

ارتباط بین هاپلوتیپ‌های ژن بتا ۴-دیفنسنین با صفات تولیدی شیر و تعداد سلول‌های بدنی در گاوهای هلشتاین ایران

اعظم رحیمی رضایی^۱ و مصطفی محقق دولت آبادی^{۲*}

شماره صفحات

۴۷-۵۵

(۱) دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه یاسوج.

(۲) استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج.

*نویسنده مسئول: mmuhaghegh@yu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۲

چکیده

دیفنسنین‌ها گروهی از پروتئین‌های کاتیونی ضد میکروبی هستند که در سیستم ایمنی ذاتی پستانداران فعالیت دارند. از این رو، ژن‌های کد کننده این پروتئین‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگر ژنتیکی برای مقاومت به بیماری در گاوهای شیری در نظر گرفته شوند. در مطالعات متعددی ارتباط چندشکلی‌های ژن بتا ۴-دیفنسنین و صفات سلامت و تولید در گاوهای شیری گزارش شده است. هدف از این تحقیق یافتن ارتباط بین هاپلوتیپ‌های ناحیه اینترون ژن بتا-۴ دیفنسنین با صفات تولید شیر و تعداد سلول‌های بدنی در گاوهای هلشتاین ایران بود. برای این منظور، بخشی از ناحیه اینترون این ژن (۲۱۰۰ الی ۲۴۹۳) توسط تکنیک تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCPs) در ۱۸۹ راس گاو هلشتاین ایران تعیین هاپلوتیپ شد. تعداد ۵ الگوی مجزا SSCP (A, B, C, D و E) در کل نمونه‌های بررسی شده مشاهده شد که فراوانی آن‌ها در جمعیت مورد مطالعه به ترتیب ۷۵/۶۶، ۱۲/۱۷، ۸/۴۶، ۲/۱۲ و ۱/۵۹ بودند. آنالیز ارتباطی بین هاپلوتیپ و فنوتیپ برای داده‌های صفات تولید شیر و تعداد سلول‌های بدنی انجام شد. هیچ ارتباط معنی‌داری بین هاپلوتیپ‌های ژن بتا-۴ دیفنسنین و صفات مورد مطالعه مشاهده نشد. اگرچه، تمایل نزدیک به معنی‌داری بین هاپلوتیپ‌ها و صفت مقدار تولید شیر روزانه مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: تعداد سلول‌های بدنی، هاپلوتیپ، ژن بتا-۴-دیفنسنین و صفات تولیدی شیر.

مقدمه

افزایش روزافزون نیاز جامعه بشری به فرآورده‌های دام‌های اهلی، باعث شده تا پژوهشگران تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌ی بهبود صفات اقتصادی دام‌ها به‌ویژه گاوهای شیری انجام دهند. از طرف دیگر، پرهزینه و زمان‌بر بودن روش‌های قدیمی اصلاح دام، باعث انجام تحقیقات زیادی در زمینه ژنتیک مولکولی شده به‌طوری‌که امروزه ژن‌های زیادی شناسایی شده‌اند که بر روی صفات اقتصادی گاوهای شیری مؤثر بوده و از آن‌ها برای افزایش دقت و کاهش فاصله نسل‌ها در برنامه‌های اصلاحی استفاده می‌شود. صفات تولیدی شیر نظیر، مقدار تولید شیر و درصد پروتئین و چربی شیر از صفات اقتصادی مهمی هستند که تأثیر زیادی بر صنعت پرورش گاو شیری دارند. از صفات مهم دیگر در گاوهای شیری نمره‌ی سلول‌های بدنی (SCS) می‌باشد که همبستگی ژنتیکی بالایی با بیماری ورم پستان دارد (۰/۶ تا ۰/۸) و از این رو ابزار مفیدی برای تشخیص ورم پستان محسوب می‌گردد (Shook, 1994). به‌همین دلیل در اصلاح نژاد گله‌های شیری به تنوع ژنتیکی ژن‌های مؤثر و ارتباط آن‌ها با صفات تولیدی شیر و صفات مرتبط با ورم پستان توجه ویژه‌ای می‌شود. برای استفاده از اطلاعات DNA در برنامه‌های اصلاحی، نواحی ژنومی که در آن‌ها چندشکلی مرتبط با صفت مورد نظر وجود دارد باید شناسایی گردند. تعیین چندشکلی در ژن‌های مؤثر و مطالعه ارتباط بین این چندشکلی‌ها و بروز صفات اقتصادی روشی است که امروزه بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد و تحت عنوان رویکرد ژن کاندیدا^۳ نامگذاری شده است (Beutler, 2005). امروزه افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث گسترش تحقیقات در نمونه‌ای از ژن‌های کاندیدا در گاوهای شیری به نام ژن بتا-دیفنسین شده- است. دیفنسین‌ها یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌ی پپتیدهای آنتی‌میکروبی بوده (Hancock & Mookherjee, 2007). Sorensen, 2001) که به‌عنوان فاکتور دفاعی در غده پستان عمل می‌کنند. این پپتیدها بیش‌تر با تخریب غشای میکروب‌ها عمل خود را انجام می‌دهند. در سطح شیمیایی دیفنسین‌ها (دارای ۴۹-۲۹ اسیدآمینو و وزن مولکولی ۳/۵ تا ۶ کیلودالتون)، پپتیدهای غنی از سیستمین کوچکی هستند که ساختار آن با سه پیوند دی‌سولفیدی محکم شده و دارای شش سیستمین می‌باشند (De Smet & Contreras, 2005). دیفنسین‌های پستانداران بر اساس اختلاف فاصله شش سیستمین و ترتیب پیوندهای دی‌سولفیدی به سه دسته‌ی آلفا، بتا و تتا طبقه‌بندی می‌شوند (Brogden et al, 2005). در پستانداران همه‌ی ژن‌های آلفا و بتا دیفنسین‌ها دارای دو اگزون و یک اینترون می‌باشند که به وسیله‌ی ژن‌های نزدیک به هم کد می‌شوند (Lehrer & Ganz, 1999) و بر اساس محل پیوندهای دی‌سولفیدی درونی، ساختار پیش‌ساز و جایگاه بیان آن‌ها از یک‌دیگر متمایز می‌شوند. طبق نتایج پژوهش‌های مختلف ژن بتا-دیفنسین علاوه‌بر بیان در مغز استخوان در سلول‌های اپیتلیال پستانی و همچنین در نوتروفیل‌ها بیان می‌شود و میزان بیان آن‌ها در غدد پستانی گاو در زمان عفونی شدن با باکتری افزایش می‌یابد.

¹ Somatic cell score

² Polymorphism

³ Candidate gene approach

ژن بتا-دیفنسنین در خوک، سویه مرغی، اسب و انسان به‌ترتیب روی کروموزوم‌های ۱۵ (Brogden *et al*, 2010)، ۳، ۹ (Meade *et al*, 2009) و ۸ (O'Brien *et al*, 1993) قرار دارد. در گاو نیز ژن بتا-دیفنسنین شامل دو اگزون و یک اینترون بوده که روی کروموزوم شماره‌ی ۲۷ قرار گرفته است (Ryniewicz *et al*, 2003). بتا-دیفنسنین‌های گاو اثرات میکروب‌کشی قوی در *in vitro* اعمال می‌کنند و فعالیت آنتی‌میکروبیال علیه اشیشیاکولی^۴، استافیلوکوکوس آرنوس^۵ و کاندیدا آلبیکنز^۶ دارند (Campanelli *et al*, 1990). اخیراً چند شکلی ژن‌های دیفنسنین انسانی به‌طور قابل توجهی مورد مطالعه قرار گرفته‌است. چند شکلی‌های بتا-دیفنسنین‌ها با افزایش حساسیت به بیماری‌های خاصی در ارتباط است. از جمله این بیماری‌ها می‌توان به دیابت، سرطان دهان و پروستات، ورم معده و بیماری‌های عفونی مانند HIV اشاره کرد (Bagnicka *et al*, 2010). مطالعه چند شکلی ژن بتا-دیفنسنین و ارتباط آن با بیماری در گوسفندان شیری (Monteleone *et al*, 2011) و سویه مرغی (Hasenstein & Lamont, 2007) نقش این پپتیدها در تنظیم پاسخ ایمنی را آشکار کرده‌است. در پژوهش‌های مختلف نیز ارتباط این ژن با صفاتی مانند صفات تولیدی شیر و تعداد سلول‌های بدنی^۷ (SCC) در گاو مورد بررسی قرار گرفته‌است (Bagnicka *et al*, 2007، Bagnicka *et al*, 2008، Hafez *et al*, 2008، Ryniewicz *et al*, 2003). نتایج حاصل از این پژوهش‌ها نشان داده که دیفنسنین‌ها ممکن است به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی جهت انتخاب گاوهای پرتولید با مقاومت بالا نسبت به عفونت‌های پستانی استفاده شوند. از این رو، هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ژن بتا ۴-دیفنسنین^۸ در گاوهای شیری هلشتاین ایران می‌باشد و انتظار می‌رود از نتایج آن در برنامه‌های اصلاحی، جهت بهبود راندمان تولید و پیشرفت ژنتیکی صفات اقتصادی گاوهای هلشتاین ایران استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

ابتدا از ۲۰۰ رأس گاو هلشتاین شیرده با شکم‌های زایش متفاوت زیر نظر مرکز اصلاح دام کشور که دارای داده‌های ثبت شده برای صفات تولیدی شیر (میانگین تولیدشیر، درصد چربی و درصد پروتئین روزانه برای یک دوره ۳۰۵ روزه) و میانگین روزانه تعداد سلول‌های بدنی از مجتمع شیر و گوشت فتاحی اصفهان نمونه‌ی خون تهیه شد. سپس استخراج DNA با استفاده از کیت آکوپرب آلمان صورت گرفت. انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به کمک کیت لیوفیلز بایونیر (شرکت تکاپوزیست) انجام گرفت. غلظت نهایی مواد در ۲۵ میکرولیتر عبارت بودند از: یک واحد آنزیم DNA پلیمرز Taq، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۲۰۰ میلی مول MgCl₂، ۱۸ پیکومول از هر آغازگر، ۵۰ نانوگرم DNA و بافر استاندارد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ۳۹۳ جفت‌بازی بخشی از انتهای اینترون ۱ و قسمت اندکی از اگزون ۲ انجام شد. برای انجام واکنش PCR از آغازگرهای رفت و برگشت زیر استفاده گردید (باگنیکا و همکاران ۲۰۰۷).

⁴ Escherichia coli

⁵ Staphylococcus aureus

⁶ Candida albicans

⁷ Somatic Cell Count (SCC)

⁸ β 4-defensin

آغازگر رفت 5-TGGCAGGAAGGAGGATGTAG- آغازگر برگشت 5-ACGGCACAAGAACGGAATAC

برنامه حرارتی مورد استفاده شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه جهت واسرشته شدن اولیه و فعال‌سازی آنزیم DNA پلی‌مراز، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه جهت واسرشته شدن، دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغازگر، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه جهت تکثیر و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه جهت تکثیر نهایی و به تعداد ۳۵ چرخه بود. برای بررسی و اطمینان از تکثیر قطعه ۳۹۳ جفت‌بازی (۲۱۰۰ الی ۲۴۹۳)، نمونه‌های تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز افقی شدند. تکنیک مورد استفاده در این پژوهش، تکنیک SSCP است. این تکنیک یک روش جدید، سریع و آسان برای شناسایی جهش‌های ناشناخته و همچنین متداول‌ترین تکنیک برای مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی است. برای انجام SSCP مقدار ۱/۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۴/۵ میکرولیتر بافر بارگذاری (۰/۰۵ بروموفنل بلو، ۰/۰۵ زایلون، ۰/۹۵ فرمامید و ۲۰ میلی مولار EDTA) مخلوط شد. به منظور واسرشته‌سازی محصول PCR، نمونه‌ها به مدت ۷ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و بلافاصله بر روی یخ، حداقل به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. از محلول پایه ۴۰ درصد با نسبت ۱: ۳۷/۵ اکریلامید به بیس اکریلامید برای تهیه ژل ۱۰ درصد استفاده شد و نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت و با ولتاژ ۱۵۰ ولت در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی ژل اکریلامید ران شدند. برای مشاهده هاپلوتیپ از رنگ‌آمیزی نیترا نقره استفاده شد.

آنالیز آماری

جهت مطالعه ارتباط صفات با هاپلوتیپ‌های به‌دست آمده، از مدل آماری زیر استفاده شد.

$$Y_{ijklm} = \mu + G_i + P_j + F_k + S_l + C_m + e_{ijklm} \quad \text{رابطه ۱:}$$

در این مدل: Y_{ijklm} = مقدار مشاهده برای هر کدام از صفات مورد مطالعه، μ = میانگین جامعه، G_i = اثر ژنوتیپ هر یک از آغازگرها، P_j = شکم زایش، F_m = فصل زایش، S_l = اثر پدر (به‌خاطر مشترک بودن پدر در برخی از حیوانات)، C_m = سن زایش و e_{ijklm} = اثرات باقی مانده را نشان می‌دهد. برای بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های شناسایی شده با صفات مورد مطالعه از رویه GLM نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده شد. در این پژوهش به منظور تابعیت تعداد سلول‌های بدنی، تبدیل داده لگاریتم در مبنای ۱۰ صورت گرفت. از آنجایی که در بین ۲۰۰ راس دام مورد استفاده جهت این مطالعه، تعداد ۱۱ راس فاقد اطلاعات کامل بودند، جهت آنالیز داده‌ها از ۱۸۹ راس دارای اطلاعات کامل استفاده گردید.

نتایج و بحث

پس از تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها با روش SSCP، ۵ الگوی مجزا مشاهده گردید (شکل ۱) که این نتیجه بیانگر میزان چندشکلی

بالا و در پی آن تنوع ژنتیکی مطلوب در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. با توجه به فراوانی‌های مشاهده شده در جدول ۱ مشاهده می‌گردد که الگوهای A و E با فراوانی ۷۵/۶۶ درصد و ۱/۵۹ درصد به ترتیب دارای بیشترین و کمترین فراوانی می‌باشند. هاپلوتیپ‌های با فراوانی کمتر از ۲/۵ درصد در تجزیه و تحلیل آماری مورد استفاده قرار نگرفت.



شکل ۱- الگوهای شناسایی شده روی ژل اکریل آمید ۱۰ درصد
Figure 1- Patterns identified on 10% acrylamide gel

جدول ۱- تعداد دام و فراوانی الگوهای مشاهده شده

Table 1. Livestock numbers and frequency of observed patterns

الگو Pattern	تعداد دام Number of livestock	فراوانی Frequency
A	143	75.66
B	23	12.17
C	16	8.46
D	4	2.12
E	3	1.59

پژوهش‌های گوناگونی درباره‌ی چندشکلی اینترون ژن بتا ۴-دیفنسین انجام شده‌است. با مطالعه بر چند شکلی اینترون ژن بتا ۴-دیفنسین در نژاد گاو فریزین لهستان، دو چند شکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شد. با مطالعه Bagnicka *et al* (2007)، جابجایی نوکلئوتید C با T در جایگاه ۲۲۳۹ گزارش شد. چند شکلی تک نوکلئوتیدی A1674C، دارای سه ژنوتیپ AA، AC و CC با فراوانی‌های ۰/۶۵، ۰/۳۲ و ۰/۰۳ بود و چند شکلی C1877T دارای دو ژنوتیپ CC و CT با فراوانی‌های ۰/۹۴ و ۰/۰۶ بود (Bagnicka *et al*, 2008). ژنوتیپ‌های حاصل از این چند شکلی تک نوکلئوتیدی به ترتیب CC با فراوانی ۰/۷۲، CT با فراوانی ۰/۲۶ و TT با فراوانی ۰/۰۲ در گاوهای فریزین هلشتاین گزارش شده‌است. Krzyzewske *et al* (2008) با مطالعه بر اینترون بتا ۴-دیفنسین، سه ژنوتیپ CC، CT و TT برای جایگاه C2239T مشاهده کردند. ژنوتیپ TT فراوانی کمی در بین جمعیت مورد مطالعه داشت. در این پژوهش، قطعه تکثیر شده جهش مطالعات Bagnicka *et al* (2007) و همچنین Krzyzewske *et al* (2008) را پوشش می‌دهد. بنابراین بخشی از تنوع ژنتیکی مشاهده شده می‌تواند به‌خاطر

وجود جهش جایگاه C2239T باشد. از طرف دیگر تنوع بیش‌تر این ناحیه در این مطالعه می‌تواند به دلیل وجود جهش یا جهش‌های دیگر در قطعه تکثیر شده باشد که با تعیین توالی ناحیه تکثیر شده این ژن قابل شناسایی است.

ارتباط هاپلوتیپ با صفات تولیدی شیر و تعداد سلول‌های بدنی

نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که هاپلوتیپ‌های حاصل از این آغازگر هیچ تأثیری بر صفات تولیدی شیر و نمره سلول‌های بدنی ندارد (جدول ۲). البته ارتباط این هاپلوتیپ‌ها با صفت تولید شیر روزانه متمایل به معنی‌داری ($P=0/10$) است. در پژوهش‌های متعددی ارتباط بین چند شکلی‌های بخش اینترون ژن بتا۴-دیفنسنین گاوهای شیری با صفات تولیدی شیر مورد ارزیابی قرار گرفته‌است (Bagnicka et al, 2007; Bagnicka et al 2008; Krzyzewske et al, 2008).

نتایج پژوهش Krzyzewske et al (2008) ارتباط بالای تولید شیر را در ژنوتیپ CC جهش جایگاه C2239T در دو دوره شیردهی استاندارد و شیردهی کامل نشان داد. در حالی که مطالعه صورت گرفته توسط Bagnicka et al (2007) عدم ارتباط بین چند شکلی‌های این جایگاه (C2239T) از اینترون ژن بتا۴-دیفنسنین و تولید شیر روزانه را نشان داد. همچنین در مطالعه Bagnicka et al (2008) ارتباط ژنوتیپ با تولید شیر در هر دو دوره شیردهی استاندارد و کامل معنی‌دار گزارش شد. در تحقیق حاضر ارتباط هاپلوتیپ‌های قطعه تکثیر شده و صفت تولید شیر روزانه متمایل به معنی‌داری داشت ($p=0/10$). در پژوهش انجام گرفته توسط Krzyzewske et al (2008) هیچ تفاوتی بین ژنوتیپ‌های حاصل چندشکلی و محتوای چربی در طول دو دوره شیردهی استاندارد و کامل گزارش نشد در حالی که در پژوهش صورت گرفته به‌وسیله باگنیکا و همکاران (۲۰۰۷) ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و محتوای چربی ارزیابی شده به‌وسیله مدل روزآزمون شیر مشاهده شد. در هر دو مطالعه صورت گرفته به‌وسیله Krzyzewske et al (2008) و Bagnicka et al (2007) ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و محتوای پروتئین گزارش شد که در هر دو پژوهش نیز گاوهای حامل ژنوتیپ CT درصد پروتئین بیش‌تری نشان دادند. در مطالعه انجام گرفته توسط Bagnicka et al (2008) ارتباط بین ژنوتیپ و محتوای پروتئین و چربی در هر دو دوره شیردهی استاندارد و کامل معنی‌دار گزارش شد.

در این مطالعه حیوانات دارای ژنوتیپ CC بیش‌ترین میانگین محتوای چربی و حیوانات حامل ژنوتیپ AA کم‌ترین میانگین محتوای پروتئین و چربی را نشان دادند (Bagnicka et al 2007). همچنین در پژوهش Bagnicka et al (2008) ژنوتیپ‌ها هیچ گونه ارتباطی با تعداد سلول‌های بدنی نداشتند. توجیه این تفاوت‌ها مشکل است ولی می‌تواند ناشی از مدل به‌کار رفته، تعداد ژنوتیپ‌ها، چند شکلی‌های شناخته شده در هر پژوهش و اختلاف در اندازه نمونه باشد.

جدول ۲- برآورد میانگین حداقل مربعات (LSM) و خطای استاندارد برای صفات تولیدی شیر و نمره سلول‌های بدنی

Table 2. The estimated least square means (LSM) and standard errors for milk yield and somatic cell score

هاپلوتیپ Haplotype	تولید شیر (لیتر) Production milk	پروتئین شیر (درصد) Milk protein (%)	چربی شیر (درصد) Milk fat (%)	نمره سلول‌های بدنی Body cell score
A	30.41±2.25	3.09±0.13	3.86±0.18	0.72±0.36
B	29.22±2.30	3.13±0.13	±0.18 3.87	0.77±0.37
C	32.00±2.36	3.16±0.13	3.87±0.19/۸۷	0.80±0.38
مقدار p	0.10n.s	0.52n.s	0.99n.s	0.87n.s

n.s: غیر معنی‌دار

n.s: Non significant

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، قطعه تکثیر شده از ژن بتا-۴ دیفنسنین دارای تنوع ژنتیکی مناسبی در جمعیت مورد مطالعه بود. اگرچه ارتباط معنی داری بین هاپلوتیپ‌های شناسایی شده با صفات تولیدی شیر و تعداد سلول‌های بدنی مشاهده نشد ولی این ارتباط برای صفت مقدار تولید شیر روزانه تمایل به معنی‌داری نشان داد. بنابراین بررسی وضعیت این جهش و جهش‌های دیگر این ژن در مطالعاتی با تعداد نمونه بیشتر می‌تواند تاثیر ژنوتیپ‌های این ژن بر صفات اقتصادی گاوهای شیری را رد یا تایید نماید.

منابع

- Bagnicka, E., Strzalkowska, N., Flisikowski, K., Szreder, T., Jozwik, A., Prusak, B., Krzyzewski, J. and Zwierzchowski, L. (2007). The polymorphism in the β 4-defensin gene and its association with production and somatic cell count in Holstein-Friesian cows. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 124: 150-156.
- Bagnicka, E., Strzalkowska, N., Jozwik, A., Krzyzewski, J., Horbanczuk, J. and Zwierzchowski, L. (2010). Expression and polymorphism of defensins in farm animals. *Institute of Genetics and Animal Breeding in Jastrzebiec*. 57: 487-497.
- Bagnicka, E., Strzalkowska, N., Strzalkowska, T., Prusak, B., Jozwik, A., Kosciuczuk, E., Krzyzewski, J. and Zwierzchowski, L. (2008). A/C polymorphism in the 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.
- Beutler, B. K. and Hoebe, L. (2005). Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 560: 29-39.
- Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray Jr, P. B. and Tack, B. F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defence. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22: 465-478.
- Campanelli, D., Detmers, P. A., Nathan, C. F. and Gabay, J. E. (1990). Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils differential antimicrobial and proteolytic properties. *The Journal of Clinical Investigation*. 85: 904-905.
- De Smet, K. and Contreras, R. (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters*. 27: 1337-1347.
- Hafez, E. E., Abdel-Rahman, S. M., and El-Sohaimy, S. A. (2008). Accompaniment of the polymorphism at defensin gene loci with milk productivity in Holstein Friesian and Egyptian cows. *Biotechnology in animal husbandry*. 24: 9-21.
- Hasenstein, J. R. and Lamont, S. J. (2007). Chicken gallinacin gene cluster associated with Salmonella response in advanced intercross line. *Avian Diseases*. 51: 561-567.

Krzyzewski, J., Bagnicka, E., Strzałkowska, N., Jozwik, A., Pyzel, B. and Zwierzchowski, L. (2008). Association between the polymorphism of bovine β 4-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.

Lehrer, R. I. and Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opinion in Immunology*. 11: 23-27.

Meade, K. G., Higgs, R., Lloyd, A. T., Goles, S. and O'Farrelly, C. (2009). Differential antimicrobial peptide gene expression patterns during early chicken embryological development. *Developmental & Comparative Immunology*. 33: 516-524.

Monteleone, G., Calascibetta, D., Scaturro, M., Galluzzo, P., Palmeri, M., Riggio, V. and Portolano, B. (2011). Polymorphisms of b-defensin genes in Valle del Belice dairy sheep. *Molecular Biology Reports*. 38: 5405-5412.

Mookherjee, N. and Hancock, R. E. (2007). Cationic host defense peptides innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64: 922-933.

O'brien, S. J., Womack, J. E., Lyons, L. A., Moore, K. J., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. (1993). Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature Genetics*. 3: 103-112.

Ryniewicz, Z., Zwierzchowski, L., Bagnicka, E., Flisikowski, K., Maj, A., Krzyżewski, J. and Strzałkowska, N. (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.

Ryniewicz, Z., Zwierzchowski, L., Bagnicka, E., Krzyzewsk, I. J. and Strzałkowska, N. (2002). Preliminary investigations on the polymorphysm of defensin Genes in cattle. *Animal Science Papers and Reports*. 20: 125-131.

Shook, G. E. (1994). Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. *Journal of Dairy Science*. 77: 648-658.

Sorensen, O. E. (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*. 97: 3951-3959

Haplotype association of B-4 defensin gene with milk production traits and somatic cell count in Holstein cattle of Iran

Rahimi Rezaei¹ and M. Muhaghegh Dolatabady*²

1) M.Sc. student of Animal Sciences, Yasouj University

2) Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Yasouj university

Corresponding Author: mmuhaghegh@yu.ac.ir

Received: 2021.06.23

Accepted: 2021.09.03

Abstract

Defensins are a group of cationic antimicrobial peptides that play important role in vertebrate innate immunity. Therefore, genes encoding these peptides could be considered as genetic markers for disease resistance in dairy cattle. Several studies have been reported association between beta-defensin gene polymorphisms with health and production traits in dairy cattle. The aim of this study was to find association of genetic variation in the intron of B4-defensin gene with milk production traits and somatic cell counts in Holstein cattle of Iran. The part of intron of B4-defensin gene was screened by single strand conformation polymorphism (SSCP) method. One hundred eighty nine Iranian Holstein cows were genotyped, giving 5 distinct SSCP patterns (A, B, C, D and E) and the frequencies of these patterns for amplified fragment were 75.66%, 12.17%, 8.46%, 2.12% and 1.59% respectively. An association analysis between haplotype and phenotype data for milk production traits and somatic cell score was performed. No significant associations of the haplotype in B4-defensin gene were observed for any trait. However, the haplotype was tended to associate with milk yield ($P=0.10$).

Keywords: B4-defensin gene- Haplotype-Milk production traits- Somatic cell count