Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Evaluation of the association between polymorphism in Interleukin 2 and Interleukin 10 genes with reproductive traits in Holstein cattle

A. Taherian-Ghadi[1], G. Rahimi-Mianji[2], M. Gholizadeh[3]*

[1]M.Sc. Graduate, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

[2]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

[3]Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, Email: m.gholizadeh@sanru.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 04/06/2022
Revised: 06/21/2022
Accepted: 06/22/2022

Keywords:
Holstein cow
Interleukin
Reproductive traits
Selective genotyping

ABSTRACT

Background and objectives: Reproductive efficiency is one of the most important factors influencing dairy cow performance. In the present study, the relationship between the polymorphism in interleukin 2 (IL-2: exon 6) and interleukin 10 (IL-10: exon 5) genes with reproductive characteristics including days open, calving interval, days from calving to first duty, gestation period, Service result, stillbirth and calving ease was examined.

Materials and methods: In the present study, the relationship between interleukin 2 and interleukin-10 as two candidate genes with some important reproductive traits in Holstein dairy cows was investigated by means of selective genotyping. Individuals were selected based on their open door residuals obtained from mixed models. In the model used, the effects of year of birth, year of calving, time of calving, and lactation were taken into account as fixed effects, and the random effects of the animal and the covariate effect of milk yield were also included in the model. A total of 194 cows, 97 of which were individual cows, were selected from both tails of the residual value distribution. The DNA was extracted using modified salting out procedure. Polymerase chain reactions (PCR) using specific primers were implemented to amplify fragments of 172 bp and 325 bp of IL-2 and IL-10, respectively. Different banding patterns were identified using the PCR-SSCP technique. The Cox test in SAS was used to examine the association between banding patterns with open days, calving interval, days from calving to the first service, and gestation duration. The logistics regression was implemented in SAS for service results, stillbirths, and calving ease.

Results: The results showed the existence of polymorphism for both loci studied. Four different band patterns in IL-2 and seven different band patterns in IL-10 were observed. At the IL-10 locus, striped patterns 5 and 6 had the highest frequency and pattern 3 showed the lower frequency in the individuals with residual values below the mean. In the second group with residual values above the mean, the highest frequency was observed for pattern 6, which also had the highest frequency in the total samples. For IL-2, patterns 1 and 2 showed the greatest and lesser frequency, respectively, in the individuals with residual values below the mean. Pattern 4 had the lower frequency in this locus. Statistical results showed a significant association between IL-2 on open days and length of gestation. In addition, IL-10 had a significant effect on open days.

Conclusion: Taking into account the polymorphisms in the studied regions for the population of Holstein dairy cows and the association of these polymorphisms with reproductive traits, following confirmation of the results using the sequencing approach, these regions could be considered in animal breeding programs.

Cite this article: Taherian-Ghadi, A., Rahimi-Mianji, G., Gholizadeh, M. (2022). Evaluation of the association between polymorphism in Interleukin 2 and Interleukin 10 genes with reproductive traits in Holstein cattle. *Journal of Ruminant Research*, 10 (2), 105-118.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/ejrr.2022.20073.1844
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخواکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

ارزیابی ارتباط چند شکلی در ژن‌های اینترلوکین ۲ و ۱۰ با صفات تولید مثلی در گاو هلشتاین

اکرم طاهریان قادی[۱]، قدرت رحیمی میانجی[۲]، محسن قلی‌زاده[۳*]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[۲]استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[۳]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، رایانامه: m.gholizadeh@sanru.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۱۷
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۳/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۱

واژه‌های کلیدی:
اینترلوکین
تعیین ژنوتیپ انتخابی
صفات تولیدمثلی
گاو هلشتاین

چکیده

سابقه و هدف: بازدهی تولیدمثلی، یکی از مهم‌ترین صفات مؤثر بر عملکرد تولیدی گاو شیرده محسوب می‌شود. در پژوهش حاضر، ارتباط چندشکلی نوکلئوتیدی موجود در ناحیه اگزون ٦ ژن اینترلوکین ۲ و ناحیه اگزون ۵ ژن اینترلوکین ۱۰، با صفات تولیدمثلی شامل روزهای باز، فاصله گوساله‌زایی، فاصله زایش تا اولین تلقیح، طول دوره آبستنی، مرده زایی، موفقیت تلقیح و بروز سخت‌زایی در گاو هلشتاین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، از روش تعیین ژنوتیپ انتخابی برای ارتباط سنجی، دو ژن کاندیدای اینترلوکین ۲ و ۱۰ با صفات تولیدمثلی در گاوهای هلشتاین استفاده شد. بدین منظور، در گام اول، انتخاب حیوانات بر مبنای داده‌های فنوتیپی حد آستانه‌ای توزیع باقی‌مانده صفت روزهای باز مبتنی بر مدل‌های آماری مختلط انجام شد. در مدل مورداستفاده عواملی همچون، اثرات سال تولد، سال زایش، فصل زایش، شکم شیردهی به‌عنوان اثرات ثابت در نظر گرفته شدند و همچنین، اثر حیوان به‌عنوان اثر تصادفی و مقدار تولید شیر، به‌عنوان کوواریت در مدل وارد شدند. درمجموع، تعداد ۱۹٤ گاو، متشکل از ۹۷ گاو ماده با مقادیر باقیمانده کمتر از حد آستانه‌های میانه و تعداد ۹۷ گاو ماده با مقادیر باقی‌مانده بزرگ‌تر از میانه انتخاب شدند. سپس، استخراج DNA از نمونه‌های خون بر اساس روش نمکی بهینه یافته انجام شد. متعاقباً، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعات ۱۷۲ و ۳۲۵ جفت بازی به ترتیب از نواحی کد شونده اگزون‌های ٦ و ۵ ژن‌های اینترلوکین ۲ و اینترلوکین ۱۰ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و شناسایی الگوی باندی مختلف در هر دو ژن با استفاده از روش PCR-SSCP انجام شد. ارتباط الگوهای باندی هر یک از جایگاه‌های ژنی با صفات روزهای باز، فاصله گوساله‌زایی، فاصله زایش تا اولین تلقیح و طول دوره آبستنی با آزمون آماری کاکس و برای صفات مرده زایی، نتیجه تلقیح و سخت‌زایی آزمون لجستیک استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که در هر دو جایگاه نشانگری ژن‌های اینترلوکین ۲ و اینترلوکین ۱۰ چند شکلی مشاهده شد. در جایگاه اینترلوکین ۲، چهار الگو و در جایگاه

اینترلوکین ۱۰، هفت الگوی مختلف باندی مشاهده شد. همچنین، در جایگاه اینترلوکین ۱۰ الگوی باندی ۵ و ٦ بیشترین فراوانی و الگوی باندی ۳ کمترین فراوانی را در بین نمونه‌های گروه اول دارا بودند درحالی‌که، در گروه دوم بیشترین فراوانی به الگوی باندی ٦ تعلق داشت. در این جایگاه الگوی باندی ٦ بیشترین فراوانی را در کل نمونه‌های موردمطالعه داشت. در جایگاه اینترلوکین ۲ در گروه اول، الگوی باندی ۱ بیشترین فراوانی و الگوی ۲ کمترین فراوانی را داشت و در کل جمعیت الگوی ٤ کمترین فراوانی را داشت. نتایج نشان داد که جایگاه ژنی اینترلوکین ۲ اثر معنی‌داری روی صفت روزهای باز (P<۰/۰۵) و طول دوره آبستنی (P<۰/۰۱) داشت و جایگاه ژنی اینترلوکین ۱۰ (P<۰/۰۱) اثر معنی‌داری بر صفت روزهای باز، داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به چندشکلی بالای نواحی موردمطالعه در جمعیت گاوهای هلشتاین و ارتباط این چند شکلی‌ها با صفات تولیدمثلی، می‌توان با تائید نتایج با کمک توالی یابی، این ژن‌ها در برنامه‌های اصلاح نژادی مدنظر قرار داد.

استناد: طاهریان قادی، ا.، رحیمی میانجی، ق.، قلی‌زاده، م. (۱٤۰۱). ارزیابی ارتباط چندشکلی در ژن‌های اینترلوکین ۲ و ۱۰ با صفات تولیدمثلی در گاو هلشتاین. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۰ (۲)، ۱۱۸-۱۰۵.

DOI: 10.22069/ejrr.2022.20073.1844

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

عملکرد تولید مثلی، یکی از مهمترین صفات مؤثر بر بازدهی اقتصادی گله‌های گاو شیرده محسوب می‌شود. به‌منظور بهبود بازدهی گله‌های شیری، انتخاب دام‌هایی با پتانسیل ژنتیکی برتر، برای رسیدن به اهداف برنامه‌های اصلاح نژادی ضروری است. یکی از راهکارهایی موجود در این زمینه انتخاب مبتنی بر نشانگر[1] می‌باشد (۱۷). انتخاب ژنتیکی برای گاوهای با تولید شیر بالاتر، با باروری ضعیف‌تر آن‌ها همراه است، بنابراین، کنترل وضعیت باروری گله از طریق انتخاب ژنتیکی در طولانی مدت یک راه‌حل دائمی می‌باشد (۳). در این راستا، کارایی تولیدمثل یک گاو از طریق سن زایش اول، تعداد روزهای غیرآبستن، تعداد تلقیح به ازای آبستنی و فاصله دو زایش ارزیابی می‌شود (۸). مطالعات ارتباط سنجی ژنتیکی، یک روش مرسوم است که در اصلاح دام برای شناسایی نواحی ژنومی مؤثر بر صفات اقتصادی استفاده می‌شوند. در اکثر روش‌های آنالیز، فرض می‌شود فنوتیپ‌ها دارای توزیع نرمال هستند، ولی بسیاری از صفات هدف در گاو شیری ازجمله صفات دو حالتی و صفات دارای توزیع زمانی از توزیع نرمال پیروی نمی‌کنند. بسیاری از صفات مهم اقتصادی در گاو شیری ازجمله روزهای باز، فاصله زایش از توزیع بقا[2] تبعیت می‌کنند. برای تجزیه‌وتحلیل چنین صفاتی معمولاً از مدل‌های ویبول و کاکس استفاده می‌شود. مدل ویبول یک مدل نمایی تعمیم‌یافته و پارامتریک است. مدل کاکس یک روش نیمه پارامتری است. یکی دیگر از مشکلات توزیعی که در مطالعات ارتباطی نشانگر و فنوتیپ ایجاد می‌شود، استفاده از روش تعیین ژنوتیپ انتخابی است. تعیین ژنوتیپ انتخابی[3] یک روش مؤثر در مطالعه جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی می‌باشد که با انتخاب افراد در دو انتهای منحنی توزیع فنوتیپی صورت می‌گیرد و به‌طور قابل‌توجهی سبب افزایش بهره‌وری در یک آزمایش می‌شود (۵). هنگامی که فنوتیپ همه افراد دارای توزیع نرمال باشد، استفاده از رگرسیون خطی منجر به برآوردهای بیش‌ازحد اثرات می‌شود (۱۵). هنشال و گودارد (۱۹۹۹) نشان دادند که رگرسیون ژنوتیپ به فنوتیپ منجر به برآوردهای نااریب اثرات می‌شود (۱۳).

اینترلوکین‌ها به خانواده سیتوکین‌ها تعلق دارند که توسط لوکوسیت‌ها ترشح می‌شوند (۲۱). سیتوکین‌ها مولکول‌های تنظیمی ایمنی هستند که در پروسه تولیدمثل اهمیت بسیار زیادی دارند (۲۳). اینترلوکین ۲، یک عامل رشد، بقاء و تمایز برای لنفوسیت‌های T است و نقش اساسی در تنظیم پاسخ‌های T از طریق عملکردش بر سلول‌های T تنظیمی دارد. اینترلوکین ۲ در ابتدا، به خاطر توانایی در حمایت از تکثیر سلول‌های T عامل رشد سلول T نامیده شد. اینترلوکین ۲ عمدتاً توسط سلول‌های TCD4+ تولید می‌شود. فعال شدن سلول‌های T تحت تأثیر آنتی‌ژن و مولکول‌های کمک محرک باعث تحریک نسخه‌برداری از ژن اینترلوکین ۲ و ترشح پروتئین آن می‌شود (۲۵). اینترلوکین ۱۰، سبب افزایش بقای سلول‌های B، تکثیر، تمایز و تولید آنتی‌بادی می‌شود و همچنین روی بیماری‌های مختلف خود ایمنی مؤثر است (۱۹). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که اینترلوکین‌ها در انسان با سقط‌های مکرر در ارتباط می‌باشند (۱۲، ۱٤، ۲۲ و ۲۵). همچنین، مطالعات متعددی نشان داده‌اند که اینترلوکین ۲ نقش مهمی در بیماری‌های گاوی مانند ورم پستان (۱) و عفونت لیشمانیا (۹) دارد.

چند شکلی ناشی از کنفورماسیون باند تک رشته (PCR-SSCP)، قابلیت شناسایی هم‌زمان چندین واریانت ژنتیکی را در یک قطعه تکثیری فراهم

1. Marker assisted selection
2. Survival distribution
3. Selective Genotyping

می‌کند. از مزایای این تکنیک می‌توان به‌سادگی نسبی آن در انجام کار اشاره کرد. ولی، در این روش، طول قطعات مورد آنالیز به حدود ۳۵۰ جفت باز محدود است و با افزایش طول احتمال شناسایی جهش کاهش می‌یابد. علاوه بر محدودیت طول قطعه مورد تکثیر، این روش برای شناسایی دقیق واریانت‌ها به توالی یابی مستقیم DNA به عنوان ابزار تکمیلی نیازمند است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی ارتباط فرم‌های مختلف باندی در نواحی کد شونده اگزون ششم ژن‌های اینترلوکین ۲ و اگزون پنجم اینترلوکین ۱۰ با صفات مهم تولیدمثلی در گاوهای نژاد هلشتاین با روش PCR-SSCP بود.

جدول ۱- توالی آغازگرهای رفت‌وبرگشت مورداستفاده برای تکثیر جایگاه‌های ژنی اینترلوکین ۲ و اینترلوکین ۱۰

Table 1- Sequence of reverse and forward primers for amplifying Interleukin 2 and Interleukin 10 loci

ژن Gene	جایگاه Locus	توالی آغازگر Primer sequence	اندازه محصول Product size	رفرنس Reference
اینترلوکین ۲ Interleukin 2	اگزون ٦- کروموزوم ۱۷ Exon 6 – chr. 17	F: 5'- CAACTCTTGTCTTGCATTGCAC- 3' R: 5'-ATGTATGCATCCTGGAGAGCTT -3'	۱۷۲ جفت باز 172 base-pair	(2) (۲)
اینترلوکین ۱۰ Interleukin 10	اگزون ٥- کروموزوم ١٦ Exon 5 – chr. 16	F: 5'- GGTAAAGCAGTCCTGAATCCAA -3' R: 5' -TCCTTCATGGGCCCTATTT -3'	۳۲۵ جفت باز 325 base-pair	(27) (۲۷)

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA: نمونه‌گیری از مجموع ۲۰۰ رأس گاو ماده نژاد هلشتاین موجود در گاوداری صنعتی مهدشت ساری (ایران) بر اساس توزیع باقی‌مانده صفت روزهای باز انجام شد. بر این اساس، در گام اول، از بین گاوهای دارای رکورد، ۱۹٤ رأس گاو در گروه بیشترین و کمترین توزیع مقادیر باقی‌مانده مدل رگرسیونی انتخاب شدند. در مدل مورداستفاده، اثرات سال تولد، سال زایش، فصل زایش، دوره شیردهی به‌عنوان اثرات ثابت در نظر گرفته شدند و همچنین اثرات تصادفی حیوان و اثر متغیر کمکی مقدار تولید شیر در مدل وارد شدند. در گام دوم، خون از سیاهرگ پستانی به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر گرفته شد. برای جلوگیری از انعقاد خون از لوله‌های خلأ حاوی EDTA استفاده شد. نمونه‌ها بلافاصله با حفظ شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل‌شده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از خون کامل به روش بهینه شده نمکی انجام گرفت (۱۸) . سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ ٪ بررسی شد.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز: در این مطالعه از دو جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر اگزون ششم اینترلوکین ۲ و اگزون پنجم اینترلوکین ۱۰ استفاده شد (جدول۱).

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (10x)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم پلیمراز (1U/ml)، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱/۵ میکرولیتر منیزیم کلرید (۱/۵ میلی مولار) و یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکو مولار)

انجام شد. سپس، چرخه‌های حرارتی پی سی آر شامل: ۹۵ درجه سانتی گراد جهت واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ ثانیه، دمای ۵۸ درجه سانتی گراد برای اتصال آغازگرهای اینترلوکین ۱۰ و ٦١ درجه سانتی گراد برای آغازگرهای اینترلوکین ۲ به مدت ٤٥ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد جهت بسط آغازگرها به مدت ٤٥ ثانیه به تعداد ۳۵ چرخه و بسط نهائی به مدت ۱۰دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. برای تائید اندازه قطعه تکثیرشده و هم‌چنین تعیین کمیت و کیفیت محصول PCR از ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید به همراه نشانگر وزنی M50 (GeneRuler 50 bp DNA Ladder) محصول شرکت فرمنتاز استفاده شد.

تعیین ژنوتیپ

الف: آنالیز نشانگر اس اس سی پی: برای تعیین ژنوتیپ هر حیوان، از روش PCR-SSCP و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪ استفاده شد. در این روش تعیین ژنوتیپ، بر اساس اختلاف حرکت محصول PCR تکثیرشده در میدان الکتروفورز که ناشی از تغییر شکل فضایی DNA تک‌رشته‌ای است، صورت می‌پذیرد. برای تک رشته سازی، ۷ میکرولیتر از محصول PCR را با ۷ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخصوص ژل اکریل آمید (EDTA نیم مولار، گلیسرول ۱۹۰ میلی لیتر، فرمامید ۸۰۰ میکرولیتر، برموفنل ۱۰ درصد ۱۰ میکرولیتر) مخلوط و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر به مدت ٦ دقیقه با دمای ۹٦ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و سپس بلافاصله روی یخ منتقل شد. بعد از انجام الکترفورز محصولات PCR روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد با ولتاژ ۱۸۰ به مدت ۱۸ ساعت، از نیترات نقره برای رنگ‌آمیزی استفاده شد و تعیین ژنوتیپ مستقیما از روی ژل انجام و با شمارش مستقیم الگوهای باندی، فراوانی آللی و ژنوتیپی برآورد شد.

بررسی ارتباط بین الگوهای باندی هر یک از جایگاه‌های ژنی و صفات موردمطالعه: ارتباط ژنوتیپ‌های هر یک از جایگاه‌های ژنی با صفات روزهای باز، فاصله گوساله‌زایی، فاصله زایش تا اولین تلقیح و طول دوره آبستنی با آزمون کاکس نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ در رویه PHREG مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت برای صفات مرده زایی، نتیجه تلقیح و سخت‌زایی آزمون لجستیک و برای وزن بدن از رویه GLM استفاده شد. مدل نهایی مورداستفاده به شکل زیر بود:

$$y = \mu + G + A + YB + YC + SC + LP + MY + e$$

در مدل مورداستفاده، y: رکورد، μ میانگین، G: الگوی باندی، YB: اثرات سال تولد (۵ سطح)، YC: سال زایش (۵ سطح)، SC: فصل زایش (٤ سطح)، LP: دوره شیردهی (٤ سطح)، A: اثرات تصادفی حیوان و L: اثر متغیر کمکی مقدار تولید شیر بودند.

نتایج و بحث

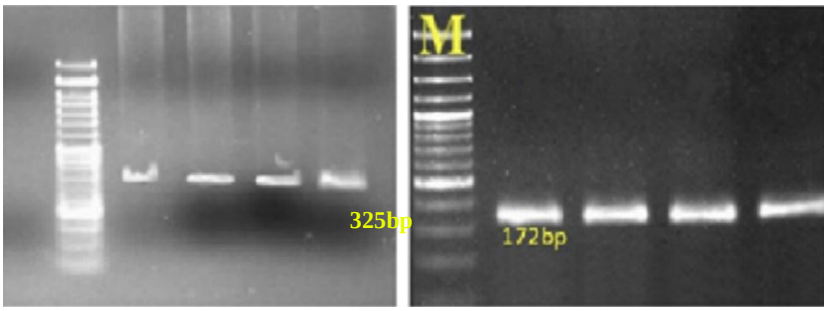
آمار توصیفی و بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده: آمار توصیفی در جدول ۲ آمده است. بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که DNAهای استخراج شده از کیفیت و کمیت مناسبی جهت ادامه مطالعه برخوردار بودند.

جدول ۲- آمار توصیفی صفات تولیدمثلی در جمعیت مورد مطالعه

Table 2- Descriptive statistics for reproductive traits in studied population.

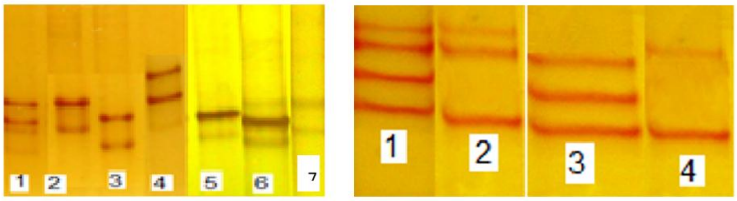
میانگین Mean	انحراف استاندارد SD	ضریب تغییرات CV	حداکثر Max	حداقل Min	صفت Trait
68.26	22.97	0.33	123	20	روزهای خشک Dry period (day)
407.63	46.49	0.11	760	289	فاصله گوساله زایی (روز) Calving interval (day)
133.58	17.48	0.13	214	38	روزهای باز Days Open
69.38	29.66	0.42	171	41	فاصله زایش تا اولین تلقیح Days between calving and first service
1.8	0.68	0.37	15	1	تعداد سرویس برای آبستنی Number of services per conception
24.16	2.32	0.09	45	18	سن در اولین زایش (ماه) Age at first calving (mo)

شناسایی چندشکلی در جایگاه ژنی اینترلوکین ۲: قطعه ۱۷۲ جفت بازی از اگزون ششم ژن اینترلوکین ۲ و قطعه ۳۲۰ جفت بازی از ناحیه اگزون پنجم ژن اینترلوکین ۱۰ توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر شدند. الکتروفورز محصولات PCR این جایگاه روی ژل آگارز ۲ درصد و در حضور نشانگر وزنی ۵۰ جفت بازی انجام شد و صحت تکثیر قطعه موردنظر تائید شد (شکل ۱).



شکل ۱- محصولات PCR ژن ایترلوکین ۱۰ (شکل راست) و ژن ایترلوکین ۲ سمت چپ

Figure 1- PCR products respectively for Interleukin 2 (left) and Interleukin 10 (right)



شکل ۲- الگوهای مختلف باندی جایگاه اینترلوکین ۲ (راست) و اینترلوکین ۱۰ (چپ)

Figure 2- Distinct banding patterns for Interleukin 2 (right) and Interleukin 10 (left)

جهت تک رشته سازی و شناسایی الگوهای باندی محصولات PCR با استفاده از ژل اکریل آمید ۱۲ درصد در دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت الکتروفورز شدند. پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، برای ژن اینترلوکین ۲ چهار الگوی مختلف باندی و برای ژن اینترلوکین ۱۰ هفت الگوی مختلف باندی مشاهده شد (شکل۲).

فراوانی‌های الگوهای مختلف باندی جایگاه‌های تکثیرشده: در این مطالعه، مجموع ۱۹٤ حیوان برای دو جایگاه اینترلوکین ۲ و اینترلوکین ۱۰ تعیین ژنوتیپ شدند. نمونه‌های موردمطالعه بر اساس مقدار باقی‌مانده مدل آماری برای صفت روزهای باز در دو گروه تقسیم‌بندی شدند که گروه اول شامل کمترین مقدار عوامل باقی‌مانده و گروه دوم، شامل بیشترین مقدار عوامل باقی‌مانده بودند. توزیع ژنوتیپی و نیز فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی مربوط به جایگاه‌های ژنی موردمطالعه در جدول ۳ آمده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود در جایگاه اینترلوکین ۱۰ الگوی باندی ۵ و ٦ بیشترین فراوانی و الگوی باندی ۳ کمترین فراوانی را در بین نمونه‌های گروه اول دارا هستند در حالیکه، در گروه دوم بیشترین فراوانی به الگوی باندی ٦ تعلق داشت. در این جایگاه الگوی باندی ٦ بیشترین فراوانی را در کل نمونه‌های موردمطالعه داشت. در جایگاه اینترلوکین ۲ در گروه اول، الگوی ۱ بیشترین فراوانی و الگوی ۲ کمترین فراوانی را داشت و در کل جمعیت الگوی ٤ کمترین فراوانی را داشت.

جدول ۳- فراوانی الگوهای باندی جایگاه اینترلوکین ۲ و اینترلوکین ۱۰ در دو گروه با بیشترین (گروه یک) و کمترین (گروه دو) مقادیر باقی مانده مدل آماری صفت روزهای باز

Table 3- Frequency of banding patterns for Interleukin 2 and Interleukin 10 in groups with highest (group1) and lowest (group2) residual values for days' open

لوکوس Locus	الگوی باندی Banding pattern	گروه مطالعه Study group		
		گروه ۱ Group1	گروه ۲ Group 2	کل Total
اینترلوکین ۱۰ Interleukin 10	1	18.56	9.28	13.92
	2	16.5	18.56	17.52
	3	5.15	12.37	8.76
	4	9.28	6.18	7.73
	5	21.65	18.56	20.1
	6	21.65	22.68	22.17
	7	7.21	12.37	9.8
اینترلوکین ۲ Interleukin 2	1	79.38	76.29	77.83
	2	16.5	16.25	16.5
	3	2.06	4.12	3.09
	4	2.06	3.09	2.58

بررسی اثر جایگاه‌های ژنی بر صفات تولید مثلی: ارتباط بین جایگاه‌های موردمطالعه و صفات تولیدمثلی در جدول ٤ آمده است. در تحقیق حاضر، برای بررسی اثرات جایگاه‌های موردمطالعه بر صفاتی که توزیع زمانی دارند (روزهای باز، طول دوره آبستنی، فاصله زایش، فاصله زایش تا اولین تلقیح) از

آزمون COX و برای صفات آستانه‌ای (سخت‌زایی، زنده‌زایی و نتیجه تلقیح) از مدل لجستیک استفاده شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود جایگاه ژنی اینترلوکین ۲ اثر معنی‌داری روی روزهای باز و طول آبستنی داشت. همچنین نتایج نشان داد جایگاه ژنی اینترلوکین ۱۰ اثر معنی‌داری بر روزهای باز، داشت.

جدول ٤- ارتباط جایگاه‌های ژنی موردمطالعه با صفات تولیدمثلی ارتباط معنی‌دار پررنگ هستند)

Table 4- Association between studied loci with reproductive traits (significant associations are in bold)

	اینترلوکین ۲ Interleukin 2		اینترلوکین ۱۰ Interleukin 10	
	مقدار مربع کای X^2	P value	مقدار مربع کای X^2	P value
روزهای باز Days open	7.46	0.047	15.96	0.01
طول دوره آبستنی Gestation Period	0.89	0.01	2.31	0.88
فاصله زایش Calving interval	6.03	0.11	5.55	0.47
فاصله زایش تا اولین تلقیح Days from calving to first service	0.36	0.94	5.92	0.43
سخت زایی Calving ease.	0.73	0.86	1.75	0.94
مرده زایی Stillbirth	1.68	0.64	5.47	0.48
موفقیت تلقیح Service outcome	0.34	0.95	5.65	0.46

در تحقیق حاضر از روش تعیین ژنوتیپ انتخابی برای بررسی ارتباط جایگاه‌های موردمطالعه با صفات تولیدمثلی استفاده شد. برای تمام صفات، حیوانات بر اساس مقدار باقی‌مانده مدل آماری هر صفت به دو گروه مساوی تقسیم شدند. گروه اول شامل، افراد مربوط به باقیمانده‌های بالاتر از میانه و گروه دوم شامل افراد مربوط به باقیمانده‌های کمتر از میانه بود. میانگین گروه‌ها با استفاده از آزمون t محاسبه شد و نتایج نشان داد که مقایسه گروه‌ها بر اساس مقادیر باقی‌مانده برای تمام صفات معنی‌دار بود، این نتایج، مبنای انتخاب گروه‌ها که بر اساس مقادیر باقی‌مانده در نظر گرفته‌شده بود، را تأیید کرد.

در این تحقیق برای بررسی ارتباط جایگاه‌های موردمطالعه با صفات تولیدمثلی که از توزیع بقایی پیروی می‌کنند از آزمون COX استفاده شد. آنالیز بقا در مقایسه با دیگر روش‌های رگرسیون برای محاسبات اثراتی که صفات تولیدمثلی ازجمله روزهای باز را تحت تأثیر قرار می‌دهند مانع از تخمین بیش‌ازحد اثرات در رگرسیون خطی می‌شود و تخمین نااریبی را ارائه می‌دهد (۱۰، ۱٦ و ۷).

همچنین، نتایج نشان داد که تکنیک PCR-SSCP روش مناسبی برای تکثیر جایگاه‌های موردمطالعه بود و هر دو جایگاه به‌ویژه اینترلوکین ۱۰ دارای تنوع ژنتیکی بالایی (۷ الگوی باندی) در جمعیت موردمطالعه بودند. مطالعات متعددی همبستگی چندشکلی‌های موجود در نواحی کد کننده اینترلوکین ۱۰ و سقط‌جنین را در جمعیت‌های مختلف انسانی بررسی کرده‌اند (٦ و۱۱). همچنین، نقش اینترلوکین ۲ در بیماری‌های گاو مانند ورم پستان (۱) و لیشمانیا (۹) گزارش‌شده است. ولی، تاکنون مطالعه‌ای درزمینه

ارتباط این جایگاه‌ها با صفات تولیدمثلی در گاو گزارش نشده است. پراکاش و همکاران (۲۰۱۱) چندشکلی اینترلوکین ۲ را در گاوهای آمیخته هندی با کلونینگ و تعیین توالی مطالعه کردند. در مطالعه آن‌ها سه الگوی باندی (ژنوتیپ) مشاهده شد که کمتر از تعداد الگوهای باندی مشاهده‌شده در تحقیق حاضر است. آن‌ها همچنین نشان دادند ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ناحیه پروموتور اینترلوکین ۲ با کل تولید شیر در دوره اول وجود دارد (۲۱). فیشر و همکاران (1397) دو آلل را در جایگاه اینترلوکین ۲ گاو شناسایی و با استفاده از آنالیز لینکاژ این جایگاه را روی کروموزوم ۱۷ نقشه یابی کردند که متناظر با کروموزوم ٤ انسان بود (۱۱). بهاتاچاریا و همکاران چندشکلی اینترلوکین ۲ را در گاو مطالعه کردند و دو آلل شناسایی کردند (٤). محقق دولت‌آبادی ارتباط چندشکلی ناحیه پروموتور IL-8 را با صفات تولیدی گاوهای هلشتاین مطالعه کرد و سه الگوی SSCP را برای این ناحیه گزارش داد که به‌طور معنی‌داری با تولید شیر در ارتباط بود (۲۰). نقش ژن‌های موردمطالعه در تحقیقات دیگر نیز گزارش‌شده است. نقش انواع سیتوکین‌های دیگر با صفات تولیدمثلی اهمیت این خانواده را در صفات اقتصادی نشان می‌دهد. به‌طور مثال، دیسیتوکین استاسی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که بیان سیتوکین‌ها شامل IL1α, IL1β, IL4, IL6, IL8 و TNFα با ثبات فولیکولی و نقص در اوولاسیون در گاو ارتباط دارند (۲٤). همچنین، در مطالعه دیگری نشان داده‌شده است که IL-6 تولید آندروژن را خاموش کرده و بیان نشانگرهای سلول‌های لایه خارجی فولیکول را تنظیم می‌نمایند (۲٦). در تحقیق دیگری، محقق دولت‌آبادی و همکاران چندشکلی SSCP را در ناحیه غیرکدشونده ژن IL-1 بررسی کردند. نتایج تحقیق آن‌ها ٤ الگوی باندی مختلف را در این ناحیه نشان داد. تفاوت در تعداد چندشکلی در نواحی موردمطالعه می‌تواند به دلیل تفاوت‌های نژادی باشد (۲۰).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق چندشکلی نواحی اگزون ٦ اینترلوکین ۲ و اگزون ٥ اینترلوکین ۱۰ را در نمونه‌ای از جمعیت گاوهای هلشتاین موردمطالعه نشان داد. نتایج بررسی ارتباط جایگاه‌های موردمطالعه با صفات تولیدمثلی نشان داد جایگاه ژنی اینترلوکین ۲ اثر معنی داری روی روزهای باز و طول دوره آبستنی و جایگاه ژنی اینترلوکین ۱۰ اثر معنی‌داری بر روزهای بازداشتند. با توجه به نقش این جایگاه‌ها در صفات تولیدمثلی، می‌توان با تائید نتایج با توالی یابی و تکرار در جمعیت‌های مستقل، از این نتایج در برنامه‌های اصلاح نژادی بهره برد.

منابع

1. Alluwaimi, A.M., Rossito, P. V., Leutenegger, C.M., Farver, T. B., Smith, W.L. and Cullor, JS. 2003. The cytokines marker in the *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. Journal of Veterinary Medicine, 50: 105–111.
2. Amills, M., Ramiya, V., Norimine, J., Colleen, O. and Lewin, H.A. 2002. Reduced IL-2 and IL-4 mRNA Expression in CD4+ T Cells from Bovine Leukemia Virus-Infected Cows with Persistent Lymphocytosis. Virology, 304, 1-9.
3. Babbage, S.J., Arkwright, P. D., Vince, G. S., Perrey, C., Pravica, V., Quenby, S., Bates, M. and Hutchinson, I.V. 2001. Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. Journal of Reproductive Immunology, 1: 21-27.
4. Bhattacharya, T K., Badola, S., Kumar, P., Shukla, A. and Sharma, A. 2002. PCR-RSP study of IL-2 gene in cattle and buffalo. In: Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (August 19–23, 2002), Montpellier, France.

5. Bovenhuis, H. and Spelman, R.J. 1998. Selective genotyping to detect QTL for multiple traits in outbred populations. Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale, Australia 26: 241-244.
6. Daher, S., Shulzhenko, N., Morgun, A., Mattar, R., Rampim, G. F., Camano, L. and DeLima, M. G. 2003 Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. Journal of Reproductive Immunology, 58: 69-77.
7. Del, M., Schneider, P., Strandberg, E., Ducrocq, V. and Roth, A. 2005. Survival analysis applied to genetic evaluation for female fertility in dairy cattle. Journal of Dairy Science, 88: 2253-2259.
8. Dematawewa, C.M.B. and Berger, P.J. 1998. Genetic and phenotypic parameters for 305-day yield, fertility and survival in Holsteins. Journal of Dairy Science, 81: 2700-2709.
9. Diez, B., Nicolar, R., Goldeano, A., Cisterna, R. and Canavate, M. L. 1991. Kinetics and regulation of NK activity by IL-2 and interferon in acute toxoplasmosis. Journal of Immunology, 34: 673-677.
10. Farin, P., Slenninq, B., Correa, M. and Britt, J. 1994. Effects of calving season and milk yield on pregnancy risk and income in North Carolina Holstein cows. Journal of Dairy Science, 77: 1848-1855.
11. Fisher, S.R., Beever, J. E. and Lewin, H.A. 1997. Genetic mapping of five human chromosome 4 orthologous to bovine chromosome 6 and 17. Animal Genetics, 28: 253–257.
12. Fu, W.Q. and Sill, B. 2007. Correlation of T lymphocyte subsets and serum IL-2, IL-10 with spontaneous abortion. Jiangsu Medical Journal, 33: 328-329.
13. Henshall, J. M. and Goddard, M.E. 1999. Multiple-trait mapping of quantitative trait loci after selective genotyping using logistic regression. Genetics, 151: 885–894.
14. Kamali-Sarvestani, E., Zolghadri, J., Gharesi-Fard, B. and Sarvari, J. 2005. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. Journal of Reproductive Immunology, 65: 171-178.
15. Lander, E.S. and Botstein, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics, 121: 185–199.
16. Lee, L., Ferguson, J. and Galligan, D. 1989. Effect of disease on days open assessed by survival analysis. Journal of Dairy Science, 72: 1020-1026.
17. Madrid, S., Lopez, A. and Echeverri, J. J. 2015. INHA A 192G polymorphism and its association with dairy traits in Antioquia Holstein cattle. Archive Zootecnia, 64: 147-154.
18. Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16: 1215.
19. Moore, K.W., de Waal, M.R., Coffman, R.L. and O'Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annual Review Immunology, 19: 683-765.
20. Muhaghegh-Dolatabady, M. 2014. Single Nucleotide Polymorphism in the Promoter Region of Bovine Interleukin 8 Gene and its Association with Milk Production Traits and Somatic Cell Score of Holstein Cattle in Iran. Iranian Journal of Biotechnology, 1: e1016
21. Prakash, V., Bhattacharya, T. K., JyotsanaN, B. and Pandey, O.P. 2011. Molecular Cloning, Characterization, Polymorphism, and Association Study of the Interleukin-2 Gene in Indian Crossbred Cattle. Biochemical Genetics, 49(9): 638-644
22. Raghupathy, R., Makhseed, M., Azizieh, F., Omu, A., Gupta, M. and Farhat, R. 2000. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. Human Reprodion, 15: 713–8.
23. Saito, S., Tsukaguchi, N., Hasegawa, T., Michimata, T., Tsuda, H. and Narita, N. 1999. Distribution of Th1, Th2 and Th0 and Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. American journal Reproductive Immunology, 42: 240–5.
24. Samir, M., Glister, C., Mattar, D., Laird, M. and Knight, P.G. 2017. Follicular expression of pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha), interleukin 6 (IL6) and their receptors in cattle: TNF alpha, IL6 and macrophages suppress thecal androgen production in vitro. Reproduction, 154: 35-49

25. Shang, D.K., Zheng, X.Q. and Yan, W.H. 2008. The significance of the serum Th1/Th2 cytokine leves in the recurrent spontaneous abortions. Chinese Journal of Birth Health and Heredity, 16: 25-26.
26. Stassi, A.F., Baravalle, M. E., Belotti, E.M. Amweg, A.N., Angeli, E., Velazquez, M.M.L., Re, F., Salvetti, N.R. and Ortega, H.H. 2018. Altered expression of IL-1beta, IL-1RI, IL-1RII, IL-1RA and IL-4 could contribute to anovulation and follicular persistence in cattle. Theriogenology, 110: 61-73
27. Verschoor, C.P., Pant, S.D., You, Q., Schenkel, F.S., Kelton, D F. and Karrow, N.A. 2010. Polymorphisms in the gene encoding bovine interleukin-10 receptor alpha are associated with *Mycobacterium avium ssp*. paratuberculosis infection status. BMC Genetics, 11: 23.