



ارتباط چندشکلی ژن **FGF2** (فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲) با صفات سن اولین زایش و تعداد تلقیح منجر به آبستنی در

گاوهای شیری هلشتاین

فرید هدایتی*^۱، سعید انصاری مهیاری^۲، سعید خلج زاده^۱

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، گروه علوم دامی، ساوه، ایران

۲- دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*E-mail: Farid.h.1360@gmail.com

چکیده

ژن **FGF2** به عنوان تنظیم کننده بیان انترفرون t -(IFNT) در بلاستوسیت گاو و همچنین موثر در لانه گزینی جنین در رحم، تشخیص آبستنی و توسعه غده پستان و فعال سازی ژن های گروه **STAT** نقش دارد. برای اساس در این مطالعه، ارزیابی فراوانی آللی و چند شکلی های این ژن و ارتباط آن با صفات تعداد تلقیح منجر به آبستنی در شکم اول و دوم و سن اولین زایش مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۳۵۵ راس گاو شیری هلشتاین از ۵ جمعیت مختلف دارای اطلاعات مورد نظر، به طور تصادفی انتخاب و سپس **DNA** ژنومیکی از نمونه های خون به روش نمکی میلر استخراج گردید و با استفاده از تکنیک **PCR-RFLP** قطعه مورد نظر (**SNP 11646**) از ژن تکثیر و مورد هضم قرار گرفت. برای این چند شکلی سه ژنوتیپ **AA,AG,GG** با فراوانی های ۰/۲۵ و ۰/۵۴ و ۰/۲۱ مشاهده شد. ژنوتیپ روی هر دو صفت اثر معنی دار نداشت. اما مقایسه میانگین ژنوتیپ ها نشان داد افراد دارای ژنوتیپ **GG** کمترین تعداد تلقیح منجر به آبستنی و همچنین کمترین میزان سن در اولین زایش را داشتند. همچنین جایگزین کردن آلل **G** به جای آلل **A** موجب بهبود عملکرد هر دو صفت گردید. برآورد ارزش اصلاحی ژنوتیپ ها نشان داد که ژنوتیپ **GG** روی صفت تعداد تلقیح منجر به آبستنی اثر مثبت و ژنوتیپ های **AG,AA** اثر منفی دارند. ژنوتیپ **GG** و **AG** روی صفت سن اولین زایش نیز دارای اثر منفی و ژنوتیپ **AA** دارای اثر مثبت بود. نتایج تحقیق نشان می دهد که نمی توان با قاطعیت گفت که این ژن اثر معنی داری روی دو صفت تولید مثلی دارد و نیاز به پژوهش های بیشتری است.

واژگان کلیدی: ژن **FGF2**، گاو هلشتاین، ژنوتیپ، چندشکلی، صفات تولید مثلی

مقدمه

اهمیت بهبود عملکرد صفات تولید مثلی در گاوهای شیری بر کسی پوشیده نیست چرا که تولید مثل منظم، طبیعی و بازدهی بالا سرآغاز تولید شیر و افزایش تعداد گوساله ها در صنعت گاو شیری است. در ضمن با بروز چالش های محیطی در جهان از جمله کاهش میزان باروری و بقاء جنینی در گاوهای شیری طی دهه گذشته و با عنایت به اینکه مسائل ژنتیکی مسئول ۳۰ درصد این چالش هستند، توجه با اصلاح نژاد این صفات از اهمیت دو چندان برخوردار است.

از آنجائیکه تکرار پذیری و وراثت پذیری صفات تولید مثلی اندک است و تفکیک سهم اثرات محیطی از سهم اثرات ژنتیکی با روشهای کلاسیک مشکل است، استفاده از مارکر های مولکولی در اصلاح نژاد این صفات امروزه دارای جایگاه ویژه است. یکی از این روشها استفاده از مارکر مستقیم یا ژن کاندید است. ژن مورد نظر انتخاب و چند شکلی های آن ژن مشخص و با ایجاد گروه های مختلف جمعیت بر مبنای عملکرد صفات و چندشکلی های ژن کاندید دسته بندی شده و وقتی مشخص شد که افراد دارای



رکوردهای مناسب، چندشکلی خاص از ژن کاندید را در ژنوم خود دارند معلوم می گردد که ژن خاص با شکلی خاص از آلل هایش بر عملکرد صفات مورد نظر موثر بوده و همچنین اثر ژنوتیپ ها با عملکرد صفات مورد تجزیه آماری قرار می گیرد و می توان انتخاب بر اساس آن ژن کاندید را مورد توجه قرار دهد.

ژن FGF2 (ژن کاندید) حدود ۵۹ Kb طول و دارای ۳ اگزون و جایگاه آن روی کروموزوم شماره ۱۷ بین ژن های GGS12 و NUDT6 می باشد. پروتئین آن تقریباً ۱۸ کیلو والتون و به طول ۱۵۶ اسید آمینه است. دارای ۱۷۶ NP و در غده پستان و در بافت مخاطی رحم فعال است.

یک فاکتور آنژیو ژنیک بوده و در توسعه اولین جنین نقش دارد. همچنین تنظیم کننده بیان انترفرون E در بلاستوسیت گاو است. بیان ژن هایی که در جایگزینی جنین دخیل هستند را تنظیم نموده و برای سازماندهی مجدد غده پستانی اهمیت دارد. از پسرقت جسم زرد نیز ممانعت می کند و در تنظیم بیان ژنهای STAT1, STAT2, STST5 نیز نقش دارد. صفات مورد بررسی هم سن اولین زایش و تعداد تلقیح منجر به آبستنی است. صفت سن اولین زایش اثر مهمی بر صفات و پارامترهای محکمی نظیر فاصله نسلی، ویژگی های تیپ و تولید شیر و درصد چربی شیر دارد. تعداد تلقیح منجر به آبستنی هم معیاری مستقیم برای اندازه گیری باروری و یکی از صفات مهم تولید مثلی از نظر اقتصادی است.

مواد و روشها

تعداد ۳۵۵ راس گاو های نژاد هلشتاین در دامداری های استان اصفهان به طور تصادفی انتخاب و خونگیری از سیاهرگ جگولار انجام گرفت. از محلول ضد انعقاد EDTA به نسبت ۱۰ درصد استفاده گردید و نمونه ها با حفظ شرایط زنجیری سرد به آزمایشگاه منتقل و تازمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA تمامی نمونه ها طبق پروتکل روش نمکی میلر انجام گرفت. سنجش کیفیت نمونه ها با استفاده از ژن آغاز ۷ درصد و با رنگ آمیزی اتیدیوم برومایه عکس برداری شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ۲۰۷ جفت بازی ژن FGF2 با استفاده از دو آغازگر رفت و برگشت زیر انجام شد.

آغازگر رفت 5'-CATAGTTCTGTAGACTAGAAG-3'

آغازگر برگشت 5'-CCTCTAAAGAAGGATTAAGTCAAAATGGGGGTGGTA-3'

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و با ترکیب ۲ میکرولیتر از DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول، ۴ میکرولیتر از آنزیم تک پلیمرز، ۷ میکرولیتر از کلرید منیزیم، ۵ میکرولیتر آب استریل، انجام شد. برای تعیین چند شکلی ژن مورد نظر از روش PCR-RFLP برای جدا سازی الل های مختلف ژن از آنزیم CSP6I استفاده گردید. در صورت برش در یک جایگاه ۱۷۱ bp ژنوتیپ GG، برش در هر دو جایگاه (۱۷۱ و ۲۰۷) ژنوتیپ AG و این آنزیم در آلل وحشی دارای جایگاه برش نبوده و دارای ژنوتیپ AA می باشد. برای محاسبه فراوانی آلل ها از نرم افزار POPGENE32 استفاده شد. جهت مطالعه ارتباط صفت با ژنوتیپ های بدست آمده از نرم افزار SAS رویه GLM استفاده گردید.



نتایج و بحث

نتایج حاصل از هضم محصولات PCR سه ژنوتیپ AA,AG,GG را در جمعیت مورد مطالعه نشان داد. فراوانی ژنوتیپ AA,AG,GG به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۵۴ و ۰/۲۱ برآورد گردید. تجزیه آماری داده ها نشان داد، ژنوتیپ اثر معنی داری روی دو صفت تعداد تلقیح منجر به آبستنی و سن اولین زایش نداشته ولی اثر ترکیبی گله سال، فصل روی هر دو صفت اثر معنی دار نشان داده و همچنین متغیر کمکی تعداد تلقیح در مورد صفت سن اولین زایش هم اثر معنی دار نشان می دهد. مقایسه میانگین ژنوتیپ ها هم نشان می دهد کمترین تعداد تلقیح در ژنوتیپ GG و همچنین کمترین سن در اولین زایش هم در همین ژنوتیپ می باشد که البته معنی دار نیست (جدول ۱ و ۲ و ۳).

جدول ۳				
ژنوتیپ	تعداد تلقیح شکم اول	تعداد تلقیح شکم دوم	ژنوتیپ	سن اولین زایش
AA	۱/۴۳± ۰/۱۵	۲/۴۲± ۰/۳۱	AA	۷۶۷±۱۳
AG	۱/۵۸± ۰/۱۴	۱۲/۰۶	AG	۱۲/۰۶ ۷۶۵±
GG	۱/۳۵± ۰/۱۷	۱۲/۸۱ ۲/۲۶±	GG	۷۵۷±۱۲/۸۱

جدول ۱				منبع تغییرات
تعداد تلقیح منجر به آبستنی شکم اول		تعداد تلقیح منجر به آبستنی شکم دو		
درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
۲	۸/۸ ^{ns}	۲	۲/۷۱ ^{ns}	ژنوتیپ
۳۹	۱۰/۸۰ [*]	۳۹	۳/۴۵ [*]	اثر گله، سال و فصل زایش
۱۸۲	۰/۷۹۶	۱۸۲	۳/۵۳	خطا

* معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

ns عدم معنی دار در سطح ۵ درصد

در سال ۲۰۱۱ ایکونومو و همکاران در یک تحقیق مشابه نشان دادند که جایگزینی الل G به جای الل A در جایگاه SNP11646 باعث کاهش سن در اولین زایش و تعداد تلقیح منجر به آبستنی می گردد که با نتایج حاصله در این تحقیق مطابقت دارد. بررسی ارزش اصلاحی ژنوتیپ ها هم موید همین نکته است که ژنوتیپ GG دارای اثر مثبت روی صفات تعداد تلقیح منجر به آبستنی است که با نتایج خطیب و همکاران ۲۰۰۸ و ایکونومو و همکاران ۲۰۱۱ مشابه کامل دارد. معنی دار نبودن اثر ژنوتیپ روی عملکرد صفات هم در هر دو تحقیق مورد اشاره تایید شده است. براین اساس استفاده از جایگاه های مختلف این ژن FGF2 به منظور بهبود صفات تولید مثلی در برنامه های اصلاحی نیاز به پژوهش های بیشتری دارد.



- Abraham.J.A,A.Mergia,J.L.Whany,A.Tumolo,J.Friedman,K.A.H.Jerrild,D.Gospodarowicz,and J.C Fiddes. 1986. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenicprotein ,basic fibroblast growth factor .Science 233:545-548.
- James , K.D, and R.W.Deverewhiate fibroblast growth factor2.tamor angiogenesis , and prostate-related mitogenetic and on cogenic function.2000. UROLOGY 55 : 800-806.
- Khatib.H,C.Matecca , R.L.Monson , V. Schutzkus , X,Wand , and Jrutledge. 2008. The fibroblast growth factor2 gene is associated with embryonic mortality in cattle .J .Animi. sci. 86:2063-2067.
- Koran.R,K.Das , M.E.Lindy , M.Hameed,R. Wieder . 2007 .Coordinate loss of fibroblast growth factor2 and laminin 5 expression during neoplastic progression of mammary duct epithelium .HumamPathology . 38: 154-160.
- Lipeka , C.,M. Pieta , 1991. Genetic Polymorphism of blood postassiamin various breees and strains of sheep. Geneticapolonico. Vol.32.No.3 : 113-117.
- Lucy , M . C .2001 . Reproductive loss in high – produving dairy cattle : where will itend. J .Dairy .Sci .84 : 1277-1293.
- Micheal , D.D , Alvarem , I.M. ocon ,O.M.powell,2006. Fibro blast growth factor 2 is expressed by the bovine uterus and simulates interferon – tauproduction in bovine thropsectoderm. Endocvinology. 147: 3571-3579.
- Okada – Ban. M,G . Hoens , J . P ,Thiery , J. Jounanneau. 1999. Molecules in focus fibroblast growth factor (FGF)-2. The international journal of Biochemistry and cellbiligy. 32 : 263-267.
- Oikonomou .G , G. Michailidis , A. Kougioumtzis , M. Avdi , G. Banos . 2011 . Effect of polymorphis at the STAT5A and FGF2 geneloci on reproduction milk yield and lamenss of Holstein cows .Elsevier ltd : 10. 1016-1022.