دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

ارتباط پلی‌مورفیسم ناحیه ای از ژن بتادیفنسین با ورم پستان بالینی در گاوهای شیری هلشتاین: یک مطالعه شاهد- موردی

فاطمه یوسفی[۱]، عبداله میرزایی[۲]، حسن شریفی یزدی[۳] و ابوالفضل حاجی بمانی شورکی[۴]

۱- دانش‌آموخته‌ی دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
۲- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران، (نویسنده مسوول: mirzaei@shirazu.ac.ir)
۳- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۴- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۸
صفحه: ۱۱۸ تا ۱۲۵

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: در صنعت پرورش گاو شیری همزمان با انتخاب گاوهای پرتولید، اهمیت شناسایی ژنوتیپ مقاوم به بیماری‌ها از جمله ورم پستان نیز تاکید شده است. پلی‌مورفیسم ژن بتادیفنسین گاو می‌تواند به عنوان یکی از نشانگرهای مولکولی در انتخاب گاوهای شیری مقاوم به ورم پستان مورد استفاده قرار گیرد. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط موتاسیون نقطه ای ژن بتا-دیفنسین و وقوع ورم پستان بالینی در گاوهای شیری با استفاده از روش RFLP-PCR در جهت شناسایی ژنوتیپ مطلوب ژن بتادیفنسین گاو شیری مقاوم به ورم پستان بود.

مواد و روش‌ها: از مجموع ۷۳ گاو ماده (۳۲ راس دارای سابقه بیماری ورم‌پستان و ۴۱ راس فاقد سابقه) در یک گاوداری صنعتی نمونه خون در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA اخذ شد. پس از استخراج DNA، و تکثیر ناحیه دارای پلی‌مورفیسم ژن بتادیفنسین گاو (۳۹۳ جفت باز)، جهت تشخیص سریع پلی‌مورفیسم در ناحیه ۲۲۳۹ توالی ژن (تبدیل باز C به T)، محصولات PCR، توسط آنزیم اندونوکلئاز (NlaIII (Hin1II) هضم آنزیمی شد. بررسی آماری نتایج مطالعه به وسیله آزمون مربع کای (Chi-square) انجام گرفت.

یافته‌ها: فراوانی آلل های مربوط به ژن بتادیفنسین درمورد آلل C و آلل T در جمعیت گاوهای مورد مطالعه به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۳۲ بود. نتایج این مطالعه بیان‌گر ارتباط بین موارد ابتلا به بیماری ورم پستان و وجود پلی‌مورفیسم در ژن بتادیفنسین بود. بطوریکه، موارد ابتلا به بیماری ورم پستان در گاوهای دارای آلل T نسبت به گاوهای فاقد آن از نظر عددی کمتر بود.

نتیجه‌گیری: برخی از پلی‌مورفیسم‌های ژن بتادیفنسین، می‌تواند در برنامه‌های تولید مثلی به‌عنوان نشانگر مولکولی جهت انتخاب گاوهای شیری به منظور کاهش تعداد موارد ابتلا به بیماری ورم پستان بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بتادیفنسین، پلی‌مورفیسم، گاو شیری، ورم‌پستان

مقدمه

در صنعت پرورش گاو شیری، اصلاح نژاد موجب به وجود آمدن گاوهایی با تولید بالا جهت تامین نیازهای جوامع انسانی شده است (۲۳،۲۵). با توجه به اینکه وراثت‌پذیری ورم‌پستان بیشتر از وراثت‌پذیری تولید شیر است و از طرفی حساسیت به بیماری ورم‌پستان درگاوهای پرتولید افزایش یافته است، در نتیجه گاوهای جدید نسبت به اجداد خود به ورم‌پستان حساس‌تر شده‌اند (۹). ورم‌پستان شایع‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری عفونی غده پستان در گاوهای شیری است که عموماً توسط باکتری‌ها ایجاد می‌شود. این بیماری وضعیت سلامتی و زیستی دام را تغییر داده و به دلیل کاهش میزان تولید شیر و کیفیت آن، تحمیل هزینه‌های درمان دامپزشکی، عدم فروش شیرهای آلوده به آنتی بیوتیک و گاهی حذف زودهنگام دام، منجر به ضرر اقتصادی می‌شود (۴۷). راهبردهای گسترده‌ای از جمله اصلاح نژاد برای کاهش بروز عفونت‌های پستانی اجرا شده است. استفاده از اصلاح نژاد به عنوان ابزاری برای مقابله با ورم‌پستان در گاوهای شیری طی بیست سال گذشته مورد تلاش تحقیقاتی قابل توجهی بوده است. بسیاری از مطالعات، عوامل ژنتیکی شناخته شده‌ای را در ارتباط با صفات تولید شیر و همچنین جهت تشخیص مقاومت و یا حساسیت ابتلا به ورم‌پستان در گاوهای شیری و تلیسه شناسایی کرده‌اند (۴۶،۱۴،۱۵،۴۱،۳). پپتیدهای ضد میکروبی جزء مهم سیستم ایمنی ذاتی جهت محافظت میزبان در برابر میکروارگانیسم‌ها هستند (۵،۱۹) وجود این مولکول‌ها در سلول‌های اپیتلیال غشاء مخاطی، پوست و سلول‌های فاگوسیت کننده مخصوصاً نوتروفیل‌ها به اثبات رسیده و دارای نقش‌های متعددی هستند (۱،۱۶،۲۷،۳۲). القای تولید این پپتیدها توسط عوامل متعددی مانند باکتری‌ها و بعضی سیتوکین‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها انجام می‌شود (۲،۳۱،۳۹). یکی از مهم‌ترین این پپتیدها، دیفنسین است که مولکولی کاتیونی و کوچک بوده و دارای خاصیت وسیع ضد میکروبی مقابل باکتری‌های گرم مثبت و منفی، قارچ‌ها و برخی ویروس‌ها است (۴۰،۲۹،۱۲). دیفنسین‌ها به سه زیرگروه آلفا، بتا و تتا طبقه‌بندی می‌شوند (۱۷،۲۸). ژن *بتادیفنسین* برای تولید پپتیدهای چند منظوره با دامنه وسیعی از فعالیت ضد میکروبی کد می‌شود (۱۹،۳۶). در ژنوم گاو ۵۷ ژن *بتادیفنسین* شناسایی شده است که غالباً در بافت‌های اپیتلیال اندام‌های مختلف از قبیل غدد اشکی بینی، غدد پستانی، مجاری هوایی و ادراری-تناسلی بیان می‌شود (۲۹). البته، بتادیفنسین در پژوهش‌های دیگری از نوتروفیل‌های قسمت‌های مختلف گاو نیز جدا شده است (۷،۴۵). این پپتیدها به عنوان اولین خط دفاعی در برابر عفونت‌ها از جمله عفونت‌های داخل پستان در گاو شیری نقش دارند (۱۹). چون پاسخ التهابی در زمان ایجاد عفونت یکی از مکانیسم‌های دفاع ذاتی است، مطالعات مختلف با بررسی نقش این مولکول‌ها در

پاسخ التهابی به عفونت در غدد پستانی گاو شیری، بیانگر افزایش بیان ژن *بتادیفنسین* در بافت پستان گاوهای آلوده هستند (۴،۱۲،۱۹،۲۱،۴۳). با توجه به اینکه دیفنسین محافظت از بافت پستان در برابر کلونیزه شدن باکتری‌ها را انجام می‌دهد، درنتیجه کیفیت شیر را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴،۱۰،۲۶). پاسخ ایمنی در بافت‌های غدد پستانی می‌تواند جهت ارتقاء راهکارهای محافظتی برای مبارزه با این بیماری کمک کند. بالاتر بودن بیان اکثر ژن‌های رمزکننده *بتادفنسین* در بافت‌های پستانی آلوده با باکتری‌ها نسبت به موارد غیر آلوده، نشانه نقش اساسی آن‌ها در دفاع از غده پستان گاو در برابر ورم‌پستان است (۲۴). در گاو شیری، بین نژادهای مختلف از نظر ژنتیکی تفاوت‌هایی در بیان و آرایش ژن‌های *بتادیفنسین* وجود دارد که در درون هر نژاد نیز این تفاوت‌ها گزارش شده است که باعث تفاوت در میزان تولید شیر و باروری می‌شوند (۳۰،۴۴). پلی‌مورفیسم ژن*بتادیفنسین*-۴ گاوی می‌تواند یک نشانگر ژنتیکی برای شمارش سلول‌های سوماتیک، چربی، پروتئین و لاکتوز شیر باشد (۲۱،۲۶). مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر بیانگر استفاده از پلی‌مورفیسم ژن *بتادیفنسین* در برنامه‌های اصلاح نژاد گاو به منظور افزایش بهروه‌وری و تولید گاوهای مقاوم به عفونت‌ها از جمله ورم‌پستان هستند (۴،۱۹،۲۱).

از آنجایی که اطلاعات کافی در خصوص ارتباط بین ابتلا به ورم‌پستان بالینی و پلی‌مورفیسم ژن *بتادیفنسین*-۴ در گاو شیری در دسترس نبود و به نظر می‌رسید که شناسایی پلی‌مورفیسم ژن *بتادیفنسین*-۴ (به عنوان یک نشانگر انتخاب ژنتیکی مقاومت گاو به ورم‌پستان) دارای اهمیت است. از این رو در این پژوهش با استفاده ازروش RFLP-PCR، موتاسیون نقطه‌ای در یک ناحیه مشخصی از ژن *بتادیفنسین*-۴ شناسایی و سپس ارتباط پلی‌مورفیسم شناسایی شده به عنوان یکی از مارکرهای ژنتیکی مرتبط با ورم‌پستان درگاو مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

انتخاب گاوهای ماده مورد مطالعه بر اساس تاریخچه مشخص در یک گاوداری صنعتی انجام شد، تعداد کل گاوهای مورد مطالعه ۷۳ رأس بود به طوری که ۳۲ راس گاو دارای سابقه بیماری ورم‌پستان و ۴۱ راس گاو سالم یا فاقد سابقه ابتلا به ورم‌پستان در دوره‌های شیردهی قبلی بودند. همه‌ی گاوها در سیستم open shed نگهداری می‌شدند، روزانه سه بار شیردوشی و بعد از گذراندن دوره انتظار اختیاری (۵۵ روزگی بعد از زایش) تلقیح مصنوعی می‌شدند. همچنین همه گاوها تحت یک شرایط محیطی و آب و هوایی و مدیریت یکسان بودند. از همه گاوها به میزان ۲ میلی‌لیتر خون از ورید دمی در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA گرفته و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پس از خارج نمودن نمونه‌ها از فریزر ۲۰- و قرار گرفتن آن‌ها در دمای محیط و ذوب شدن آن، به مدت ۱۰ ثانیه هر نمونه ورتکس و حجم ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه خون کامل به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل ریخته شد. مراحل استخراج DNA در اتاق مخصوص و مجزایی در آزمایشگاه مرکزی انجام گرفت. استخراج DNA بر اساس مراحل ارائه شده درکیت استخراج DNA (PrimePrepTM) شرکت GeNet Bio کشور کره انجام شد.

جهت تکثیر ناحیه دارای پلی‌مورفیسم ژن *بتادیفنسین* گاو (۳۹۳ جفت باز)، از پرایمرهای پیشنهادی طبق جدول ۱ استفاده شد (۴). سنتز پرایمرها توسط شرکت تحقیقاتی ژن فن آوران با مشخصات مندرج در جدول ۱ انجام شد. رقیق‌سازی پرایمرها به نحوی انجام شد که غلظت محلول کار پرایمر جهت انجام PCR، ۱۰میکرومولار و غلظت نهایی در واکنش ۰/۴ میکرومولار بود. تمامی رقیق‌سازی‌ها طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای بکار رفته در PCR

Table 1. Characteristics of primers used in PCR

نام پرایمر	ترادف (۳'-۵')	تعدادباز پرایمرها	طول محصول (bp)
Beta F	5'-TGGCAGGAAGGAGGATGTAG-3'	۲۰	۳۹۳
Beta R	5'-ACGGCACAAGAACGGAATAC-3'	۲۰	

محل اتصال پرایمر Forward در قطعه اینترون بر اساس شماره دسترسی در بانک ژن AF008307 بین نوکلئوتیدهای ۲۱۰۰ و ۲۱۱۹ بود، در حالی که ناحیه اتصال پرایمر Reverse مطابق ترادف قابل دسترسی در بانک ژن امریکا، اگزون ۲ بین نوکلئوتیدهای ۲۴۷۳ و ۲۴۹۲ بود.

جهت تکثیر نواحی ژنی مورد نظر در گام اول حجم نهایی واکنش ۳۰ میکرولیتر مدنظر قرار گرفت و سایر مواد مورد نیاز جهت واکنش PCR برای این حجم نهایی بر اساس میکرولیتر محاسبه شد که شامل ۲/۱ میکرولیتر پرایمر F، ۲/۱ میکرولیتر پرایمر R، ۱۵ میکرولیترMaster mix 2x، ۶/۸ میکرولیتر آب مقطر بود. ساخت مسترمیکس در کنار یخ و شرایط استریل صورت گرفت. در پایان به میزان ۴ میکرولیتر به ازای هر نمونه DNA به مخلوط در میکروتیوب‌های استریل مخصوص PCR اضافه شد و یک واکنش ۳۰ میکرولیتری PCR آماده شد. برنامه حرارتی PCR جهت اجرای سیکل‌های دمایی و زمانی مختلف (واسرشت سازی اولیه ^{o}C ۹۴ – ۵ دقیقه؛ واسرشت سازی: ^{o}C ۹۴ – ۱ دقیقه؛ الحاق: ^{o}C ۵۷ – ۴۵ ثانیه؛ گسترش: ^{o}C ۷۲ - ۴۵ ثانیه؛ گسترش نهایی^{o}C ۷۲ – ۵ دقیقه) به دستگاه ترموسایکلر Bio RAD (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) داده شد. یک قطره روغن معدنی به میکروتیوب حاوی نمونه‌ها اضافه گردید و درب میکروتیوب بسته و در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. با پایان یافتن سیکل‌های حرارتی و زمانی PCR و تکثیر نواحی ژنی مورد

نظر، محصول به دست آمده، با استفاده از الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. از ژل با درصد حدودی ۱/۵ به منظور رؤیت محصولات در الکتروفورز در کنار شاخص ۱۰۰ جفت بازی (Ladder) (GeneRuler DNA ladder plus, 100bp) استفاده شد. از رنگ Red safe نیز جهت رنگ آمیزی ژل و نمایان شدن باندها استفاده شد.

جهت شناسایی و تشخیص سریع پلی‌مورفیسم رخ داده در ناحیه ۲۲۳۹ توالی ژن *بتا ۴ دیفنسین* (تبدیل باز C به T)، محصولات PCR (۳۹۳ جفت باز)، توسط آنزیم اندونوکلئاز *Nla*III (*Hin*1II) هضم آنزیمی انجام شد. روند هضم آنزیمی توسط این آنزیم برشگر (محدودالاثر) به این نحو بود که در صورت موتاسیون نقطه‌ای و تبدیل C به T در ناحیه موردنظر با توالی نوکلئوتیدی '5'CATG3، آنزیم *Nla*III (*Hin*1II) قادر به شناسایی ترادف و برش دادن این ناحیه ژنی بود. لذا در حیوانات هموزیگوت موتاسیون یافته (ژنوتیپ TT)، محصول با وزن ملکولی ۳۹۳ جفت بازی ژن *بتادیفنسین* به دنبال هضم آنزیمی به دو قطعه کوچکتر ۲۵۳ و ۱۴۰ جفت بازی شکسته شد؛ در حالی‌که محصول PCR براساس توالی ژن در گاوهای با ژنوتیپ CC یا همان گروه هموزیگوت موتاسیون نیافته برش نخورده و بدون هضم با وزن مولکولی اولیه خود (۳۹۳ جفت بازی) باقی ماند. از طرفی محصولات PCR در گاوهای با ژنوتیپ CT یا هتروزیگوت پس از هضم آنزیمی به سه قطعه مختلف ۳۹۳، ۲۵۳ و ۱۴۰ جفت بازی شکسته شد. محصول به دست آمده از واکنش PCR RFLP روی ژل ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید.

بررسی آماری داده‌های مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS for Windows, Version 22, Inc., Chicago, Illinois) انجام شد. جهت بررسی آماری و مقایسه درصد (تعداد) ژنوتیپ‌های مختلف گاوهای دارای سابقه بیماری ورم پستان و فاقد سابقه ابتلا به بیماری بر اساس نوع پلی‌مورفیسم ژن *بتادیفنسین* و هم‌چنین مقایسه آن‌ها بر اساس حضور آلل T و یا عدم حضور آن از آزمون مربع کای (Chi-square) استفاده گردید.

آنالیز آماری و مقایسه درصد (تعداد) گاوهای بیمار دارای آلل T (CT، TT) در مقایسه با گاوهای بیمار فاقد آلل T (CC) بر اساس تعداد موارد ابتلا (یک بار در مقایسه با دو و یا بیش‌تر از آن) به بیماری ورم‌پستان به وسیله آزمون مربع کای (Chi-square) انجام گرفت. نتایج مربوط به گاوهای با ژنوتیپ مختلف به صورت تعداد و درصد گزارش شدند. اختلاف آماری با دقت ($p < ۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

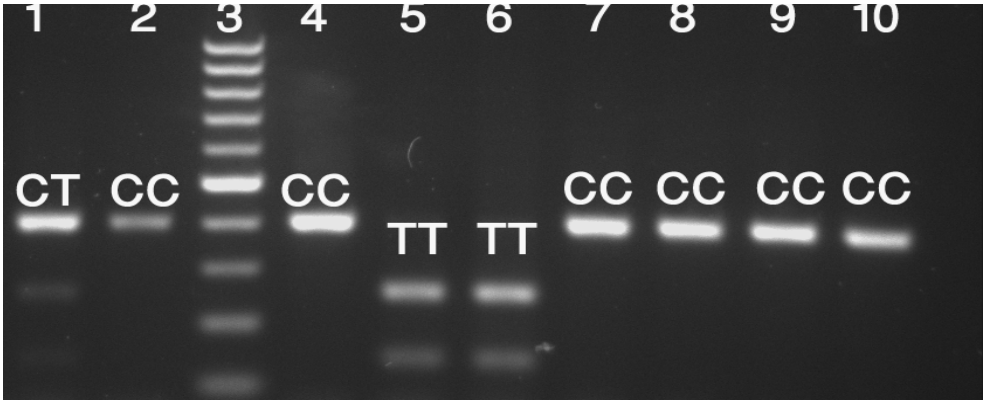
نتایج و بحث

ورم‌پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های موثر در گاو شیری است که از نظر اقتصادی از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۳،۲۲،۳۸). *بتادیفنسین* یکی از پپتیدهای ضد میکروبی و از مکانیسم‌های دفاع ذاتی است که در پاسخ التهابی به عفونت در غدد پستانی نقش داشته و بیان این ژن در ورم پستان افزایش پیدا می‌کند (۴،۲۰،۲۴). تحقیقات فراوانی درباره ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن *بتادیفنسین* و استعداد ابتلا به بیماری‌های مختلف از قبیل دیابت، سرطان‌ها، بیماری کرون، درماتیت، بیماری‌های عفونی از جمله HIV و بسیاری دیگر در انسان، انجام شده است (۵). اطلاعات موجود درباره پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی جهت برنامه‌های انتخابی در برخی کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بررسی‌های مختلف در مورد ژن‌ها و تنظیم آن‌ها منجر به بهبود استراتژی‌های انتخاب ژنتیکی و اثربخشی برنامه‌های ارزیابی ژنتیکی در اصلاح نژاد گاوهای شیری خواهد شد و شواهد و مدارک کافی وجود دارد که عوامل ژنتیکی بر مقاومت یا حساسیت به ورم‌پستان در تلیسه‌های شیری موثر هستند (۸،۱۱). به علت وجود نقش‌های متنوع ژن *بتادیفنسین*، کشف پلی‌مورفیسم‌های تنظیمی و نامترادف آن می‌تواند شاخص مهمی جهت انتخاب حیوانات مقاوم در برابر بیماری‌ها و ابزار قابل توجهی جهت بهبود ژنتیک و افزایش گاوهای مقاوم به بیماری‌ها باشد (۱۹،۲۹). به طور مثال برخی پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های *دیفنسین* از جمله ژن *بتا۴–دیفنسین*، می‌تواند در برنامه‌های تولیدمثلی به عنوان شاخص مولکولی در جهت انتخاب گاوهای شیری با مقاومت بالا به بیماری ورم‌پستان و در نتیجه بازدهی بیش‌تر تولید شیر مورد استفاده قرار گیرد (۴،۶،۲۱،۴۲). در گوسفندان شیری هم نشان داده شد که پلی‌مورفیسم در جایگاه G1659A در ژن بتادفنسین ۲ باعث افزایش مقاومت و از طرفی پلی‌مورفیسم در جایگاه G1747A در ژن بتادفنسین ۱ باعث حساسیت به ورم‌پستان می‌شود (۴۲).

در تحقیق حاضر، موتاسیون C→T در موقعیت اینترونی ۲۲۳۹ ژن *بتا۴–دیفنسین* مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی حاکی از تکثیر موفقیت‌آمیز ناحیه ژنی مورد نظر با تولید محصولات با وزن مولکولی ۳۹۳ جفت بازی با استفاده از نمونه های DNA استخراج شده از گاوهای مورد مطالعه بود. در این مرحله تکثیر اولیه تمامی گاوها به طور یکسان انجام شده و محصول ثابت ۳۹۳ جفت بازی تولید شد.

پس از اطمینان از تولید محصول PCR که دارای وزن مولکولی مورد نظر بود، در مرحله روش PCR-RFLP و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *Nla*III (*Hin*1II) انجام شد.

به دنبال هضم آنزیمی سه الگوی متفاوت هضمی در اثر برش آنزیمی در گاوهای مورد مطالعه بر اساس طراحی اولیه تولید شد. در گاوهای TT یا همان گاوهای هموزیگوت موتاسیون یافته، بر اثر هضم آنزیمی محصول کامل ژن *بتادیفنسین* به دو قطعه کوچکتر ۲۵۳ و ۱۴۰ جفت بازی تبدیل و شکسته شد؛ در حالی که محصول PCR براساس توالی ژن در گاوهای با ژنوتیپ CC یا همان هموزیگوت موتاسیون نیافته برش نخورده و بدون هضم با وزن مولکولی اولیه ۳۹۳ جفت بازی باقی ماند. از طرف دیگر محصول PCR در گاوهای با ژنوتیپ CT یا همان هتروزیگوت به سه قطعه مختلف ۳۹۳، ۲۵۳ و ۱۴۰ جفت بازی تبدیل شد (شکل ۱).



شکل ۱- الگوهای متفاوت از هضم آنزیمی محصولات متعلق به ژنوتیپ‌های مختلف ژن *بتا دیفنسین* در الکتروفورز آگارز، توسط آنزیم *Nla*III (*Hin*1II). چاهک ۱: ژنوتیپ CT؛ چاهک ۲، ۴، ۷، ۸، ۹، ۱۰: ژنوتیپ CC؛ چاهک ۵ و ۶: ژنوتیپ TT؛ چاهک ۳: مارکر ۱۰۰ جفت بازی
Figure 1: Different patterns of enzymatic digestion of products belonging to different genotypes of *β-difensin* gene in agarose electrophoresis, by *NlaIII (Hin1II)*. Lane 1: CT genotype, lane 2, 4, 7, 8, 9 and 10: CC genotype , lanes 5 and 6: TT genotype, Lane 3: ladder 100 bp

براساس نتایج مطالعه حاضر فراوانی آلل‌های مربوط به ژن بتادیفنسین درمورد آلل C و آلل T در جمعیت گاوهای مورد مطالعه به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۳۲ بود. نتایج مطالعه حاضر در مورد رخداد موتاسیون C→T در موقعیت اینترونی ۲۲۳۹ ژن *بتا۴-دیفنسین* شبیه به مطالعات دیگر (۴،۱۰) بیانگر بیشتر بودن فراوانی آلل C در مقایسه با آلل T می‌باشد.

تعداد و درصد گاوهای دارای پلی‌مورفیسم در ژن *بتادیفنسین* و ارتباط آن با سابقه بیماری ورم‌پستان در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. بیست و پنج درصد از گاوهای با ژنوتیپ TT دارای ورم‌پستان بودند درحالیکه ۴۶/۷ و ۴۵/۷ درصد از گاوهای با ژنوتیپ CT و CC به ترتیب دارای ورم‌پستان بودند. هر چند که، مقایسه آماری گروه‌های دارای سابقه ورم پستان با گروه کنترل (بدون ورم‌پستان) نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بین ژنوتیپ‌های مختلف وجود ندارد (p>۰/۰۵). در جدول شماره ۲، همچنین تعداد و درصد گاوهای دارای ژنوتیپ‌های مختلف بر اساس پلی‌مورفیسم در ژن *بتادیفنسین* و ارتباط آن با تعداد دفعات ابتلا به ورم‌پستان نشان داده شده است.

جدول ۲- مقایسه ژنوتیپ‌های مختلف گاوهای دارای سابقه یکبار و دو بار یا بیشتر ابتلا به ورم پستان در مقایسه با فاقد سابقه ابتلا به ورم پستان بر اساس نوع پلی‌مورفیسم ژن *بتادیفنسین*
Table 2. Comparison of the different genotypes of cows with one and two or more times infection of mastitis and without mastitis based on the different β-defensin gene polymorphism

گروه‌های مورد مطالعه	نوع پلی مورفیسم ژن بتادیفنسین درصد (تعداد)		
	TT	CT	CC
بدون ورم‌پستان	۷۵ (۶)	۵۳/۳(۱۶)	۵۴/۳ (۱۹)
دارای ورم‌پستان	۲۵ (۲)	۴۶/۷(۱۴)	۴۵/۷ (۱۶)
یکبار (۱)	۱۲/۵ (۱)	۳۰(۹)	۱۴/۳ (۵)
دو بار یا بیشتر (≥۲)	۱۲/۵ (۱)	۱۶/۷(۵)	۳۱/۴ (۱۱)
مجموع	۱۰۰(۸)	۱۰۰(۳۰)	۱۰۰(۳۵)

در جدول شماره ۳، مقایسه درصد گاوهای دارای ورم پستان با آلل T (CT، TT) در مقایسه با گاوهای دارای ورم پستان و فاقد آلل T (CC) نشان داده شده است. در این جدول درصد گاوهای دارای ورم پستان و فاقد آلل T به صورت عددی نسبت به گاوهای دارای آن بیشتر است؛ اما این تفاوت معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵).

جدول ۳- مقایسه درصد ژنوتیپ گاوهای دارای آلل T در مقایسه با گاوهای فاقد آلل T
Table 3. Comparison of the genotype of cows with and without T allele

گروه‌های مورد مطالعه	ژنوتیپ CC (فاقد آلل T)	ژنوتیپ CT، TT (دارای آلل T)
بدون ورم‌پستان	۵۴/۳ (۱۹)	۵۷/۹(۲۲)
دارای ورم‌پستان	۴۵/۷ (۱۶)	۴۲/۱(۱۶)
یکبار (۱)	۱۴/۳ (۵)	۲۶/۳(۱۰)
دو بار یا بیشتر (≥۲)	۳۱/۴ (۱۱)	۱۵/۸(۶)
مجموع	۱۰۰(۳۵)	۱۰۰(۳۸)

در جدول شماره ۳، درصد گاوهای مبتلا به ورم پستان بر اساس تعداد دفعات ابتلا به ورم‌پستان و دارای آلل T (CT، TT) در مقایسه با گاوهای دارای ورم پستان و فاقد آلل T (CC) نیز نشان داده شده است. در این جداول درصد گاوهای ورم پستان فاقد آلل T با سابقه دو بار ابتلا به ورم پستان و بیشتر از آن بصورت عددی نسبت به گاوهای دارای آلل T

بیشتر است؛ هر چند که این تفاوت معنی‌دار نیست (p>۰/۰۵). بطوریکه ۳۱/۴ درصد از گاوهای فاقد آلل T دارای سابقه دو بار ابتلا به ورم‌پستان و یا بیشتر از آن بوده‌اند. درحالیکه ۱۵/۸ درصد از گاوهای دارای آلل T (جدول ۳) دارای سابقه دو بار ابتلا به ورم‌پستان و یا بیشتر از آن بوده‌اند.

جدول ۴- مقایسه درصد (تعداد) گاوهای با سابقه یک‌بار ابتلا به ورم پستان و دو بار یا بیش‌تر از آن بر اساس ژنوتیپ گاوهای دارای آلل T در مقایسه با گاوهای فاقد آلل T

Table 4. Comparison percentage (number) of the cows with one and two or more times infection of mastitis based on the genotype of cows with and without T allele

گاوهای دارای سابقه بیماری	ژنوتیپ CC (فاقد آلل T)	ژنوتیپ CT، TT (دارای آلل T)
یکبار (۱)	۳۱/۲ (۵)	۶۲/۵(۱۰)
دو بار یا بیشتر (≥۲)	۶۸/۸ (۱۱)[b]	۳۷/۵(۶)[a]
مجموع	۱۰۰(۱۶)	۱۰۰(۱۶)

a,b: حروف نامتشابه بیانگر تفاوت تمایل به معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشند (p=۰/۰۷)

مقایسه درصد (تعداد) گاوهای با سابقه بیماری ورم پستان و دارای آلل T (CT، TT) در مقایسه با گاوهای دارای ورم پستان و فاقد آلل T (CC) بر اساس تعداد دفعات ابتلا به بیماری ورم پستان در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. این نتایج بیانگر تفاوت تمایل به معنی‌داری (p=۰/۰۷) در میزان وقوع موارد ورم‌پستان بین گاوهای فاقد آلل T در مقایسه با گاوهای دارای آلل T می‌باشد. بطوریکه، به ترتیب ۶۸/۸ و ۳۷/۵ درصد از گاوهای فاقد آلل T و دارای آلل T در سابقه آنها موارد ابتلا به بیماری ورم‌پستان دو بار و بیش از آن مشاهده گردید. نتایج این مطالعه بیانگر ارتباط تمایل به معنی‌داری بین تعداد دفعات ابتلا به بیماری ورم‌پستان و وجود پلی‌مورفیسم در ژن *بتادیفنسین* می‌باشند. به طوری که موارد ابتلا به بیماری ورم‌پستان در گاوهای دارای آلل T نسبت به گاوهای فاقد آن کمتر بود.

مطالعات دیگر در ارتباط با پلی‌مورفیسم در موقعیت اینترونی ۲۲۳۹ ژن *بتا۴-دیفنسین* و فاکتورهای تولید شیر نشان دادند که میزان تولید، لاکتوز و چربی شیر در گاوهای دارای ژنوتیپCC در مقایسه با ژنوتیپ CT بیشتر بود درحالی که سلول سوماتیک (SCC) کم‌تری داشتند (۴،۱۰،۲۶). چنین به نظر می‌رسد که با انتخاب گاوهای پرتولید در سال‌های متمادی به دلیل تولید شیر کمتر حیوانات دارای ژنوتیپ TT و حذف آن‌ها از گله فراوانی این آلل در جمعیت گاوها کم‌تر شده است که با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر کم‌تر بودن فراوانی آن هم خوانی دارد. در واقع می‌توان گفت که آلل C برای انتخاب و اصلاح نژاد جهت افزایش میزان تولید شیر و بهبود صفات تولید شیر مطلوب‌تر است، در حالی که آلل T برای انتخاب مقاومت در برابر ورم پستان دارای مزیت است (۴). مطالعه حاضر هم نشان داد هر چند که گاوهای دارای آلل T نیز به ورم پستان مبتلا می‌شوند اما تعداد موارد ابتلا به بیماری ورم‌پستان بالینی در آن‌ها نسبت به گاوهای فاقد آن کم‌تر می باشد که این بیانگر تاثیر حضور این آلل در ابتلا کمتر به این بیماری می باشد. برخی از مطالعات هم نشان دادند که وجود آلل T در ژن ژن *بتا۴-دیفنسین* در ژنوتیپ گاوها باعث مقاومت به سایر بیماری‌ها ازجمله اندومتریت می‌شود (۱۸).

مطالعات نشان دادند که پلی‌مورفیسم توالی ژن *بتا۴-دیفنسین* در گاو نژاد هولشتاین با SCC در ارتباط است (۴،۱۰) و SCC شیر بیانگر وضعیت سلامت پستان می‌باشد (۳۳،۳۴). ژنوتیپ‌های دیفنسین همراه با میزان کم SCC در شیر، ممکن است به عنوان شاخص‌های یک پستان سالم در نظر گرفته شوند. تأثیر قابل ملاحظه پلی‌مورفیسم ژن‌های *دیفنسین* بر SCC و صفات تولید شیر و همچین مقاومت یا حساسیت گاوها به ورم‌پستان می‌تواند منجر به استفاده از دیفنسین به عنوان نشانگر ژنتیکی در برنامه های اصلاح نژاد با هدف انتخاب گاوهای پرتولید با مقاومت بیش‌تر در برابر عفونت‌های پستان شود (۳۷).

مطالعه‌ی رئوفیان و همکاران (۳۵) نشان داد که بین پلی‌مورفیسم ژن‌های TLR2 و TNFα با مقادیر باقیمانده نمره سلول‌های بدنی (بعنوان شاخص مهم مرتبط با بیماری ورم پستان) ارتباط آماری معنی‌داری وجود دارد. افزایش بیان ژن‌های رمزگذاری‌کننده *بتادیفنسین* در پستان آلوده، نقش اساسی آن‌ها را در دفاع از غدد پستانی گاو در برابر ورم‌پستان تأیید می‌کند (۴،۱۰،۱۹). سطح بیان ژن‌های مورد بررسی احتمالاً به مدت زمان عفونت و نوع باکتری‌ها بستگی دارد (۲۴).

بر اساس بررسی‌های انجام شده در مطالعات مختلف و مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که از ژن *بتادیفنسین* گاو می‌توان به عنوان یک نشانگر در انتخاب گاوهای شیری برای کاهش موارد ابتلا به ورم پستان استفاده کرد (۲۵،۱۰). مقاومت به ورم‌پستان یا کاهش موارد ابتلا به آن می‌تواند از جنبه‌های مختلف از جمله کاهش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، رفاه بیش‌تر حیوانات و بازگشت منابع مالی برای تولیدکنندگان تأثیرات مثبتی داشته باشد (۴۲). درنتیجه، بر اساس مطالعه حاضر ممکن است با انتخاب گاوهای دارای آلل T موارد ابتلا به بیماری ورم‌پستان بالینی را در گاوهای شیری کم‌تر نمود. جهت بررسی دقیق‌تر اهمیت این موضوع نیاز به مطالعات گسترده‌تر در آینده با استفاده از تعداد بیشتری از گاوهای شیری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شیراز به جهت تامین اعتبار طرح تشکر می نمایند.

منابع

1. Afshar, M. and R.L. Gallo. 2013. Innate immune defense system of the skin. Veterinary Dermatology, 24: 32-39.
2. Ageitos, J., A. Sánchez-Pérez, P. Calo-Mata and T. Villa. 2017. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. Biochemical Pharmacology, 133: 117-138.
3. Ali, G., M. Ibrahim and S. Zaki. 2019. Association assessment of single nucleotide polymorphism in Forebrain Embryonic Zinc Finger-Like gene with mastitis susceptibility in Holstein cattle (Bos taurus). Large Animal Review, 25: 163-171.
4. Bagnicka, E., N. Strzałkowska, K. Flisikowski, T. Szreder, A. Jóźwik, B. Prusak, J. Krzyżewski and L. Zwierzchowski. 2007. The polymorphism in the β4-defensin gene and its association with production and somatic cell count in Holstein-Friesian cows. Journal of Animal Breeding and Genetics, 124: 150-156.
5. Bagnicka, E., N. Strzałkowska, A. Jóźwik, J. Krzyżewski, J. Horbańczuk and L. Zwierzchowski. 2010. Expression and polymorphism of defensins in farm animals. Acta Biochimica Polonica, 57.
6. Bagnicka, E., N. Strzałkowska, T. Szreder, B. Prusak, A. Jóźwik, E. Kościuczuk, J. Krzyżewski and L. Zwierzchowski. 2008. A/C polymorphism in the β-4 defensin gene and its association with phenotypic and breeding values of milk production traits in Polish-Friesian cows. Animal Science Papers and Reports, 26: 239-250.
7. Bassel, L.L. and J.L. Caswell. 2018. Bovine neutrophils in health and disease. Cell and Tissue Research, 371: 617-637.
8. Berglund, B. 2008. Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. Reproduction in Domestic Animals, 43: 89-95.
9. Blowey, R.W. and P. Edmondson. 2010. Mastitis control in dairy herds. Cabi.
10. Brodowska, P., L. Zwierzchowski, S. Marczak, W. Jarmuż and E. Bagnicka. 2019. Associations between Bovine β-Defensin 4 Genotypes and Production Traits of Polish Holstein-Friesian Dairy Cattle. Animals, 9: 723.
11. Canaza-Cayo, A.W., P.S. Lopes, J.A. Cobuci, M.F. Martins and M.V.G.B.D. Silva. 2018. Genetic parameters of milk production and reproduction traits of Girolando cattle in Brazil. Italian Journal of Animal Science, 17: 22-30.
12. Cormican, P., K.G. Meade, S. Cahalane, F. Narciandi, A. Chapwanya, A.T. Lloyd and C. O'Farrelly. 2008. Evolution, expression and effectiveness in a cluster of novel bovine β-defensins. Immunogenetics, 60: 147-156.
13. DeGraves, F.J. and J. Fetrow, 1993. Economics of mastitis and mastitis control. The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice, 9: 421-434.
14. Derakhshani, H., K.B. Fehr, S. Sepehri, D. Francoz, J. De Buck, H.W. Barkema, J.C. Plaizier and E. Khafipour. 2018. Invited review: microbiota of the bovine udder: contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. Journal of Dairy Science, 101: 10605-10625.
15. Detilleux, J. 2009. Genetic factors affecting susceptibility to udder pathogens. Veterinary Microbiology, 134: 157-164.
16. Dürr, M. and A. Peschel. 2002. Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. Infection and Immunity, 70: 6515.
17. Ganz, T. 2004. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. Comptes Rendus Biologies, 327: 539-549.
18. Goroohi, Z., H. Sharifiyazdi, A. Mirzaei, S. Nazifi and A. Hajibemani. 2020. Association between beta defensin gene polymorphism and alterations in acute phase proteins and leukogram in dairy cows with endometritis. Iraninan Journal of Veterivary Clinical Sciences, 14: 3-11.
19. Gurao, A., S.K. Kashyap and R. Singh. 2017. β-defensins: An innate defense for bovine mastitis. Veterinary World, 10: 990.
20. Gurao, A., R. Kataria, R. Singh, R.D. Kumar, S. Mishra and S. Kashyap. 2018. Association analysis of differential expression of beta defensins with mastitis in indicine dairy cattle. Indian Journal of Dairy Science, 71: 534-537.
21. Herlina, N., A. Wulandari, N. Yanthi, D. Aditia and M. Yaman. 2020. Mammary Gland Health and Identification of β-defensin Gene of Holstein-Friesian Cows. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 012031.
22. Jamali, H., H.W. Barkema, M. Jacques, E.-M. Lavallée-Bourget, F. Malouin, V. Saini, H. Stryhn and S. Dufour. 2018. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. Journal of Dairy Science, 101: 4729-4746.
23. Johnson, W. and P. Gentry. 2000. Optimization of bovine reproduction efficiency. Veterinary Journal (London, England: 1997), 160: 10-12.
24. Kościuczuk, E.M., P. Lisowski, J. Jarczak, J. Krzyżewski, L. Zwierzchowski and E. Bagnicka. 2014. Expression patterns of β-defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland

infected with coagulase-positive or coagulase-negative Staphylococci. BMC Veterinary Research, 10: 1-14.
25. Krpálková, L., N. O'Mahony, A. Carvalho, S. Campbell and J. Walsh. 2020. Evaluating the economic profit of reproductive performance through the integration of a dynamic programming model on a specific dairy farm. Czech Journal of Animal Science, 65: 124-134.
26. Krzyżewski, J., N.S. Bagnicka, A. Jóźwik and L.Z. Pyzel. 2008. Association between the polymorphism of bovine β4-defensin gene and milk traits in Holstein-Friesian cows as computed for standard (305 days) and the whole lactation. Animal Science Papers and Reports, 26: 191-198.
27. Liang, W. and J. Diana. 2020. The dual role of antimicrobial peptides in autoimmunity. Frontiers in Immunology, 11: 2077.
28. Meade, K.G., P. Cormican, F. Narciandi, A. Lloyd and C. O'Farrelly. 2014. Bovine β-defensin gene family: opportunities to improve animal health? Physiological Genomics, 46: 17-28.
29. Narciandi, F., A. Lloyd, K. Meade and C. O'Farrelly. 2014. A novel subclass of bovine β-defensins links reproduction and immunology. Reproduction, Fertility and Development, 26: 769-777.
30. Narciandi ,F., A.T. Lloyd, A. Chapwanya, C. O'Farrelly and K.G. Meade. 2011. Reproductive tissue-specific expression profiling and genetic variation across a 19 gene bovine β-defensin cluster. Immunogenetics, 63: 641-651.
31. Navid, F., M. Boniotto, C. Walker, K. Ahrens, E. Proksch, T. Sparwasser, W. Müller, T. Schwarz and A. Schwarz. 2012. Induction of regulatory T cells by a murine β-defensin. The Journal of Immunology, 188: 735-743.
32. Pfalzgraff, A., K. Brandenburg and G. Weindl. 2018. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. Frontiers in Pharmacology, 9: 281.
33. Philipsson, J., G. Ral and B. Berglund. 1995. Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle. Livestock Production Science, 41: 195-200.
34. Rainard, P., G. Foucras, D. Boichard and R. Rupp. 2018. Invited review: low milk somatic cell count and susceptibility to mastitis. Journal of Dairy Science, 101: 6703-6714.
35. Raufian, P., J. Shodja Ghyas, R. Jafari, G. Moghaddam and A. Javanmard. 2018. Identification of Genetic Variation in two Candidate Genes of TLR2 and TNFα and its Association with Mastitis in Holstain Cattle. Research on Animal Production, 8(18): 147-154 (In Persian).
36. Roosen, S., K. Exner, S. Paul, J.M. Schröder, E. Kalm and C. Looft. 2004. Bovine β-defensins: Identification and characterization of novel bovine β-defensin genes and their expression in mammarygland tissue. Mammalian Genome, 15: 834-842.
37. Ryniewicz, Z., L. Zwierzchowski, E. Bagnicka, K. Flisikowski, A. Maj, J. Krzyżewski and N. Strzałkowska. 2003. Association of the polymorphism at defensin gene loci with dairy production traits and milk somatic cell count in Black-and-White cows. Animal Science Papers and Reports, 21: 209-222.
38. Seegers, H., C. Fourichon and F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Veterinary Research, 34: 475-491.
39. Selsted, M.E. and A.J. Ouellette. 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. Nature Immunology, 6: 551-557.
40. Shelley, J.R., D.J. Davidson and J.R. Dorin. 2020. The dichotomous responses driven by β-defensins. Frontiers in Immunology, 11.
41. Szyda, J., M. Mielczarek, M. Frąszczak, G. Minozzi, J.L. Williams and K. Wojdak-Maksymiec. 2019. The genetic background of clinical mastitis in Holstein-Friesian cattle. Animal, 13: 2156-2163.
42. Tolone, M., S. Mastrangelo, R. Di Gerlando, A.M. Sutera, G. Monteleone, M.T. Sardina and B. Portolano. 2016. Association study between β-defensin gene polymorphisms and mastitis resistance in Valle del Belice dairy sheep breed. Small Ruminant Research, 136: 18-21.
43. Whelehan, C.J., K.G. Meade, P.D. Eckersall, F.J. Young and C. O'Farrelly. 2011. Experimental Staphylococcus aureus infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. Veterinary Immunology and Immunopathology, 140: 181-189.
44. Whiston, R., E.K. Finlay, M.S. McCabe, P. Cormican, P. Flynn, A. Cromie, P.J. Hansen, A. Lyons, S. Fair and P. Lonergan. 2017. A dual targeted β-defensin and exome sequencing approach to identify, validate and functionally characterise genes associated with bull fertility. Scientific Reports, 7: 1-13.
45. Yount, N.Y., J. Yuan, A. Tarver, T. Castro, G. Diamond, P.A. Tran, J.N. Levy, C. McCullough, J.S. Cullor and C.L. Bevins. 1999. Cloning and expression of bovine neutrophil β-defensins: biosynthetic profile during neutrophilic maturation and localization of mature peptide to novel cytoplasmic dense granules. Journal of Biological Chemistry, 274: 26249-26258.
46. Zakizadeh, S., M.J. Hashemi, R. Vakili and M. Ghods Rohani. 2016. The Influence of two Polymorphic Sites of PPARGC1α Gene on Milk Production Traits in Brown Swiss Cattle. Research on Animal Production, 7(14): 149-156 (In Persian).
47. Zigo, F ,.M. Vasil, S. Ondrašovičová, J. Výrostková, J. Bujok and E. Pecka-Kielb. 2021. Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. Frontiers in Veterinary Science, 8: 69.

Association Between *β-Defensin* Gene Polymorphism and Clinical Mastitis in Holstein Dairy Cows: A Case-Control Study

Fatemeh Yousefi[1], Abdullah Mirzaei[2], Hassan Sharifi Yazdi[3] and Abolfazl Haji Bemani Shuraki[4]

1- Graduated PhD. Student, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Iran
2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran (Corresponding Author: mirzaei@shirazu.ac.ir)
3- Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
4- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 19 July, 2021 Accepted: 30 October, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: In the dairy industry, it is important to identify the genotypes resistant to mastitis while select high-yielding dairy cows. Bovine *β-difensin* gene polymorphism can be used as a molecular marker in the selection of mastitis-resistant dairy cows. The aim of this study was to investigate the relationship between point mutation of *β4-difensin* gene and the occurrence of clinical mastitis in the dairy cows using RFLP-PCR method and identification of superior genotype of dairy cows *β-difensin* gene for mastitis resistance.

Material and Methods: blood sample (with EDTA anticoagulant) was taken from total 73 cows (32 with a history of mastitis and 41 with no history of mastitis) in an industrial dairy farm. After DNA extraction amplification of the region of bovine *β-difensin* gene (393 bp) was performed. PCR products were digested by endonuclease (*Nla*III (*Hin*1II)) for rapid detection of polymorphism in the 2239 region of the *β-difensin* gene (C to T conversion). Statistical analysis was performed by Chi-square test.

Results: Allele frequencies were 0.68 and 0.32 for C and T, respectively. Statistical analysis was performed by Chi-square test. The results of this study indicate the association between number of mastitis and polymorphism in the *β-difensin* gene. In other words, the incidence of mastitis was numerically lower in cows with T allele than in cows without it (p=0.07).

Conclusion: It can be concluded that the bovine *β-difensin* gene can also be used as a molecular marker in the selection of dairy cows to reduce the incidence of mastitis.

Keywords: *β-difensin*, Dairy cow, Mastitis, Polymorphism