دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

تاثیر چند شکلی دو جایگاه ژن PPARGC1α روی صفات تولید شیر گاو براون سوئیس

سونیا زکی زاده[۱]، میر جلال هاشمی[۲]، رضا وکیلی[۳] و محسن قدس روحانی[۴]

۱- دانشیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان خراسان رضوی (نویسنده مسوول: soniazaki@yahoo.com)
۲ و ۳- کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کاشمر
۴- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان خراسان رضوی
تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۳

چکیده

اکثر صفات مهم در دامپروری تحت تاثیر جایگاه‌های صفات کمی و اثرات محیطی قرار می‌گیرند. ژن PPARGC1α عضوی از خانواده فعال‌کننده‌های کمک رونویسی می‌باشد که نقش اساسی در تنظیم هموستازی انرژی دارد. در این تحقیق از ۱۰۰ راس گاو براون سوئیس نمونه خون گرفته شد و DNA به روش نمکی از خون کامل استخراج گردید. دو جایگاه چندشکلی تک نوکلئوتیدی A/C و T/C به ترتیب واقع در ناحیه غیرقابل ترجمه ٔ۳ و اینترون ۹، با استفاده از روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. ارزش اصلاحی صفات تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین شیر با مدل ۱ نرم‌افزار DFREML به‌طور جداگانه پیش‌بینی شد. ارتباط چند شکلی‌های مدنظر با ارزش اصلاحی صفات در سطح معنی‌داری ۵٪ با نرم‌افزار آماری SAS بررسی شد. فراوانی ژنوتیپ AA، AC و CC در جایگاه PPARGC1α-A968C به‌ترتیب ۰/۵۹۳، ۰/۳۸۵ و ۰/۰۲۲ و فراوانی آللی A و C به ترتیب ۰/۷۸۶ و ۰/۲۱۴ محاسبه شد. در جایگاه PPARGC1α-T19C فراوانی ژنوتیپ TT، TC و CC به ترتیب ۰/۱۶٤، ۰/٤۲۸ و ۰/٤۰۷ و فراوانی آللی T و C به‌ترتیب ۰/۳۷۹ و ۰/٦۲۱ محاسبه گردید. آزمون کای- مربع بیان‌گر تعادل جمعیت برای هر دو جایگاه بود (P<۰/۰۵). اگرچه در بررسی جداگانه و توأم چندشکلی‌های ژن PPARGC1α با یک‌دیگر هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین ارزش اصلاحی صفات تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین و این ژنوتیپ‌ها یافت نشد، اما افزایش تعداد نمونه‌ها برای انجام آنالیزهای آماری دقیق‌تر و کاهش واریانس خطا، توصیه می‌شود.

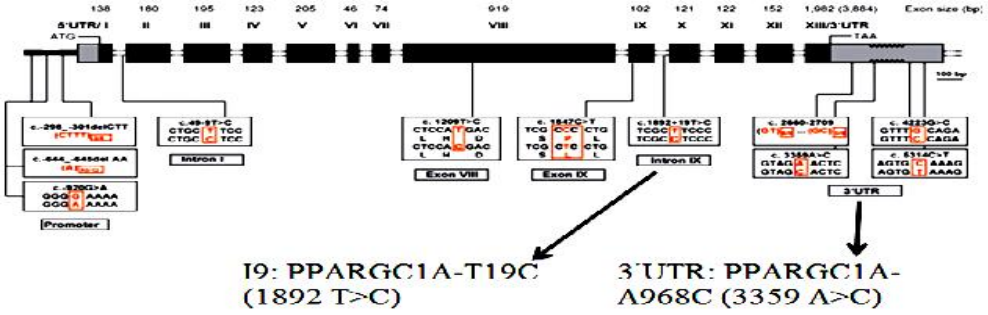
واژه‌های کلیدی: PPARGC1α، PCR-RFLP، چند شکلی تک نوکلئوتیدی، صفات تولیدی شیر، ارزش اصلاحی

مقدمه

امروزه هم‌چنان بررسی شایستگی ژنتیکی حیوانات بر پایه تئوری ژنتیک کمّی می‌باشد، اما به‌تدریج و با پیشرفت ژنتیک ملکولی، امکان شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده بخشی از تفاوت‌ها در صفات مهم اقتصادی چندژنی، با روش‌های آزمایشگاهی فراهم آمده است. اگرچه اکثر صفات تولیدی از راه چندین ژن کنترل می‌شوند، صفات مهم اقتصادی بیشتر تحت تاثیر ژن‌های کاندید می‌باشند که در کروموزوم‌های مختلف گاوی قرار دارند. در این میان کروموزوم ۶ در گاو بیشترین تعداد ژن‌های کاندید را دارد (۲). ژن *PPARGC1α*[1] که با نام PGC-1α نیز شناخته شده است، روی کروموزوم شش گاوی قرار گرفته و دارای ۱۳ اگزون می‌باشد. این ژن از ۶۲۶۱ جفت باز تشکیل شده و در سطوح مختلف در تعداد زیادی از بافت‌ها بیان می‌شود و پروتئینی با ۷۹۷ اسید آمینه را کد می‌نماید که نقش کلیدی در فعال‌سازی گیرنده‌های هورمونی هسته‌ای و رونویسی فاکتورهای تنظیم‌کننده هموستازی انرژی دارد (۹). ژن *PPARGC1α* عضوی از خانواده فعال‌کننده‌های کمک رونویسی می‌باشد که نقش اساسی در تنظیم هموستازی انرژی دارد. این ژن همچنین در سازگاری سوخت و ساز بدن، متابولیسم اکسیداتیو و سوخت و ساز چربی و گلوکز تاثیرگذار است (۷).

تاکنون تعداد ۱۱ چندشکلی روی نواحی مختلف از جمله ردیف‌های کدکننده، اینترون، اگزون، نواحی پروموتورو نواحی غیر قابل ترجمه ٔ۳ یا ٔ۵ این ژن شناسایی شده است (شکل ۱) (۹). از میان چندشکلی‌های این ژن چند شکلی *A968C* در موقعیت ۳۳۵۹ (c.3359 *A>C*) واقع در ناحیه غیرقابل ترجمه ٔ۳ (*3'UTR*) با جایگزینی نوکلئوتیدی *A/C* و چندشکلی *T19C* در موقعیت ۱۸۹۲ (c.1892+19 *T>C*) واقع در ناحیه اینترون ۹ ژن با جایگزینی نوکلئوتیدی *T/C* به دلیل تاثیر معنی‌داری که روی شیر و ترکیبات آن دارند، به دفعات در نژادهای مختلف بررسی شده‌اند (۹،۸،۷،۶،۵،۳،۱). جایگزینی نوکلئوتید در منطقه غیرقابل ترجمه از نوع غیرمشابه است که در آن اسیدآمینه آلانین به سیستئین و بالعکس تبدیل می‌شود (۱). چندشکلی تک نوکلئوتیدی *T19C* باعث می‌شود که اسیدآمینه ترئونین به سیستئین و بالعکس جایگزین گردد. این تغییر در اسید آمینه‌ها از تغییر در توالی نوکلئوتیدی کدون آنها ناشی می‌شود که به نوبه خود روی پروتئین‌های کد شده حاصل از این اسیدآمینه‌ها، تاثیر می‌گذارد. در مجموع به دلیل این که این ژن در داخل QTL مربوط به ترکیبات شیر واقع در کروموزوم ۶ گاو قرار دارد و نیز به علت نقش معنی‌دار این ژن در تنظیم هماهنگی هموستازی انرژی، سوخت و ساز چربی و گلوکز در پاسخ به محرک‌های محیطی و فیزیولوژیکی درونی، می‌تواند عملکرد یک ژن کاندید را داشته باشد (۹).

از آن‌جایی‌که دورنمای بهبود ژنتیکی یک صفت در جامعه وابسته به فراوانی آلل مطلوب می‌باشد، هدف از این تحقیق در مرحله اول بررسی چند شکلی تک‌نوکلوتیدی جایگاه‌های *A968C* و *T19C* ژن *PPARGC1α* و تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی آن در نژاد براون سوئیس و سپس بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های مختلف این ژن با ارزش اصلاحی صفات تولید شیر، درصد چربی، درصد پروتئین بود.



شکل ۱- نمای شماتیک ۱۱ چندشکلی ژن PPARGC1α (جایگاه‌های T19C و A968C با فلش مشخصند)
Figure 1. Schmatic picture of 11 polymorphisms of PPARGC1α (T19C and A968C is shown by arrow)

مواد و روش‌ها

خون‌گیری و استخراج DNA

در این آزمایش از تعداد ۱۰۰ راس گاو شیری نژاد براون سوئیس واحد گاوداری مجتمع آموزش جهاد کشاورزی خراسان رضوی واقع در شهرستان مشهد که دارای ثبت مشخصات و شجره خویشاوندی، رکورد تولید شیر، چربی و پروتئین بودند، استفاده شد. گاوها به صورت تصادفی انتخاب و خون گیری از ورید دمی (به میزان ۱۰cc از هر گاو) و با استفاده از ونوجکت‌های خلادار ۱۵ cc انجام شد. به منظور جلوگیری از انعقاد خون، محلول نیم مولار EDTA (اتیلن دی ناتریوم دی هیدروژن دی آمی ترا استات) به ونوجکت‌ها تزریق شد. نمونه‌ها در داخل کلمن یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

از مقدار ۳cc خون کامل برای استخراج DNA به روش استخراج نمکی تغییر داده شده استفاده گردید. برای ارزیابی کمّی DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد و برای تعیین کیفیت DNA روی ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید به مدت ۴۰ دقیقه و ولتاژ ۹۰ بارگذاری و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، به وسیله دستگاه ژل داک مشاهده گردید.

اجزای واکنش و شرایط PCR

اجزای واکنش برای تکثیر هر دو جایگاه چند شکل ژن PPARGC1α شامل ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA ژنومی، بافر 1XPCR، ۲Mgcl2 میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۰/۵ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز، ۱ پیکومول بر میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت و مابقی حجم تا ۲۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر بود. شرایط دمایی در نظرگرفته شده شامل۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه دمای دناتوراسیون، ۳۰ سیکل دمایی با شرایط ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه دمای دناتوراسیون، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه دمای اتصال، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه دمای سنتز به نظر رسید. در نهایت سنتز نهایی به وسیله دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده به صورت لیوفیلیزه در اختیار قرار گرفتند که بر حسب سفارش شرکت سازنده (Generay Biotech)، برای به دست آوردن غلظت ۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر، مقادیر لازم آب دو بار تقطیر به آنها اضافه گردید. مشخصات پرایمرها، محل و طول قطعه تکثیری به همراه آنزیم برش دهنده هر جایگاه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد مطالعه، طول قطعه تکثیر و آنزیم شناسایی مناسب
Table 1. Studied primers, length of amplified sequence and desirable digestive enzyme

نام جایگاه	توالی پرایمر رفت و برگشت	محل و طول قطعه تکثیر	آنزیم شناسایی	شماره دستیابی
PPARGC1α – T19C	F:5' CATAGCCGGCGGCCCAGGTAATGATGCACGTTGGC 3' R: 5'TGGAGCCTTTCGTGCTGGTACTCCTCGTAGCTGTC 3'	اینترون ۹ ۲۵۰bp	Bsur I	AY547554
PPARGC1α - A968C	F:5'GCGAGCACGGTGTTACATTACTAAGGAGAGTTGGCTAG3' R:5'GAAAATCAGAAGTGTGATAGAC 3'	3' ژن ۱۹۱bp	Nhe I	AY321517

هضم آنزیمی RFLP

در این تحقیق آنزیم‌های محدود الاثر مناسب هضم جایگاه‌های مورد مطالعه، ساخت شرکت فرمنتاز بودند (جدول ۱). واکنش هضم آنزیمی طبق پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده آنزیم در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۳/۱۲۵ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر تانگو (بافر مخصوص آنزیم)، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم مربوط به هر جایگاه و ۱۴/۲۷۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام شد. میکروتیوب‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و طول شب برای هضم در انکوباتور قرار داده شدند.

تعیین ژنوتیپ، فراوانی آللی و ژنوتیپی

برای تعیین ژنوتیپ گاوها مقدار ۴ میکرولیتر از محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۳ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید به مدت ۵۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ الکتروفورز شد. با مشاهده ژل با دستگاه ژل داک تعیین ژنوتیپ دام‌ها بر اساس تعداد و اندازه باندهای هر جایگاه، صورت گرفت. سپس با استفاده نرم‌افزار آنالیز اطلاعات ژنتیک جمعیت PopGene ویرایش ۱/۳۱ فراوانی آللی هر ژن و فراوانی ژنوتیپی هر یک از جایگاه‌های مد نظر به طور جداگانه برآورد شد. پس از برآورد فراوانی‌های ژنوتیپی قابل مشاهده و مورد انتظار برای هر ژن با نرم افزار، با استفاده از آزمون کای مربع، جمعیت از نظر تعادل هاردی واینبرگ در سطح ۰/۰۵ بررسی شد.

برآورد پارامترهای ژنتیکی و هم بستگی ژنوتیپ‌ها و صفات تولیدی

صفات مورد بررسی در این تحقیق شامل رکوردهای دوره اول شیردهی گاوها مانند رکورد ماهیانه شیر، درصد چربی و پروتئین طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۹ بوده که از مرکز اصلاح نژاد دام استان برای آنالیزهای آماری گرفته شد. با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی محدود شده (REML) تحت مدل دام و مدل یک نرم‌افزار DFREML پارامترهای ژنتیکی و فنوتیپی برای سه صفت مورد مطالعه (شیر، درصد چربی و درصد پروتئین) به‌طور جداگانه برآورد شد. ارزش اصلاحی حیوانات در این نرم‌افزار با استفاده از روش بهترین پیش بینی نااریب خطی (BLUP) پیش‌بینی شد. اثرات ثابت در نظر گرفته شده در مدل شامل سال- فصل زایش و تعداد روزهای شیرواری و اثرات تصادفی شامل اثر حیوان و باقی مانده بودند. ارتباط بین چندشکلی‌های مد نظر با ارزش اصلاحی صفات مورد مطالعه، به‌صورت جداگانه و یا توام هر دو جایگاه در سطح معنی‌داری ۵ درصد، با نرم افزار آماری SASو مدل خطی زیربررسی شد.

$$Y_{ijk} = \mu + A968_i + T19_j + e_{ijk}$$

Y_{ijk}= ارزش اصلاحی برآورده شده برای هر کدام از صفات مورد مطالعه

$A968_i$= ژنوتیپ iام در جایگاه چندشکلی A968C

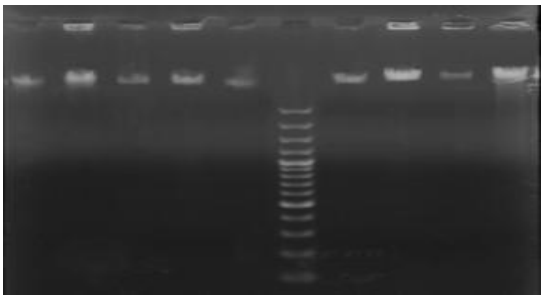
$T19_j$= ژنوتیپ iام در جایگاه چندشکلی T19C

نتایج و بحث

بررسی کیفیت DNA با دستگاه ژل داک بیان‌گر این بود که باندهای اضافی در نمونه‌ها وجود نداشت، به‌طوری که مولکول‌های DNA سالم بوده و شکستگی در آنها مشاهده نشد (شکل ۲).

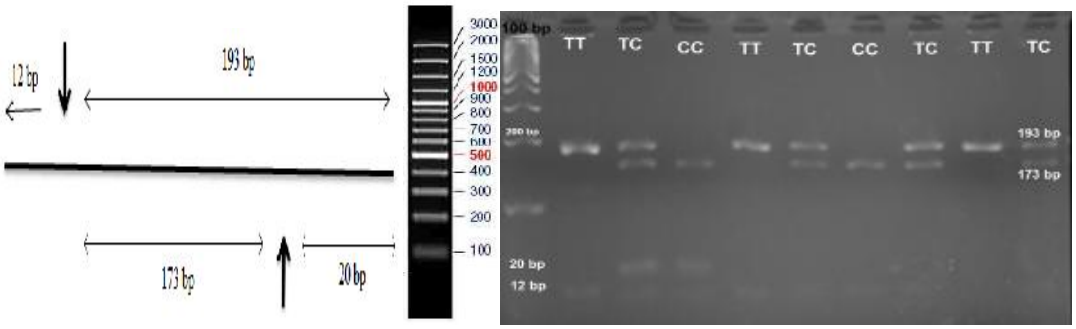
فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه PPARGC1α-T19C

قطعه ۲۰۵ جفت بازی تکثیر شده دارای دو منطقه شناسایی برای آنزیم Bsur I (Hae III) بوده است (GG↓CC). منطقه اول باعث برش این قطعه به قطعات ۱۹۳ و ۱۲ جفت باز شد که در این حالت آلل T شناسایی شد. اگر قطعه 193 جفت بازی دارای محل شناسایی دوم آنزیم بود، در این صورت به قطعات ۱۷۳ و ۲۰ جفت باز تقسیم می‌شد که در این حالت باعث تشخیص آلل C می‌گردید. نمونه‌ها پس از انجام واکنش هضمی، روی ژل آگارز ۳ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شده و تعیین ژنوتیپ آن‌ها صورت گرفت (شکل ۳). پس از تعیین ژنوتیپ‌ها، برای بررسی فراوانی ژنی و ژنوتیپی جمعیت مورد مطالعه، تعداد گاوهای با ژنوتیپ‌های مختلف ثبت و شمارش شدند. فراوانی آللی، ژنوتیپی، هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار، و نیز تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار PopGene ویرایش ۱/۳۱ محاسبه گردید (جدول ۲). شاخص‌های هتروزیگوتی و هموزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین و کمترین فراوانی ژنوتیپی جمعیت مورد مطالعه، به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های TC و TT بود. با بررسی مقدار عدد کای- مربع برآورد شده با نرم‌افزار ژنتیکی PopGene (۰/۷۳۱۳) با مقدار جدول مشخص شد که جمعیت مورد مطالعه از نظر ژن PPARGC1α-T19C در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارد.



شکل ۲- کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪

Figure 2. The quality of extracted DNA on 1% agarose gel.



(ب) (الف)

شکل ۳- (الف) طرح شماتیک محل تکثیر ژن PPARGC1α-T19C و هضم توسط آنزیم *Bsur I* را نشان می‌دهد (فلش‌ها جایگاه‌های شناسایی آنزیم می‌باشد). (ب) تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم T19C ژن PPARGC1α (به علت کوچک بودن بیش از حد قطعات ۲۰ و ۱۲ جفت بازی به سختی قابل تشخیص هستند).

Figure 3. (a) Schematic picture of amplified sequence of PPARGC1α-T19C and digestion by *Bsur I* (arrows show the recognition sites of enzyme). (b) Genotyping of PPARGC1α-T19C (amplified sequences of 20 and 12 bp are hardly visible).

جدول ۲- فراوانی آللی و ژنوتیپی PPARGC1α –T19C

Table 2. Allelic and genotypic frequencies of PPARGC1α-T19C

ژنوتیپ	TT	TC	CC
تعداد حیوانات	۱۵	۳۹	۳۷
فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده	۰/۱۶۴	۰/۴۲۸	۰/۴۰۷
فراوانی ژنوتیپی مورد انتظار	۰/۱۴۳۷	۰/۴۷۰۸	۰/۳۸۵۵
فراوانی آللی (ژنی)	T = ۰/۳۷۹	C = ۰/۶۲۱	

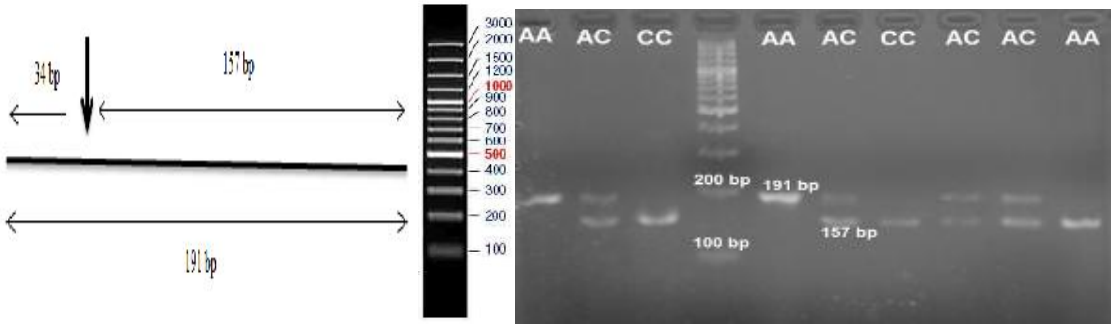
جدول ۳- شاخص‌های هموزیگوتی و هتروزیگوتی جایگاه‌های چندشکل ژن PPARGC1α

Table 3. Hemozygosity and heterozygosity indexes of PPARGC1α polymorphic sites

جایگاه	اندازه نمونه	هموزیگوتی مشاهده شده	هتروزیگوتی مشاهده شده	هموزیگوتی مورد انتظار	هتروزیگوتی مورد انتظار
PPARGC1α-T19C	۱۰۰	۰/۵۷۱۴	۰/۴۲۸۶	۰/۵۲۹۲	۰/۴۷۰۸
PPARGC1α- A968C	۱۰۰	۰/۶۱۵۴	۰/۳۸۴۶	۰/۶۶۳۲	۰/۳۳۶۸

فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه PPARGC1α-A968C

با توجه به این‌که جایگاه شناسایی آنزیم NheI به صورت G↓CTAGC است، لذا قطعه ۱۹۱ جفت بازی تکثیر شده فقط دارای یک منطقه شناسایی برای آنزیم بود. اگر نمونه مورد بررسی در توالی ژنومی خود دارای توالی شناسایی آنزیم بود، قطعه ۱۹۱ جفت بازی به قطعات ۱۵۷ و ۳۴ جفت بازی هضم می‌شد که در این صورت آلل A شناسایی می‌شد، اما اگر نمونه دارای این توالی نبود، قطعه ۱۹۱ جفت بازی برش نخورده باقی می‌ماند که در این صورت آلل شناسایی شده C بود. نمونه‌ها پس از واکنش هضمی روی ژل آگارز ۳ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، الکتروفورز شدند و تعین ژنوتیپ آنها صورت گرفت (شکل ۴). به علت کوچک بودن بیش از حد قطعه ۳۴ جفت بازی، این باند به سختی قابل تشخیص بود. معمولا برای مشاهده قطعات کوچکتر ژل عمودی اکریل آمید از ژل آگارز مناسب‌تر می‌باشد.



(الف) (ب)

شکل ۴- (الف) طرح شماتیک محل تکثیر ژن PPARGC1α-A968C و هضم از طریق آنزیم *NheI* را نشان می‌دهد (فلش‌ها جایگاه‌های شناسایی آنزیم می‌باشد). (ب) تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم A968C ژن PPARGC1α (قطعه ۳۴ جفت بازی به علت کوچک بودن به سختی قابل تشخیص بود).

Figure 4. (a) Schematic picture of amplified site of PPARGC1α-A968C and digestion by *NheI* (arrows show the recognition sites of enzyme). (b) Gnotyping of PPARGC1α-A968C (34 bp band is hardly visibl)

مشاهده شده و مورد انتظار و نیز تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار PopGene ویرایش ۱/۳۱ محاسبه گردید (جدول ۴). شاخص‌های هتروزیگوتی و هموزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار در جدول ۳ آورده شده است. فراوانی ژنوتیپ AA در جمعیت مورد مطالعه بیشترین مقدار بود و ژنوتیپ CC کمترین فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده را به خود اختصاص داد. در این مطالعه فقط دو گاو دارای ژنوتیپ هموزیگوت CC بودند.

جدول ۴- فراوانی ژنی و ژنوتیپی PPARGC1α-A968C

Table 4. Gene and genotype frequencies of PPARGC1α-A968C

ژنوتیپ	AA	AC	CC
تعداد حیوانات	۵۴	۳۵	۲
فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده	۰/۵۹۳	۰/۳۸۵	۰/۰۲۲
فراوانی ژنوتیپی مورد انتظار	۰/۶۱۷۳	۰/۳۳۶۷	۰/۰۴۵۹
فراوانی آللی (ژنی)	A = ۰/۷۸۶	C = ۰/۲۱۴	

نتایج حاصل از محاسبه عدد کای- مربع (۱/۸۳۹۹) با نرم‌افزار ژنتیکی PopGene حاکی از متعادل بودن این جمعیت از نظر جایگاه PPARGC1α-A968C در تعادل هاردی واینبرگ بود.

در مطالعه‌ای که در کشور لهستان روی جایگاه PPARGC1α-A968C انجام شد، فراوانی آلل A و C را به ترتیب ۰/۶۴ و ۰/۳۶ گزارش کردند و هر سه نوع ژنوتیپ ممکن نیز شناسایی شد (۵). در مطالعه دیگر روی دو جمعیت متفاوت گاوهای هلشتاین درآمریکا، فراوانی ژنوتیپی AA، AC و CC به‌ترتیب ۱۶/۳، ۵۰/۶ و ۳۳/۱ درصد در یک جمعیت و ۱۲/۳، ۴۳ و ۴۴/۷ درصد در جمعیت دیگر گزارش گردید (۱).

این در حالی است که در تحقیق دیگر با بررسی چند شکلی A968C در منطقه غیرقابل ترجمه ´۳ ژن PPARGC1α فراوانی ژنوتیپی AA، AC و CC به‌ترتیب ۰/۷۶، ۰/۲۴ و صفر گزارش گردید (۴). پسندیده و همکاران (۷) فراوانی ژنوتیپی AA، AC و CC را در گاوهای هلشتاین ایرانی به ترتیب ۰/۳۸، ۰/۵۲ و ۰/۱۰ گزارش کردند. بیشتر بودن فراوانی آلل A در مطالعه حاضر با نتایج کمیسارک و دورین (۳)، کوالوسکا و همکاران (۴) و پسندیده و همکاران (۷) مطابقت داشت اما با نتایج خطیب و همکاران (۱) هم‌سو نبود.

جهش دیگری که در این تحقیق روی ژن PPARGC1α مورد بررسی قرار گرفت، چند شکلی تک نوکلئوتیدی T19C در موقعیت ۱۸۹۲ در منطقه اینترون ۹ بود. فراوانی ژنوتیپی TT، TC و CC در این جایگاه به ترتیب ۰/۱۶۴، ۰/۴۲۸ و ۰/۴۰۷ و فراوانی آللی T و C به‌ترتیب ۰/۳۷۹ و ۰/۶۲۱ محاسبه گردید. فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت TC مشاهده شده در جمعیت مورد مطالعه بیشترین مقدار بود و همچنین کمترین فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده مربوط به ژنوتیپ TT بود. در بررسی روی ۴۵۳ گاو فریزین در لهستان، فراوانی آلل T و C به ترتیب ۰/۲۷ و ۰/۷۳ (۳) و در مطالعه دیگر روی جمعیت گله هلشتاین دانشگاه ویسکانسین (۹۳۱ رأس)، فراوانی ژنوتیپی TT، TC و CC به ترتیب ۱/۹، ۶۵ و ۳۳/۱ درصد گزارش شد (۱). کوالوسکا و همکاران (۴) فراوانی ژنوتیپی TT، TC و CC را به‌ترتیب ۰/۲۷، ۰/۷۲ و ۰/۰۱

گزارش کردند، به طوری که کلاس ژنوتیپی CC در این تحقیق دارای کمترین فراوانی بود. پسندیده و همکاران (۷) با بررسی ژن PPARGC1α-T19C در گاوهای هلشتاین ایرانی فراوانی ژنوتیپی TT، TC و CC را به‌ترتیب ۰/۱۲، ۰/۶۵ و ۰/۲۳ گزارش کردند.

پیش‌بینی ارزش ارثی صفات تولیدی و ارتباط آن با انواع ژنوتیپ

ارزش اصلاحی صفات تولید شیر با استفاده از نرم‌افزار DFREML برآورد شد که ضمن اطلاع به گاوداری برای استفاده در برنامه‌های انتخاب و اصلاح نژاد، از آنها برای بررسی ارتباط بین صفات تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین با چندشکلی در جایگاه‌های مختلف استفاده شد. نتایج آنالیزهای آماری حاکی از این مطلب بود که چه به‌صورت مجزا و چه توام، ژنوتیپ‌های افراد در این دو جایگاه تاثیری معنی‌دار روی ارزش اصلاحی صفات نداشتند.

شینیک و همکاران (۸) در کشور هلند اثرات چند شکلی ژن PPARGC1α-T19C را روی ترکیب چربی شیر گاو بررسی نمودند و نتایج آنها نشان داد که فراوانی آلل C به مراتب بیشتر از فراوانی آلل T بود. در تحقیقی روی جایگاه تک نوکلئوتیدی ژن PPARGC1α، موقعیت ۱۸۹۲ منطقه اینترون ۹ به همراه ۱۱ چندشکلی دیگر این ژن بررسی شد. نتایج حاکی از این مطلب بود که ژنوتیپ هتروزیگوت در منطقه اینترون ۹ بالاترین فراوانی را دارد (۹). در مطالعه حاضر فراوانی آلل C بیشترین و آلل T کمترین مقدار را داشتند که با نتایج برخی از تحقیقات مطابقت (۸،۷،۳،۱) و با برخی دیگر موافق نبود (۴).

در بررسی جداگانه و توام چند شکلی ژنوتیپ‌های PPARGC1α-A968C و T19C با صفات تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین ارزش اصلاحی صفات و ژنوتیپ‌ها یافت نشد. در تحقیق کمیسارک و دورین (۳) نتایج معنی‌داری از ارتباط بین چند شکلی‌های A968C و T19C با صفات تولید شیر، پروتئین، چربی و همچنین درصد آنها یافت نشد، اگرچه ارتباط بسیار قابل توجهی بین چندشکلی T19C و میزان برگشت‌ناپذیری در تلیسه‌ها و اثر کمتری از تاثیر این جایگاه روی تولید پروتئین مشاهده گردید. خطیب و همکاران (۱) نیز ارتباطی بین چندشکلی T19C مشاهده نکردند، در حالی که در تحقیقی دیگر، ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم T19C و تولید چربی شیر یافت شد،اگرچه روی مقدار چربی شیر تاثیری نداشت (۹).

در مطالعه پسندیده و همکاران (۵)، ژنوتیپ‌های موقعیت C<c.1892T با صفات درصد چربی تصحیح شده بر اساس دو بار دو شش در روز، ارزش اصلاحی تولید شیر، ارزش اصلاحی درصد چربی شیر، تولید پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز و تولید پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ گاوهای هلشتاین استان‌های اصفهان و تهران، ارتباط معنی‌دار نشان دادند. همچنین، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های موقعیت C<c.3359A با دو صفت درصد چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز و ارزش اصلاحی درصد چربی شیر مشاهده شد.

خطیب و همکاران (۱)، ارتباط معنی‌دار جایگاه A968C را با تولید شیر و درصد پروتئین و امتیاز سلول‌های بدنی گزارش کردند، به طوری که آلل A با تاثیر معنی‌دار و مثبت بر درصد پروتئین و کاهش تولید شیر همراه بود. وایکارد و همکاران (۹) گزارش کردند که ارتباط معنی‌داری بین تولید چربی شیر و چندشکلی A968C وجود دارد اما این ارتباط برای تولید شیر و درصد چربی شیر معنی‌دار نبود. این محققان تاثیر روی چربی شیر را با اثر بی تعادلی ناشی از پیوستگی بین چند شکلی‌های T19C و A968C مرتبط دانسته‌اند. در تحقیقی دیگر ژن PPARGC1α به همراه ژن‌های ABCG2، FASN، OLR1، PRL و STAT5 در ۱۹۰۵ راس گاو فریزین هلشتاین در جایگاه چندشکلی تک نوکلئوتیدی موقعیت ۱۸۹۲ منطقه اینترون ۹ بررسی شد. از نظر فراوانی ژنوتیپی جمعیت در تعادل هاردی واینبرگ بود. با وجود این‌که قبلا اثر این چندشکلی روی صفات تولیدی شیر گزارش شده بود اما محققین نتوانستند اثر معنی‌داری بین این ژنوتیپ و صفات تولیدی شیر مشاهده کنند (۸).

عملکرد شیردهی در گاوهای شیری پر تولید، باعث محدودیت در فرآیندهای متابولیکی می‌شود که با متابولیسم گلوکز و چربی در اثر هجوم شیردهی همراه است. در این میان PPARGC1α می‌تواند یک واسطه یا میانجی اساسی و قابل قبولی برای خواسته‌های متابولیکی در نظر گرفته شود که با پیشرفت شیردهی در گاوهای شیری همراه است. نقش بالقوه این ژن در متابولیسم غدد پستانی به علت نقش پویا و حساس در تنظیم برنامه‌های مرتبط با هموستازی انرژی و چاقی مرتبط با آن و هماهنگ کردن فرآیندهای سازگاری متابولیکی کبد، بافت چربی و عضلات می‌تواند محرز و مشخص باشد (۹). در مطالعه حاضر هر سه ژنوتیپ ممکن در جایگاه‌های مورد نظر مشاهده شد و جمعیت در حالت تعادل هاردی واینبرگ بود. اگرچه در بررسی جداگانه و توأم چندشکلی‌های ژن PPARGC1α با یک‌دیگر هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین ارزش اصلاحی صفات تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین و این ژنوتیپ‌ها یافت نشد، اما افزایش تعداد نمونه‌ها برای انجام آنالیزهای آماری دقیق‌تر و کاهش واریانس خطا، توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این جستار لازم می‌دانند تا از مسوولان محترم مرکز آموزش جهاد کشاورزی خراسان رضوی به‌ویژه آقای مهندس زرقی که در تهیه نمونه‌های خون همکاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را بنمایند.

منابع

1. Khatib, H., I. Zaitoun, J. Wiebelhaus-Finger, Y. M. Chang and G.J. M. Rosa. 2007. The Association of bovine *PPARGC1A* and *OPN* genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. Journal of Dairy Science, 90: 2966-2970.
2. Khatkar, M.S., P.C. Thomson, I. Tammen and H.W. Raadsma. 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: Review and meta-analysis. Genetic Selection Evolution, 36: 163-190.
3. Komisarek, J. and Z. Dorynek. 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, 50: 125-132.
4. Kowalewska, I.V., H. Kulig and M. Kmiec. 2010. Associations between the bovine PPARGC1A gene and milk production traits. Czech Journal of Animal Science, 55: 195-199.
5. Pasandideh, M., M.R. Mohammadabadi, A. Tarang, A. Esmaili, R. Sayghalani, S. Ansari and R. Pasandideh. 2011. 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 (In Persian).
6. Pasandideh, M., M.R. MohammadAbadi, A.R. Torang, A. Esmaeilizadeh, R. Seighalani, S. Ansari and H. KharatiKoopaei. 2010. Analysis of bovine PPARGC1A gene polymorphism (to position 1892T>C) in Iran Holstein cattle populations. Proceeding of the 4th congress on animal science, 2843-2874 pp. Karaj. Iran (In Persian).
7. Pasandideh, M., M.R. MohammadAbadi, A.R. Torang, A. Esmaeilizadeh, R. Seighalani, S. Ansari, Sh. Ghovvati and H. KharatiKoopaei. 2010. Analysis of bovine PPARGC1A gene polymorphism (to position 3359A>C) in Iran Holstein cattle populations. Proceeding of the 4th congress on animal science, 2848-2852 pp. Karaj. Iran (In Persian).
8. Schennink, A., H. Bovenhuis, K.M. Le´on-Kloosterziel, J.A.M. van Arendonk and M. H.P.W. Visker. 2009. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. 2009. Animal Genetics, 40: 909-916.
9. Weikard, R., C. Kuhn, T. Goldammer, G. Freyer and M. Schwerin. 2005. The bovine PPARGC1A gene: Molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. Physiology Genomics, 21: 1-13.

The Influence of two Polymorphic Sites of PPARGC1α Gene on Milk Production Traits in Brown Swiss Cattle

Sonia Zakizadeh[1], Mir Jalal Hashemi[2], Reza Vakili[3] and Mohsen Ghods Rohani[4]

1- Associate Professor, Animal Science, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO (Correspond Author: Soniazaki@yahoo.com)
2 and 3- M.Sc. and Associate Professor, Islamic Azad University, Kashmar Branch
4- Assistant Professor, Food Science, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO
Received: March 24, 2013 Accepted: October 25, 2014

Abstract

The most important traits of animal are affected by quantitative trait loci and environmental effects. Peroxisome proliferator's active receptor gamma co activator 1 alpha (PPARGC1A) gene is a member of transcription co activators family, which plays a central role in cellular energy hemostasis regulating. In this study, blood samples were collected from hundred Brown Swiss cow and DNA was extracted from whole blood by modified salting out procedure. Two SNP positions, one located in the 3-untranslated region (A/C) and the other one in iron 9 of PPARGC1A-T19C were genotyped by PCR-RFLP. Breeding values were individually predicted for milk production, fat and protein milk percent traits by DFREML model one. Association between polymorphisms and breeding values were investigated by SAS at 5% significant level. Genotype frequencies of AA, AC and CC genotypes at PPARGC1a-A968C were 0.593, 0.385 and 0.022, as well as, the allele frequencies of A and C were 0.786 and 0.214, respectively. Genotype frequencies of TT, TC and CC for PPARGC1a-T19C were 0.165, 0.428 and 0.407 and the allele frequencies of T and C were 0.379 and 0.621, respectively. Chi-square test of the both SNPs indicated Hardy-Weinberg expectations ($P<0.05$). In the both separated and common analyze of polymorphisms, there was no significant associations between genotypes of polymorphisms and breeding values of milk production, fat and protein percent traits, however, increasing the samples are recommended for more precise of statistical analysis and decreasing the mean square of error.

Keywords: Breeding Value, Milk Production Traits, PCR-RFLP, PPARGC1A, Single Nucleotide Polymorphism