ژن بر روی صفات تولید شیر در گاوهای مونته بلیارد نشان دادند که گاوها با ژنوتیپ AA تولید شیر بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها دارد (۷). بریم و همکاران (۲۰۰۴) تأثیر معنی‌دار ژن پرولاکتین در تولید شیر در گاوهای سیاه و سفید را گزارش کردند (۳).

با توجه به مطالب فوق و با نظر به این‌که در گوسفند نژاد کردی شیروان تحقیقی در زمینه ارتباط تولید شیر با ژن‌های مرتبط صورت نگرفته است، تحقیق حاضر به منظوربررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده در ژن پرولاکتین با رکوردهای روز آزمون تولید شیر میش‌های کردی ایستگاه پرورش و اصلاح‌نژاد حسین‌آباد شیروان انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق از میش‌های ایستگاه پرورش و اصلاح‌نژاد گوسفند کردی شیروان واقع در روستای حسین‌آباد شهرستان شیروان، استان خراسان شمالی استفاده شد. در این گله تعداد میش‌های

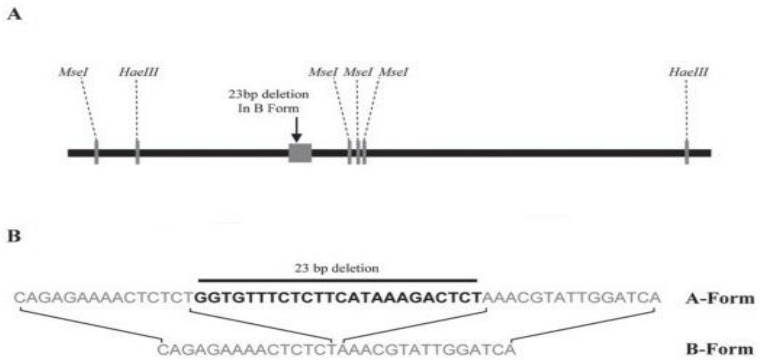
مولد ۳۰۰ و تعداد قوچ‌ها ۲۰ رأس بود. در این تحقیق از ۱۰۰ رأس میش رکوردگیری شده در ایستگاه پرورش و اصلاح‌نژاد گوسفند کردی شیروان به‌طور تصادفی از رگ وداج با استفاده از سرنگ ونوجکت ۱۰ سی‌سی خونگیری شد و نمونه‌ها در لوله‌های حاوی محلول ضد انعقاد خون به نام اتیلن دی امین تترا استیک اسید نیم مولاردر داخل یخ به آزمایشگاه ژنتیک ایستگاه منتقل گردید و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA به کمک روش گوانیدین ایزو تیوسیانات- سیلیکاژل (۲) و با استفاده از کیت استخراج (شرکت سیناژن) انجام گرفت. در این کیت روش استخراج مبتنی بر استفاده از ایزو تیوسیانات گوانیدین به عنوان یک عامل لیزکننده سلول‌های خونی و جمع‌آوری DNA آزاد شده به کمک ذرات سلیکا استخراج شده بود. در این پژوهش برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از دو روش الکتروفورز روی ژل آگارز و روش اسپکتوفتومتری استفاده شد.

با توجه به این‌که محصول PCR با استفاده از مارکر RFLP قطعه بزرگی (۲/۵ کیلو جفت باز) می‌باشد.

(Sequence GenBank accession no. NC 007324)

و به‌منظور کاهش هزینه‌های تعیین چندشکلی و صرفه‌جویی در زمان، ارفورد و همکاران (۲۰۱۰) با توالی‌یابی مستقیم DNA از محصولات PCR دریافتند که آلل B حاصل حذف ۲۳ جفت باز از ۲ سایت هضمی آنزیم HaeIII می‌باشد (شکل ۱) (۱۳).



شکل ۱- ساختار مولکولی واریانت‌های A و B ژن پرولاکتین گوسفندی، حذف توالی DNA داخل اینترون ۲ ژن پرولاکتین (B).

Figure 1. Molecular characterization of ovine prolactin variants A and B. DNA sequence of the deletion within intron 2 of the ovine PRL gene (B).

پرایمر جدیدی بر این اساس طراحی شد تا بدون نیاز به واکنش هضم آنزیمی و همزمان، با توجه به حذف صورت گرفته در آلل امکان تعیین ژنوتیپ حیوانات فراهم گردد (GenBank with accession numbers HM234397). با توجه به موارد ذکر شده تصمیم بر این شد تا از این روش در تعیین ژنوتیپ، در این پژوهش استفاده گردد به همین منظور جهت تکثیر قطعات ۲۱۳ و ۱۹۰ جفت بازی انترون ۲ این ژن از آغازگرهای پیشنهادی ارفورد و همکاران (۲۰۱۰) که شامل توالی زیر بود، استفاده شد (۱۳).

آغازگر رفت: 5′TCTGCTAAGGGCTCTGCCTA 3′

آغازگر برگشت: 5′ACAAGGGAAGCCCAGAAGAT 3′

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۲ میکرولیتر انجام گرفت. به طوری‌که برای هر واکنش ۶ میکرولیتر Master Mix، ۲/۵ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰۰-۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۲ میکرولیتر مخلوط آغازگرها با غلظت ۵ پیکومول بر میکرولیتر استفاده شد و در نهایت برای رسیدن حجم نهایی واکنش به ۱۲ میکرولیتر از آب دو بار تقطیر استفاده شد. برنامه حرارتی برای تکثیر ناحیه ژنی مورد نظر از این ژن در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- برنامه حرارتی برای تکثیر ژن پرولاکتین.

Table 1. Thermal program for prolactin gene extension.

تعداد چرخه Cycle number	زمان Time	دما (سانتی‌گراد) Temperature	مرحله Step
1	5'	94	واسرشته‌سازی اولیه DNA Initial denaturation
35	30"	94	واسرشته سازی DNA Denaturation
	30"	60	اتصال آغازگرها Annealing
	30"	72	سنتز Extension
1	5'	72	تکثیر نهایی Final extension

': min, ": sec

محصولات تکثیر شده ژن پرولاکتین توسط PCR بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد منتقل شد. مقدار ۵ میکرولیتر محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شده و در چاهک مربوطه قرار داده شد. مدت زمان الکتروفورز ۲ ساعت و با ولتاژ ۱۸۰ ولت بود. جهت مقایسه و ارزیابی، مقدار ۱ میکرولیتر نشانگر استاندارد ۵۰ جفت باز استفاده شد. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره استفاده شد.

ژنوتیپ‌های حیوانات از روی تعداد باندها و جایگاه تشکیل باندها بعد از PCR تعیین گردید؛ به منظور محاسبه فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی و همچنین آزمون کای مربع و برای بررسی تعادل هاردی- واینبرگ، از نرم‌افزار POP Gene 1.32 استفاده شد (۲۰).

برای به‌دست آوردن اطلاعات فنوتیپی از تولید شیر این حیوانات به روش شیردوشی دستی توأم با وزن‌کشی بره هر ۱۴ روز و از اردیبهشت تا مرداد سال ۱۳۹۱ رکوردگیری انجام شد (۸). بره‌ها ۱۲ ساعت قبل از مادرشان جدا و سپس میش‌ها با دست دوشیده شدند و شیر آن‌ها وزن شده و آنگاه پس از وزن کردن بره‌ها به آن‌ها اجازه مکیدن داده شد و دوباره توزین شدند. اختلاف اوزان بره‌ها محاسبه شده و با مقدار شیر به‌دست آمده از طریق دوشش با دست جمع گردید تا مقدار تولید شیر روزانه به‌دست آمد.

تجزیه آماری به‌منظور تشخیص ارتباط ژنوتیپ‌های مذکور با این صفات با دو رویه INBREED و MIXED نرم‌افزار SAS 9.1 (۱۶) و مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات با آزمون توکی- کرامر در سطوح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد و با نرم‌افزار CFC 1.0 (۱۵) ساختار جمعیتی گوسفند کردی مورد مطالعه قرار گرفت.

مدل آماری ۱ برای آنالیز داده‌ها استفاده شد:

مدل آماری ۱ (۱۷)

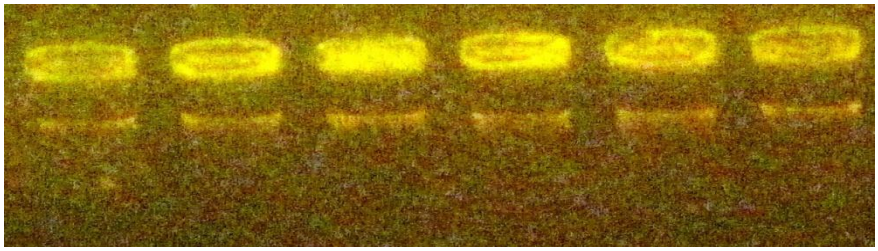
$$y_{ijklm}=\mu+G_i+Ls_j+Rm_k+A_l+DL_{m(k)}+e_{ijklm}$$

در این مدل:

y_{ijklm}: مقدار تولید شیر در هر روز آزمون، μ: میانگین کل تولید شیر، G_i اثر ثابت iامین ژنوتیپ، Ls_j: اثر ثابت j امین تعداد بره در هر زایش،: اثر ثابت k امین ماه رکوردگیری، A_l: اثر تصادفی میش، $DL_{m(k)}$: اثر تصادفی روزآزمون و شکم زایش داخل میش، e_{ijklm}: اثر تصادفی باقیمانده بود.

نتایج و بحث

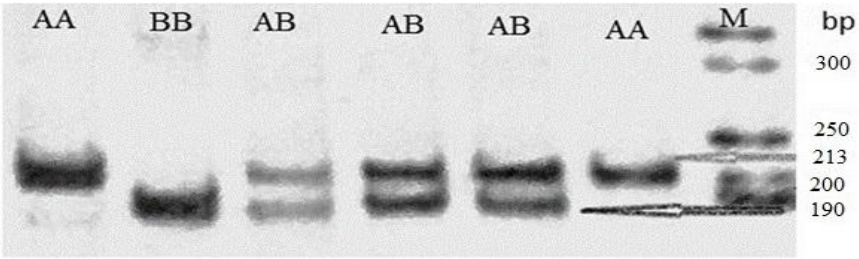
استخراج DNA از تمامی نمونه‌ها به خوبی انجام شد و از کیفیت خوبی برای ادامه آزمایش برخوردار بود (شکل ۲).



شکل ۲- نمونه‌های تصادفی DNA استخراج شده میش‌های کردی بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.

Figure 2. Random samples of extracted DNA of Kurdi ewes on 0.8% agar gel.

در شکل ۳ هر یک از ژنوتیپ‌ها بر روی ژل اکریل‌آمید ۸ درصد نشان داده شده‌اند. فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی در جدول ۲ ارائه شده است.



شکل ۳- نمونه‌ای از ژنوتیپ‌های مختلف پرولاکتین. M: نشانگر اندازه bp ۵۰.

Figure 3. A sample of different prolactin genotypes. M: DNA ladder 50bp.

فراوانی آلل A (۰/۷۶۵) در این تحقیق بیشتر از آلل B (۰/۲۳۵) بود (جدول ۲) که با نتایج ارفورد و همکاران (۲۰۱۰) که فراوانی آلل A را در نژاد چویز ۰/۷۴ به‌دست آوردند و نیز تحقیق دیگری که در آن فراوانی آلل A در گوسفندان نژاد سرادا استریلا و مرینوس‌های سیاه و سفید به‌ترتیب ۰/۶۳، ۰/۵۷ و ۰/۷۲ مشاهده شد مطابقت داشت (۱۳ و ۱۴). اما وینست و راتسچیلد (۱۹۹۷) فروانی آلل A را در گوسفند بومی (۰/۳۱) کمتر از آلل B (۰/۶۹) گزارش کردند (۱۸). استایگر و همکاران (۲۰۱۰) با تحقیق بر روی میش‌های فریزین، فراوانی آلل A (۰/۱۳) را کمتر به‌دست آوردند (۱۷).

جدول ۲- فراوانی ژنی و ژنوتیپی ژن پرولاکتین.

Table 2. Prolactin genes and genotypes frequencies.

فراوانی آللی Allele frequency	فراوانی ژنوتیپی Genotype frequency	تعداد Number	ژنوتیپ Genotype
0.765 (A)	0.60	60	AA
	0.33	33	AB
0.235 (B)	0.07	7	BB

علت این شباهت‌ها و تفاوت‌ها را در نوع نژادها و موقعیت جغرافیایی آن‌ها می‌توان جستجو کرد. پس از به‌دست آوردن فراوانی ژنی و ژنوتیپی، از آزمون کای مربع جهت تعیین وجود یا عدم وجود تعادل هاردی واینبرگ استفاده شد که نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است و نتایج نشان‌دهنده وجود تعادل هاردی واینبرگ در جامعه می‌باشد که در خصوص عدم تعادل جمعیت گوسفند مرینو و سردا استریلا مغایرت داشت. بنابراین، به‌نظر می‌رسد عوامل بر هم زننده تعادل به‌ویژه انتخاب و مهاجرت بر روی این ژن در این جامعه مؤثر نبوده‌اند. در واقع نشان می‌دهد که انتخابی بر اساس آلل‌های موجود در این جایگاه در جمعیت گوسفند کردی شیروان در جهت افزایش یا کاهش صفات فنوتیپی موردنظر صورت نگرفته است چرا که سیاست کلی انتخاب در این ایستگاه غالباً بر اساس وزن یک ماهگی بره‌ها صورت می‌گیرد و آمیزش‌ها در این جمعیت به‌صورت جفت‌گیری کنترل شده می‌باشد. مهاجرت به‌خصوص در مورد نرهایی که خارج از گله وارد می‌شود باعث بر هم زدن تعادل می‌شود که گویا این مهاجرت در این مورد در ایستگاه صورت نگرفته است چرا که این مهاجرت‌ها باعث یک جریان ژنی می‌شود.

جدول ۳- آزمون مربع کای برای بررسی تعادل هاردی واینبرگ.

Table 3. Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium.

ژنوتیپ Genotyp			تعداد Number
BB	AB	AA	
7	33	60	تعداد مشاهده شده (O) Observed number
5.4322	36. 1357	58.4322	تعداد مورد انتظار (E) Expected number
0.4525	0.2721	0.0421	$(O-E)^2/E$
	^{NS} 0.766		χ^2

NS: notsignificant, P >0.05

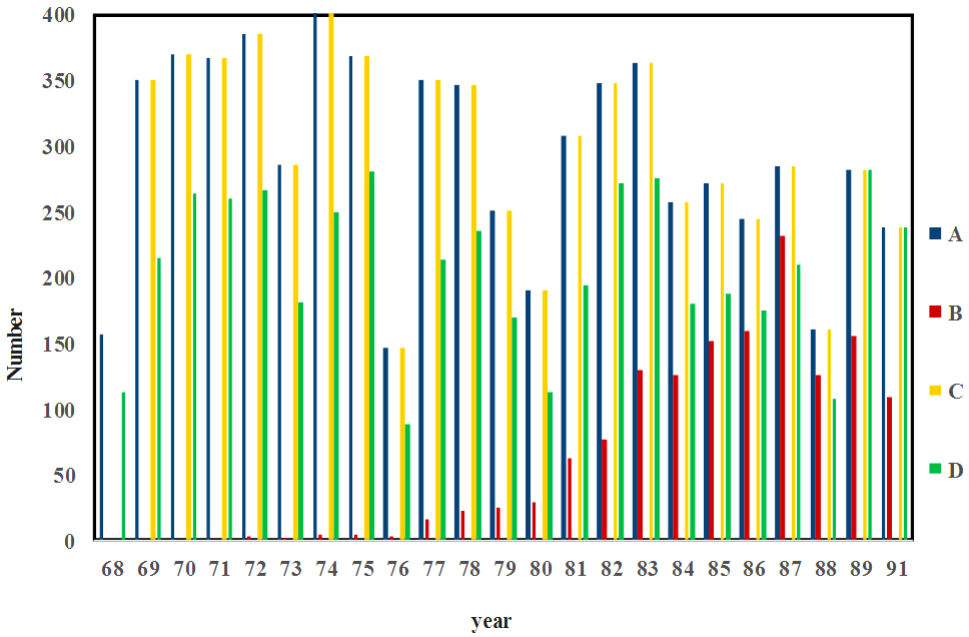
براساس هتروزیگوسیتی مشاهده شده (جدول ۴) تنوع ژنتیکی پایینی مشاهده گردید کـه مـی‌تـوان علت آن را در سیستم نگهداری بسته ایستگاه جستجو کرد. احتمالاً عدم استفاده از قوچ‌هـای اصـلاحی سایر گله‌ها، باعث افزایش سطح هم خونی و به دنبال آن کاهش سطح هتروزیگوتی شده است.

جدول ۴- میزان هتروزیگوتی و شاخص اطلاعات شانون.

Table 4. Heterozygosity value and Shannon's Information index.

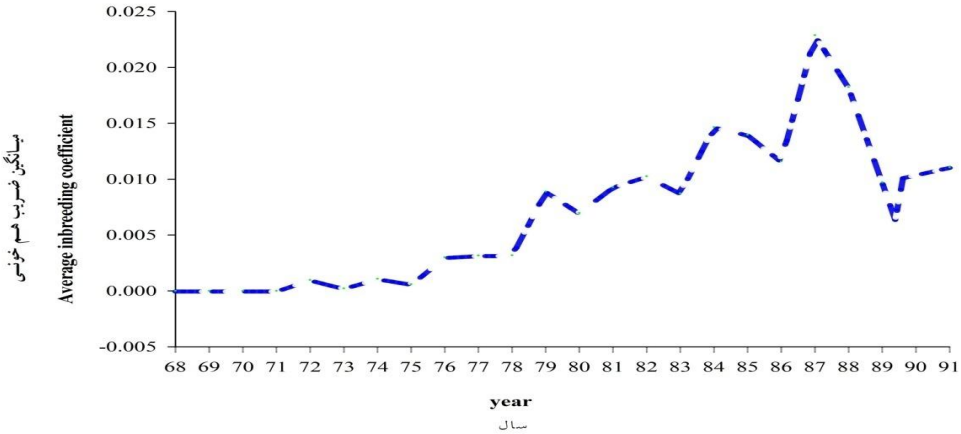
اطلاعات Information	میزان Value
شاخص اطلاعات شانون Shannon's Information index	0.5452
متوسط هتروزیگوسیتی Heterozygosity Mean	0.3596
شاخص نئی (Nei) expected heterozygosity	0.3596
درجه آزادی Degree of freedom	1
سطح احتمال Probability	0.3812

با توجه به شکل ۴ میزان افراد هم خون در گله از سال ۷۷ تا سال ۸۷ بالا رفته و سپس با شیب ملایمی در حال کاهش می‌باشد و تعداد افراد مولد در جمعیت، کمی از دهه ۷۰ کاهش یافته است، این موضوع را می‌توان در مورد میزان نرخ ضریب هم خونی در شکل ۵ در طی سال‌های مورد آزمون، با بالاترین نرخ در سال ۸۷ مشاهده کرد. افزایش هم‌خونی باعث کاهش تنوع ژنی در جمعیت گوسفند کردی شده است. تغییر در برنامه‌های اصلاح‌نژادی ایستگاه توانسته نرخ هم‌خونی را کاهش دهد و احتمالاً افت هتروزیگوتی را در جمعیت گوسفند کردی شیروان بهبود بخشد.



شکل ۴- تعداد افراد در جمعیت گوسفند کردی شیروان در سال‌های مختلف **A**: تعداد کل افراد، **B**: تعداد افراد هم خون، **C**: تعداد افراد با والدین مشخص، **D**: تعداد افراد بدون والدین مشخص).

Figure 4. Number of individuals in Shirvan Kurdi sheep station population over the years (A: Number of individuals, B: Number of inbreds, C: Number of individuals with both known parents, D: Number of individuals with no progeny).



شکل ۵- میانگین ضریب هم خونی در سال‌های مختلف در گوسفند کردی شیروان.

Figure 5. Average inbreeding in Shirvan Kurdi sheep station populationin different years.

در میان ژن‌های کاندید ژن پرولاکتین به دلیل نقش مهمی که در توسعه غدد پستانی و شروع و حفظ شیردهی دارد، مورد توجه زیادی می‌باشد. در این مطالعه ارتباط بین چندشکلی ژن پرولاکتین با صفت تولید شیر روزآزمون در گله میش‌های کردی شیروان با یک ساختار شجره مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر بین ژنوتیپ‌های مختلف ژن پرولاکتین و صفت تولید شیر ارتباط معنی‌داری یافت نشد (جدول ۵). میانگین‌های حداقل مربعات رکوردهای روزآزمون صفت تولید شیر در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۵- آزمون معنی‌داری اثرات ثابت برای تولید شیر روزآزمون.

Table 5. Significant test of fixed effects for test day milk yield.

P>F	F	اثرات ثابت Fixed effects
0.0001	17.70	ماه رکوردگیری Month of recording
0.31	1.03	تعداد بره‌ها در هر زایش Litter size
0.92^{NS}	0.08	ژنوتیپ Genotype

NS: not significant, P >0.05

جدول ۶- مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات تولید شیر روزآزمون ژنوتیپ‌های ژن پرولاکتین (اینترون ۲).

Table 6. Least squares means comparison for test day milk yield in different prolactin genotypes (intron 2).

میانگین ± خطای استاندارد (گرم) Mean ± Standard error(gr)	ژنوتیپ Genotype
424.93±22.30	AA
424.09±23.48	AB
440.93±42.74	BB

راموس و همکاران (۲۰۰۹) اثر چند شکلی ژن پرولاکتین را بر روی نژادهای سرادا استریلا و مرینو انجام دادند و دریافتند که در نژاد سرادا استریلا چندشکلی ژن پرولاکتین رابطه معنی‌داری با تولید شیر و درصدهای چربی و پروتئین دارد و میش‌های دارای ژنوتیپ AB تولید شیر بیشتری دارند و آلل B در تولید شیر بیشتر نقش دارد. اما تفاوت معنی‌داری در نژاد مرینو مشاهده نشد آن‌ها دلایلی

همچون اندازه کوچک نمونه و اینکه جهش مورد آزمون، اثر مستقیمی روی تولید شیر ندارد به این دلیل که در تعادل لینکاژی (پیوستگی متعادل) با جهش‌های متعدد است، بیان نموده‌اند (۱۴).

استایگر و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی ارتباط چند شکلی ژن پرولاکتین بر روی میش‌های نژاد فریزین شرقی نشان دادند که میش‌های دارای ژنوتیپ AB تولید شیر بیشتری دارند و آلل A به‌طور متوسط ۱۱۰ گرم تولید شیر بیشتری نسبت به آلل B داشت (۱۴).

در مطالعه‌ای که ارفورد و همکاران (۲۰۱۰) در نژاد چویز و نژاد بومی قبرس انجام دادند چندشکلی این ژن را تأیید کردند و در نژاد چویز فروانی آلل B (۰/۲۹) را کمتر از آلل دیگر (A) گزارش کردند (۰/۷۲). دریافتند که میش‌های حامل آلل B تولید شیر بیشتری نسبت به آن‌هایی که این آلل را ندارند، داشتند در واقع در این مطالعه آلل مطلوب را آلل B معرفی شده است چرا که در نژاد بومی فراوانی آلل مطلوب را ۰/۰۹ مشاهده کردند که تولید شیر کم (۱۰۷ کیلوگرم تولید شیر در یک دوره شیردهی در مقابل ۲۲۲ کیلوگرم) این نژاد را مصداق آن دانستند (۱۳).

نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج حاصل از مطالعه انجام گرفته در نژاد مرینو مطابقت اما با نتایج حاصل از تحقیقات در سایر نژادهای ذکر شده در بالا مغایرت داشت.

اگر چه مدل خطی عمومی یک روش ساده و آسان برای مقایسه بین ژنوتیپ‌های کلاس‌بندی برای صفت موردنظر می‌باشد اما همبستگی ژنتیکی میان افراد نادیده گرفته می‌شود و ممکن است منجر به بیان روابط منفی و غلط شود (۱۷) در تحقیق حاضر، با وجود استفاده از یک مدل مختلط و در نظر گرفتن کوواریانس ژنتیکی بین افراد، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های ژن پرولاکتین و تولید شیر در گله مورد بررسی مشاهده نشد که از بین دلایل احتمالی آن می‌توان به خاموش بودن جهش در اینترون این ژن، کم بودن اندازه نمونه و تأثیر عوامل محیطی کنترل نشده اشاره نمود.

در پژوهش حاضر، چون اثر ژنوتیپ‌های ژن پرولاکتین بر تولید شیر معنی‌دار نشده است، نمی‌توان اظهار داشت که کدام ژنوتیپ مطلوب می‌باشد. به‌منظور بررسی دقیق‌تر ارتباط ژن پرولاکتین با تولید شیر در این نژاد، لازم است نمونه‌گیری و رکوردگیری بیشتری انجام شود. همچنین در صورت امکان ارتباط چندشکلی سایر جایگاه‌های مرتبط با تولید شیر در گوسفندان مورد مطالعه قرارگیرد.

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم سپاس فراوان خود را تقدیم به کادر فنی و کارگری زحمتکش ایستگاه پرورش و اصلاح‌نژاد حسین‌آباد شیروان نماییم که حمایت‌های زیادی در به نتیجه رسیدن این تحقیق داشتند.

منابع

1. Alipanah, M., Kalashnikova, L., and Rodionov, G. 2007. Association of prolactin gene variants with milk production traits in Russian Red Pied cattle. Iranian Journal of Biotechnology. 5: 158-161.
2. Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jasen, C.L., Wertheim Van Dillen, P.M., and Van Der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for urification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology. 28: 495-503.
3. Brym, P., Kaminski, S., and Wojcik, E. 2005. Nucleotied sequence polymor phism within exon 4 of the bovine prolactin geneand its association with milk performance traits. Journal of Applied Genetics. 45(2): 179-185.
4. Busch, M.A., Bomblies, K., and Weigel, D. 1999. Activation of a floral homeotic gene in Arabidopsis. Science. 285: 585–587.
5. Cardellino, R.A., and Benson, M.E. 2002. Lactation curves of commercial ewes rearing lambs. Journal of Animal Science 80: 23–27.
6. Chu, M.X., Wang, X.C., Jin, M., Di, R., Chen, H.Q., Zhu, G.Q., Fang, L., MaY., H., and Li, K. 2008. DNA polymorphism of 5¢ flanking region of prolactin gene and its association with litter size in sheep. Journal of Breeding Genetic. 126: 63-68.
7. Ghasemi, N., Zadehrahmani, M., Rahimi, G.H., and Hafezian, S.H. 2009. Associations between prolactin gene polymorphismand milk production in montebeliard cows. International Journal of Genetics and Molecular Biology. 1 (3): 048-051.
8. Hadi Tavatori, M.H., Mohammadian, M., Nikonam, G.H., Moustashari, M., and Monem, M. 2007. Lactation and milk characteristics of Qazvin Shal sheep. Journal of Pajouhesh and Sazandegi. 77: 34-41. (In Persian)
9. Knight, C.H. 2001. Overview of prolactin's role in farm animal lactation. Journal of Livestock Production Science. 70: 87–93.
10. Lan, X.Y., Pan, C.Y., Chen, H., Lei, C.Z., Li, F.Y., Zhang, H.Y., and Ni., Y.S. 2009. Novel SNP of the goat prolactingene (PRL) associated with cashmere traits. Journal of Applied Genetics. 50: 51-54.
11. Marivani, G., and Rostamzadeh, J. 2012. Analysis of PRL gene polymorphism i n markhoz goats in kurdistan province. 12th Iranian Genetics Congres in Tehran. 1-6.

12. NCBI Website. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/443317#reference-sequences.
13. Orford, M., Tzamaloukas, O., Papachristoforou, C., and Miltiadou, D. 2010. Technical note: a simplified PCR-based assay for the characterization of two prolactin variants that affect milk traits in sheep breeds. Journal of Dairy Science. 93: 5996–5999.
14. Ramos, A.M., Matos, C.A.P., Russo-Almeida, P.A., Bettencourt, C.M.V., Matos, J., Martins, A., Pinheiro, C., and Rangel-Figueiredo, T. 2009. Candidate gene for milk production traits in Portuguese dairy sheep. Small Ruminant Research. 82: 117-121.
15. Sargolzaei, M., Iwaisaki, H., and Colleau, J.J. 2006. CFC: a tool for monitoring genetic diversity, In: Proceedings of 8th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production 13-18 Aug., Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, Pp: 27-28.
16. SAS Institute. 2001. SAS user Guide: statistics. SAS Institute Inc., Carry, NC.
17. Staiger, E.A., Thonney, M.L., Buchanan, J.W., Rogers, E.R., Oltenacu, P.A., and Mateescu, R.G. 2010. Effect of prolactin, β-lactoglobulin, and κ-casein genotype on milk yield in East Friesian sheep. Journal of Dairy Science. 93: 1736–1742.
18. Vincent, A.L., and Rothschild, M.F. 1997. A restriction fragment length polymorphism in the ovine prolactin gene. Journal of Animal Science. 75: 1686-1687.
19. Yang, L., Jin, G., Zhao, X., Zheng, Y., Xu, Z., and Wu, W. 2007. PIP: a database of potential intron polymorphism markers. Supplementary data are available at Bioinformatics online. 23: 2174-2177.
20. Yeh, F.C., Yang, R., Boyle, T.J., Ye, Z., and Xiyan, J.M. 2000. POPGENE 32, Microsoft window based freeware for population genetic analysis, Version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta: Edmonton, Canada. User notes, Animal Genetics and Breeding Unit, Armidale, 55p.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Ruminant Research, Vol. 3(4), 2016
http://ejrr.gau.ac.ir

Study on second intron of prolactin gene polymorphism and its association with milk yield in Kurdi sheep of Shirvan

F. Kazemi Borzel Abad[1], *S. Hassani[2], F. Samadi[2], M. Ahani Azari[2] and D. Ali Saghi[3]

[1]M.Sc. Graduated and [2]Associate Prof., Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof., Agriculture and Natural Resources Research Center of Khorasan Razavi

Received: 10/26/2015; Accepted: 02/28/2016

Abstract

Background and objectives: This study was conducted to investigate association between prolactin gene polymorphism and milk yield of Shirvan Kurdi sheep. Prolactin is a lactogenic hormone that plays a significant role in milk production; its depletion in sheep provokes a severe reduction of milk secretion suggesting that prolactin is a functional candidate gene that could contribute to variations in milk yield. An Investigation indicated that polymorphism prolactin gene in Chios sheep. They identified a 23-bp indel (insertion or deletion) in the 213 region and found that the B allele is the result of a 23-bp deletion in a allele. They also reported A and B allele with the frequencies of 0.71 and 0.29, respectively and foundthat the B allele may be associated with higher milk yield.

The present study investigated the association between polymorphisms in prolactin gene and daily milk yield records of Kurdi ewes in Hossien Abad Kurdi sheep breeding station.

Materials and methods: In this study, blood samples were collected randomly from 100 milking Kurdi ewes in Hossien Abad Kurdi sheep breeding station. Milking was carried out by hand combined with lamb suckling at 14 days intervals starting from May to Agust 2012.Allele and genotype frequencies, chi-square test and the goodness of fit test for Hardy–Weinberg equilibrium were calculated with PopGeneV 1.31 software. Statistical Analysis was performed using INBREED and the MIXED procedures of SAS to estimate the association of genotypes with milk production.

*Corresponding author: saeedh_2000@yahoo.com

Results: A 23-bp indel (insertion or deletion) was identified in prolactin gene by PCR.A mixed model was used to investigate the association of prolactin gene with test day milk yield. AA genotype had the highest genotype frequency in the studied population (0.60).A and B allele frequencies were 0.765 and 0.235, respectively. Results indicated that there was no significant association between prolactin gene polymorphism and milk yield in the studied population.

Conclusion: In the present study, no genotype was identified to be better than the others and there was no significant association between prolactin gene polymorphism and milk yield.

Keywords: Sheep, Milk yield, Prolactin gene, Polymerase chain reaction