تحلیل جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی *CXCR1* و تأثیر آن بر کیفیت شـــیر در نژادهای مختلف گاو شیری

چکیده

ژن کاندیدا *CXCR1* یکی از ژن‌های مرتبط با تولید شیر و مقاومت/حساسیت به بیماری ورم پستان در گاوهای شیری می‌باشد. لذا هدف از پژوهش حاضر شناسایی چندشکلی در ناحیه ژن *CXCR1* و ارتباط آنها با صفات کیفی شیر در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال بود. نمونه‌های خون از سیاهرگ گردنی و شیر در طی یک دوره سه ماهه از ۲۷ رأس گاو (سیستانی ۱۰ رأس، هلشتاین ۱۰ رأس و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال ۷ رأس) جمع‌آوری و ترکیبات شیر شامل درصد چربی، پروتئین، لاکتوز و ماده خشک بدون چربی اندازه‌گیری گردید. استخراج DNA به روش نمکی-بهینه‌یافته انجام شد. قطعه ۵۹۴ جفت بازی از ژن *CXCR1* با یک جفت پرایمر اختصاصی تکثیر شد. توالی‌یابی قطعه تکثیر شده به روش سانگر انجام گرفت. شناسایی جایگاه‌های چندشکلی و محاسبه ساختارهای ژنتیکی جوامع از نرم‌افزارهای MEGA11 و Dnasp5 استفاده شد و در نهایت ارتباط جایگاه‌های چندشکلی با صفات کیفی شیر از مدل تابعیت چندگانه و رویه GLM نرم‌افزار SAS9.4 استفاده گردید. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی محدود در ژن *CXCR1* بین نژادهای مختلف وجود دارد. نژاد هلشتاین بیشترین واگرایی ژنتیکی را داشت و آمیخته‌ها به نژاد سیستانی نزدیک‌تر بودند. ده جایگاه چندشکلی و پنج تغییر آمینواسیدی در این ژن شناسایی شد و نسبت d_N/d_S برابر با ۱/۶۳ نشان‌دهنده تأثیر انتخاب طبیعی در تکامل ناحیه ژن مذکور می‌باشد. ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی‌ها در جایگاه SNP230 با درصد چربی، لاکتوز و ماده خشک بدون چربی شیر مشاهده شد. این یافته‌ها اهمیت ژن *CXCR1* را در برنامه‌های اصلاح نژاد گاوهای شیری نشان می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: *CXCR1، کیفیت شیر، گاو شیری، چندشکلی‌ها، مقاومت به ورم پستان.*

Analysis of single-nucleotide polymorphism in the CXCR1 gene and its association with milk quality traits in different cattle breeds

Abstract

The CXCR1 gene is associated with milk production and mastitis resistance/sensitivity in dairy cows. This study aimed to identify polymorphisms in the CXCR1 gene and their association with milk quality traits in Holstein, Sistani, and Sistani×Simmental crossbred cows. Over three months, blood and milk samples were collected from 27 cows (10 Sistani, 10 Holstein, and 7 Sistani×Simmental). Milk components, including fat, protein, lactose, and solids-not-fat percentages, were measured. DNA was extracted using an optimized salting-out method, and a 594 bp fragment of the CXCR1 gene was amplified and sequenced via the Sanger method. Polymorphic regions were identified, and genetic structures were analyzed using MEGA11 and Dnasp5 software. Multiple linear regression and GLM procedures in SAS 9.4 were used to assess associations with milk quality traits. Results indicated limited genetic diversity in the CXCR1 gene among breeds, with Holsteins showing the highest divergence. Ten polymorphic sites and five amino acid changes were identified, with a d_N/d_S ratio of 1.63, suggesting natural selection's role in gene evolution. Notably, variants in the SNP230 region significantly correlated with fat, lactose, and solids-not-fat percentages in milk. These findings underscore the CXCR1 gene's potential in enhancing dairy cattle breeding programs.

Keywords*: CXCR1, Dairy cattle, Mastitis resistance, Milk quality, Polymorphisms.*

مقدمه

نژاد گاو هلشتاین به عنوان یکی از مهم‌ترین نژادهای شیری در سطح جهانی شناخته می‌شود و در گستره وسیعی از کشورهای مختلف پراکنده شده است. در گذشته‌ای نه چندان دور، توجه بیشتری به گوشت این نژاد معطوف بود، اما با افزایش جمعیت جهانی و نگرانی‌های بهداشتی ناشی از مصرف زیاد گوشت قرمز، توجه به جنبه شیردهی این حیوان به تدریج افزایش یافت. با ورود گاوهای هلشتاین به کشورهای هلند و آمریکای شمالی و جنوبی و از طریق انتخاب‌های ژنتیکی، تغییراتی در ساختار ژنتیکی این نژاد به وجود آمد که منجر به افزایش تولید شیر شد (Berglund, 2008). به گونه‌ای که این گاوها به طور متوسط سالانه بیش از ۱۲,۰۰۰ لیتر شیر تولید می‌کنند (Berglund, 2008). علاوه بر این، تحقیقات نشان داده‌اند که امکان افزایش تولید ترکیبات امگا-۳ در شیر نژاد هلشتاین تا ۲/۳ برابر در چربی شیر وجود دارد. همچنین، تغییرات ژنتیکی در این نژاد منجر به تغییرات قابل توجهی در سطح

ایمونوگلوبین‌ها، به ویژه IgG، پروتئین‌ها و لاکتوز شده است (Muller and Leweke, 2016). این یافته‌ها نشان‌دهنده اهمیت نژاد هلشتاین در بهبود کیفیت شیر و افزایش مقاومت به بیماری‌ها در برنامه‌های پرورش گاوهای شیری است.

گاو سیستانی از حدود ۵۰۰۰ سال پیش در اطراف دریاچه هامون پرورش داده و همواره از آن برای کار کشاورزی، تولید شیر و گوشت استفاده می‌شود، اما جمعیت این نژاد گاو بدلیل خشکسالی‌های طولانی و تغییرات در زیست بوم منطقه سیستان در معرض خطر انقراض قرار گرفته است. در بین نژادهای موجود در ایران، گاو سیستانی از توانایی رشد و تولید گوشت زیادی برخوردار است. ویژگی‌های این نژاد نظیر مقاومت به بیماری‌ها، کنه‌ها، تغییرات جوی و کم توقعی در کنار استعداد رشد و پروار شدن جبرانی گوساله‌های نر سیستانی در زمان پرواربندی، قابلیت تولید گوشت، کمیت و کیفیت لاشه، بازده غذایی و قابلیت پرواربندی مناسب در این نژاد قابل توجه است. همچنین از لحاظ شیردهی گاو سیستانی در شرایط پرورش سنتی روزی ۵ الی ۷ کیلوگرم تولید می‌کند که البته تغییرات میزان شیر به چگونگی تغذیه و انتخاب دام بستگی دارد. شیر گاو سیستانی از لحاظ مقدار چربی و پروتئین، غنی‌تر از بسیاری از نژادهای گاو است. متوسط چربی شیر گاوهای سیستانی ۴/۶ درصد است که پس از گاو تالشی بیشترین درصد چربی را در میان گاو های ایرانی دارد (Maghsoudi *et al.*, 2022).

ورم پستان مهمترین بیماری عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌ها در گاوهای شیری است که منجر به کاهش تولید شیر، پروتئین، میزان باروری و افزایش فاصله زایمان می‌گردد (Rekik *et al.*, 2008). شمارش سلول‌های بدنی شیر (SCC[1]) یک شاخص قابل اعتماد برای تشخیص زود هنگام ورم پستان در گاوهای شیری است. شمارش سلول‌های بدنی شیر به عنوان نشانگری برای مقاومت ورم پستان در برنامه‌های اصلاحی گاو شیری در نظر گرفته می‌شود. همبستگی ژنتیکی بالایی بین شمارش سلول‌های بدنی شیر و بروز ورم پستان (۰/۶ تا ۰/۸) نشان داد (Ablondi *et al.*, 2023)، که می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر غیرمستقیم ورم پستان مورد استفاده قرار گیرد.

تعدادی ژن کاندیدا مرتبط با تحمل/حساسیت به ورم پستان شناسایی شده است. یکی از این ژن‌ها CXCR1 هست که در ناحیه تقریباً ۹۰/۳ سانتی‌مورگان از سانترومر کروموزوم ۲ *Bos Taurus* (BTA2) نقشه‌یابی شده است و شامل ۷ اگزون و ۶ اینترون به طول ۷/۵ کیلوبایت است. این جایگاه در فاصله ۱/۳ سانتی‌مورگان جایگاه ژن پروتئین ماکروفاژ مرتبط با مقاومت طبیعی -1 (NRAMP) که یک ژن با چندشکلی بالا و مرتبط با عملکرد ایمنی در گاو، انسان و موش معرفی شده است که نشان می‌دهد این ناحیه از کروموزوم گاوی ممکن است مرتبط با عملکرد ایمنی و مقاومت در برابر بیماری ورم پستان باشد (Grosse *et al.*, 1999).

پیشینه پژوهش

تحقیقات نشان داده‌اند که برخی نژادهای گاو نسبت به ورم پستان مقاوم‌تر هستند. اگر این مقاومت یا حساسیت به بیماری ریشه ژنتیکی داشته باشد، می‌توان با شناسایی نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با سلامت پستان، نژادهایی را پرورش داد که علاوه بر افزایش تولید شیر، مقاومت بالایی نیز در برابر ورم پستان از خود نشان دهند (Nilsen *et al.*, 2009; Ogorevc *et al.*, 2009).

در مطالعات متعدد اهمیت واسطه‌های پروتئینی[2] در التهاب ورم پستان آشکار شده است. یکی از گیرنده‌های بیماری‌های التهابی، گیرنده اینترلوکین ۸ می‌باشد که به عنوان یک نشانگر کاندیدا ورم پستان معرفی شده است. گیرنده chemokine-α بر فعالیت نوتروفیل‌ها تأثیر می‌گذارد و موجب مهاجرت آنها به محل التهاب می‌گردد، که یکی از مهمترین اجزای سامانه ایمنی ذاتی است (Paape *et al.*, 2000). یکی دیگر از نواحی ژنی مرتبط با حساسیت یا مقاومت، جهش در ناحیه ژن CXCR1 است (Goertz *et al.*, 2009; *Hosseini Moghaddam et al., 2017*). مطالعات اولیه بر روی چندشکلی در ژن CXCR1 منجر به شناسایی پنج جهش تک نوکلئوتیدی شد (Grosse *et al.*, 1999; Youngerman *et al.*, 2004b; Pighetti and Rambeaud, 2006). برخی از محققین ارتباط بین چندشکلی در ژن CXCR1 و سلامت پستان، با استفاده از فراسنجه‌های مختلف مانند شمارش سلول‌های بدنی شیر گزارش نمودند (Youngerman *et al.*, 2004a; Beecher *et al.*, 2012; Galvão *et al.*, 2011). نتایج برخی دیگر از محققین

[1] Somatic cell count
[2] Chemokines

برخلاف نتایج مذکور بوده است (Leyva-Baca *et al*., 2008, Goertz *et al*., 2009). مطالعات اخیر حاکی از چندشکلی بالا در ژن CXCR1 است. پیگتی و همکاران (۲۰۱۲)، سی و شش SNP را در مناطق کدکننده و غیرکدکننده این ژن شناسایی کردند. در حالی که Verbeke و همکاران (۲۰۱۲)، شانزده چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی را در ناحیه کدگذاری این ژن گزارش نمودند که شش مورد قبلا گزارش نشده بود. لذا به عنوان یک نشانگر ژنتیکی بالقوه در برنامه‌های اصلاحی گاو پیشنهاد شد. ژو و همکاران (۲۰۱۳)، ارتباط بین چهار نوع جهش SNP در قطعه ۵۵۰ جفت باز اگزون II ژن با صفات شیر گزارش نمودند (Zhou *et al*., 2013).

لذا با توجه به نتایج ضد و نقیض بین جایگاه‌های چندشکلی در ژن CXCR1 و ارتباط آنها با سلامت پستان و سایر صفات کیفی شیر و همچنین با توجه به گستره آمیخته‌گری‌ها در گاو سیستانی با انواع دام‌های مستعد و غیرمستعد به بیماری ورم پستان، هدف از مطالعه حاضر شناسایی چندشکلی‌های مختلف در جایگاه ژن CXCR1 و ارتباط آنها با صفات کیفی شیر به منظور طراحی برنامه آمیخته‌گری مناسب در جهت افزایش فراوانی چندشکلی‌های مطلوب و مقاوم به بیماری ورم پستان می‌باشد.

روش‌شناسی پژوهش

جمعیت مورد مطالعه: در تحقیق حاضر تعداد ۲۷ رأس گاوهای خالص سیستانی و هلشتاین (از هر گروه ۱۰ رأس) و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال (۷ رأس) از مرکز تحقیقات گاو سیستانی و از گله‌های بومی منطقه سیستان به طور تصادفی انتخاب و خونگیری از سیاهرگ گردنی در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون (EDTA ۵ درصد) انجام گرفت. تمام گاوهای شیری استفاده شده شکم اول زایش بودند و تحت شرایط تغذیه‌ای، مدیریتی و محیطی مشابه واقع شدند. گاوهای آمیخته نتاج F1 حاصل از نژاد خالص سیستانی و اسپرم نژاد خالص سیمنتال بودند. جهت اندازه‌گیری صفات کیفی شیر به مدت سه ماه و به صورت هفتگی نمونه‌های شیر به میزان ۳۰ میلی‌لیتر در دو شیفت صبح و عصر جمع‌آوری و به آزمایشگاه علوم دامی دانشگاه زابل منتقل گردید و با دستگاه میلواسکن تمام اتوماتیک صفات کیفی شیر شامل درصد چربی، پروتئین، لاکتوز و ماده خشک بدون چربی اندازه‌گیری شدند.

استخراج DNA کل از نمونه‌های خون به روش نمکی-بهینه‌یافته شرکت زیست فناوری زند (زیست فناوری زند، شیراز) انجام گرفت. سپس DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۵ درصد الکتروفورز شدند و نمونه‌هایی که کیفیت مناسبی داشتند، برای واکنش تکثیر PCR استفاده شدند. همچنین برای بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ استفاده شد. نمونه‌های در دامنه ۲-۱/۸ مطلوب، کمتر از ۱/۸ نشانه آلودگی پروتئین و بیش از ۲ نشانه RNA زیاد است. برای تکثیر قطعه ۵۹۴ جفت بازی از جایگاه ژن CXCR1 در گاوهای خالص سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال از یک جفت آغازگر اختصاصی رفت F: 5'-CACCATGACAATCATCCTGA-3' و برگشت R: 5'-GCAGACTAGGTCGGAGTACG-3' در دمای بهینه ۶۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. برای واکنش تکثیر ژن از کیت مسترمیکس شرکت زیست‌فن‌آوری زند (شرکت زیست‌فن‌آوری زند، شیراز) در دستگاه ترموسیکلر مدل اپندورف استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA نمونه هدف (۷۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر، یک میکرولیتر از استوک پرایمر (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر) و ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (۲X) در دستگاه ترموسایکلر مدل اپندروف انجام شد. برنامه گرمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل یک مرحله واسرشت کردن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، در ادامه ۳۵ سیکل شامل واسرشت کردن ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات تکثیر PCR بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند، نمونه‌هایی که کیفیت باند مطلوب و بدون باند غیرتخصصی بودند برای توالی‌یابی به روش سانگر به شرکت توپاز ژن (توپاز ژن، تهران) ارسال و تعیین توالی شدند.

ویرایش داده‌های توالی‌یابی: ویرایش داده‌های توالی‌یابی با نرم‌افزار کروماس[1] (https://technelysium.com.au/wp/chromas/) انجام شد و توالی‌های بی‌کیفیت بویژه در ابتدا و انتهای نمونه‌ها حذف شدند و مابقی توالی‌های باقیمانده با فرمت FASTA برای

[1] Chromas

انجام تجزیه‌های بعدی ذخیره شدند. کروماس یکی نرم افزارهای پایه در زمینه پژوهش‌های ژنتیکی است که تشخیص هم‌پوشانی–های هتروپلاسمی و هموپلاسمی، نمایش خودکار نقاط دارای ابهام برای ویرایش و حذف داده‌های با کیفیت پایین را انجام می‌دهد (Lopez and Bonasora, 2017).

همتراز کردن توالی‌ها، با استفاده از ابزار Clastal-W نرم‌افزار MEGA نسخه ۱۱ (Tamura *et al.*, 2021) انجام شد. بعد از هم‌ردیف کردن توالی‌ها، مقایسه توالی‌ها و اطلاع از فرآسنجه‌های ژنتیکی از قبیل تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی و تعداد جایگاه–هایی که در آنها جایگزینی مشابه اتفاق افتاده و همچنین، پیش‌بینی انواع جایگزینی انتقالی و تقاطعی در تبدیل بازهای پورینی و پیریمیدینی با روش حداکثر درستنمایی[1] از نرم‌افزارهای MEGA11 و Dnasp نسخه ۵ (Librado and Rozas, 2009) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل تبارزایی: ترسیم درخت تبارزایی، توالی نوکلئوتیدی ژن CXCR1 برای جمعیت‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 پیش‌بینی گردید. پس از ویرایش توالی‌ها و حذف نواحی غیر کدکننده، درخت تبارزایی با استفاده از روش اتصال–همسایگی (NJ[2]) ترسیم شد. در این روش از ماتریسی (Q) استفاده می‌شود که در این ماتریس از کل شاخه‌ها استفاده شده و کمترین مقدار که بیان کننده شباهت بالای دو شاخه باشد، انتخاب شده و در یک انشعاب از درخت تبارزایی به کار می‌رود. مقادیر Bootstrap بوسیله ۱۰۰۰۰ بار نمونه‌گیری بدست آمدند. تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی تخمینی هستند از اینکه چگونه اعضاء یک خانواده می‌توانند در طی تکامل از هم انشقاق پیدا کرده باشند. این روابط به وسیله مطالعه جهش‌های جایگزینی، حذف، ازدیاد و جهش با آرایش مجدد تعیین می‌شود که در معرض انتخاب طبیعی قرار می‌گیرد (Petersen and Seberg, 2003). هدف از تجزیه‌های تبارزایی کشف ترتیبی از شاخه‌ها به صورت درخت‌هایی است که نشان‌دهنده بهترین روابط توالی‌ها باشد. همچنین Bootstrap نیز یک آزمون آماری درخت‌های تبارزایی با استفاده از روش نمونه‌برداری‌های متعدد از داده‌های اولیه است و برای آزمون درخت‌های ترسیم شده با روش‌های فاصله‌ای و درستنمایی به کار گرفته می‌شود. نتایج حاصل از این درخت به صورت عدد در کنار درخت نمایان می‌گردد و در واقع درصد دفعاتی است که هر شاخه مشخص در نمونه‌برداری مختلف توسط این آزمون و درخت‌های حاصل از آن تشکیل می‌شود (Zhang *et al.*, 2009).

بررسی تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N) نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینه حاصله نداشته‌اند (d_S)، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد. بنابراین، با استفاده از مقدار عددی این نسبت (d_N/d_S) روند انتخاب طبیعی برای ژن CXCR1 بررسی گردید. مقادیر d_N و d_S به ترتیب با استفاده از روابط ۲ و ۳ قابل محاسبه شدند.

$$d_N = -3/4\mathrm{Ln}(1 - 4/3P_N)$$ رابطه ۱)

$$d_S = -3/4\mathrm{Ln}(1 - 4/3P_S)$$ رابطه ۲)

در روابط بالا، P_N، نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی غیرمشابه و P_S نیز نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی مشابه می‌باشند.

تعیین میزان اثر جایگاه‌های چندشکل و تعیین محل QTNها: اثرات چندشکلی (SNP) بر صفات کیفی شیر در قالب مدل‌های تابعیت چندگانه و رویه GLM نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ (SAS Institute, 2004) مطابق با مدل ریاضی زیر برآورد شدند:

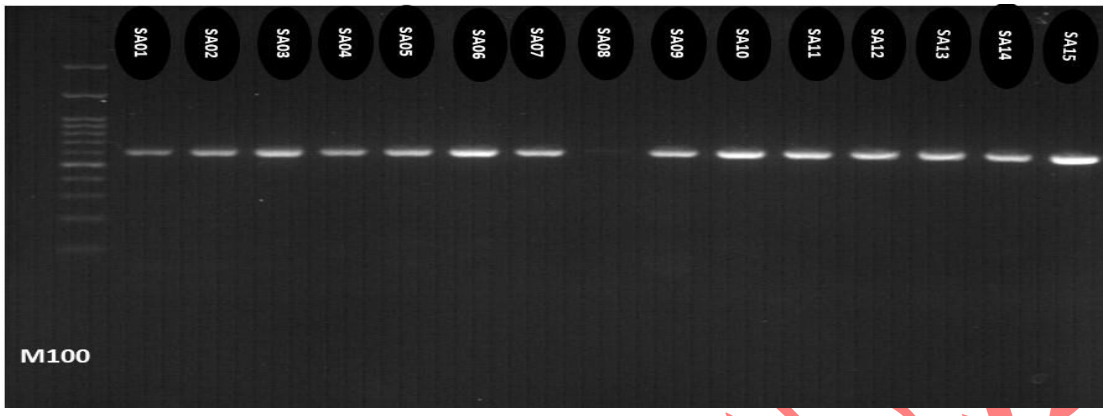
$$Y_{ijk} = M + Breed_i + SNP_j + e_{ijk}$$ رابطه ۳)

در معادله بالا، Y_{ijk} رکوردهای مربوط به صفات کیفی شیر شامل درصد چربی، پروتئین، لاکتوز و ماده خشک بدون چربی بودند در گاوهای مربوط به نژاد i، جایگاه نشانگر j و نمونه k بودند؛ M میانگین هر صفت؛ $Breed_i$ اثر نژاد شامل سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال و SNP_j اثر چندشکلی‌های هر جایگاه نشانگر تک‌نوکلئوتیدی و e_{ijk} خطای باقیمانده می‌باشد. مقایسه میانگین گروه‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با روش توکی کرامر انجام شد.

یافته‌های پژوهش و بحث

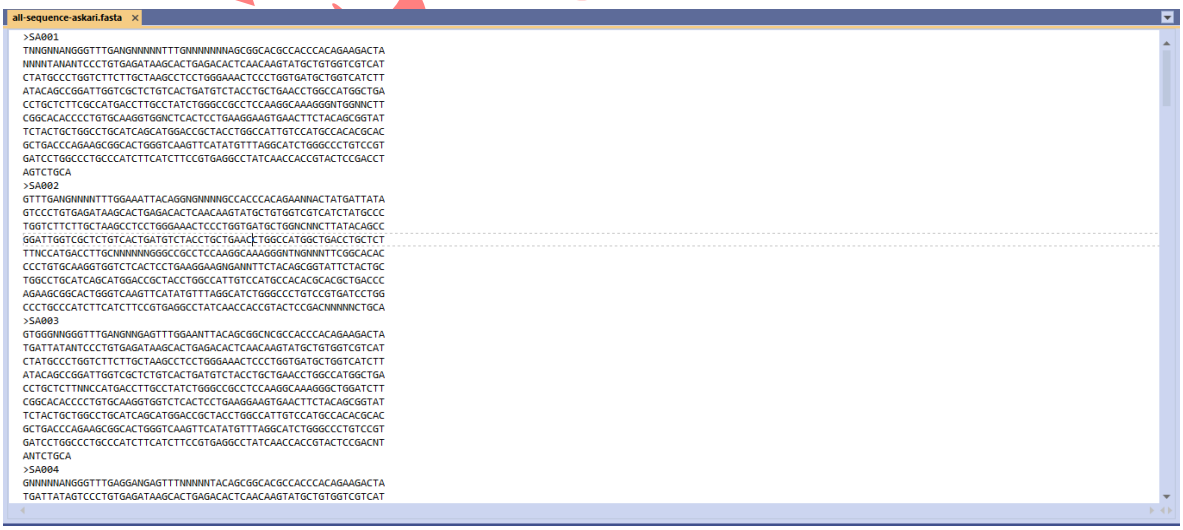
1 - Maximum Likelihood
2 - Neighbor-Joining

تکثیر قطعه ۵۹۴ جفت بازی از ژن CXCR1 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و دمای بهینه اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد با دستگاه ترموسیکلر مدل اپندرف، بیانگر تکثیر اختصاصی ناحیه هدف و بدون باند غیراختصاصی بود (شکل ۱). ستون اول از سمت چپ نشانگر اندازه به فواصل ۱۰۰ جفت بازی (M100) می‌باشد و سایر ستون‌ها الگوی باند ژن CXCR1 به طول ۵۹۴ جفت بازی در گاوهای خالص سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌ها را نشان می‌دهد (SA01 الی SA15).



شکل ۱. الکتروفورز یک درصد محصولات تکثیر ناحیه ۵۹۴ جفت بازی از جایگاه ژن CXCR1 در نمونه‌های مختلف گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

در توالی‌یابی سانگر، آداپتورهایی به هر کدام از نوکلئوتیدها متصل شده که در هنگام نمایان‌سازی حساس به پرتونگاری بوده و نتایج نهایی در گراف‌ها به رنگ‌های مشخصی نمایان می‌گردند. از چهار رنگ قرمز، مشکی، آبی و سبز به ترتیب برای تفکیک نوکلئوتیدهای تیمین، گوانین، سیتوزین و آدنین استفاده شده است. ویرایش داده‌های توالی‌یابی با نرم‌افزار کروماس انجام شد و توالی‌های بی‌کیفیت بویژه در ابتدا و انتهای نمونه‌ها حذف شدند و مابقی توالی‌های باقیمانده با فرمت FASTA برای انجام تجزیه‌های بعدی ذخیره شدند. بعد از ویرایش و تولید کانتیگ از توالی‌های رفت و برگشت، کلیه نمونه‌ها با نرم‌افزار کروماس به فرمت FASTA تبدیل شدند که نتایج مطابق با شکل ۲ می‌باشد. طول ۵۱۸ جفت بازی بدون نواحی بدون کیفیت نتیجه نهایی ویرایش کیفی داده‌ها بود.


all-sequence-askari.fasta

```
>SA001
TNNGNNANGGGTTTGANGNNNNNTTTGNNNNNNNAGCGGCACGCCACCCACAGAAGACTA
NNNNTANANTCCCTGTGAGATAAGCACTGAGACACTCAACAAGTATGCTGTGGTCGTCAT
CTATGCCCTGGTCTTCTTGCTAAGCCTCCTGGGAAACTCCCTGGTGATGCTGGTCATCTT
ATACAGCCGGATTGGTCGCTCTGTCACTGATGTCTACCTGCTGAACCTGGCCATGGCTGA
CCTGCTCTTCGCCATGACCTTGCCTATCTGGGCCGCCTCCAAGGCAAAGGGNTGGNNCTT
CGGCACACCCCTGTGCAAGGTGGNCTCACTCCTGAAGGAAGTGAACTTCTACAGCGGTAT
TCTACTGCTGGCCTGCATCAGCATGGACCGCTACCTGGCCATTGTCCATGCCACACGCAC
GCTGACCCAGAAGCGGCACTGGGTCAAGTTCATATGTTTAGGCATCTGGGCCCTGTCCGT
GATCCTGGCCCTGCCCATCTTCATCTTCCGTGAGGCCTATCAACCACCGTACTCCGACCT
AGTCTGCA
>SA002
GTTTGANGNNNNTTTGGAAATTACAGGNGNNNNGCCACCCACAGAANNACTATGATTATA
GTCCCTGTGAGATAAGCACTGAGACACTCAACAAGTATGCTGTGGTCGTCATCTATGCCC
TGGTCTTCTTGCTAAGCCTCCTGGGAAACTCCCTGGTGATGCTGGNCNNCTTATACAGCC
GGATTGGTCGCTCTGTCACTGATGTCTACCTGCTGAACCTGGCCATGGCTGACCTGCTCT
TTNCCATGACCTTGCNNNNNNGGGCCGCCTCCAAGGCAAAGGGNTNGNNNTTCGGCACAC
CCCTGTGCAAGGTGGTCTCACTCCTGAAGGAAGNGANNTTCTACAGCGGTATTCTACTGC
TGGCCTGCATCAGCATGGACCGCTACCTGGCCATTGTCCATGCCACACGCACGTGACCC
AGAAGCGGCACTGGGTCAAGTTCATATGTTTAGGCATCTGGGCCCTGTCCGTGATCCTGG
CCCTGCCCATCTTCATCTTCCGTGAGGCCTATCAACCACCGTACTCCGACNNNNCTGCA
>SA003
GTGGGNNGGGTTTGANGNNGAGTTTGGAANTTACAGCGGCNCGCCACCCACAGAAGACTA
TGATTATANTCCCTGTGAGATAAGCACTGAGACACTCAACAAGTATGCTGTGGTCGTCAT
CTATGCCCTGGTCTTCTTGCTAAGCCTCCTGGGAAACTCCCTGGTGATGCTGGTCATCTT
ATACAGCCGGATTGGTCGCTCTGTCACTGATGTCTACCTGCTGAACCTGGCCATGGCTGA
CCTGCTCTTNNCCATGACCTTGCCTATCTGGGCCGCCTCCAAGGCAAAGGGCTGGATCTT
CGGCACACCCCTGTGCAAGGTGGTCTCACTCCTGAAGGAAGTGAACTTCTACAGCGGTAT
TCTACTGCTGGCCTGCATCAGCATGGACCGCTACCTGGCCATTGTCCATGCCACACGCAC
GCTGACCCAGAAGCGGCACTGGGTCAAGTTCATATGTTTAGGCATCTGGGCCCTGTCCGT
GATCCTGGCCCTGCCCATCTTCATCTTCCGTGAGGCCTATCAACCACCGTACTCCGACNT
ANTCTGCA
>SA004
GNNNNNANGGGTTTGAGGANGAGTTTNNNNNTACAGCGGCACGCCACCCACAGAAGACTA
TGATTATAGTCCCTGTGAGATAAGCACTGAGACACTCAACAAGTATGCTGTGGTCGTCAT
```

شکل ۲. بخشی از فایل FASTA که حاوی کلیه نمونه به طول ۵۱۸ جفت باز می‌باشد.

توالی‌یابی سانگر[1] یک روش استاندارد برای تعیین توالی DNA است. ویرایش داده‌ها و حذف نواحی بی‌کیفیت (به دلیل وجود پیک‌های نامشخص) برای اطمینان از دقت و صحت توالی‌های نهایی ضروری است. تولید توالی‌های با کیفیت ۵۱۸ جفت بازی نشان‌دهنده موفقیت در این مرحله است. در بسیاری از مطالعات ژنتیکی روی گاوها و سایر دام‌ها از توالی‌یابی سانگر برای تعیین توالی DNA استفاده شده است (Brown *et al.*, 2017).

همترازی[2] تعداد ۲۷ نمونه مربوط به توالی ژن CXCR1 در نژادهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال به صورت دوتایی و چندگانه انجام شد (شکل ۳). تعداد ۲ نمونه (۱۵ و ۲۶) بدلیل نتایج همترازی نامطلوب حذف شدند و تعداد ۲۵ نمونه برای تجزیه‌های بعدی ذخیره شدند. با حذف نواحی نامطلوب در ابتدا و انتهای توالی‌های هر نمونه یک قطعه به طول ۵۱۸ جفت باز برای بررسی ساختارهای ژنتیکی با فرمت mega ذخیره شدند.

شکل ۳. نتایج همترازی (Allign) دوتایی و چندگانه با روش Clustal-W نرم افزار MEGA11 برای ژن CXCR1 در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

نواحی چندشکلی کل توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی CXCR1 در گاوهای خالص هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جدول ۱ ارائه شده است. جهش‌ها از قبیل جهش‌های نقطه‌ای (تغییر تنها در یک نوکلئوتید) به صورت تفاوت در کاراکترهای یک ستون، یا جهش‌های حذف و اضافه (indel) به صورت خط تیره در یک یا چند توالی ظاهر شده‌اند و قابل ذکر است که در هر ستون تقریباً نوکلئوتیدهای یکسانی قرار گرفته است. ستون‌های دارای نوکلئوتیدهای یکسان با رنگ مشابه و ستون‌های دارای نوکلئوتیدهای متفاوت با رنگ‌های متفاوت نمایش داده می‌شوند (شکل ۳). اختلاف نوکلئوتیدی که در هر ستون دیده می‌شود به دلیل چندشکلی در بین نمونه‌ها می‌باشد. در ۱۰ جایگاه از طول ۵۱۸ جفت بازی در ۲۵ نمونه که متعلق به گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال بودند، نواحی چندشکلی نمایان گردید. در بین کل نمونه‌ها میزان چندشکلی کم و به میزان ۱/۹۳ درصد بود که بیانگر محافظت ناحیه مذکور در ژنوم گاو می‌باشد.

جدول ۱. نواحی چندشکلی در جایگاه ژنی CXCR1 در گاوهای خالص سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

شماره حیوان	نژاد	موقعیت چندشکلی‌ها									
		۲	۳	۸	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۲۳۰	۲۷۲	۳۰۴
SA001	هلشتاین	A	G	G	T	A	C	A	C	C	T
SA002	هلشتاین	G	A	A	A	C	A	G	T	.	.
SA003	هلشتاین	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.

[1] Sanger sequencing
[2] Allingment

SA004	هلشتاین	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
SA005	هلشتاین	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
SA006	هلشتاین	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C
SA007	هلشتاین	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SA008	هلشتاین	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
SA009	هلشتاین	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SA010	هلشتاین	.	.	.	.	.	.	T	T	T	.
SA011	آمیخته‌ها	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
SA012	آمیخته‌ها	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SA013	آمیخته‌ها	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C
SA014	آمیخته‌ها	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SA016	آمیخته‌ها	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.
SA017	آمیخته‌ها	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SA018	سیستانی	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SA019	سیستانی	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SA020	سیستانی	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.
SA022	سیستانی	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SA021	سیستانی	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SA023	سیستانی	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
SA024	سیستانی	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SA026	سیستانی	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
SA027	سیستانی	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.

در ۵۱۸ جفت بازی ژن CXCR1 مورد مطالعه ۱۰ جایگاه چندشکلی مشاهده شد که تمام جایگاه‌های مذکور چندشکلی دو آللی بودند که شش جایگاه چندشکلی دو اللی منحصر به فرد و چهار جایگاه چندشکلی دو آللی غیرمنفرد یا پرسیمونی بودند. میزان چندشکلی ۱/۹۳ درصد نشان می‌دهد که در ناحیه مورد مطالعه تنوع ژنتیکی وجود دارد، اما میزان آن نسبتاً کم است. این می‌تواند به دلیل کوچک بودن اندازه جمعیت و طول ناحیه مورد مطالعه یا محافظت شدید در ناحیه ژن CXCR1 باشد. در مطالعات مشابه روی گاوها، میزان چندشکلی در ژن‌های مختلف متفاوت است. در برخی ژن‌های مرتبط با تولید شیر، میزان چندشکلی بالاتری گزارش شده است (Kim *et al*., 2011).

چندشکلی آمینواسیدی: توالی‌های نوکلئوتیدی ژن CXCR1 بر اساس کدهای ژنتیکی به توالی آمینواسیدی ترجمه شدند که طول ۵۱۸ جفت بازی ناحیه مورد مطالعه در ژن CXCR1 منجر به تشکیل زنجیره پروتئینی به طول ۱۷۲ آمینواسید گردید. در بین ۱۷۲ آمینواسیدی، پنج جایگاه چندشکلی شناسایی شد و مابقی نواحی تمایزی در بین نمونه‌های مختلف نداشتند. موقعیت و نوع تغییرات آمینواسیدی در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲. نواحی چندشکلی در توالی آمینواسیدی جایگاه ژنی CXCR1 در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

ردیف	موقعیت در طول ۱۷۲ آمینواسیدی	تغییرات	توضیحات
۱	۳	G<E	گلیسین به گلوتامات
۲	۵	T<Q	ترئونین به گلوتامین
۳	۷۷	S<L	سرین به لوسین
۴	۹۱	A<V	آلانین به والین
۵	۱۰۲	S<P	سرین به پرولین

شناسایی پنج جایگاه چندشکلی آمینواسیدی در پروتئین CXCR1 (از ۱۷۲ اسیدآمینه) نشان‌دهنده تنوع محدود، اما معنی‌دار در این جایگاه است. شش SNP در ژن CXCR1 گاوهای هلشتاین لهستانی شامل چهار مورد در ناحیه کدکننده (T<c.+291C، C<c.+365T، A<c.+816C و A<c.+819G) و دو مورد در UTR'۳ ژن CXCR1 (T<C۱۰۹۳+ و A<C۱۳۷۳+) گزارش شده است. از بین جهش‌های گزارش شده تنها یک مورد منجر به تغییر در پروتئین کد شده گردید (C<c.+365T) که باعث جایگزینی والین به آلانین در موقعیت ۱۲۲ زنجیره آمینواسید شد (Pokorska *et al.*, 2015).

نواحی حفاظت شده در جایگاه ژنی CXCR1: در طول ۵۱۸ جفت بازی دو منطقه حفاظت شده به طول ۲۱۴ جفت بازی و در مجموع ۴۲۸ جفت باز حفاظت شده و بدون تغییر مشاهده گردید که از تغییرات ناشی از عوامل تکاملی مانند جهش‌ها، حذف و اضافه در امان مانده‌اند (شکل ۴).

```
=================== Conserved Regions ===================

Dynamic Defined Parameters given the observed S:
   Minimum window length, MWL: 133
   Conservation threshold, CT: 1

[Region: Start-End    Conservation    Homozigosity    P-value]

Region_1: 16-229    1/000    1/000    0/0046
GCGGCACGCCACCCACAGAAGACTATGATTATAGTCCCTGTGAGATAAGC
ACTGAGACACTCAACAAGTATGCTGTGGTCGTCATCTATGCCCTGGTCTT
CTTGCTAAGCCTCCTGGGAAACTCCCTGGTGATGCTGGTCATCTTATACA
GCCGGATTGGTCGCTCTGTCACTGATGTCTACCTGCTGAACCTGGCCATG
GCTGACCTGCTCTT

Region_2: 305-518    1/000    1/000    0/0046
CTCACTCCTGAAGGAAGTGAACTTCTACAGCGGTATTCTACTGCTGGCCT
GCATCAGCATGGACCGCTACCTGGCCATTGTCCATGCCACACGCACGCTG
ACCCAGAAGCGGCACTGGGTCAAGTTCATATGTTTAGGCATCTGGGCCCT
GTCCGTGATCCTGGCCCTGCCCATCTTCATCTTCCGTGAGGCCTATCAAC
CACCGTACTCCGAC
```

شکل ٤. نواحی حفاظت شده در ناحیه ژنی CXCR1 در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

ماتریس جایگزینی توالی‌ها: ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژن CXCR1 در بین نمونه‌های مختلف در جدول ۳ ارائه شده است. هر ورودی احتمال جایگزینی (r) از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. الگوی جانشینی و نرخ‌ها تحت مدل تامورا–نئی (۱۹۹۳) برآورد شدند. نرخ جانشینی‌های انتقالی مختلف به صورت پررنگ و نرخ جانشینی‌های متقاطع به صورت مورب نشان داده شده است. برای تخمین مقادیر حداکثر درستنمایی، یک توپولوژی درختی به طور خودکار محاسبه می‌گردد. لگاریتم حداکثر احتمال درستنمایی ۷۳۲/۴۸- بدست آمد و تجزیه و تحلیل شامل ۲۵ توالی نوکلئوتیدی بود. تمام موقعیت‌های حاوی شکاف‌ها و داده‌های از دست رفته حذف شدند. در مجموع ۵۱۸ موقعیت در مجموعه داده نهایی وجود داشت. نرخ جایگزینی شامل جایگزینی‌های انتقالی و تقاطعی می‌باشند. جایگزینی انتقالی شامل تبدیل یک باز پورین به پورین و پیریمیدین به پیریمیدین می‌باشد و جایگزینی تقاطعی تبدیل یا جانشینی بازهای پورین با پیریمیدین و برعکس می‌باشد. در بین نمونه‌ها درصد جانشینی انتقالی ۷۹/۰۹ درصد و ۲۰/۹۱ درصد جانشینی تقاطعی در بین نمونه‌ها رخ داده است. جانشینی انتقالی بدلیل وجود پیوندهای قوی‌تر فراوانی بیشتر و جانشینی تقاطعی به دلیل پیوندهای سست‌تر فراوانی کمتری داشتند.

جدول ۳. ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی CXCR1 در بین کل نمونه‌ها با روش حداکثر درستنمایی

	A	T	C	G
A	–	۳/۱۱	۳/۸۲	**۲۰/۵۳**
T	۲/۵۱	–	**۲۰/۶۹**	۳/۰۲
C	۲/۵۱	**۱۶/۸۳**	–	۳/۰۲
G	**۱۷/۰٤**	۳/۱۱	۳/۸۲	–

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصدهای جهش انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به صورت **پررنگ** و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به صورت **مورب** نشان داده شده‌اند. الگوی جایگزینی تحت مدل تامورا– نئی (۱۹۹۳) و با استفاده از روش آماری ML برآورد شده است (Tamura and Nei, 1993).

ماتریس جانشینی انتقالی و تقاطعی توالی‌های ژن CXCR1 در بین گاوهای هلشتاین در جدول ۴ ارائه شده است. اعداد در قطر و پررنگ نشان دهنده جانشینی‌های انتقالی و اعداد خارج قطر و مورب جانشینی‌های تقاطعی را نشان می‌دهند. درصد جانشینی

انتقالی برابر با ۷۵/۵۸ درصد و درصد جانشینی تقاطعی ۲۴/۴۲ درصد برآورد گردید. در بین توالی‌ها بالاترین درصد جانشینی انتقالی تبدیل آدنین به گوانین و کمترین درصد جانشینی انتقالی مربوط به سیتوزین به تیمین بودند. جانشینی‌های تقاطعی در دامنه بین ۲/۴۶ تا ۳/۷۳ درصد بودند که بیشترین مربوط به تبدیل آدنین به سیتوزین و کمترین متعلق به تیمین و سیتوزین به آدنین بودند.

جدول ٤. ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی CXCR1 در بین گاوهای هلشتاین با روش حداکثر درستنمایی

	A	T	C	G
A	–	۳/۰۵	۳/۷۳	**۲۵/۲٤**
T	۲/۴۶	–	**۱٦/۲۰**	۲/۹۷
C	۲/۴۶	**۱۳/۲٤**	–	۲/۹۷
G	**۲۰/۹۰**	۳/۰۵	۳/۷۳	–

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصدهای جهش انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به صورت **پررنگ** و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به صورت مورب نشان داده شده‌اند. الگوی جایگزینی تحت مدل تامورا– نئی (۱۹۹۳) و با استفاده از روش آماری ML برآورد شده است (Tamura and Nei, 1993).

ماتریس جانشینی انتقالی و تقاطعی توالی‌های ژن CXCR1 در بین گاوهای سیستانی در جدول ۵ ارائه شده است. اعداد در قطر و پررنگ نشان دهنده جانشینی‌های انتقالی و اعداد خارج قطر و مورب جانشینی‌های تقاطعی را نشان می‌دهند. درصد جانشینی انتقالی برابر با ۹۹/۹۹ درصد و درصد جانشینی تقاطعی ۰/۰۱ درصد برآورد گردید. در بین توالی‌ها بالاترین درصد جانشینی انتقالی تبدیل آدنین به گوانین و کمترین درصد جانشینی انتقالی مربوط به سیتوزین به تیمین و بالعکس بودند. جانشینی تقاطعی در دامنه بین ۰/۰۰۰۱ تا ۰/۰۰۰۲ درصد متغیر بودند.

جدول ۵. ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی CXCR1 در بین گاوهای سیستانی با روش حداکثر درستنمایی

	A	T	C	G
A	–	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲	**٥٤/٦٢**
T	۰/۰۰۰۱	–	**۰/۰۰**	۰/۰۰۰۱
C	۰/۰۰۰۱	**۰/۰۰**	–	۰/۰۰۰۱
G	**٤٥/۳۷**	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲	–

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصدهای جهش انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به صورت **پررنگ** و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به صورت مورب نشان داده شده‌اند. الگوی جایگزینی تحت مدل تامورا– نئی (۱۹۹۳) و با استفاده از روش آماری ML برآورد شده است (Tamura and Nei, 1993).

ماتریس جانشینی انتقالی و تقاطعی توالی‌های ژن CXCR1 در بین گاوهای آمیخته سیستانی×سیمنتال در جدول ۶ ارائه شده است. اعداد در قطر و پررنگ نشان دهنده جانشینی‌های انتقالی و اعداد خارج قطر و مورب جانشینی‌های تقاطعی را نشان می‌دهند. درصد جانشینی انتقالی برابر با ۹۹/۹ درصد و درصد جانشینی تقاطعی ۰/۱ درصد برآورد گردید. در بین توالی‌ها بالاترین درصد جانشینی انتقالی تبدیل تیمین به سیتوزین و کمترین درصد جانشینی انتقالی مربوط به گوانین به آدنین بودند. جانشینی تقاطعی در بین نمونه‌های گاو آمیخته فراوانی کم و حدود ۰/۰۱ درصد بودند.

جدول ٦. ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی CXCR1 در بین گاوهای آمیخته سیستانی×سیمنتال با روش حداکثر درستنمایی

	A	T	C	G
A	–	۰/۰۱	۰/۰۱	**۲۰/۹٦**
T	۰/۰۱	–	**۳٤/۰۲**	۰/۰۱
C	۰/۰۱	**۲۵/۵۷**	–	۰/۰۱
G	**۱۷/۳۵**	۰/۰۱	۰/۰۱	–

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصدهای جهش انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به صورت **پررنگ** و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به صورت مورب نشان داده شده‌اند. الگوی جایگزینی تحت مدل تامورا- نئی (۱۹۹۳) و با استفاده از روش آماری ML برآورد شده است (Tamura and Nei, 1993).

جدول ۷ مقایسه درصد انواع جایگزینی انتقالی و تقاطعی بین جمعیت‌های هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال را نشان می‌دهد. بالاترین و کم‌ترین درصد جانشینی انتقالی به ترتیب مربوط به جمعیت سیستانی و هلشتاین بودند. همچنین در جانشینی‌های تقاطعی، بالاترین و کم‌ترین درصد جانشینی به ترتیب متعلق به جمعیت‌های هلشتاین و سیستانی بودند.

جدول ۷. درصد انواع جایگزینی انتقالی و تقاطعی در بین جمعیت‌های هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جایگاه ژن CXCR1

جمعیت	درصد جانشینی انتقالی	درصد جانشینی تقاطعی
سیستانی	۹۹/۹۹	۰/۰۱
هلشتاین	۷۵/۵۸	۲۴/۴۲
آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال	۹۹/۹	۰/۱
کل	۷۹/۰۹	۲۰/۹۱

درصد توالی‌های مختلف جایگاه ژن CXCR1 در بین جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جدول ۸ آورده شده است. در بین تمام جمعیت‌ها باز آدنین کمترین درصد و باز سیتوزین بالاترین فراوانی را داشتند. درصد بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در جمعیت‌های سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال اختلافات معنی‌دار نداشتند (P>۰/۰۵).

جدول ۸. درصد فراوانی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی CXCR1 در داخل و بین گاوهای خالص سیستانی و هلشتاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال با روش حداکثر درستنمایی

جمعیت	A	T	C	G	حداکثر درستنمایی
سیستانی	۲۰/۱۴	۲۴/۹	۳۰/۷۲	۲۴/۲۵	-۷۱۸/۷۵
هلشتاین	۲۰/۱۲	۲۵/۰۰	۳۰/۵۹	۲۴/۲۹	-۷۹۴/۳۱
آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال	۲۰/۱۲	۲۴/۸۸	۳۰/۷۰	۲۴/۳	-۷۳۲/۵۹
کل جمعیت	۲۰/۱۳	۲۴/۹۴	۳۰/۶۶	۲۴/۲۷	-۷۹۵/۴۲

ضریب نسبت جانشینی انتقالی به تقاطعی (r) بیانگر میزان تغییرات ژنتیکی و تکامل در طی دوره‌های گذشته است. حد خنثی کیمورا برابر با ۰/۵ هست و مقادیر بالاتر از ۰/۵ بیانگر نقش انتخاب در تکامل و کمتر از ۰/۵ عدم دخالت انتخاب و تأثیر سایر عوامل تکاملی مانند مهاجرت و جهش هست. در مطالعه حاضر ضریب کیمورا بزرگتر از ۰/۵ بود که بیانگر نقش انتخاب در تکامل نژادهای مذکور می‌باشد (جدول ۹).

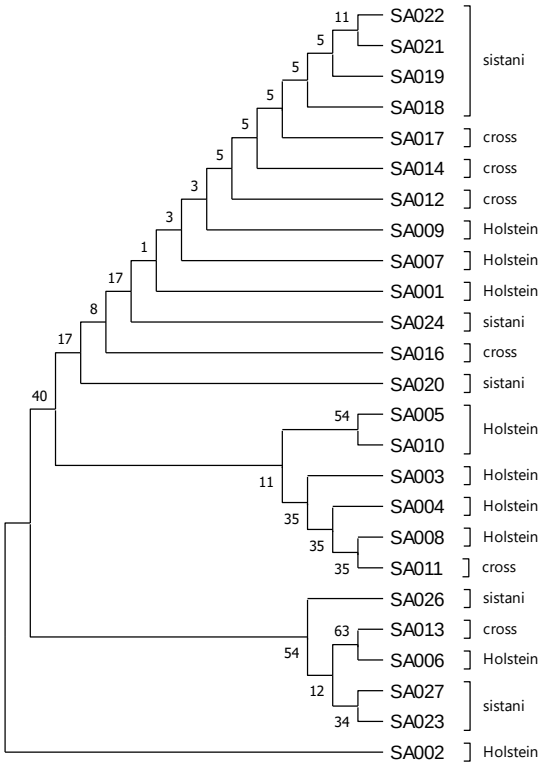
جدول ۹. ضریب جایگزینی انتقالی به تقاطعی در جایگاه ژن CXCR1 در جمعیت‌های هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

جمعیت	نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی (R)
سیستانی	۱۰۸۵۵۲/۳۳
هلشتاین	۳/۰۳
آمیخته سیستانی×سیمنتال	۳۱۴۷۰۳/۳۸
کل جمعیت	۳/۰۲

بررسی نرخ جایگزینی‌های انتقالی و تقاطعی در بین نمونه‌ها و در بین نژادهای مختلف (هلشتاین، سیستانی، و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال). درصد جانشینی انتقالی بیشتر از جانشینی تقاطعی بود. ضرایب نسبت جانشینی انتقالی به تقاطعی در نژادهای سیستانی و آمیخته بالاتر از هلشتاین بود. ماتریس جایگزینی توالی‌ها اطلاعاتی در مورد الگوهای جایگزینی نوکلئوتیدها در طول

زمان ارائه می‌دهد. درصد بالاتر جانشینی‌های انتقالی نسبت به جانشینی‌های تقاطعی می‌تواند به دلیل پایداری بیشتر آن‌ها باشد. ضرایب نسبت جانشینی انتقالی به تقاطعی بالاتر در نژادهای سیستانی و آمیخته نشان می‌دهد که این نژادها در طول زمان تحت تأثیر انتخاب طبیعی قرار داشته‌اند، البته در گاوهای هلشتاین حداقل در طی صد سال آخرین بیشترین فشارها در تغییرات ژنتیکی در طی برنامه های اصلاح نژادی و انتخاب مصنوعی بوده‌اند. در مطالعات مشابه بر روی گاوهای بومی و مقایسه آنها با نژادهای اصیل و اصلاح شده، الگوهای مشابهی از جانشینی نوکلئوتیدها گزارش شده است (Lee *et al.*, 2015).

تجزیه و تحلیل تبارزایی: نتایج تجزیه تبارزایی گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در شکل ۵ نمایش داده شده است. درخت تبارزایی با روش اتصال همسایگی و تعداد ۱۰۰۰۰ تکرار آزمون Bootstaping انجام گرفت. اعداد روی شاخه میزان همپوشانی توالی‌ها در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. درخت تبارزایی نشان می‌دهد که نمونه‌های هلشتاین، سیستانی و دورگه‌ها در گروه‌های جداگانه‌ای خوشه‌بندی شده‌اند، که نشان‌دهنده تفاوت‌های ژنتیکی بین این گروه‌ها است. برخی از نمونه‌های سیستانی (مانند SA021 و SA022) به هم نزدیک‌تر بودند و یک گروه فرعی را تشکیل دادند. نمونه‌های مربوط به آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال نیز در نقاط مختلف درخت پراکنده شده‌اند که نشان‌دهنده تلاقی‌ها در طول زمان و بین گروه‌های مختلف رخ داده است.



شکل ۵. نتایج تجزیه تبارزایی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژن CXCR1 در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال با روش اتصال همسایگی (NJ) .

میانگین فاصله (واگرایی) ژنتیکی (Distance): میانگین واگرایی در بین و درون نژادهای هلشتاین، سیستانی و آمخته‌های سیستانی×سیمنتال در جدول ۱۰ ارائه شده است. تجزیه و تحلیل تعداد جایگزینی‌های پایه در هر جفت باز از میانگین‌گیری در تمام جفت‌های دنباله در هر گروه با استفاده از مدل تامورا–نئی محاسبه گردید. بالاترین میزان واگرایی در درون نژادها و جمعیت‌ها مربوط نژاد هلشتاین (۰/۰۱) بود و جمعیت سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال حدواسط در جایگاه مذکور بودند. از میزان واگرایی در بین نژادهای مختلف، بالاترین میزان واگرایی بین آمیخته‌ها با هلشتاین (۰/۰۰۳۵۴) و کمترین بین سیستانی با آمیخته ها (۰/۰۰۱۴) بود.

جدول ۱۰. برآورد میانگین واگرایی تکاملی بر روی جفت‌های توالی جایگاه ژن CXCR1 بین و داخل نژادهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال (اعداد داخل جدول خطای برآورد را نشان می‌دهد)

جمعیت	هلشتاین	سیستانی	آمیخته
هلشتاین	**(۰/۰۰۲) ۰/۰۰۵**	۰/۰۰۱۴۶	۰/۰۰۰۸
سیستانی	۰/۰۰۳۴۹	**۰/۰۰۱(۰/۰۰۱)**	۰/۰۰۱۴۵
آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال	۰/۰۰۳۵۴	۰/۰۰۱۴	**(۰/۰۰۱) ۰/۰۰۲**

میزان تفرق ژنتیکی (Diversity): نتایج میزان تفرق ژنتیکی در جایگاه ژن CXCR1 در بین نژادهای مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال و کل جمعیت‌ها در جدول ۱۱ ارائه شده است. تعداد جایگزین‌های پایه در هر جایگاه از محاسبات میانگین تنوع در زیرجمعیت‌ها محاسبه گردیده است. تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از مدل حداکثر درستنمایی ترکیبی و با روش بوت استراپ (۱۰۰۰۰ تکرار) انجام شد. میانگین تفرق در بین نژادها و جمعیت‌ها محاسبه شدند. ضریب تمایز تکاملی در بین نژادها برابر با ۰/۰۹۹ با خطای استاندارد ۰/۰۵۶ بود که ضریب تمایز بسیار کم در ناحیه مورد مطالعه می باشد.

جدول ۱۱. میانگین تفرق ژنتیکی یا تکامل بین جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جایگاه ژن CXCR1

	میانگین تفرق ژنتیکی (d)	خطای استاندارد (s.e)
میانگین تفرق بین جمعیت‌ها	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۲
میانگین تفرق داخل جمعیت‌ها	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱
میانگین تفرق کل جمعیت‌ها	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱
ضریب تمایز تکاملی	۰/۰۹۹	۰/۰۵۶

تجزیه نواحی حذف و اضافه (Indel) در طول ۵۱۸ جفت باز از ژن CXCR1 در بین نژادهای مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال بیانگر ۳ ناحیه حذف و اضافه بود که ویژگی‌های آنها در جدول ۱۲ ارائه شده است. متوسط طول رویداد حذف و اضافه ۱ جفت باز و متوسط طول ناحیه حذف و اضافه ۱ جفت باز بود. تعداد هاپلوتیپ‌ها و میزان تفرق هاپلوتیپی بواسطه حذف و اضافه در کل جمعیت‌ها شامل هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال به ترتیب ۴ و ۰/۴۱۷ بودند. همچنین ضریب تفرق حذف و اضافه و تفرق حذف و اضافه به ازای هر جایگاه به ترتیب ۰/۵۱ و ۰/۰۰۰۹۹ محاسبه شدند. در نهایت ضریب تاجیما (D) ۰/۸۷۸۹-محاسبه شد که در سطح احتمال ۵ درصد غیرمعنی‌دار بود (P>۰/۰۵).

جدول ۱۲. تجزیه نواحی حذف و اضافه توالی‌های جایگاه ژن CXCR1 در جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

تغییرات به واسطه حذف و اضافه	جفت باز
تعداد کل وقوع حذف و اضافه	۳
متوسط طول رویداد هر حذف و اضافه	۱
متوسط طول ناحیه حذف و اضافه	۱
تعداد هاپلوتیپ ناشی از حذف و اضافه	۴
تفرق هاپلوتیپی ناحیه حذف و اضافه	۰/۴۱۷
تفرق حذف و اضافه (ki)	۰/۵۱۳
تفرق حذف و اضافه به ازای هر جایگاه (Pi(i))	۰/۰۰۰۹۹
D تاجیما	-۰/۸۷۸۹
P-value	۰/۱ غیرمعنی‌دار

نتایج تجزیه دو به دو جمعیت‌ها شامل هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جدول ۱۳ ارائه شده است. در دو نژاد هلشتاین و سیستانی به ترتیب ۹ و ۱ جایگاه چندشکلی در نتیجه ۹ جهش مشاهده گردید. متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت در دو نژاد هلشتاین و سیستانی به ترتیب ۲/۴۷ و ۰/۵ و میزان تفرق نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۰۹۷ محاسبه شدند. تعداد ۸ جایگاه جهش‌های چندشکلی در نژاد هلشتاین نشان دادند، اما در نژاد سیستانی تک‌شکل بودند و برعکس تعداد جایگاه‌هایی که در نژاد سیستانی چندشکل، اما در هلشتاین همشکل و مونومورف بودند، برابر با صفر بود. تعداد یک جهش در هر دو نژاد مشترک بودند.

در جمعیت نژاد سیستانی و آمیخته‌ها به ترتیب ۱ و ۳ جایگاه چندشکلی در نتیجه به ترتیب ۱ و ۳ جهش مشاهده گردید. متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت در دو نژاد سیستانی و آمیخته‌ها به ترتیب ۰/۵ و ۱ و میزان تفرق نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۰۰۰۹۷ و ۰/۰۰۲ محاسبه گردید. تعداد جایگاه‌هایی که جهش‌های چندشکلی در نژاد سیستانی نشان دادند، اما در آمیخته‌ها همشکل بودند برابر با صفر بود و همچنین تعداد جایگاه‌هایی که در آمیخته‌ها جهش چندشکلی نشان دادند، اما در نژاد سیستانی هم‌شکل و هموزیگوت بودند برابر با ۲ ناحیه بود. تعداد یک جهش چندشکلی در بین هر دو نژاد مشترک بودند.

در جمعیت نژاد هلشتاین و آمیخته‌ها به ترتیب ۹ و ۳ جایگاه چندشکلی در نتیجه به ترتیب ۹ و ۳ جهش مشاهده گردید. متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت در دو نژاد هلشتاین و آمیخته‌ها به ترتیب ۲/۴۶۷ و ۱ و میزان تفرق نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۲ محاسبه گردید. تعداد شش جایگاه جهش‌های چندشکلی در نژاد هلشتاین نشان دادند، اما در آمیخته‌ها همشکل بودند و همچنین تعداد جایگاه‌هایی که در آمیخته‌ها جهش چندشکلی نشان دادند، اما در نژاد هلشتاین همشکل و هموزیگوت بودند برابر با صفر بود. تعداد سه جهش چندشکلی در بین هر دو نژاد مشترک بودند.

جدول ۱۳. تجزیه نواحی چندشکلی توالی‌های جایگاه ژن CXCR1 در مقایسات دو به دوی جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

جمعیت	تعداد نمونه	تعداد کل ناحیه چندشکل	تعداد کل جهش ها	متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت	تفرق نوکلئوتیدی
هلشتاین	۱۰	۹	۹	۲/۴۷	۰/۰۰۵
سیستانی	۹	۱	۱	۰/۵	۰/۰۰۱
کل	۱۹	۹	۹	۱/۶۵	۰/۰۰۳
سیستانی	۹	۱	۱	۰/۵	۰/۰۰۰۹۷
آمیخته های سیستانی×سیمنتال	۶	۳	۳	۱	۰/۰۰۲
کل	۱۵	۳	۳	۰/۶۸۶	۰/۰۰۱
هلشتاین	۱۰	۹	۹	۲/۴۶۷	۰/۰۰۵
آمیخته های سیستانی×سیمنتال	۶	۳	۳	۱	۰/۰۰۲
کل	۱۶	۹	۹	۱/۹۱۷	۰/۰۰۴

حذف/اضافه‌های کوچک معمولاً تأثیر محدودی بر عملکرد پروتئین دارند، اما می‌توانند تنوع ژنتیکی را افزایش دهند. این یافته مشابه نتایج مطالعه زانگ و همکاران (۲۰۱۲) است که نشان داد حذف/اضافه‌های کوچک در CXCR1 تأثیر کمی بر صفات شیر دارند. برخی مطالعات مانند تحقیق شارما و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که حذف/اضافه‌ها می‌توانند بر صفات مقاومت به بیماری‌ها تأثیرگذار باشند.

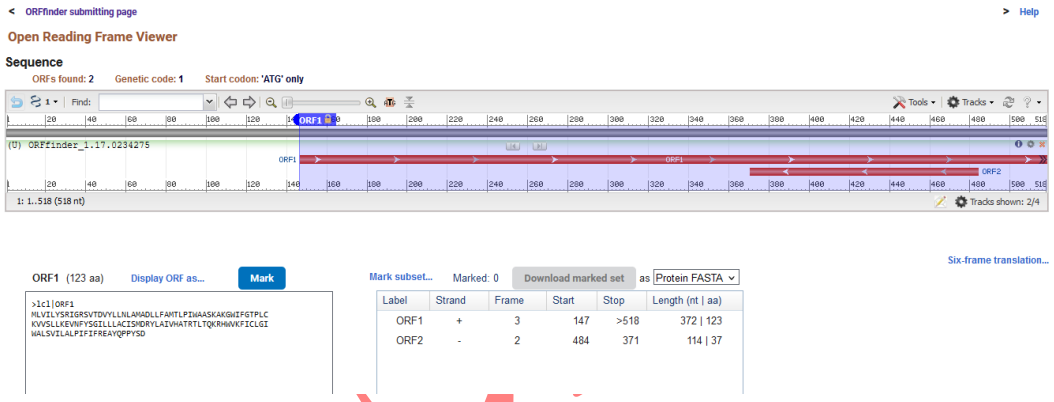
شاخص روند انتخاب طبیعی یا نسبت جایگزینی dN/dS: نسبتی از جهش‌ها که منجر به تغییر آمینواسید شده‌اند (d_N) نسبت به تغییراتی که تغییری در امینواسید ایجاد نکرده‌اند (d_S)، شاخصی می‌باشد که نشان‌دهنده نقش انتخاب طبیعی در روند تکامل جمعیت‌ها نشان می‌دهد. نتایج تجزیه متوسط مقایسه دو به دوی توالی‌ها در جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جدول ۱۴ آورده شده است. مقادیر این شاخص اگر بزرگتر از یک باشد انتخاب مثبت و اگر کمتر از یک باشد

انتخاب خالص و اگر برابر با یک باشد انتخاب خنثی را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر در مقایسه دو به دوی توالی نمونه‌های مختلف گاو سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌ها انجام گرفت برابر با ۱/۶۳ بدست آمد که نشان از دخالت انتخاب طبیعی در طی تکامل نژادهای مختلف گاو می باشد.

جدول ۱۴. شاخص روند انتخاب طبیعی یا نسبت جایگزینی غیرمتعارف به متعارف (d_N/d_S) در مقایسه دو به دوی حیوانات در جمعیت‌های مختلف سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌ها

شاخص ها	مقدار برآورد	خطای استاندارد
d_N	۰/۰۱۵۵	۰/۰۰۰۹
d_S	۰/۰۰۹۷	۰/۰۰۱۵
d_N/d_S	۱/۶۳	

در نهایت تجزیه ناحیه‌ای که برای رونویسی پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد (Open Reading Frame) با نرم‌افزار انلاین (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder) انجام شد و منجر به شناسایی یک ORF به طول ۳۷۲ جفت باز و ۱۲۳ آمینواسید گردید (شکل ۶). کد شروع ORF کدون ATG می باشد.



شکل ٦. شناسایی ناحیه رنویسی جایگاه ژنی CXCR1 در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

نتایج بررسی اثر نژاد و نواحی چندشکل بر درصد چربی شیر در گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌ها در جدول ۱۵ ارائه شده است. اثر نژاد بر درصد چربی شیر معنی‌دار بود. شیر گاوهای سیستانی بالاترین درصد چربی (۵/۰۵ درصد) و آمیخته‌های سیستانی و سیمنتال کمترین درصد چربی شیر را داشتند. تفاوت درصد چربی بین گاوهای هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال معنی‌دار نبود. اثرات جایگزینی آلل‌ها در ناحیه SNP8 بر درصد چربی شیر معنی‌دار نبود، اما از نظر عددی چندشکلی A با بالاترین درصد چربی (۴/۲ درصد) و چندشکلی G با کمترین درصد چربی (۳/۸۳ درصد) همراه بودند. چندشکلی G کمترین فراوانی و چندشکلی A بالاترین فراوانی را در جمعیت‌های مورد مطالعه داشت. اثرات جایگزینی آللی در ناحیه چندشکل SNP230 بر درصد چربی شیر معنی‌دار بود. چندشکلی C با بیشترین فراوانی، بالاترین درصد جایگزینی (۴/۲۸ درصد) و چندشکلی T با کمترین فراوانی، کمترین درصد جایگزینی آللی (۲/۶۸ درصد) را نشان داد و به عنوان یک نشانگر در افزایش درصد چربی شیر در بین نژادها با ویژگی قدرت ترکیبی عمومی آل‌ها و در درون نژاد با انتخاب چندشکلی برتر مورد استفاده قرار گیرد. همچنین در ناحیه چندشکلی SNP272 چندشکلی با بالاترین فراوانی (C) و چندشکلی با کمترین فراوانی (T) اثرات جایگزینی متفاوتی بر صفت درصد چربی شیر نشان دادند، اما از نظر آماری اختلافات معنی‌دار نبود.

جدول ۱۵. میانگین اثرات نژاد و نواحی چندشکل بر درصد چربی شیر در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته های سیستانی×سیمنتال (درصد)

منابع تغییرات		تعداد	میانگین صفات کیفی شیر			
			درصد چربی	درصد پروتئین	درصد لاکتوز	درصد ماده خشک بدون چربی
اثر نژاد	سیستانی	۹	^{a}۵/۰۵	^{a}۳/۰۹	^{a}۴/۲۷	^{a}۷/۹۲
	هلشتاین	۱۰	^{b}۳/۲۰	^{a}۲/۴۳	^{ab}۲/۹۸	^{b}۵/۴۴
	آمیخته	۳	^{b}۲/۸۴	^{a}۱/۸۹	^{b}۲/۴۵	^{b}۵/۰۴
SNP8	A	۵	^{a}۴/۲	^{a}۲/۸۲	^{a}۳/۸۴	^{a}۷/۳۸
	G	۱۷	^{a}۳/۸۳	^{a}۲/۵۷	^{a}۳/۳۲	^{a}۶/۱۱
SNP230	C	۱۷	^{a}۴/۲۸	^{a}۲/۸۲	^{a}۳/۷۲	^{a}۶/۷۷
	T	۵	^{b}۲/۶۸	^{a}۱/۹۶	^{b}۲/۴۸	^{b}۵/۱۴
SNP272	C	۲۰	^{a}۳/۹۸	^{a}۲/۶۹	^{a}۳/۵۲	^{a}۶/۵۰
	T	۲	^{a}۳/۳۲	^{a}۲/۰۴	^{a}۲/۶۳	^{a}۵/۳۸

گروه‌های با حروف غیرمشترک (a، b) بیانگر اختلافات معنی‌دار میانگین‌ها در سطح کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار هستند (P>۰/۰۵)

اثرات نژاد و نواحی چندشکل در ژنوم دام‌ها در ناحیه CXCR1 بر درصد پروتئین شیر غیرمعنی‌دار بودند (جدول ۱۵). میانگین اثرات نژاد و نواحی چندشکل در جایگاه ژن CXCR1 بر درصد لاکتوز شیر در گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جدول ۱۵ آورده شده است. اثر نژاد بر درصد لاکتوز شیر در نژادهای مختلف معنی‌دار بود و شیر گاوهای سیستانی بالاترین درصد لاکتوز و آمیخته‌ها کمترین درصد لاکتوز را داشتند. وجود بالاتر درصد لاکتوز شیر به عنوان تنها قند شیر می‌تواند از نظر تغذیه انسانی و نوزادان حائز اهمیت باشد. اختلاف درصد لاکتوز شیر هلشتاین و آمیخته‌ها اختلاف معنی‌دار نداشتند.

اثرات چندشکلی‌های مختلف در دو ناحیه SNP8 و SNP272 بر درصد لاکتوز شیر معنی‌دار نبود، هر چند که چندشکلی A در ناحیه SNP8 و چندشکلی C در ناحیه SNP272 بالاترین درصد جایگزینی آللی را داشتند، اما اثرات جایگزینی چندشکلی‌ها در ناحیه SNP230 بر درصد لاکتوز شیر معنی‌دار بود. چندشکلی C بالاترین میزان اثر (۳/۷۲) و آلل T کمترین میزان اثر (۲/۴۸) را بر درصد لاکتوز شیر داشت. درصد ماده خشک در شیر گاوهای سیستانی (۷/۹۲ درصد) بالاتر از گاوهای هلشتاین و آمیخته‌ها بود، اما بین هلشتاین و آمیخته‌های اختلافات معنی‌داری نداشتند. در جایگاه SNP8 دو چندشکلی A و G مشاهده شدند که میزان اثر آنها بر درصد ماده خشک شیر معنی‌دار بود، هر چند که میزان اثر چندشکلی A بیشتر از چندشکلی G بود، اما اثرات چندشکلی‌های مختلف در ناحیه SNP230 بر درصد ماده خشک شیر معنی‌دار بود و آلل C بالاترین اثر (۶/۷۷ درصد) و آلل T کمترین اثر (۵/۱۴ درصد) را بر درصد ماده خشک شیر داشتند. همچنین اثرات جایگزینی آلل‌ها در ناحیه SNP272 بر درصد ماده خشک شیر غیرمعنی‌دار بود، هر چند که باز هم آلل C اثرات بیشتری نسبت به آلل T بر درصد ماده خشک شیر در جمعیت‌های مورد مطالعه داشت (جدول ۱۵).

نسبت d_N/d_S برابر با ۱/۶۳ بود که نشان‌دهنده انتخاب مثبت در طی تکامل نژادهای مختلف گاو است. مقدار d_N/d_S بیشتر از یک نشان می‌دهد که جهش‌های غیرمترادف نسبت به جهش‌های مترادف تحت فشار انتخاب مثبت قرار گرفته‌اند. این یافته با مطالعاتی همسو است که نشان می‌دهند ژن‌های مرتبط با سامانه ایمنی (مانند CXCR1) در گاوها تحت تأثیر انتخاب طبیعی قرار دارند (Martinez *et al.*, 2009). برخی مطالعات مانند تحقیق زانگ و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که تغییرات آمینواسیدی در CXCR1 تأثیر معنی‌داری بر صفات شیر ندارند. این اختلاف ممکن است ناشی از تفاوت در جمعیت‌ها یا شرایط محیطی باشد. مناطق حفاظت‌شده معمولاً نشان‌دهنده اهمیت عملکردی بخش‌هایی از ژن هستند. مناطقی از CXCR1 که با اتصال به IL-8 مرتبط هستند، معمولاً حفاظت‌شده باقی می‌مانند (Petersen & Seberg, 2003). CXCR1 نقش کلیدی در مقاومت به ورم پستان از طریق مسیر سیگنالینگ IL-8 ایفا می‌کند. نواحی چندشکلی در منطقه CXCR1ها درجات متفاوتی از مقاومت به ورم پستان را نشان دادند. در جمعیت گاوهای هلشتاین چینی چهار SNP، A < -1768T، G < -1830A و C < -344T و A <۷۸۳C در ناحیه بالادست ۵' و منطقه کدگذاری شناسایی شدند. تجزیه و تحلیل همبستگی نشان داد که ۱۸۳۰AA- ، 1768TT- و ۳۴۴TT- به

ترتیب با کمترین شمارش سلول‌های بدنی شیر ارتباط معنی‌داری داشتند. همچنین تجزیه و تحلیل هاپلوتیپ نشان داد که هاپلوتیپ (ATTA) به طور قابل توجهی با کمترین شمارش سلول‌های بدنی شیر همبستگی داشت. لذا یک نشانگر ژنتیکی بالقوه مقاومت به ورم پستان در گاوهای شیری معرفی می‌گردد (Chen *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای که به منظور بررسی وجود چندشکلی‌های ژن CXCR1 و ارتباط آن‌ها با ورم پستان بالینی، اختلالات تولیدمثلی و ویژگی‌های عملکردی در گاو Hardhenu انجام گرفت، ژنوتیپ (T<C SNP rs211042414) در جایگاه g.106216468 ژن CXCR1 و هضم با آنزیم محدودکننده Bsa1 انجام شد. سه ژنوتیپ CC، CT و TT را گزارش کردند که آلل C شایع‌ترین آنها بود. ژنوتیپ CC نسبت به ژنوتیپ‌های TT و CT حساسیت بیشتری به ورم پستان بالینی داشت (P<۰/۰۵). علاوه بر این، تجزیه حداقل مربعات ارتباط معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌ها و صفات عملکردی مانند تولید شیر ۳۰۵ روزه و اوج عملکرد گزارش کردند (P<۰/۰۵). ژنوتیپ CC تولید شیر بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های CT و TT داشت که نشان‌دهنده ارتباط مثبت بین آلل C و افزایش تولید شیر است. این یافته‌ها پیامدهای عملی برای بهبود ژنتیکی گاو Hardhenu دارند. چندشکلی شناسایی شده در ژن CXCR1 و بکارگیری در معیارهای انتخاب موجود می‌تواند به افزایش مقاومت در برابر بیماری و صفات تولید شیر کمک کند (Magotra *et al.*, 2023).

در مطالعه‌ای که به منظور بررسی چندشکلی‌های ژن CXCR1 و ارتباط آنها با شمارش سلول‌های بدنی شیر (SCC) در گاوهای دو نژاد Deoni و آمیخته‌های آن با روش هضم آنزیمی CXCR1/BsaI انجام گرفت، دو ژنوتیپ AA و AG با فراوانی‌های ۰/۱۷ و ۰/۸۳ در آمیخته‌ها و ۰/۲۱ و ۰/۷۹ در گاوهای Deoni گزارش کردند. فراوانی آلل A در دو جمعیت Deoni و آمیخته‌ها به ترتیب ۰/۵۹ و ۰/۵۷ و برای آلل G به ترتیب ۰/۴۱ و ۰/۴۳ بودند. مقایسه توالی چندگانه آلل A آمیخته‌ها و Deoni دو موقعیت جابجایی انتقالی در موقعیت‌های ۲۹۵ C>T و ۲۹۹ A>G جفت باز نشان داد. تجزیه داده‌های شمارش سلول‌های بدنی شیر با ژنوتیپ‌های جایگاه مذکور در آمیخته‌های اختلاف معنی‌داری نشان نداد، ولی ارتباط در نژاد خالص Deoni از نظر آماری معنی‌دار بود و گاوهای با ژنوتیپ AG عاری از بیماری ورم پستان بودند (Shankarappa *et al.*, 2021). یک SNP واقع بر ژن CXCR1 در موقعیت ۷۷۷+، گزارش شده است که مرتبط با ورم پستان تحت بالینی، شمارش سلول‌های بدنی شیر، تولید شیر و عملکرد نوتروفیل هست (Youngerman *et al.*, 2004b). آندومتریت یکی از بیماری‌های تولیدمثلی است که می‌تواند باعث اختلال در سلامت رحم پس از زایمان گاو شود. در مطالعه‌ای که به منظور ارزیابی ارتباط بین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در گیرنده ژن α اینترلوکین ۸ (CXCR1) و احتمال آندومتریت در گاوهای شیری هلشتاین انجام گرفت، نتایج وجود نسبت متفاوتی از چندشکلی‌ها (G > C) در ژن CXCR1 در گاوهای مبتلا به اندومتریت بالینی، در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان داد که بین بروز بیماری و ژنوتیپ‌های در موقعیت ۹۵۶ ژن CXCR1 همبستگی معنی‌داری وجود دارد، گاوهای با ژنوتیپ GC شیوع بیشتری از اندومتریت بالینی در مقایسه با گاوهای دارای ژنوتیپ GG بودند. لذا موقعیت چندشکلی مذکور در ژن CXCR1 می‌تواند، نشانگر مناسبی برای شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به اندومتریت در گاوهای شیری هلشتاین باشد (Asadpour *et al.*, 2020). اینترلوکین ۸ (IL-8) یکی از مهمترین جذب کننده‌های شیمیایی بحرانی برای نوتروفیل‌هاست. اتصال اینترلوکین ۸ به گیرنده‌های (CXCR1 و CXCR2) بر روی غشای سیستوپلاسمی نوتروفیل موجب تحریک نوتروفیل‌ها شده، تحریک کموتاکسی و تقویت فاگوسیتوزی و توانایی از بین بردن این سلول‌ها می‌شود (Mitchell *et al.*, 2003). شواهد وجود چندشکلی در CXCR1 مانند dbSNP ID: c.735C>G (rs208795699) بر بقا و مهاجرت نوتروفیل‌ها در پاسخ به اینترلوکین ۸ گزارش شده است (Pighetti *et al.*, 2012)، اما چندشکلی در ناحیه CXCR1 c.777C>G هیچ ارتباط قابل توجهی با بیمارهای تولیدمثلی نداشته است (Kosciuczuk *et al.*, 2014). ژن CXCR1 در پاسخ‌های ایمنی مربوط به عفونت ورم پستان نقش دارد. در مطالعه‌ای که به منظور بررسی چندشکلی و ارتباط ژن CXCR1 با شمارش سلول‌های بدنی شیر، به عنوان شاخصی برای تشخیص ورم پستان در گاو بومی گیلان (نژاد تالشی) انجام گرفت، پس از هضم توسط آنزیم *BaeGI* ناشی از G>C SNP در موقعیت ۷۳۵ دو آلل و سه نوع ژنوتیپ در جمعیت‌های مورد مطالعه مشاهده شد. فراوانی ژنوتیپی ۶۷، ۱۲ و ۲۰ درصد برای ژن CXCR1 گزارش گردید. ژنوتیپ‌های جایگاه مذکور با شمارش سلول‌های بدنی شیر (SCS)، ارتباط داشت (P<0.1) (Hosseini Moghaddam *et al.*, 2021).

چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) روی ژن CXCR1 در موقعیت (C<CXCR1c.+735G) با استفاده از آنزیم BaeGI در گاوهای هلشتاین گزارش شده است (Galvao *et al.*, 2011). ژانگ و همکاران (۲۰۱۲) ژن CXCR1 را به عنوان یک ژن کاندیدا

برای ورم پستان گاوی معرفی نمودند و ارتباط چندشکلی CXCR1 گاوی با شمار سلول‌های سوماتیکی شیر در گاوهای هلشتاین چینی گزارش شده است (Zhang *et al*., 2012).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

با توجه به نتایج حاصل از بررسی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی در ژن CXCR1 و ارتباط آن‌ها با صفات کیفی شیر در گاوهای سیستانی و آمیخته‌های آن‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که تنوع ژنتیکی در این جایگاه ژنی در بین نژادهای مختلف گاو وجود دارد، اما این تنوع محدود است. نژاد هلشتاین بالاترین میزان واگرایی ژنتیکی درون‌نژادی را نشان داد، در حالی که آمیخته‌ها از نظر ژنتیکی به نژاد سیستانی نزدیک‌تر بودند. شناسایی ده جایگاه چندشکلی و پنج جایگاه چندشکلی آمینواسیدی در ژن CXCR1 نشان می‌دهد که این ژن تحت تأثیر انتخاب طبیعی در طی تکامل نژادهای مختلف گاو قرار گرفته است، همانطور که نسبت d_N/d_S برابر با ۱/۶۳ نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل ارتباط بین چندشکلی‌های ژنی و صفات کیفی شیر نشان داد که چندشکلی‌های خاصی در ناحیه SNP230 با درصد چربی، لاکتوز و ماده خشک بدون چربی شیر ارتباط معنی‌داری داشتند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ژن CXCR1 می‌تواند به عنوان یک هدف برای مطالعات بیشتر در زمینه اصلاح نژاد مولکولی گاوهای شیری مورد استفاده قرار گیرد، اما نیاز به بررسی‌های گسترده‌تر با حجم نمونه بزرگ‌تر و در نظر گرفتن عوامل محیطی مؤثر بر صفات شیر وجود دارد.

منابع

مقصودی، ع.، نجاتی جوارمی، ا.، حسنی بافرانی، ع.، نوری صادق، ح.، جهان، م.، سروری کلوتی، ح. و خانی بندانی، ح. ۱۴۰۱. بررسی عوامل مؤثر بر کاهش جمعیت گاو نژاد سیستانی و راهکارهای احیای آن. *نشریه علوم دامی*، ۱۳۵، ۳۹-۵۴.

Ablondi M., Summer A., Stocco G., Degano L., Vicario D., Stefanon B., Sabbioni A. and Cipolat-Gotet C. (2023). Heritability and genetic correlations of total and differential somatic cell count with milk yield and composition traits in Italian Simmental cows. *Journal of Dairy Science*, 106(12), 9071-9077.

Asadpour, R., Feyzi, L., Jafari-Joozani, R., Hamali, H., Abolfaz, H., Hajibemani H. and Firouzamandi, M. (2020). The relationship between polymorphism of the CXCR1 gene and the risk of endometritis in Holstein dairy cows. *Veterinarski Arshiv*, 90(6), 557-563.

Beecher C., Daly M., Ross R. P., Flynn J., McCarthy T. V. and Giblin L. (2012). Characterization of the bovine innate im mune response in milk somatic cells following intramammary infection with Streptococcus dysgalactiae subspecies dysga lactiae. *J. Dairy Sci.*, 95, 5720-5729.

Berglund B. (2008). Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 89-95.

Brown, A. J., Joseph, P. R., Sawant, K. V. and Rajarathnam, K. (2017). Chemokine CXCL7 heterodimers: structural insights, CXCR2 receptor function, and glycosaminoglycan interactions. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(4), 748. doi:10.3390/ijms18040748.

Chen, L., Fan, J., Chen, H., Meng, Z., Chen, Z., Wang, P. and et al. (2014). The IL-8/CXCR1 axis is associated with cancer stem cell-like properties and correlates with clinical prognosis in human pancreatic cancer cases. *Sci Rep.*, 4, 5911. doi: 10.1038/srep05911.

Galvão, K. N., Pighetti, G. M., Cheong, S. H. and et al. (2011). Association between interleukin-8 receptor-α (CXCR1) polymorphism and disease incidence, production, reproduction, and survival in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 94, 2083-2091.

Goertz, I., Baes, C., Weimann, C., Reinsch, N. and et al. (2009). Association between single-nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and somatic cell score in Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 92, 4018-4022.http://dx.doi.org/10.3168/ jds.2008-1536.

Grosse, W. M., Kappes, S. M., Laegreid, W. W. and Keele, J. W. (1999). Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and linkage mapping of bovine cytokine genes. *Mammalian Genome*, 10, 1062-1069.

Hosseini Moghaddam, S. H., Ayatollahi1, M., Ahadzadeh, O., Mirhoseini, S. Z., Khataminejad, R. and Alaei, H. (2021). Genotyping of Lactoferrin and CXCR1 genes in Guilan native cows and its association with milk somatic cell score. Irani an Journal of Applied Animal Science, 11(1), 87-93.

Kim, H. Y., Choi, J. H., Kang, Y. J., Park, S. Y., Choi, H. C. & Kim, H. S. (2011). Reparixin, an inhibitor of CXCR1 and CXCR2 receptor activation, attenuates blood pressure and hypertension-related mediators expression in spontaneously hypertensive rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34(1), 120–127. https://doi.org/10.1248/bpb.34.120

Kosciuczuk, E. M., Lisowski, P., Jarczak, J., Krzyzewski, J., Zwierzchowski, I. and Bagnicka, E. (2014). Expression patterns of β-defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland infected with coagulase-positive or coagulase-negative Staphylococci. *BMC. Vet. Res.*, 10, 1. DOI: 10.1186/s12917-014-0246-z.

Lee, D. W. and et al. (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 385, 517–528.

Leyva-Baca, I., Schenkel, F., Martin, J. and Karrow, N. A. (2008). Polymorphisms in the 5' upstream region of the CXCR1 chemokine receptor gene, and their association with somatic cell score in Holstein cattle in Canada. *J. Dairy Sci.*, 91, 407-417.

Librado, P. and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, *25*, 1451-1452. doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187.

Lopez, A. and Bonasora, M. G. (2017). Phylogeography, genetic diversity and population structure in a Patagonian endemic plant. *AoB Plants*, 16(4), 275-285.

Maghsoudi, A., Nejati-Javaremi, A., Hasani Baferani, A., Noure Sadegh, H., Jahan, M., Sarvari-Kalouti, H. and Khani-Bandani, H. (2021). Evaluation of the effective factors on reducing the population of Sistani cattle and the revitalization strategies. *Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 135, 39-54. (In Persian)

Magotra, P. A., Bangar, Y. C., Patil, C. S., Kamaldeep, P., Sindhu, V., Malik, D., Chaudhary, P., Garg, A. R. and Kumar, S. (2023). Association of CXCR1 gene polymorphism with clinical mastitis, reproductive disorders and performance traits in Hardhenu (Bos taurus × Bos indicus) cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(9), 1234-1243.

Martinez, L., Lucas, P., Navarro, G., Checa, A. I., Franco, R., Martínez-A, C., Rodríguez-Frade, J. M. & Mellado, M. (2009). Dynamic regulation of CXCR1 and CXCR2 homo- and heterodimers. Journal of Immunology, 183(11), 7337–7346. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901802.

Mitchell, G. B., Albright, B. N. and Caswell, J. L. (2003). Effect of interleukin-8 and granulocyte colony-stimulating factor on priming and activation of bovine neutrophils. *Infect. Immun.*, 71, 1643-1649. DOI: 10.1128/iai.71.4.1643-1649.2003.

Muller, J. K. and Leweke, F. M. (2016). Bipolar disorder: clinical overview. *Medizinische Monatsschrift fur Pharmazeuten*, 39(9), pp.363-9.

Nilsen, H., Olsen, H. G., Hayes, B., Nome, T. and et al. (2009). Characterization of a QTL region affecting clinical mastitis and protein yield on BTA6. *Anim. Genet.*, 40, 701-712. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01908.x.

Ogorevc, J., Prpar, S. and Dovc, P. (2000). Establishment and characterization of a caprine mammary epithelial cell line. *In vitro Cell Development Biology Science, 36(1),* 26-37. doi: 10.1290/1071-2690(2000)036<0026:EACOAC>2.0.CO;2.

Paape, M. J., Shafer-Weaver, K., Capuco, A. V., Van Oostveldt, K. and et al. (2000). Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 480, 259-277. http://dx.doi.org/10.1007/0-306-46832-8_31.

Petersen, G. and Seberg, O. (2003). Phylogenetic analyses of the diploid species of Hordeum (Poaceae) and a revised classification of the genus. *Systematic Botany, 28,* 293-306. DOI:10.1043/0363-6445-28.2.293.

Pighetti, G. M. and Rambeaud, M. (2006). Genome conservation between the bovine and human interleukin-8 receptor complex: improper annotation of bovine interleukin-8 receptor b identified. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 114, 335–340.

Pighetti, G. M., Kojima, C. J., Wojakiewicz, L. and Rambeaud, M. (2012): The bovine CXCR1 gene is highly polymorphic. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 145, 464-470.

Pokorska, J., Dusza, M., Kułaj1, D., Żukowski, K. and Makulska, J. (2015). Single-nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and its association with clinical mastitis incidence in Polish Holstein-Friesian cows. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), gmr.15027247.

Rekik, B., Ajili, N., Hani, H. B., BenGara, A. and Rouissi, H. (2008). Effect of somatic cell count on milk and protein yields and female fertility in Tunisian Holsteins cows. *Livest. Sci.*, 106, 309-317.

SAS Institute. (2004). SAS®/STAT Software, Release 9.4. SAS Institute, Inc., Cary, NC. USA.

Shankarappa, B., Nagaraja, R., Yathish, H. M. and Prasanna, S. B. (2021). Identification of CXCR1 gene variants and their association with somatic cell count in HF crossbred and Deoni cattle. *The Pharma Innovation Journal*, SP-10(11), 2098-2102.

Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution, 10*, 512-526. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.

Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, https://doi.org/10.1093/molbev/msab120.

Verbeke, J., Piepers, S., Peelman, L., Van Poucke, M. and De Vliegher, S. (2012). Pathogen-group specific association between CXCR1 polymorphisms and subclinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Research*, 79(3), 341–51.

Youngerman, S. M., Saxton, A. M. and Pighetti, G. M. (2004a). Novel single-nucleotide polymorphisms and haplotypes within the bovine CXCR2 gene. *Immunogenetics*, 56, 355–359.

Youngerman, S. M., Saxton, A. M., Oliver, S. P. and Pighetti, G. M. (2004b). Association of CXCR2 polymorphisms with sub clinical and clinical mastitis in dairy cattle. J. Dairy Sci. 87: 2442–2448.

Zhang, C., Fan, X., Yu, H. Q., Zhang, H. Q., Wang, X. L. and Zhou, Y. H. (2009). Phylogenetic analysis of questionable tetraploid species in Roegneria and Pseudoroegneria (Poaceae: Triticeae) inferred from a gene encoding plastid acety1-CoA carboxylase. *Biochemical Systematics and Ecology*, *37*, 412-420. https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.04.011.

Zhang, C., Wang, Y., Chen, H., Fang, X. and Gu, C. (2012). The chemokine receptor 1 gene polymorphism and its association with somatic cell score and milk production traits in dairy cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 30(1), 25–33.

Zhou, L., Wang, H. M., Ju, Z. H. and et al. (2013). Association of novel single nucleotide polymorphisms of the CXCR1 gene with the milk performance traits of Chinese native cattle. *Genet. Mol. Res.*, 12, 2725-2739.

Analysis of single-nucleotide polymorphism in the CXCR1 gene and its association with milk quality traits in different cattle breeds

Extended Abstract

Introduction: The CXCR1 gene is one of the candidate genes affecting milk quality and resistance to mastitis in dairy cows. This gene has been mapped on chromosome 2 of cows (BTA2), and studies in different breeds have shown that some specific variants of this gene lead to increased resistance to mastitis. Therefore, the present study aims to identify different variants at the CXCR1 locus and their association with milk quality traits.

Materials and methods: In the present study, 27 purebred Sistani and Holstein cows (10 heads each breed) and Sistani×Simmental crossbred (7 heads) were randomly selected and blood was collected from the jugular vein. In addition, milk quality traits including fat, protein, lactose and solids non-fat percent were analyzed for three months. DNA extraction was performed using the optimized salting-out method. A pair of specific primers was used to amplify a 594 bp fragment of the CXCR1 gene. The amplification products were sequenced using the Sanger method. Genome editing was performed using the Chromas program and low-quality regions were removed, and a 518 bp fragment was used to examine polymorphism among different sequences. Identification of genetic variants, including deletions and additions (Indel) and single-nucleotide polymorphisms as well as genetic structures of populations such as the distance and divergence between and within populations and phylogenetic analysis were performed using MEGA11 and Dnasp5 software. Finally, the association between the variants and milk quality traits was examined using a multiple regression model using the GLM procedure of SAS 9.4 software.

Results: In 10 regions of 518 base pairs in length, polymorphism was revealed in 25 different sequences belonging to Sistani, Holstein and Sistani×Simmental crossbred cows after editing the sequences. The 10 regions included 7 single-nucleotide polymorphic sites and three deletions and additions (Indel). The percentage of polymorphism among the total samples was 1.93%. Among the 172 amino acids resulting from the translation of the nucleotide sequence of the CXCR1 locus, five polymorphic regions were revealed, which were located at positions 3, 5, 77, 91 and 102 of the protein chains. Changes in the protein chain included the conversion of glycine to glutamate, threonine to glutamine, serine to leucine, alanine to valine, and serine to proline. In all populations, the percentage of transition substitution was higher than transversional substitution, which is probably due to the greater stability of transition substitutions. Kimura's neutral limit is equal to 0.5, and values higher than 0.5 indicate the role of selection in evolution, and less than 0.5 indicate the absence of selection and the influence of other evolutionary factors such as migration and mutation. The Kimura index coefficient in all breeds was more than 0.5, indicating the role of selection in the evolution of breeds and genetic changes in the mentioned area. The highest divergence rate was in the Holstein population (0.01 bp). Among the divergence rates of different breeds, the highest divergence rate was observed between crosses and Holsteins (0.00354 bp), and the lowest between Sistani and crossbred (0.0014 bp). The coefficient of evolutionary differentiation among breeds was 0.099 bp, with a standard error of 0.056 bp, indicating a very low coefficient of differentiation in the studied area. The number of deletions and additions (Indel) was 3 positions with a length of one base pair. The ratio of mutations that led to amino acid changes (d_S) to changes that did not cause amino acid changes (d_N) is an index that indicates the role of natural selection in the evolution of populations. In the present study, a pairwise comparison of the sequences from different samples of Sistani, Holstein, and crossbred cows was performed, yielding a value of 1.63, which indicates the involvement of natural selection during the evolution of different cattle breeds. The results of the study of the association of genetic variants in the CXCR1 gene region with milk quality traits showed that polymorphism in the 230 gene region (SNP230) had a significant association with the traits of fat, lactose and solids non-fat percentage. At the SNP230 locus, the allele with higher frequency in the population had a higher effect than the allele with lower frequency in all quality traits of milk.

Conclusions: Genetic variation was observed at the CXCR1 gene locus, but it was limited. Most regions of the gene were conserved across breeds. Association analysis between gene variants and milk quality traits showed significant associations, so it could be a useful marker in dairy cattle breeding programs.

***Keywords**: CXCR1, Dairy cattle, Mastitis resistance, Milk quality, Polymorphisms.*

Author Contributions

Methodology, S. A., G. R. D. and M. R.; software, S. A., G. R. D. and M. R.; formal analysis, S. A., G. R. D. and M. R. writing—original draft preparation, S. A., G. R. D., M. R., M. V., and A. J.; writing—review and editing, S. A., G. R. D., M. R., M. V., and A. J.; supervision, G. R. D., M. R., All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

The authors would like to thank all participants of the present study.

Ethical consideration

The study was approved by the Ethics Committee of the University of Zabol (Ethical cod: IR-UOZ-4398). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.