فنآوری زیستی در کشاورزی/ جلد هفدهم/ شمارهٔ دوم/ پاییز و زمستان ۹۷
DOI: 10.22084/ab.2018.14190.1355

بررسی تنوع اگزون ۴ ژن هورمون رشد و ارتباط آن با صفات شیر و چندقلوزایی در بزهای خلخالی

Investigation of Diversity in Exon 4 of Growth Hormone Gene and Relationship with Milk traits and Litter Size in Khalkhali Goats

نعمت هدایت ایوریق[۱*]، زهرا نوروزی[۲]، رضا سیدشریفی[۳] و حسین عبدی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲۷

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در ژن هورمون رشد و ارتباط آن با تولید شیر و چندقلوزایی در ۱۲۰ رأس از بزهای شیری خلخالی انجام گرفت. برای انجام این مطالعه از روش PCR-SSCP جهت شناسایی الگوهای مختلف و توالی‌یابی جایگاه موردنظر استفاده شد. نتایج این مطالعه منجر به شناسایی ۴ الگوی مختلف در اگزون ۴ ژن هورمون رشد گردید که با بررسی توالی‌های حاصل از الگوهای مختلف منجر به شناسایی پنج جهش شد که ایجادکننده ۴ هاپلوتیپ I، II، III و IV با فراوانی به‌ترتیب ۰/۲۴، ۰/۴۶، ۰/۱۷ و ۰/۱۳ بود. آنالیز ارتباط اثر هاپلوتیپ‌های شناسایی شده با صفات تولیدی نشان داد که هاپلوتیپ‌های مختلف تأثیر معنی‌داری بر صفات میزان تولید شیر، درصد چربی، درصد پروتئین داشته ($p<0.05$) درحالی‌که تأثیری بر روی صفات درصد لاکتوز و میزان مواد جامد شیر نداشت. هم‌چنین تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی شناسایی شده باعث ایجاد واریانس در صفت چندقلوزایی می‌شود به‌طوری‌که حیوانات با هاپلوتیپ II بیش‌ترین میزان چندقلوزایی (۲/۱۵۹) و هاپلوتیپ IV کم‌ترین میزان چندقلوزایی (۱/۴۰) را داشتند. نتایج نشان می‌دهد که هاپلوتیپ II برای صفت چندقلوزایی و هاپلوتیپ‌های I، II و IV برای صفات تولید شیر و ترکیبات آن می‌تواند یک نشانگر ژنتیکی مناسب به‌شمار رود.

واژه‌های کلیدی: هاپلوتیپ، ژن هورمون رشد، صفات شیر، چندقلوزایی، بزهای خلخالی

۱، ۲، ۳ و ۴. به‌ترتیب استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران، گروه علوم دامی، دانشکده مهندسی علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
*: نویسنده مسوول Email: nhedayat@uma.ac.ir

مقدمه

بز به‌دلیل میزان باروری بالا، سازگاری به شرایط محیطی مختلف و محبوبیت محصولات آن، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین دام‌های مزرعه به‌شمار می‌رود. بز خلخالی یک نژاد بومی بوده که محصول اصلی آن شیر است و جمعیت آن روند نزولی دارد. بز خلخالی از شاخص‌ترین نژادهای بز منطقه شمال‌غرب کشور است که به علت هزینه نگهداری نسبتاً کم و سازگاری با شرایط اقلیمی منطقه از لحاظ اقتصادی و تولید دارای اهمیت است (کریمی و همکاران، ۱۳۹۶) ولی باتوجه به ضعیف بودن از لحاظ تولید شیر و چندقلوزایی تلاقی‌گری با نژادهای خارجی مانند آلپاین در آن شروع شده است.

ژن هورمون رشد به دلیل اثرات عمده‌ای که در رشد، تولید شیر و توسعه غدد شیری دارد به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ژن‌های کاندیدا برای صفات کمی مربوط به تولید شیر موردتوجه قرار گرفته است. این هورمون پپتیدی توسط غدد درون‌ریز هیپوتالاموس ترشح و دارای چندین نقش و وظایف مهم در بدن ازجمله تأثیر بر رشد، میزان شیردهی، سلامتی و غیره است *آیوک* و *شفرد* (Ayuk and Sheppard, 2006). علاوه‌بر موارد ذکر شده، هورمون رشد بر روی بیان تعدادی زیادی از ژن‌ها مؤثر است. ژن هورمون رشد یک قطعه ۲/۵۴ کیلو جفت بازی است که از ۵ اگزون و ۴ اینترون تشکیل شده است *آلاکیلی* و همکاران (Alakilli *et al*., 2012). محققان نشان دادند که اگزون ۴ در مقایسه با سایر اگزون‌ها در بز چندشکلی بالایی دارد *مارکوس* و همکاران؛ *مالویروه* و همکاران (Marques *et al*., 2003; Malveiro *et al*., 2001). تنوع بالای ژنتیکی در اگزون‌های ۴ و ۵ در نژادهای بنگال (Bangal goat)، سیروهی (Sirohi goat) و جاکرانا (Jakhrana goat) گزارش شده است *گوپتا* و همکاران (Gupta *et al*., 2007, 2009).

هورمون رشد بر فعالیت آنابولیکی و کاتابولیکی در عملکرد پستانی و افزایش شیر نقش ایفا می‌کند. فعالیت آنابولیکی از قبیل بالا بردن عملکرد بافت و یا افزودن مواد غذایی، افزایش نرخ در دسترس بودن اسید آمینه‌ها، گلوکز و اسید چرب و فعالیت کاتابولیکی از قبیل کاتابولیسم عمومی و آزادسازی مواد غذایی از بافت‌های هدف مثل کاهش گلوکز، اسید آمینه و اسید چرب و هم‌چنین افزایش لیپولیسیز، گیلیکو ژئولیز، گلوکونئولیسیز می‌باشد *آن* و همکاران (An *et al*., 2010).

گیرنده‌های هورمون یا در سطح سلول یا در داخل سلول می‌باشند. به‌طورکلی گیرنده‌های سطح سلولی اعمال هورمون‌های پلی پپتیدی کاتیکول آمین‌ها و پروستوگلاندین‌ها را میانجی می‌نمایند. اثر متقابل بین هورمون‌های جنسی و هورمون رشد گزارش شده است. تزریق استروژن و آندروژن پاسخ به هورمون رشد را افزایش می‌دهد. در حضور هورمون رشد هورمون‌های جنسی وIGF-I پلاسما افزایش می یابد ولی در صورت کاهش هورمون رشد قادر به انجام آن نیستند. به نظر می‌رسد اثرات هورمون رشد با دخالت پروتئین واسطی به نام فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-I) و یا سوماتومدین C انجام می‌پذیرد از طرفی دیگر هورمون رشد باعث فعال شدن هترودایمر گیرنده هورمون رشد و گیرنده پرولاکتین در بافت سینه می‌شود که درنهایت باعث فعالیت پرولاکتین می‌گردد. اطلاعات به‌دست‌آمده از حیوانات ترانسژنیک نشان می‌دهد که هورمون رشد در بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیک نقش محوری دارد. هورمون رشد را به‌عنوان هورمون کلیدی در فرآیندهای متابولیکی مانند رشد، تولید مثل، پیری و پاسخ‌های ایمینولوژیکی معرفی نمودند *هول* و *هاروی* (Hull and Harvy, 2014). *آگری* و همکاران (Ageri *et al*., 1998) گزارش نمودند که این هورمون در گاوهای شیری بر شیردهی و توسعه غددپستانی موِثر می‌باشد. به دلیل اثر افزاینده استروژن بر ترشح هورمون رشد اثر هورمون رشد درجنس ماده بیش‌تر از جنس نر است.

مطالعات مختلفی اخیراً بر روی بررسی تنوع ژنتیکی در ژن هورمون رشد در گونه‌های مختلف مزرعه‌ای مانند گاو *هرناندز* و همکاران (Hernandez *et al*., 2016)، گوسفند *عبدالمونیع* و همکاران (Abdelmoneim *et al*., 2016)، بز *ناکوب* و همکاران (Ncube *et al*., 2016) شتر (هدایت و همکاران، ۱۳۹۵) و غیره انجام شده است. براساس اطلاعات ارائه شده مطالعه‌ای بر روی چندشکلی‌های ژن هورمون رشد و ارتباط آن با صفات اقتصادی بز خلخالی انجام نگرفته است. باتوجه به مهم بودن ژن هورمون رشد و اهمیت صفات شیر در بز، این مطالعه با هدف بررسی چندشکلی‌های موجود در بخشی از ژن هورمون رشد و ارتباط آن‌ها با صفت تولید شیر و چندقلوزایی در بز خلخالی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

از ۴ گله در شهرستان خلخال به تعداد ۱۲۰ رأس بز خلخالی نمونه‌گیری به‌عمل آمد و DNA ژنومی با کیت ((DirExTM kit شرکت ماکروژن کره جنوبی) استخراج گردید. از تمامی حیوانات جهت بررسی اثر ژن‌های موردبررسی نمونه‌های شیر بعد از اتمام شیردوشی دستی هر حیوان در نوبت صبح و مخلوط کامل شیر جهت داشتن شیر همگن در دو ظرف

مختلف تهیه شد و بلافاصله بعد از انتقال (بر روی یخ) به آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میلکو اسکن (MilkoScan™ FT1) اجزای ترکیبات شیر (شامل درصد چربی، درصد پروتئین، درصد مواد جامد شیر و درصد لاکتوز) اندازه‌گیری شد. هم‌چنین داده‌های مربوط به تولید شیر و تیپ زایش (تک قلو، دوقلو و سه قلو بودن)که توسط مرکز اصلاح نژاد کشور در طرح اصلاح نژاد بزهای خلخالی بر اساس ۷۰ روز شیردهی ثبت شده بود، دریافت گردید. داده‌های توصیفی صفات شیر در جدول ۱ نشان داده شده است.

تکثیر و تعیین الگوی مختلف ژن هورمون رشد

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (از طریق شرکت زیست فناوری پیشگام در شرکت ماکروژن کره جنوبی سنتز شد) رفت 5´-ATTACAGCTGCCTGCCCCTT-3´ و برگشت 5´-CACATCTGCTTACCTTACCCG-3 که در مطالعه بهرامی و همکاران (Bahrami *et al*., 2013) گزارش شده است یک قطعه ۲۹۵جفت بازی از اگزون۴ از جایگاه ژن هورمون رشد (GH) بر اساس برنامه حرارتی، دمای واسرشت شدن اولیه ۹۴ درجه به‌مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه به‌ترتیب واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها ۶۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه و بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه و درنهایت بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه تکثیر شد.

مقادیر مورداستفاده از مواد بعد از بهینه‌سازی برای تکثیر جایگاه ژن هورمون رشد برای انجام PCR به‌ترتیب ۲/۵ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۵ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس شرکت زیست فناوری پیشگام (Taq DNA Polymerase Mix Red-Mgcl2 1.5mM) (با غلظت 1.5mM کلرید منیزیم $MgCl_2$ و ۱ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز و 0.2mM از dNTP و بافر 1x)، مابقی را تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر از آب‌مقطر استفاده شد. برای تعیین الگوهای و چندشکلی موجود قطعه تکثیر شده از روش PCR-SSCP استفاده شد. برای انجام SSCP، ۱۲ میکرولیتر محلول دای (- formamide98%,10mM-xylene 0.025% EDTA-cyanol) bromophenol 0.025% را با ۵ میکرولیتر محصول PCR مخلوط کرده سپس در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد سپس جهت تثبیت تک رشته ای DNA سریع بر روی یخ انتقال داده به مدت ۱۰دقیقه در فریز ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید نمونه ها تثبیت شده در ژل اکریل‌آمید ۱۲درصد به طول ۱۶ سانتی‌متر بارگذاری شد. و با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد. سپس الگوهای مختلف باندی در ژن‌های موردبررسی ارزیابی و مشخص شد.

توالی‌یابی جایگاه ژن هورمون رشد و آنالیز توالی‌ها

بعد از تکثیر شدن ژن هورمون رشد و تعیین الگوهای مختلف از طریق SSCP، جهت بررسی تنوع موجود و شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) از دو مسیر پرایمر رفت و برگشت (از هر الگو سه نمونه) از طریق شرکت زیست فناوری پیشگام در شرکت ماکروژن کره‌جنوبی توالی‌یابی گردید. توالی‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار BioEdit *هال* (Hall, 2004) و با الگوریتم روش Clustal W در نرم‌افزار هم‌ردیف شده و چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی شناسایی شدند. سپس با نرم‌افزار DnaSp 5.10 *لیبرادو* و *روزاس* (Librado and Rozas, 2009) هاپلوتیپ‌ها و فراسنجه‌های مربوط به تنوع ژنتیکی شامل تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیپی و غیره محاسبه گردید. جهت بررسی اثر جهش‌های ایجاد شده بر روی تغییرات احتمالی اسیدآمینه از سیستم تحت وب ExPASy (https://web.expasy.org/translate/) استفاده شد. موقعیت و جایگاه جهش بر اساس منبع دریافت شده (KU288610.1) از پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص گردید.

آنالیز آماری و ارتباط چندشکلی‌های مشاهده شده با صفات مختلف

بررسی اثر هاپلوتیپ‌های مشاهده شده با صفات تولیدی و اقتصادی صفات شیر در جمعیت بزهای خلخالی با رویه GLM نرم‌افزار SAS 9.2 و مدل زیر واکاوی شد:

$y_{ijk}= \mu + Gi+ H_j +e_{ijk}$

y_{ijk}: مشاهدات مربوط به صفات شیر و ترکیب آن

μ: میانگین کل صفات موردبررسی

G_i: اثر i امین هاپلوتیپ ژن GH (تعداد هاپلوتیپ شامل ۱، ۲، ۳ و ۴)

H_j: اثر j امین گله (تعداد گله شامل ۱، ۲، ۳ و ۴)

e_{ijk}: اثر باقیمانده

باتوجه به این‌که رکوردها از حیوانات هم سن و دوره شیری مشابه استفاده شد لذا این عوامل در معادله مدل آورده نشد اثر چندقلوزایی به‌دلیل معنی‌دار نبودن از معادله مدل حذف گردید عوامل دیگری نیز در دسترس نبود. تجزیه اثر هاپلوتیپ‌ها بر صفت چندقلوزایی با استفاده از آزمون کای اسکوئر در رویه Logistic نرم‌افزار SAS 9.2 انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها در

صفات تولیدی شیر با روش حداکثر اختلاف معنی‌دار توکی رویه GLM انجام گرفت.

نتایج و بحث

توالی‌های تکثیر شده ژن هورمون رشد با استفاده از روش SSCP منجر به شناسایی چهار الگوی متفاوت گردید همه باندها بر اساس تفاوت در تعداد و الگوی باندهای موجود نام‌گذاری شدند (شکل ۱). در کل چهار الگوی متفاوت در این مطالعه شناسایی شده که با عنوان‌های I، II، III و IV نامگذاری گردید که مطابق نتایج *خاتمی‌نژاد* (Khatami Nejhad *et al*., 2012) بود. میزان فراوانی ژنوتیپ‌ها برای ژنوتیپI ، II، III و IV به‌ترتیب ۰/۲۴، ۰/۴۶، ۰/۱۷ و ۰/۱۳ به‌دست آمد که نشان‌دهنده میزان فراوانی مناسب از هرکدام از ژنوتیپ‌ها در جمعیت‌ها است. *موسوی* و همکاران (Mosavi *et al*., 2006) ۹ الگوی مختلف از ناحیه اگزون ۴ ژن هورمون رشد در بزهای تالی گزارش کردند.

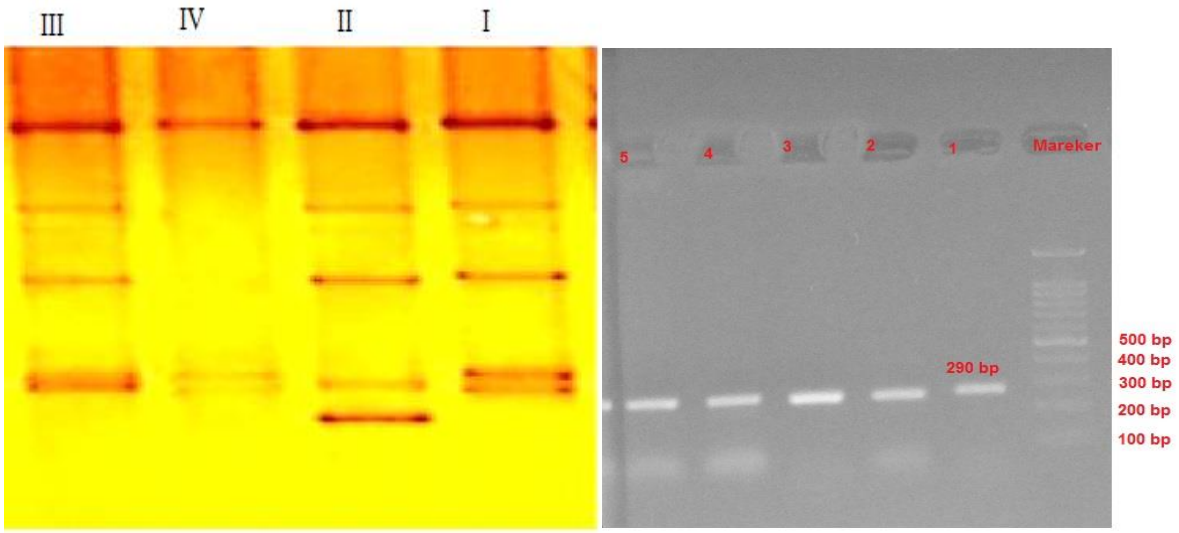
نتایج حاصل از آنالیز توالی‌یابی منجر به شناسایی ۵ جایگاه جهش در ناحیه ۲۹۰ جفت بازی ژن هورمون رشد گردید که باعث ایجاد چهار هاپلوتیپ با ترکیب ژنوتیپی مختلف شد (شکل ۲). با توجه به این‌که برنامه اصلاح نژادی مدونی برای بزهای خلخالی در ایران انجام نگرفته است و با توجه به واریانس بالا در فنوتیپ‌های تولید شیر به‌نظر می‌رسد که ژن‌های کنترل‌کننده تولید شیر و ترکیبات آن از تنوع ژنتیکی بالایی در بزهای خلخالی برخوردار باشد. تنوع ژنتیکی بالا در بز خلخالی در ژن‌های کاپاکازئین توسط *کریمی* و همکاران (Karimi *et al*, 1396) و پرولاکتین توسط *دولتی* و همکاران (Dolati *et al*., 1396) نیز گزارش شده است. در کل پنج جهش مشاهده شده به‌ترتیب باعث جایگزینی نوکلئوتیدهای C به T، T به G، C به T، A به G و T به C به‌ترتیب در جایگاه ۱۷۶۱، ۱۸۴۶، ۱۹۴۷، ۲۰۱۶ و ۲۰۱۹ گردید که از این جهش‌ها، جایگاه‌های ۱۸۴۶، ۲۰۱۶ و ۲۰۱۹ باعث تغییر اسید آمینه شد (جدول ۲). همان‌طورکه قبلاً نیز به‌وسیله *کوماری* و همکاران؛ *سینا* و همکاران (Kumari *et al*., 2014; Singh *et al*., 2015) گزارش شده است. ژن هورمون رشد یک ژن با چندشکلی بالا است که در این مطالعه نیز میزان چندشکلی بالا در ناحیه اگزون ۴ مشاهده شد.

توالی‌های تکثیر شده کدکننده پروتئینی با ۹۴ اسید آمینه می‌باشد. همان‌طورکه در جدول ۲ مشاهده می‌شود، سه نوع از جهش‌ها منجر به تغییر ساختار اسید آمینه در جایگاه‌ها ۱۸۴۶، ۲۰۱۶ و ۲۰۱۹ شده است. در جایگاه ۱۸۴۶ یک نوع تغییر اسید آمینه‌ای از سیتئین به گلیسین مشاهده شد. اسیدآمینه گلیسین یک نوع اسید آمینه غیرقطبی و آبگریز است ولی اسید آمینه سیستئین یک اسید آمینه قطبی و از طریق ایجاد پیوند هیدروژنی قابل‌حل در آب است. درحالی‌که دو نوع تغییر دیگر نیز در یک گروه اتفاق افتاده است به این صورت که تغییر تیروزین به سیستئین یک تغییر در گروه اسیدآمینه‌های قطبی و تغییر لوسین به پرولین یک تغییر در گروه اسیدآمینه‌های غیرقطبی. با توجه به اینکه قطبی و غیرقطبی بودن در ایجاد ساختارهای سوم و چهارم نقش مهمی دارد لذا جهش‌هایی که باعث تغییر قطبیت اسید آمینه‌ای می‌شود می‌تواند باعث تغییر ساختار پروتئین و در نهایت تغییر عملکرد گردد *بمجی و همکاران* (Bemji *et al*., 2018).

آنالیز چندشکلی‌های حاصل در جایگاه ژن هورمون رشد در جمعیت موردمطالعه منجر به شناسایی چهار هاپلوتیپ در جامعه شد که مشابه الگوهای مشاهده شده در آنالیز SSCP است میزان تنوع ژنتیکی و تنوع هاپلوتیپی به‌ترتیب ۰/۰۰۷۸ و ۰/۹۰ به‌دست آمد.

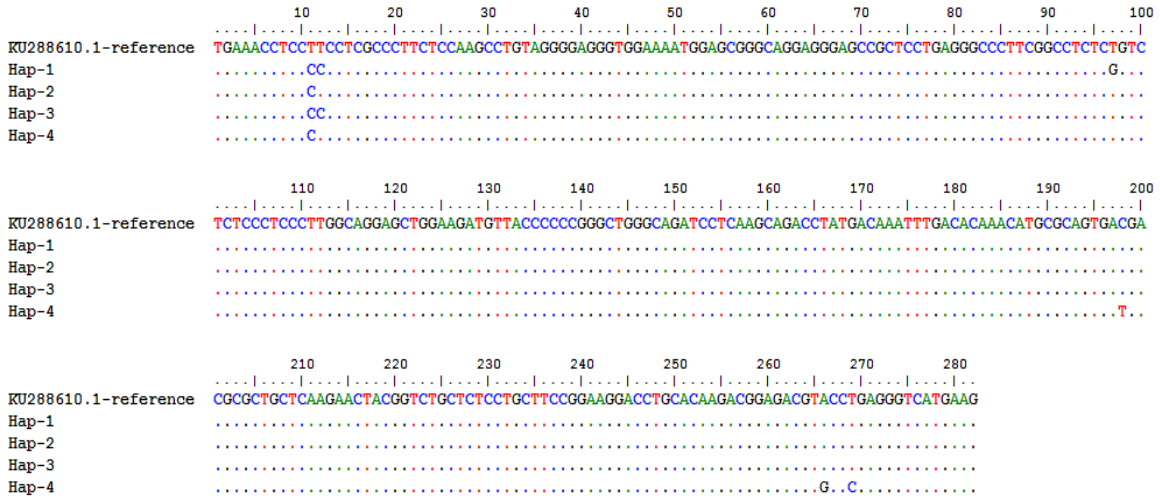
ارتباط هاپلوتیپ‌های شناسایی شده با صفت چندقلوزایی

با توجه به این‌که بزها تنوع زیادی از لحاظ چندقلوزایی دارند و چندقلوزایی یک صفت اقتصادی مهم در بز به‌شمار می‌رود ژنهای زیادی شناسایی شده است که اثر مستقیم و غیرمستقیم بر روی صفات چندقلوزایی دارد. با توجه به اهمیت ژن هورمون رشد در بحث تولید مثل، اثر هاپلوتیپ‌های مشاهده شده در این ژن بر روی چندقلوزایی با استفاده از آزمون x^2 بررسی شد و نتایج نشان داد که هاپلوتیپ II هورمون رشد بیش‌ترین میزان چندقلوزایی را دارد که در سطح ۵ درصد از لحاظ آماری معنی‌دار بود (جدول ۳) .



شکل ۱: محصول PCR (سمت راست) و الگوی مشاهده شده (سمت چپ) با تکنیک PCR-SSCP برای قطعه ۲۹۰ بازی اگزون ۴ ژن هورمون رشد در بزهای خلخالی

Fig. 1: PCR product (Right) and Pattern observed (Left) of 290bp fragment in Exon 4 of growth hormone gene in Khalkhali goats using PCR-SSCP



شکل ۲: ترکیب توالی هاپلوتیپ شناسایی شده در جایگاه اگزون ۴ ژن هورمون رشد

Fig. 2: Composition of sequence identified haplotype in exon 4 of growth hormone gene

جدول ۱: آماره‌های توصیفی صفات ترکیبات شیر در جمعیت بزهای خلخالی

Table 1: Description data of milk composition and yield in Khalkhali goats populations (G)

صفات Traits	تعداد نمونه Number of samples				میانگین ± انحراف معیار Average ± Standard deviation			
	*H1	H2	H3	H4	H1	H2	H3	H4
تولید شیر (کیلوگرم) Milk yield (Kg)	44	31	26	19	75.6±5.12	69±4.31	67.5±3.53	71.6±4.01
درصد چربی شیر Milk Fat %	44	31	26	19	2.95±0.28	2.81±0.26	3.16±0.48	2.9±0.34
درصد پروتئین شیر Milk protein %	44	31	26	19	3.19±0.35	3.29±0.49	3.35±0.45	3.43±0.22
درصد لاکتوز شیر Milk lactose %	44	31	26	19	4.73±0.29	4.81±0.38	4.79±0.53	4.87±0.30
درصد ماده خشک شیر Milk Solid Matter %	44	31	26	19	8.81±0.69	8.89±0.82	8.87±0.51	8.92±0.48

*H: گله نمونه‌گیری شده است

*H: Herd sampling

جدول ۲: جهش‌های مشاهده شده در جایگاه اگزون ۴ ژن هورمون رشد بزهای خلخالی
Table 2: Mutations identified in Exone 4 of growth hormone gene in khalkhali goats

موقعیت جهش Mutation position	جایگزینی Substitution		نوع جهش Type of mutation	کدون Codon		تغییر اسیدآمینه Amino acid changes	موقعیت براساس رفرنس Position base on (KU288610.1)
12	C	T	خاموش Silent	CCC	CCT	پرولین Prolin	1761
97	T	G	جایگزینی Substitution	TGT	GGT	سستئین به گلیسین Cysteine to Glycine	1846
198	C	T	خاموش Silent	GAC	GAT	اسیدآسپارتیک Aspartic Acid	1947
266	A	G	جایگزینی Substitution	TAC	TGC	تیروزین به سیستئین Tyrosine to Cysteine	2016
269	C	T	جایگزینی Substitution	CTG	CCT	لوسین به پرولین Lucien to prolin	2019

جدول ۳: اثر هاپلوتیپ‌های شناسایی شده ژن هورمون رشد بر روی اجزای ترکیبات شیر بز و چندقلوزایی نژاد خلخالی
Table 3: Effect of haplotypes of GH gene on milk compsition and littersize in Khalkhali goats

صفت Trait		درصد چربی شیر Milk fat %	درصد ماده خشک شیر Milk solid matter %	درصد پروتئین شیر Milk protein %	درصد لاکتوز شیر Milk lactose %	میزان شیر تولیدی (کیلوگرم) Milk yield (Kg)	چندقلوزایی Litter size
هاپلوتیپ Haplotype	I	2.99^{ab}	8.52^{a}	3.35^{a}	4.64^{a}	76.66^{a}	1.896^{ab}
	II	2.62^{b}	8.84^{a}	3.37^{a}	4.84^{a}	84.11^{a}	2.159^{a}
	III	4.22^{a}	8.88^{a}	3.02^{b}	4.73^{a}	54.22^{b}	1.882^{ab}
	IV	3.47^{ab}	9.09^{a}	3.51^{a}	4.92^{a}	76.50^{a}	1.402^{b}
میانگین اشتباه معیار Standard error means		0.479	0.244	0.177	0.135	6.139	0.115
ارزش (p) P value		0.035	0.464	0.045	0.497	0.004	0.017

*: ارزش p برای صفات شیر براساس آزمون توکی و برای صفت چندقلوزایی بر اساس احتمال معنی‌داری $Pr>X^2$ انجام گرفته است
*: p value for milk tratis is base on Tukey test and for littersize is base on X^2

همان‌طورکه مشاهده می‌شود هاپلوتیپ‌های شناسایی شده تأثیر متفاوتی بر صفت چندقلوزایی داشتند. براساس نتایج به‌دست‌آمده، هاپلوتیپ II (۲/۱۵۹ قلو) بهترین هاپلوتیپ برای صفت چندقلوزایی بوده ولی تفاوت معنی‌داری با هاپلوتیپ‌های I و III ندارد ولی نسبت به هاپلوتیپ IV (۱/۴۰ قلو) تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P<0.05$) ارتباط جهش‌های شناسایی شده ژن هورمون رشد با چندقلوزایی در مطالعه *زانگ* و همکاران (Zhang *et al.*, 2011) نیز ثابت شده است. هورمون رشد فاکتور مهم برای داشتن باروری مناسب در جنس ماده است. طوری‌که حذف هورمون رشد باعث کاهش پارامترهای مختلف باروری می‌شود (Bartke *et al.*, 2013). هورمون رشد با اثر گذاشتن بر روی تخمدان باعث تحریک تخمک‌ریزی شده و تلقیح منجر به آبستنی را در دام‌های مزرعه‌ای بهبود می‌دهد استاربوک و همکاران (Starbuck *et al.*, 2006). در واقع هورمون رشد با میانجیگری در فرآیندهای استئیدوژنز، فولیکوژنزیس و بلوغ اووسیت باعث بهبود باروری می‌شود. در استئیدوژنز تغییرات زمانی ترشح استرادیول و پروژسترون برای تمام جنبه‌های تولیدمثلی خیلی مهم است (*هول* و *هاروی*، 2014) هورمون رشد باعث تنظیم تراوش هورمون‌های پروژسترون و استرادیول می‌شود *پری* و همکاران (Perry *et al.*, 2008) از طرف دیگر فاکتور مؤثر در فولیکوژنزیس وجود خانواده‌های TGF-B، GDF9 و BMP15 است اوتساکا و همکاران (Otsuka *et al.*, 2011) که اثر متقابلی بین هورمون رشد و BMP وجود دارد و با تنظیم مستقیم گیرنده BMP بر روی این فرآیند نیز اثرگذار است. از طرفی ثابت شده است که هورمن رشد در بهبود کیفیت اووسیت نیز نقش داشته و به‌طور مستقیم بر روی بلوغ اووسیت مؤثر است

بر اساس مطالعه *لی* و همکاران (Li *et al.*, 2011) بسیاری از SNPهای کاندیدا به‌دلیل عدم تعادل لینکاژی تأثیر معنی‌داری در اصلاح دام‌های مزرعه‌ای دارد به‌نظر می‌رسد با انتخاب بر اساس این هاپلوتیپ‌های که از تعادل لینکاژی برخوردار نیستند می‌تواند برای بهبود صفات تولیدی استفاده شود در این مطالعه نیز هاپلوتیپ شناسایی شده برای بهبود میزان باروری و چندقلوزایی را در جمعیت بزهای خلخالی بهبود داد.

اثر هاپلوتیپ‌های شناسایی شده ژن هورمون رشد بر اجزای شیر

اثر ژن هورمون رشد بر میزان تولید شیر، درصد چربی، درصد پروتئین و میزان شیر تولیدی در سطح 5 درصد معنی‌دار مشاهده شد ولی بر روی مواد جامد شیر و درصد لاکتوز اثر معنی‌داری نداشت. نتایج نشان داد که هاپلوتیپ III (CTCAT) بیش‌ترین اثر (۴/۲۲ درصد) را بر درصد چربی شیر داشته و بعد از آن به‌ترتیب هاپلوتیپ‌های IV (TTTGC)، I (CGCAT) و II (TTCAT) قرار داشتند. در مقابل هاپلوتیپ‌های IV، II و I بیش‌ترین اثر را از لحاظ درصد پروتئین شیر داشتند و تفاوت معنی‌داری با هاپلوتیپ III نشان دادند ($P<0.05$) (جدول ۳).

هاپلوتیپ‌های شناسایی شده با تولید شیر نیز ارتباط معنی‌داری داشتند و هاپلوتیپ II، IV و I نسبت به هاپلوتیپ III تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. همان‌طورکه نتایج تولید شیر نشان می‌دهد هاپلوتیپ III ضعیف‌ترین هاپلوتیپ در جمعیت مورد بررسی می‌باشد. *بالوگ* و همکاران (Balogh *et al.*, 2009) نشان دادند که جهش موجود در ژن هورمون رشد بر روی تولید شیر و ترکیبات شیر گاو مؤثر می‌باشد. *دتوری* و همکاران (Dettori *et al.*, 2013) در بزهای ساردا (Sarda) ۹ الگوی متفاوت از آنالیز PCR-SSCP گزارش کردند که منجر به ایجاد ۵ جهش در اگزون ۴ گردید که بر روی صفات مختلف شیر مانند تولید شیر، درصد چربی و پروتئین تأثیرگذار بود و کاملاً با نتایج این تحقیق هم‌خوانی داشت. نقش هورمون رشد از طریق تشکیل دایمر با پرولاکتین در غدد پستانی با فسفریله کردن Stat و فعال نمودن پروتئین Stat5a و Stat5b باعث تنظیم تکثیر، تمایز و ماندگاری سلول‌های غدد پستانی می‌شود. و نبود آن باعث عدم شکل‌گیری و توسعه پستانی حیوان در دوران آبستنی می‌شود *کلی* و همکاران (Kelly *et al.*, 2002).

در کل ۵ جهش در قسمت اگزون ۴ از ژن هورمون رشد بزهای خلخالی مشاهده شد. همه پنج جایگاه چندشکل با فراوانی متوسط را نشان دادند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی زیاد بوده و امکان انتخاب بر اساس آن‌ها به‌صورت بالقوه وجود دارد. ارزیابی هاپلوتیپ‌های شناسایی شده نشان داد که هاپلوتیپ II برای صفت چندقلوزایی و هاپلوتیپ‌های IV، II و I برای صفات تولید شیر و ترکیبات آن می‌تواند یک نشانگر ژنتیکی مناسب به‌شمار رود. با توجه به این‌که هاپلوتیپ II اثر مثبت به‌صورت هم‌زمان بر روی صفت چندقلوزایی و ترکیبات شیر می‌باشد بر اساس هدف موردنظر جهت انتخاب دو صفت، می‌تواند ابزار مناسب در افزایش دقت انتخاب باشد.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۵-۶ متن انگلیسی مراجعه شود.