

پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی بخشی از ژن GH و ارتباط آن با صفات لاشه در گوسفندان

افشاری و افشاری - برولا مرینو

رحیمه سپهری^۱، طاهر هرکی‌نژاد^{۲،۳*}، صادق علیجانی^۱، جلیل شجاع‌غیاث^۱ و سید عباس رأفت^۱^۱ تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی^۲ زنجان، دانشگاه زنجان، پژوهشکده فناوریهای نوین زیستی^۳ زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۹

چکیده

هورمون رشد یکی از عوامل اصلی تأثیرگذار بر رشد حیوانات است. وجود آللهای مختلف این ژن ممکن است تأثیرات فنوتیپی متفاوتی داشته باشند. هدف مطالعه حاضر، شناسایی آللهای این ژن در نواحی آگرون ۵ و بخشی از ناحیه 3' UTR بود. برای این منظور تعداد ۱۳۳ رأس بره از یک گله و در سن تقریباً یکسان در سه گروه افشاری خالص، آمیخته افشاری-برولامرینو نسل F2 و F5 مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا از این دامها نمونه خون تهیه و پس از انجام اندازه‌گیریهای فنوتیپی بر روی دام زنده، تعداد ۸۵ رأس از آنها کشتار شدند. پس از کشتار، وزن لاشه اندازه‌گیری شد و بعد از ۲۴ ساعت ماندن لاشه در سردخانه، وزن ران، سردست، قلوه‌گاه، دنبه و ضایعات اندازه‌گیری شد. برآورد صفات لاشه در دامهای کشتار نشده، با استفاده از ضرایب رگرسیونی انجام شد. از نمونه‌های خون به روش فنل-کلروفرم DNA استخراج گردید. سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، قطعه موردنظر تکثیر و مستقیماً توالی‌یابی گردید. پس از آنالیز توالیها، ارتباط ژنوتیپها با صفات لاشه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد جایگاه نوکلئوتیدی ۲۸۴۶ دارای دو ژنوتیپ TT و TC می‌باشد که بر اندازه طول بدن دام در دامهای افشاری خالص و F5 تأثیر دارد. در جایگاه نوکلئوتیدی ۲۸۸۲ یک نوکلئوتید در برخی از دامها به توالی اضافه شده بود که این ژنوتیپ فقط در دامهای F2 با ضایعات (چربی) لاشه ارتباط داشت. این نتایج نشان می‌دهد که تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده در صورت تأیید در دیگر بررسیهای مربوطه، می‌تواند در برنامه انتخاب دام به کمک مارکرها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: گوسفند افشاری، هورمون رشد، چند قلوژیایی، کیفیت لاشه، SNP.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۴۳۳۰۵۲۲۳۰، پست الکترونیکی: Taher.harkinezhad@znu.ac.ir

مقدمه

رشد استخوان و تولید شیر و کاهش ذخیره چربی می‌شود (۴). با توجه به محدوده وسیع اثرات هورمون رشد، ژن کنترل کننده آن، GH، به عنوان یک کاندیدای اختصاصی برای تغییرپذیری صفات مرتبط با تولید و کیفیت لاشه پیشنهاد شده است (۱۲).

گوسفند افشاری جزء گوسفندان سنگین وزن ایران بوده که

هورمون رشد (GH) که به نام سوماتوتروپین نیز شناخته شده است یک پلی‌پپتید تک زنجیره است که توسط سلولهای سوماتوتروپ واقع در غده هیپوفیز پیشین ساخته، ذخیره و ترشح می‌شود (۸). GH نقش اصلی را در کنترل فرآیندهای فیزیولوژیکی متعدد شامل رشد و متابولیسم بر عهده دارد. این هورمون توزیع مواد مغذی میان بافتهای مختلف را در دامها تحت تأثیر قرار می‌دهد و سبب افزایش

کمی (لاشه) مورد استفاده قرار گیرد (۲۲). در مطالعات بعدی نشان داده شد که این چند شکلیها با صفات کیفیت گوشت و وزن لاشه (۷) و نیز غلظت‌های هورمونی پلازما (۵) در گاو سیاه ژاپنی مرتبط هستند. همچنین این دو SNP میزان بیان ژنهای FASN (Fatty acid synthesis)، SCD، Sterol (SREBP) و (Stearoyl-CoA Desaturase) regulatory element binding protein را نیز تحت تاثیر قرار دادند (۶).

تحقیق حاضر به منظور بررسی چندشکلی نوکلئوتیدی ژن GH در بره‌های این ترکیب ژنتیکی جدید (آمیخته‌های افشاری برولامرینو) و بره‌های خالص افشاری و تاثیر آن بر صفات لاشه انجام شد.

مواد و روشها

جمعیت مورد بررسی: در این تحقیق از ۱۳۳ رأس بره تقریباً همسن (۱۱ ماهه) شامل ۹۶ رأس بره آمیخته افشاری (نسل اول تلاقی برگشتی نژاد افشاری با آمیخته های افشاری - برولا مرینو)، ۱۱ رأس بره‌های نسل چهارم تلاقی برگشتی نژاد افشاری با آمیخته های افشاری - برولا مرینو و ۲۶ رأس بره خالص افشاری متعلق به گله اصلاح نژادی گوسفند افشاری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان استفاده شد. این سه گروه ژنتیکی در ادامه این نوشتار به ترتیب تحت عناوین نسل F2، نسل F5 و افشاری نام برده می‌شوند.

صفات فنوتیپی مورد مطالعه: صفات مورد نظر عبارت بودند از: الف) صفات بیومتری (مرتبط با رشد) شامل: ارتفاع جدوگاه، طول بدن و دور سینه، ب) داده‌های سونوگرافی ضخامت چربی پشت و عمق عضله راسته بین دنده ۱۲ و ۱۳ و ج) صفات لاشه شامل: وزن لاشه، ران، سردست، قلوه‌گاه، دنبه و ضایعات.

نحوه اندازه‌گیری صفات: در بخش صفات بیومتری، اندازه‌های مربوط به صفات طول بدن (حداصل بین آخرین

از لحاظ تولید گوشت حائز اهمیت می‌باشد. میزان دو قلو زایی در این نژاد قابل توجه بوده و وزن تولد، سرعت رشد و وزن از شیرگیری در این گوسفند در مقایسه با سایر نژاد های ایران قابل توجه است. لذا می‌توان این نژاد را یکی از نژادهای گوشتی گوسفند ایران به حساب آورد که از پتانسیل مناسبی برای تولید گوشت برخوردار است و نقش مهمی را در تأمین گوشت قرمز می‌تواند ایفاء کند. برای بهبود برخی از صفات لاشه این گوسفند هنوز کارهای زیادی لازم است که انجام شود (۲). برای افزایش بهره‌وری در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه زنجان اقدام به انتقال ژن چندقلوزایی از گوسفند نژاد برولامرینو به نژاد افشاری گردید. به دنبال اجرای این طرح و ایجاد آمیخته‌های افشاری- برولامرینو، ترکیب ژنتیکی جدیدی ایجاد شد.

ژن GH گوسفند (NM_001009315) (Transcript ID: ENSOART00000015172) روی کروموزوم ۱۱ واقع شده و دارای ۵ اگزون می‌باشد. پروتئین حاصله یعنی هورمون رشد در گوسفند از ۲۱۷ اسید آمینه و در انسان از ۱۹۱ اسید آمینه تشکیل شده است. مطالعات متعددی به منظور شناسایی چندشکلیهای تک نوکلئوتیدی در نژادهای مختلف گاو (۶، ۷، ۱۱، ۱۲، ۱۵، ۱۹ و ۲۲) و گوسفند (۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۱۹ و ۲۱) انجام شده است. به عنوان نمونه، بررسی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی روی گاوهای سیاه ژاپنی منجر به شناسایی دو SNP در اگزون شماره ۵ این ژن شد که سبب تغییر اسید آمینه لوسین (CTG) به والین (GTG) و ترئونین (ACG) به متیونین (ATG) به ترتیب در کدونهای ۱۲۷ و ۱۷۲ شدند. سه هاپلوتایپ حاصل از این دو SNP به نامهای هاپلوتایپ A (Leu-Thr)، هاپلوتایپ B (Val-Thr) و هاپلوتایپ C (Val-Met) سبب به وجود آمدن ۶ ژنوتیپ شامل AA, AB, BB, AC, BC و CC شد (۱۱). تاتسودا و همکاران (۲۰۰۸) ارتباط این هاپلوتایپها را با صفات لاشه در یک جمعیت ۹۴۰ رأسی بررسی نموده و نتیجه گرفتند که ژن GH گاوی می‌تواند بعنوان یک نشانگر در بهبود صفات

سردخانه خارج و با دقت از طول به دو نیمه چپ و راست تقسیم گردیدند و نیم لاشه راست جهت تعیین اندازه‌های لاشه استفاده گردید. نیم لاشه مذکور به قطعات گردن، ران، سردست، قلوه گاه، راسته، دنبه تقسیم و ضایعات (چربی روی لاشه و اعماء و احشاء) آن اندازه‌گیری شد. در مورد بره‌های خالص افشاری و نسل F5 که امکان کشتار بره‌ها وجود نداشت، برای برآورد مقادیر مربوط به این صفات از روابط رگرسیونی بین صفات بیومتری و صفات لاشه استفاده شد.

استخراج DNA از نمونه های خون: جهت تهیه نمونه‌های خون از ونوجکت خلاءدار ۵ سی‌سی حاوی ماده ضد انعقاد EDTA استفاده شد. خون‌گیری از سیاه‌رگ وداج صورت گرفت و نمونه‌ها در ظرف محتوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA، در دمای منهای ۲۰ درجه فریزر نگهداری شدند. استخراج DNA از تمام نمونه‌های خون به روش فنول-کلروفرم (۳ و ۱۸) تعدیل شده انجام شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific®, UK) استفاده شد.

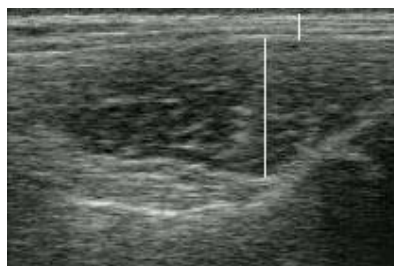
تعیین چندشکلیهای تک نوکلئوتیدی در ژن مورد بررسی: به‌منظور شناسایی چندشکلی نوکلئوتیدی ژن مورد نظر در توده مورد بررسی ابتدا پرایمر اختصاصی برای تکثیر نواحی مورد نظر (بخشی از اینترون ۴، کل اگزون ۵ و بخشی از ناحیه 3' UTR) به کمک نرم‌افزار آنالین Primer3 (v. 0.4.0) طراحی شد. توالی این پرایمرها به شرح زیر بود: پرایمر فرادست 5'

" 3' CCTTTTGAAACCTCCTCCTCCT و فرودست
"5'CCCCTAGAATAGAATGACACCT3"

مخلوط واکنش (۲۵ μl) شامل ۱۶ پیکومول از هر پرایمر، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۱۲/۵ μl Master Mix آماده با ۱/۵ mM MgCl₂ و مابقی تا رسیدن به حجم نهایی (۲۵ μl) آب دیونیزه بود. برنامه زمانی به ترتیب، مرحله

مه‌ره گردن و آخرین مه‌ره پشت) و دورسینه (محیط دور سینه در ناحیه قدامی سینه پشت دستها) به‌وسیله متر پارچه‌ای؛ و ارتفاع جدوگاه (فاصله بین سطح موازی با ستون فقرات تا کف زمین در محل شانه و چسبیده به دست سمت راست) با استفاده از کولیس فلزی بزرگ اندازه‌گیری شد (۱).

صفات ضخامت چربی پشت (UBF=Ultrasonography Back Fat) و عمق عضله راسته (ULMD=Ultrasonography Loin Muscle Depth) بین دنده ۱۲ و ۱۳ توسط دستگاه اولتراسوند Sonovet 600 (Medison, USA) که دارای پروب ۵ مگاهرتز بود، به‌دست آمد. برای تهیه تصویری صاف و شفاف باید ناحیه مورد بررسی فاقد مو و پشم باشد. به این منظور پشم چینی بره‌ها انجام شد و سپس پشمهای باقی‌مانده در ناحیه بین دنده ۱۲ و ۱۳ توسط تیغ تراشیده شد. برای حرکت بهتر پروب بر روی ناحیه مورد نظر و عاری کردن محیط بین پروب و پوست از هوا، از ژل مخصوص سونوگرافی استفاده شد. سپس تمامی بره‌ها سونوگرافی شده و تصاویر مربوطه ضبط گردید. با استفاده از نرم‌افزار Scion Image عکسهای مناسبی از تصاویر برای اندازه‌گیری نواحی موردنظر تهیه شد (۲۰). (شکل ۱).



شکل ۱- اندازه‌گیری ضخامت چربی پشت و عمق عضله راسته به کمک دستگاه اولترا سونوگرافی.

در مورد بره‌های نسل F2، بره‌ها پس از تحمل ۲۴ ساعت گرسنگی توزین و سپس کشتار شدند. لاشه‌ها پس از کشتار توزین و به یک شرکت بسته‌بندی گوشت منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در سردخانه نگهداری شدند. سپس لاشه‌ها از

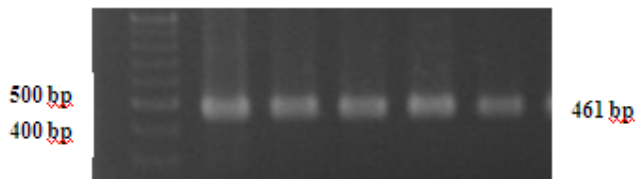
آماري داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی و ارتباط بین آنها توسط نرم افزار SAS V=9.1 و رویه GLM انجام شد. مقایسه میانگینها نیز با استفاده از آزمون توکی انجام شد.

در این پژوهش از وزن تولد و سن در زمان رکوردگیری به عنوان متغیر کمکی (کواریت) در تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش، تکثیر قطعه ای از ژن شامل بخشی از اینترون ۴ (توالی نوکلئوتیدی ۲۶۳۰-۲۵۰۹ از توالی ژن GH)، کل اگزون ۵ (توالی نوکلئوتیدی ۲۹۳۷-۲۶۳۱) و بخشی از ناحیه پایین دست 3' (توالی نوکلئوتیدی ۲۹۶۹-۲۹۳۸) با موفقیت انجام شد. طول این قطعه ۴۶۱ جفت باز بود که در بررسی باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR، نزدیک به باند ۵۰۰ نشانگر مولکولی ۱۰۰bp قرار گرفتند (شکل ۲).

M 1 2 3 4 5



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR شامل بخشی از اینترون ۴، کل اگزون ۵ و بخشی از ناحیه 3' UTR به طول ۴۶۱bp بر روی ژل آگارز یک و نیم درصد. ستون اول از سمت چپ (ستون M) نشانگر ۱۰۰ bp DNA و بقیه ستون‌ها (با شماره‌های 1,2,3,4,5) باند به دست آمده از تکثیر نمونه های مورد بررسی می باشد.

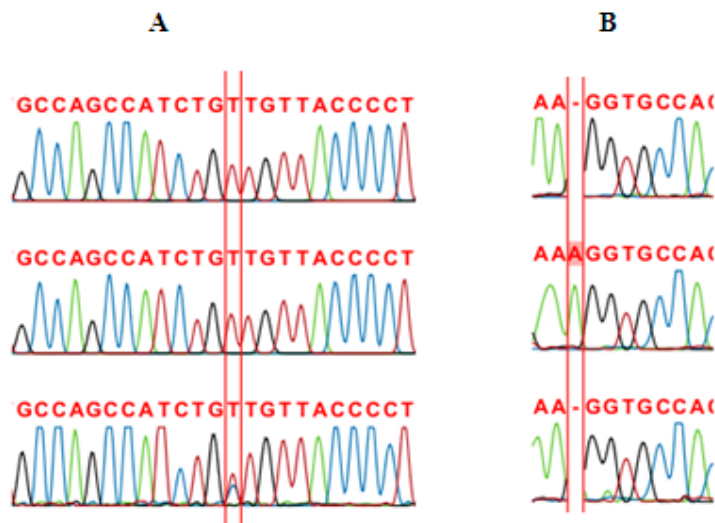
همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در جایگاه نوکلئوتیدی ۲۸۴۶، ژنوتیپهای TT و TC مشاهده شد. لازم به ذکر است که در این جایگاه در نمونه های مورد بررسی ژنوتیپ CC مشاهده نشد. جدول ۱، فراوانی ژنوتیپی و آلی چندشکلیهای مشاهده شده و وضعیت تعادل هاردی-واینبرگ را نشان می‌دهد. فراوانی آلی و ژنوتیپی در گروههای افشاری خالص، نسل F2 و F5 متفاوت بود. بیشترین فراوانی آل جهشی SNP2846 T>C در نسل F2 (۱۶/۴۸ درصد) مشاهده شد.

واسرشتگی اولیه به مدت ۵ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ چرخه شامل سه مرحله: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و یک چرخه گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه برای انجام PCR در نظر گرفته شد.

برای شناسایی SNP (های) احتمالی موجود در ناحیه مورد تکثیر از ژن مورد نظر، از روش تعیین توالی محصولات PCR استفاده شد. بدین منظور، تعیین توالی هر یک از این نمونه‌ها با ارسال به شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام گرفت. مجموعه توالیهای به دست آمده نمونه‌ها بررسی و چندشکلی SNPها به کمک نرم‌افزار CLC Main Workbench 5 شناسایی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: محاسبه فراوانیهای ژنی، ژنوتیپی و بررسی وجود تعادل هاردی-واینبرگ به کمک نرم افزار Popgene V=1.32 انجام شد. تجزیه و تحلیل

پس از بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی، یک مورد چندشکلی تک نوکلئوتیدی و یک مورد اضافه شدن یک تک نوکلئوتید در نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد (شکل ۳). این چندشکلیها در نوکلئوتیدهای شماره ۳۳۸ و ۳۷۴ قطعه تکثیر شده (نوکلئوتید ۲۸۴۶ و ۲۸۸۲ توالی GH) قرار داشتند و به ترتیب سبب تغییر نوکلئوتید T به C و اضافه شدن نوکلئوتید A به توالی شدند. هر دوی این چندشکلیها در ناحیه غیر کدکننده اگزون ۵ واقع شده‌اند.



شکل ۳- بررسی توالی محصولات PCR. A: پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در نوکلئوتید شماره ۲۸۴۶ قطعه تکثیر شده: توالی ردیف اول و دوم ژنوتیپ TT را دارند ولی توالی ردیف سوم ژنوتیپ TC را دارد. B: اضافه شدن تک نوکلئوتید (Insertion) در محل نوکلئوتید شماره ۲۸۸۲ (بین نوکلئوتید ۲۸۸۱ و ۲۸۸۲): در توالی ردیف دوم اضافه شدن تک نوکلئوتید A مشاهده می‌شود که به صورت هموزیگوت است.

فراوانی این آلل در دو گروه افشاری خالص (۵/۷۷ درصد) و نسل F5 (۴/۵۵ درصد) مشابهت زیادی داشت. در مورد فراوانی این آلل، بیشترین فراوانی آلل جهشی در گروه افشاری خالص (۴۲/۳۱ درصد) و سپس نسل F5 (۱۸/۱۸ درصد) مشاهده شد. نسل F2 کمترین فراوانی را دارا بود (۲/۰۸ درصد). در این جایگاه، آلل A به صورت هموزیگوت مشاهده شد (AA) و ژنوتیپ هتروزیگوت مشاهده نشد. میزان فراوانی آللی در گروه‌های افشاری خالص و F5، در هر دو SNP، مشابه هم بود. دلیل این تشابه، می‌تواند مشابهت بالای ترکیب ژنتیکی نسل F5 با نژاد خالص افشاری باشد.

جدول ۱- فراوانی ژنوتیپی، فراوانی آللی و وضعیت SNPها از لحاظ تعادل هاردی-واینبرگ به تفکیک گروه ژنتیکی

وضعیت تعادل	کای اسکور	درصد		فراوانی ژنوتیپی	ژنوتیپ	تعداد	گروه ژنتیکی	SNP
		فراوانی آللی	آلل					
در حالت تعادل	۶/۳۸	۹۴/۲۳	T	۸۸/۴۶	۲۳	۲۶	افشاری	
		۵/۷۷	C	۱۱/۵۴	۳			
در حالت تعادل	۳/۲۹	۸۳/۵۲	T	۶۷/۰۵	۵۹	۹۶	نسل F2	2846 T>C
		۱۶/۴۸	C	۳۲/۹۵	۲۹			
در حالت تعادل	۰/۰۰	۹۵/۴۵	T	۹۰/۹۱	۱۰	۱۱	نسل F5	
		۴/۵۵	C	۹/۰۹	۱			
عدم تعادل	۲۷/۰۹۴	۵۷/۶۹	-	۵۷/۶۹	۱۵	۲۶	افشاری	
		۴۲/۳۱	A	۴۲/۳۱	۱۱			
عدم تعادل	۱۲۷/۳۴	۹۷/۹۲	-	۹۷/۹۲	۹۴	۹۶	نسل F2	2881_2882 insA
		۲/۰۸	A	۲/۰۸	۲			
عدم تعادل	۱۴/۱۲	۸۱/۸۲	-	۸۱/۸۲	۹	۱۱	نسل F5	
		۱۸/۱۸	A	۱۸/۱۸	۲			

در مواردی، SNP‌های مسئول این پلی‌مورفیسم‌ها نیز شناسایی شده‌اند. جیا و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی چندشکلی تک نوکلئوتیدی این ژن در چند نژاد گوسفند، موفق به شناسایی سه SNP شدند که یکی از آنها در ناحیه پایین دست 3' قرار داشت (۱۴). عثمان و همکاران (۲۰۱۵) قطعه‌ای ۴۲۲ جفت بازی از نواحی اگزون ۲ و ۳ این ژن را در نژادهای نشخوارکنندگان کوچک مصر تکثیر نموده و دو الگوی ژنوتیپی (SSCP) مختلف را شناسایی نمودند. توالی‌یابی ژنوتیپهای مختلف نشان داد که SNP مسئول این تنوع (A>G)، در موقعیت ۵۵ قطعه تکثیرشده قرار داشت (۱۶). مشخصات و ویژگیهای دو SNP شناسایی شده در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که هر دو مورد جدید بوده و برای اولین بار گزارش می‌شوند.

تجزیه کوواریانس صفات: نتایج حاصل از تجزیه کوواریانس داده‌ها، حاکی از معنی دار بودن بعضی اثرات ثابت در صفات مورد بررسی بود (جدول ۲).

تحقیقات متعددی با هدف شناسایی پلی‌مورفیسم ژن GH در نژادهای مختلف گوسفند انجام شده است. در بیشتر آنها که از روش PCR-SSCP استفاده شده، تنها گروههای ژنوتیپی، مورد شناسایی قرار گرفته‌اند ولی SNP مسئول و محل دقیق چندشکلی (موقعیت آن) شناسایی نشده است از جمله: باستوس و همکاران (۲۰۰۱) در بررسی پلی‌مورفیسم ژنوتیپی ناحیه اگزون ۴ و ۵ ژن GH در گوسفند بومی پرتغالی، به ترتیب دو و پنج الگوی ژنوتیپی (۱۰) و شیری و همکاران (۲۰۰۶) سه الگوی ژنوتیپی را در اگزون ۴ گوسفند کردی (۱۹) شناسایی نمودند. طهمورث پور و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی پلی‌مورفیسم ژنوتیپی ناحیه اگزون ۵ ژن GH در گوسفند بلوچی موفق به شناسایی ۳ الگوی ژنوتیپی (G1, G2, G3) شدند (۲۱). بهرامی و همکاران (۲۰۱۵) دو الگوی ژنوتیپی را در اگزون ۴؛ و ۵ الگوی ژنوتیپی را در اگزون ۵ گوسفند مهربان شناسایی نمودند (۹).

جدول ۲- تجزیه کوواریانس صفات مورد بررسی

صفات	میانگین	انحراف استاندارد	مقادیر P (سطح معنی‌داری) منابع تغییر					
			د خطا	گروه ژنتیکی	سن مادر	تیپ تولد	جنس	وزن تولد*
UBF	۳/۴۹	۱/۲	۰/۰۴۷۸	۰/۷۴۱	۰/۹۵۳۷	۰/۷۸۲۴	۰/۱۰۹۳	۰/۰۹۵۱
ULMD	۲۳/۳۱	۳/۰۲	۰/۰۰۰۱	۰/۸۸۱۴	۰/۲۱۴۱	۰/۰۳۱۹	۰/۰۰۸۲	۰/۰۶۰۱
وزن لاشه	۲۴/۶۸	۳/۳۹	۰/۰۰۰۱	۰/۳۴۱۸	۰/۰۰۷	۰/۰۶۳۸	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۶
وزن ران	۷/۶۳	۱/۱۰	۰/۰۰۰۱	۰/۸۰۸۴	۰/۰۳۵۱	۰/۱۵۵۹	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۰۵
وزن سردست	۴/۲۰	۰/۸۵	۰/۰۰۰۱	۰/۷۱۱۳	۰/۰۶۳۶	۰/۱۴۲۵	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۳۴
وزن قله‌گاه	۴/۱۰	۰/۷	۰/۰۰۰۱	۰/۲۵۸۷	۰/۰۰۹۵	۰/۱۰۵۵	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۵۶
وزن دنبه	۱/۳۵	۰/۴۱	۰/۰۰۱۲	۰/۰۷۷۱	۰/۰۵۸۵	۰/۱۸۴۹	۰/۰۱۱۴	۰/۰۱۱۲
ارتفاع جدوگاه	۷۱/۲۹	۲/۸۵	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۲۳	۰/۵۱۲۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۴۶
دور سینه	۹۹/۴۸	۶/۲۹	۰/۰۰۰۱	۰/۱۶۴۸	۰/۳۰۹۸	۰/۰۰۳۶	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۳
طول بدن	۴۸/۴۷	۳/۳۴	۰/۰۰۲۴	۰/۳۴۷۵	۰/۰۹۷۶	۰/۰۰۱۷	۰/۰۳۳۳	۰/۲۹۹۲

^۱ واحد اندازه‌گیری دو صفت UBF و ULMD بر حسب سانتیمتر، صفات وزن لاشه و یایر قطعات لاشه بر حسب کیلوگرم و صفات ارتفاع جدوگاه، دورسینه و طول بدن نیز بر حسب سانتیمتر می‌باشد. *متغیرهای هم‌بسته (کواریت)

اثر معنی‌داری را در صفات بیومتری و نیز سونوگرافی ضخامت عضله راسته ایجاد کرد.

اثر تغییرات نوکلئوتیدی روی صفات مختلف: به دلیل تفاوت معنی‌دار میانگین تمام صفات در گروه‌های ژنتیکی متفاوت، تجزیه کوواریانس مجدد داده‌ها، به تفکیک گروه ژنتیکی، انجام شد. بر اساس نتایج این تجزیه کوواریانس، ژنوتیپ‌های مختلف تفاوت معنی‌داری (یا نزدیک به سطح معنی‌داری) را در صفات ضخامت چربی پشت، عمق عضله راسته، طول بدن و صفات لاشه در بعضی گروه‌های ژنتیکی نشان دادند.

اثر متغیرهای پیوسته وزن تولد و سن در زمان رکوردبرداری نیز (که به صورت کوواریت در مدل وارد شده بودند) بر بیشتر صفات معنی‌دار بود. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود اثر گروه ژنتیکی بر تمام صفات معنی‌دار است. اثر سن مادر بر ارتفاع جدوگاه معنی‌دار و بر وزن دنبه در آستانه معنی‌داری بود ($P=0/0771$). تیپ تولد باعث ایجاد تفاوت معنی‌داری در صفات لاشه شد ولی در مورد صفات بیومتری و صفات اندازه‌گیری شده از طریق سونوگرافی اثر معنی‌داری نداشت. جنس بره‌ها نیز

جدول ۳- ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف SNPهای شناسایی شده ژن هورمون رشد با صفات بیومتری و سونوگرافی به تفکیک گروه ژنتیکی^۱.

2881_2882insA		2846 T>C		گروه ژنتیکی	صفات (سانتی‌متر)
AA	--	TC	TT		
۷۵/۰۰	۷۵/۸۵	۷۴/۹۶	۷۵/۵۹	افشاری	ارتفاع جدوگاه
۷۲/۹۱	۷۰/۷۸	۷۲/۰۶	۷۱/۶۴	نسل F2	
۸۳/۵۰	۷۰/۹۰	۷۹/۱۴	۷۵/۲۶	نسل F5	
۵۲/۶۰	۵۲/۲۹	۵۵/۲۵ ^b	۴۹/۶۵ ^a	افشاری	طول بدن
۴۶/۵۰	۴۶/۷۸	۴۷/۳۸	۴۷/۹۰	نسل F2	
۲۴/۸۲	۵۲/۳۸	۳۸/۵۸	۳۸/۶۰	نسل F5	
۹۹/۴۶	۹۷/۶۴	۹۶/۴۷	۱۰۰/۶۳	افشاری	دورسینه
۹۸/۰۲	۹۹/۴۱	۱۰۰/۰	۹۸/۳۳	نسل F2	
۶۵/۸۶	۹۴/۷۴	۷۶/۳۶	۸۴/۲۳	نسل F5	
۱/۶۲†	۰/۹۴ †	۰/۳۰۴ ^b	۲/۲۶ ^a	افشاری	UBF
۲/۹۰	۳/۴۴	۳/۱۸	۳/۱۵	نسل F2	
۲/۷۲	۳/۵۸	۳/۲۹	۳/۰۱	نسل F5	
۲۲/۹۰†	۲۴/۹۴†	۲۲/۰۵†	۲۵/۷۹†	افشاری	ULMD
۱۹/۰۸†	۲۲/۹۳†	۲۱/۳۶	۲۰/۶۵	نسل F2	
۱۹/۳۲	۱۸/۹۴	۱۶/۶۹†	۲۱/۵۸†	نسل F5	

۱: مقادیر داخل جدول میانگین‌های تصحیح شده صفات (Least Square Means) هستند.

*: سطح معنی‌داری ($\alpha=0/05$) است و در هر صفت، گروه‌های ژنوتیپی که تفاوت معنی‌داری باهم داشتند با حروف مختلف (a,b) علامت گذاری شده‌اند. گروه‌هایی که تفاوت میانگین صفات در آنها نزدیک به سطح معنی‌داری بود ($pvalue < 0/12$)، با علامت " † " مشخص شدند.

مقایسه میانگین‌های تصحیح شده (نسبت به متغیرهای همبسته) ژنوتیپ‌ها، به روش توکی انجام شد. نتایج مقایسه میانگین صفات بیومتری و صفات اندازه‌گیری شده با سونوگرافی در ژنوتیپ‌های مختلف در جدول ۳ و صفات لاشه در جدول ۴ آمده است.

همان‌گونه که در این جداول مشاهده می‌شود، در ژنوتیپ‌های

ژنتیکی نزدیک‌تر است، به همین دلیل خصوصیات لاشه آنها نیز با هم شباهت بیشتری دارد.

در مورد ژنوتیپهای SNP2881_2882insA: در گروه F2، تنها در صفت وزن ضایعات تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده شد. در گروه افشاری، صفات سونوگرافی ضخامت چربی پشت، عمق عضله راسته و نیز کلیه صفات لاشه و در گروه F5، سونوگرافی عمق عضله راسته، تفاوتی نزدیک به سطح معنی‌داری داشتند. در هر دو گروه ژنتیکی مذکور، ژنوتیپ معمول (--) ضخامت چربی پشت کمتر و عمق عضله بیشتری داشتند. همچنین در گروه ژنتیکی افشاری، این ژنوتیپ (--) از لحاظ وزن قطعات لاشه نیز مقدار بالاتری نسبت به ژنوتیپ AA داشتند ($p=0/11$).

در بررسی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی گاوهای سیاه ژاپنی، دو SNP شناسایی شده در ناحیه کدکننده آگزون شماره ۵ ارتباط معنی‌داری با صفات کیفیت گوشت و وزن لاشه در گاو سیاه ژاپنی نشان دادند (۵). این SNPها سبب تغییر اسیدآمینه لوسین (CTG) به والین (GTG) و ترئونین (ACG) به متیونین (ATG) به ترتیب در کدونهای ۱۲۷ و ۱۷۲ شدند (۱۱). لی و همکاران (۲۰۱۳) نیز ارتباط معنی‌داری بین SNP 2258C>T واقع در آگزون ۵ گاو بومی کره و وزن لاشه مشاهده نمودند (۱۵).

در بررسی که بر روی گاوهای بومی کره‌ای صورت گرفت، مشاهده گردید که SNPهای 303C>T و 559G>A در ناحیه پروموتور به ترتیب با وزن ۶ ماهگی و ناحیه عضله راسته، 2141C>T و 2258C>T در ناحیه آگزون ۵ به ترتیب با افزایش وزن روزانه و وزن لاشه ارتباط معنی‌داری داشتند (۱۵). رییکا و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی تأثیر پلی‌مورفیسم ۱۰ ژن کاندید و از جمله GH بر صفات لاشه و کیفیت گوشت در گاو Piemontese، مشاهده کردند که تنوع ژن GH با تنوع در صفات لاشه (وزن لاشه، افزایش وزن روزانه و اسکور لاشه) مرتبط است (۱۷).

مربوط به SNP2846T>C: در گروه افشاری، از بین صفات بیومتری مورد مطالعه، در صفت طول بدن تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($\alpha=0/05$) به طوری که ژنوتیپ TC، طول بدن بیشتری نسبت به ژنوتیپ TT داشت (جدول ۳).

در تحقیقات دیگری نیز نشان داده شده است که تغییرات نوکلئوتیدی در این ژن با صفات بیومتری و رشد ارتباط دارد. برای نمونه، هوآ و همکاران (۲۰۰۹) با تعیین ژنوتیپ به شیوه RFLP نواحی آگزون ۲ و ۴ در بز Boer و شناسایی دو SNP، مشاهده نمودند که بعضی ژنوتیپها تفاوت معنی‌داری را در صفات میزان دور سینه در زمان تولد، وزن از شیرگیری و ارتفاع بدن در زمان از شیرگیری نشان می‌دهند (۱۳). جیا و همکاران (۲۰۱۴) نیز ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپهای ناحیه UTR 5'، با صفات دور سینه، طول و وزن بدن و همچنین بین ژنوتیپهای ناحیه آگزون ۴ و ناحیه 3' UTR، با صفات طول بدن، ارتفاع جدوگاه، دور سینه و وزن بدن مشاهده کردند (۱۴).

تفاوت بین ژنوتیپهای SNP 2846T>C در صفت سونوگرافی شده ضخامت چربی پشت، در گروه افشاری معنی‌دار و در مورد عمق عضله راسته، در دو گروه افشاری و F5 نزدیک به سطح معنی‌داری بود ($p=0/1170$). همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، ژنوتیپ TC، در گروه افشاری، طول بدن بیشتر و ضخامت چربی پشت کمتری نسبت به ژنوتیپ TT دارد. در مورد صفات لاشه مورد مطالعه (شامل: وزن لاشه، ران، سردست، قلوه‌گاه و دنبه)، تفاوت بین ژنوتیپها، هر چند در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود اما در دامهای گروه افشاری خالص و نتاج F5 به سطح معنی‌داری نزدیک بودند ($p=0/1170$). مقدار این صفات در ژنوتیپ TC کمتر از ژنوتیپ TT بود. میانگین این صفات در بین ژنوتیپهای گروه F2 تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۴). به نظر می‌رسد با توجه به اینکه نسل F5 به افشاری خالص از لحاظ

صفات دور سینه، طول و وزن بدن و ژنوتیپهای ناحیه اگزون ۴ و ناحیه 3' UTR، تفاوت معنی‌داری را در صفات طول بدن، ارتفاع جدوگاه، دور سینه و وزن بدن ایجاد کرده‌اند (۱۴).

جیا و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای که بر روی چهار نژاد گوسفند انجام دادند، سه SNP (در نواحی 5' UTR، اگزون ۴ و 3' UTR) شناسایی نمودند و ارتباطاتی بین این SNPها و صفات مورد نظر مشاهده نمودند. آنها گزارش کردند که ژنوتیپهای ناحیه 5' UTR، ارتباط معنی‌داری با

جدول ۴- ارتباط ژنوتیپهای مختلف SNPهای شناسایی شده ژن هورمون رشد با صفات لاشه به تفکیک گروه ژنتیکی^۱.

2881_2882insA		2846T>C		گروه ژنتیکی	صفات (کیلوگرم)
AA	--	TC	TT		
۲۴/۳۸†	۲۶/۳۴†	۲۳/۵۶†	۲۷/۱۵†	افشاری	وزن لاشه
۲۴/۲۸	۲۳/۶۴	۲۳/۸۵	۲۴/۰۷	نسل F2	
۲۰/۹۴	۲۰/۵۸	۱۸/۴۱†	۲۳/۱۱†	نسل F5	
۷/۵۳†	۸/۰۴†	۷/۳۱†	۸/۲۵†	افشاری	وزن ران
۸/۱۷	۷/۵۵	۷/۷۲	۸/۰	نسل F2	
۶/۶۳	۶/۵۴	۵/۹۷†	۷/۱۹†	نسل F5	
۴/۱۲†	۴/۵۵†	۳/۹۳†	۴/۷۳†	افشاری	وزن سردست
۴/۳۰	۴/۱۹	۴/۱۹	۴/۲۹	نسل F2	
۳/۳۶	۳/۲۷	۲/۸۰†	۳/۸۳†	نسل F5	
۳/۸۷†	۴/۵۷†	۳/۹۳†	۴/۷۳†	افشاری	وزن قلوگاه
۴/۵۴	۴/۰۶	۴/۳۸	۴/۲۲	نسل F2	
۳/۳۶	۳/۲۹	۲/۸۷†	۳/۷۹†	نسل F5	
۱/۳۲†	۱/۵۰†	۱/۲۴†	۱/۵۸†	افشاری	وزن دنبه
۱/۱۲	۱/۲۹۸	۱/۱۸	۱/۲۴	نسل F2	
۰/۹۹۱	۰/۹۶	۰/۷۶†	۱/۲۰†	نسل F5	
				افشاری	وزن ضایعات
۰/۵۴ ^b	۰/۸۹ ^a	۰/۶۷†	۰/۷۶۶†	نسل F2	
				نسل F5	

۱: مقادیر داخل جدول میانگینهای تصحیح شده صفات (Least Square Means) هستند.

*: اعداد با این علامت † نزدیک به سطح معنی‌داری قرار دارند ($p\text{value} < 0.05$) دارند.

تغییرات نوکلئوتیدی منجر به تغییر در بیان این ژن خواهند شد یا خیر؛ در دسترس نیست. با توجه به اینکه در برخی از گروه‌های بررسی شده تعداد دامها محدود بود، نیاز است که ارتباط بین این پلی مورفیسم و خصوصیات لاشه در آزمایشهای جداگانه دیگری نیز مورد بررسی قرار گیرد. در

به طور کلی، نتایج این بررسی نشان داد که تغییراتی در ناحیه غیر کد کننده اگزون ۵ این ژن در بین دامهای مورد مطالعه وجود دارد. هرگونه ارتباط معنی‌دار بین SNPها و صفات می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر این SNPها در نوع بیان ژن مربوطه باشد. تاکنون گزارشی در مورد اینکه آیا این

های اصلاح نژادی گوسفند مورد استفاده قرار گیرند.

صورتی که این ارتباطات مورد تأیید واقع گردد، این SNP ها می‌توانند در روش انتخاب به کمک مارکرها در برنامه

منابع

- ۱- خالداری، م. ۱۳۹۳. اصول پرورش گوسفند و بز. نشر جهاددانشگاهی واحد تهران.
- ۲- محمدآبادی، م. تنوع آلی ژن کالپاستاتین در گوسفند سنجابی. پژوهش‌های سلولی و ملکولی. ۲۸ (۳): ۳۹۵-۴۰۲.
- 3- نظام‌آبادی، م.، هرکی‌نژاد، ط.، شهیر، م. ح.، خرم‌تابی، ر.، اسکندری نسب، م. پ.، دانش مقدم، ل و رستمخانی، ر. ۱۳۹۴. ارتباط پلی‌مورفیسم 5'UTR ژن تیروگلوبولین با خصوصیات لاشه در بره‌های آمیخته افشاری × برولا مرینو. پژوهش‌های سلولی و ملکولی. ۲۸ (۳): ۴۲۰-۴۲۹.
- 4- Adams, N. R., and Briegle, J. R. 2005. Multiple effects of an additional growth hormone gene in adult sheep. *Journal of Animal Science* 83: 1868-74.
- 5- Ardiyanti A, Abe F, Kobashikawa H, Hirayama T, Sugino T, Suzuki K, and Katoh K. 2009. Plasma hormone and metabolite concentrations involved in the somatotrophic axis of Japanese Black heifers in association with growth hormone gene polymorphism. *Domestic animal endocrinology* 37: 243-9.
- 6- Ardiyanti, A., Abe, T., Tameoka, N., Kobayashi, E., Shoji, N., Ohtani, Y., Suzuki, K., Roh, S. and Katoh K. 2012. Effects of growth hormone gene polymorphism on lipogenic gene expression levels in diaphragm tissues of Japanese black heifers. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 25: 1055-62.
- 7- Ardiyanti, A., Oki, Y., Suda, Y., Suzuki, K., Chikuni, K., Obara, Y. and Katoh, K. 2009. Effects of GH gene polymorphism and sex on carcass traits and fatty acid compositions in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal* 80: 62-9.
- 8- Ayuk, J. and Sheppard, M.C. 2006. Growth hormone and its disorders. *Postgraduate Medical Journal* 82: 24-30.
- 9- Bahrami, A., Miraei-Ashtiani, S.R., Mehrabani-Yeganeh, H., Banani-Rad, H. and Behzadi S. 2015. The association between polymorphism of the GH1 gene and changes in protein structure and carcass traits in Mehraban sheep (*Ovis aries*). *Animal Production Science* 55: 661-5.
- 10- Bastos, E., Cravador, A., Azevedo, J. and Guedes-Pinto, H. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed 'Churra da Terra Quente'. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 5: 7-15.
- 11- Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Fukumoto, Y. and Ozawa S. 1997. A simple method for genotyping the bovine growth hormone gene. *Animal Genetics* 28: 230-2.
- 12- De, S., MacNeil, M., Wu, X., Michal, J., Xiao, Q., Garcia, M., Griffin, K., Gaskins, C., Reeves, J. and Busboom, J. Detection of quantitative trait loci for marbling and backfat in Wagyu x Limousin F2 crosses using a candidate gene approach. *Proc. Journal of Animal Science, 2004*, 82:111-: Amer SOC Animal Science 2441 Village Green Place, Champaign, IL 61822 USA.
- 13- Hua, G., Chen, S., Yu, J., Cai, K., Wu, C., Li, Q., Zhang, C., Liang, A., Han, L. and Geng, L. 2009. Polymorphism of the growth hormone gene and its association with growth traits in Boer goat bucks. *Meat science* 81: 391-5.
- 14- Jia, J.L., Zhang, L.P., Wu, J.P., Ha, Z.J. and Li, W.W. 2014. Study of the correlation between GH gene polymorphism and growth traits in sheep. *Genetics and molecular research : GMR* 13: 7190-200.
- 15- Lee, J-H., Lee, Y-M., Lee, J-Y., Oh, D-Y., Jeong, D-J. and Kim, J-J. 2013. Identification of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the Bovine Growth Hormone (bGH) Gene Associated with Growth and Carcass Traits in Hanwoo. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 26: 1359.
- 16- Othman, O.E., Alam, S.S., El-Kader, H.A.A. and Abd-El-Moneim, O.M. 2015. Genotyping of Growth Hormone Gene in Egyptian Small Ruminant Breeds. *Biotechnology* 14:136.
- 17- Ribeca, C., Bonfatti, V., Cecchinato, A., Albera, A., Gallo, L. and Carnier, P. 2014. Effect of polymorphisms in candidate genes on carcass and meat quality traits in double muscled Piemontese cattle. *Meat science* 96:1376-83.
- 18- Sambrook, J. and Maniatis, T. 2009. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition). Cold Spring Harbor Laboratory.

- 19- Shiri, S., Saghi, D., Nasiri, M., Emrani, H., Montazer Torbati, F. and Mohammadzade M. 2006. Survey of genetic diversity growth hormone and growth hormone receptor genes in Iranian indigenous sheep breed (kordian sheep) using a nonradioactive SSCP. *Proc. 57th Ann. Meet. Europ. Asso. Anim. Prod. Antalya, Turkey*: 21-8.
- 20- Smithz, M., Dolezal, H., Gill, R. and Behrens, B. 1992. Evaluation of Ultrasound for Prediction of Carcass Fat Thickness and Longissimus Muscle Area in Feedlot Steers. *J. Anim. Sci* 70: 29-37.
- 21- Tahmoorespur, M., Taheri, A., Gholami, H. and Ansary, M. 2011. PCR-SSCP variation of GH and STAT5A genes and their association with estimated breeding values of growth traits in Baluchi sheep. *Animal biotechnology* 22: 37-43.
- 22- Tatsuda, K., Oka, A., Iwamoto, E., Kuroda, Y., Takeshita, H., Kataoka, H. and Kouno, S. 2008. Relationship of the Bovine Growth Hormone Gene to Carcass Traits in Japanese Black Cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 125: 45-9.

Single Nucleotide Polymorphism in part of GH Gene and Its Association with Carcass Traits in Afshari and Afshari-Booroola Merino sheep

Sepehri R.^{1,3}, Harkinezhad T.^{2,3}, Alijani S.¹, Shoja Ghias J.¹ and Raafat S.A.¹

¹ Animal Science Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran

² Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

³ Animal Science Dept., Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

Abstract

Growth hormone is one of the main factors affecting the growth of animals. Different alleles of this gene, may lead to different phenotypic effects. The aim of this study was to identify alleles of this gene in exon 5 and part of the 3'downstream area. For this purpose, 133 lambs from a flock and ultimately at the same age in three groups of Afshari pure breed and F2 and F5 crosses of Afshari- Booroola Merino were used. After taking Blood samples and recording the phenotypic measurements on live animals, 85 lambs were slaughtered. Afterward, carcass weight was measured. After 24 hours storing the carcasses in the cold room the weight of thigh, shoulder, neck, fat tail right side of carcass and waste was measured. Regression coefficient analyses were used to estimate carcass traits of those animals that were not slaughtered. DNA was extracted by phenol-chloroform procedures from blood samples. Then, using designed primers, the desired fragment was amplified and directly sequenced. Afterward, by analyzing of sequences, association of genotypes with carcass traits were evaluated. The results showed that in the nucleotide site of 2846 there were two genotypes, TT and TC, affecting the length of the body in Afshari pure breed and F5 crosses. In position 2882 sequence of the gene, a nucleotide was inserted in some animals and this insertion only in F2 crosses was associated with waste (carcass fat). Our results on the observed variations in case be proved by further evaluations, it can be used in marker assisted selection program in sheep breeding.

Key words: Afshari sheep, growth hormon, multiple births, carcass quality, SNP.