ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴
صفحه ۳۳۶-۳۲۹

ارتباط ناحیه پروموتور ژن هورمون رشد با دوقلوزایی بزهای نژاد مرخز

Aassociation of growth hormone promoter region with twining rate in Markhoz breed goats

علیرضا عبدالمحمدی*[۱]، علی ویسی[۱]، علیرضا زبرجدی[۱]، علی مصطفایی[۲]، هادی آتشی[۳]، کیوان خانی[۱]

۱- به ترتیب استادیار، دانشجوی کارشناسی‌ارشد، دانشیار، دانشجوی کارشناسی‌ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی
۲- استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه
۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

AbdolMohammadi AR*[1], Veisi A[1], Zebarjadi AR[1], Mostafaei A[2], Atashi H[3], Khani K[1]

1. Assistant Professor, MSc Student, Associate Professor, MSc Student, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University. Kermanshah, Iran.
2. Professor, Medical Biology Research Center, Abrisham Bagh Road, Kermanshah
3. Associate Professor, Shiraz University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alirezaam@razi.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۵- تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی چندشکلی پروموتور ژن هورمون رشد و ارتباط آنها با صفت دوقلوزایی در ۱۵۰ رأس بز ماده نژاد مرخز ایران انجام شد. در مرحله توالی‌یابی محصولات PCR یک جهش تک نوکلئوتیدی C>A در فاصله ۸۷ جفت بازی قطعه مورد نظر یافت شد. در این جایگاه فراوانی ژنوتیپ‌های CC و CA به ترتیب برابر با ۰/۷۲ و ۰/۲۸ به دست آمد. مقدار شاخص شانون برابر با ۰/۴۰ برآورد شد که نشان‌دهنده وجود چند شکلی ژنتیکی بالا در پروموتور ژن هورمون رشد در این جمعیت بود. آماره کای اسکور ۳/۸۶ بیانگر عدم تعادل هاردی- واینبرگ در این جمعیت بود (P<۰/۰۵). نسبت احتمال (ORs) برای دوقلوزایی در شکم زایش اول نسبت به دوم و سوم به ترتیب برابر با ۱/۱۲ (P>۰/۰۵)، ۵/۱۴ (P<۰/۱) و در شکم زایش دوم نسبت به سوم نیز ۵/۸۱ (P<۰/۰۵) برآورد شد. نتایج حاصله از نرخ دوقلوزایی در شکم‌های مختلف، بیانگر برتری شکم‌های مختلف به صورت زایش۳< زایش۲< زایش ۱ بود. برآورد آماره کای اسکور (۰/۰۴) و برآورد نسبت احتمال (۱/۰۳۵) نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های CC و CA در پروموتور ژن هورمون رشد برای نرخ دوقلوزایی وجود ندارد (P>۰/۰۵). بر اساس این نتایج و به منظور بهبود نرخ دوقلوزایی در بز مرخز، مطالعه وجود پلی‌مورفیسم‌های دیگر در این ژن و یا دیگر ژن‌های کاندیدای دوقلوزایی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی

برآورد نسبت احتمالات
بز مرخز
دوقلوزایی
ژن هورمون رشد
PCR-SSCP

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.2.2]

مقدمه

با توجه به اینکه صفات تولیدی و تولید مثلی در دام‌های اهلی تحت تاثیر ژن‌های عمده قرار می‌گیرند، در سال‌های اخیر گرایش قابل توجهی در شناسایی و به کارگیری ژن‌های کاندیدای مرتبط با این صفات ایجاد شده است (Silva et al. 2009). از جمله ژن-های کاندیدا در دوقلوزایی می‌توان به *GDF9*[1]، *BMP*[2] ، *ALK6*[3] و *GH*[4] اشاره کرد.

هورمون رشد (GH) یا سوماتوتروپین، یکی از اجزای اصلی محور سوماتوتروپیک بدن بوده که از هیپوفیز پیشین توسط فاکتور آزادسازی هورمون رشد هیپوتالاموس آزاد می شود. این هورمون در بسیاری از فرآیندهای طبیعی بدن از قبیل رشد، متابولیسم انرژی، شیردهی، باروری و توسعه جنین نقش اساسی دارد (Davoren and Hsdeh 1986). از طرفی، هورمون رشد در پستانداران به دلیل حضور فعال در مسیرهای بیوشیمیایی داخل و خارج سلولی در فعالیت‌هایی مانند تولیدمثل، تخمک‌اندازی، رشد فولیکول، تولید اسپرم، پاسخ‌های ایمنولوژیکی و رشد حضور دارد (Ola et al. 2008).

ژن هورمون رشد در گونه بز شامل پنج اگزون و چهار اینترون با طول ۳-۲ kb است و پروموتور این ژن ۵۰۰ bp می‌باشد. این ژن روی کروموزوم ۱۹ بز و گاو، ۱۷ انسان، ۱۱ گوسفند، ۱۲ خوک و یک مرغ قرار گرفته‌است. وزن پروتئین هورمون رشد در حدود ۲۲ کیلو دالتون بوده و دارای ۱۹۱ اسید آمینه می‌باشد (Greene et al. 2014). هورمون رشد دارای دو زنجیره پلی‌پپتیدی بوده که در طول هر زنجیره چهار ناحیه آلفا هلیکس وجود دارد (Hua et al. 2009).

تحقیقات نشان داده که ژن هورمون رشد بر عملکرد گنادهای موش مؤثر بوده و تاثیر عمل هورمون رشد از طریق واسطه‌گری گیرنده خود و IGF-I به انجام می‌رسد (Mizobuchi et al. 1995). در طی پژوهش‌های صورت گرفته در نژادهای گاو، خوک، گوسفند و بز ژن هورمون رشد به عنوان ژن کلیدی در فرایندهای متابولیکی مانند رشد، تولیدمثل، پیری، تولید شیر و رشد فولیکول معرفی شده‌است (Hull and Harvey 2001). محققان دیگر نیز تأثیر ژن هورمون رشد بر فعالیت تخمدان و اسپرماتوژنز، فولیکولوژنز و همچنین افزایش لنفوسیت‌های خون را بررسی کرده و تأثیر این هورمون را در روند چرخه‌های تولید مثل و افزایش قدرت سیستم ایمنی بیان کرده‌اند Hawkins and (Day1996). همچنین تحقیق صورت گرفته در شرایط *In vitro* روی گاو و خوک حاکی از آن بوده که عملکرد ژن هورمون رشد به همراه ژن *IGF* سبب کاهش آترزیا در فولیکول‌های ثانویه و افزایش نرخ تخمک ریزی جهت باروری می‌شود (Gong 2002). مطالعه انجام شده روی گاو در شرایط IVM[5] نشان داد که بیان ژن هورمون رشد باعث سرعت بخشیدن بلوغ هسته‌ای تخمدان می‌شود. علاوه بر این مشخص شده که بیان این ژن با LH در اوایل نرخ رشد و نمو (تکامل) فولیکول‌ها و جسم زرد در روند تخمک‌ریزی مؤثر است (Joudrey et al. 2003). در ژن هورمون رشد بز دو جهش (g.781G>A و g.1575A> G) مشخص و نقش آن بر نرخ دوقلوزایی تأثیرگذار بوده‌است (Zhang et al. 2011) در تحقیقی روی ۱۴۰ رأس گوسفند زل ایرانی، چند شکلی در ژن هورمون رشد بررسی شد اما رابطه معنی‌داری بین این ژن و دو قلوزایی مشاهده نشد (Yousefi and Rasouli 2012). گروه‌های مختلف تحقیقاتی، اثر چند شکلی‌های اگزون-های ۵ و۴ در نژاد گوسفند مهربان ایران (Bahrami et al. 2013) اگزون‌های دو، سه و چهار در نژاد بزهای بوئر (Hua et al. 2009) و اگزون ۴ در نژاد بزهای تالی ایران (Nassiri and Ghiasi 2009) را گزارش کرده ولی ارتباط آن‌ها با نرخ دوقلوزایی را بررسی نکردند. اما با توجه به جمعیت محدود بز مرخز به واسطه ویژگی‌های منحصر به فرد خود و بومی بودن آن در منطقه و کشور، این پژوهش برای اولین بار با هدف بررسی وجود چندشکلی در ژن هورمون رشد نژاد بز مرخز و رابطه آن با صفت دوقلوزایی انجام شد.

[1] Growth and differentiation factor-9
[2] Bone morphogenetic proteins
[3] Activin receptor-like kinase 6
[4] Growth hormone
[5] *In vitro* maturation

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.2.2]

مواد و روش‌ها

برای مشخص کردن نمونه‌ها از رکوردهای ثبت شده در مرکز تحقیقاتی علوم دامی سنندج استفاده شد و تمامی رکوردهای مربوط به زایش و شجره برای دام‌ها در فایل جداگانه که شامل بزهای تک قلوزا در یک یا چند زایش و یک، دو و یا سه بار دوقلوزایی در هر زایش بود، ثبت شده بودند. نمونه‌گیری خون از سیاهرگ وداجی با استفاده از ونوجکت‌های حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید[1] انجام شد و تا انجام استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA با استفاده از کیت Diatom DNA Prep به روش گوانیدین سیلیکاژل انجام شد. راندمان کیفیت DNA استخراج شده با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مشخص شد.

به دلیل اهمیت بالای پروموتور این ژن و بیان آن در بافت‌های بدن، این بخش به عنوان ناحیه هدف مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین وجود چند شکلی این جایگاه از یک جفت آغازگر زیر جهت تکثیر یک قطعه به طول ۳۹۱ جفت باز استفاده شد. این آغازگرهای اختصاصی براساس توالی ژنوم بز (شماره دسترسی *D00476*) و به کمک نرم‌افزار Oligo 5 طراحی شدند. لازم به ذکر است که صحت توالی آغازگرها با برنامه BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI مورد تأیید قرار گرفت. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). آغازگر رفت و برگشت به ترتیب F: 5′- GGATTAAACCTGAGTCTCCTG- 3′ و R: 5′- CCTGAGTCGTCTGGTGAA- 3′ بودند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰۰-۵۰ نانوگرم، ۰/۲۵ میکرومولار از هر یک از آغازگرها، ۲/۵ میکرولیتر بافر 1X PCR، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، یک واحد آنزیم *Taq* پلی‌مراز انجام شد. برنامه حرارتی زیر برای تکثیر قطعه مورد نظر توسط دستگاه ترموسایکلرمدل کربیت[2] صورت گرفت: مرحله ابتدایی واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و طی ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد به منظور اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط آغازگرها در ۴۰ ثانیه و بسط نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در مدت ۱۰ دقیقه بود. برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۸۵ به مدت ۵۰ دقیقه استفاده شد و رنگ آمیزی ژل به کمک اتیدیوم بروماید به مدت یک ساعت صورت گرفت.

پس از اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر جهت بررسی چند شکلی در پروموتور ژن هورمون رشد بزهای مرخز از روش SSCP استفاده شد. تئوری این روش بر مبنای تأثیر توالی اولیه و طول قطعه DNA تک‌رشته‌ای بر روی شکل‌گیری کنفورماسیون ثانویه در ژل پلی‌اکریل‌آمید غیر دناتوره‌کننده و میزان مهاجرت آن استوار است. ابتدا دو رشته DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه از یکدیگر جدا شدند. برای جلوگیری از اتصال مجدد دو رشته نمونه‌ها روی یخ گذاشته شدند و سپس روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد بارگذاری و به مدت ۶-۵ ساعت با ولتاژ ۲۰۰ در دمای ثابت ۶ درجه سانتی‌گراد الکتروفورز شدند. رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره انجام شد و سپس الگوهای مختلف باندی در ژن هورمون رشد ارزیابی شدند. جهت تعیین ژنوتیپ‌ها از روش توالی‌یابی مستقیم استفاده شد. لذا دو نمونه محصول PCR از هر الگوی باندی انتخاب و به کشور کره جنوبی فرستاده شد. جهت اطمینان بیشتر، توالی‌یابی در دو جهت رفت و برگشت و به روش ختم زنجیره (روش Sanger) صورت گرفت.

پس از مشخص شدن نتیجه توالی‌یابی و ژنوتیپ‌های مختلف، محاسبه فراوانی آللی، ژنوتیپی و شاخص‌های جمعیتی با استفاده از نرم‌افزار PopGene 32 انجام شد. به منظور بررسی رابطه چند شکلی پروموتور ژن هورمون رشد با صفت نرخ بروز دو قلوزایی از مدل چند متغیره رگرسیون لجستیک و رویه GENMOD در نرم‌افزار SAS (9.1) استفاده شد..

اثر شکم زایش و ژنوتیپ‌های ژن هورمون رشد در این مدل به عنوان عوامل ثابت در مدل آماری منظور شدند. معادله مورد استفاده به شرح ذیل بود. $Y_{ij}= \mu+ P_i + G_j + e_{ij}$

که در این فرمول Y_{ijk} متغیر وابسته (صفت دو قلوزایی) برابر با Ln (P/1-P). P: احتمال دوقلوزایی، 1-P: احتمال عدم دوقلوزایی، μ میانگین صفت در جامعه، P_i اثر i امین شکم زایش، Gj اثر j امین ژنوتیپ و e_{ij} اثر تصادفی باقی‌مانده می‌باشد. از شاخص

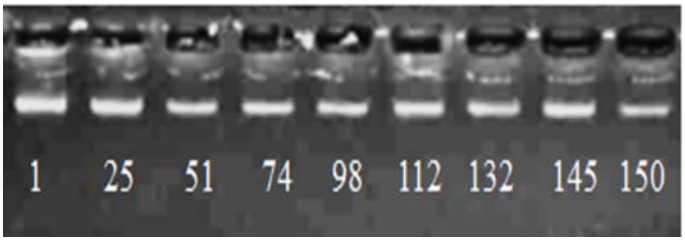
[1] Ethylenediamin tetraacetic acid (EDTA)
[2] Corbet

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.2.2]

برآورد نسبت احتمال (ORs)[1] و آماره کای اسکور برای تعیین رابطه معنی‌داری عوامل موجود در مدل و صفت دوقلوزایی استفاده شد. سطوح خطای ۰/۰۵ و ۰/۱ برای بیان اختلاف‌های معنی‌دار مد نظر قرار گرفت.

نتایج و بحث

کیفیت DNA استخراجی الکتروفورز بر روی ژل آگارز تایید شد. وجود باندهای شارپ و عدم وجود باند اضافی در ژل نشان دهنده کیفیت مطلوب DNAهای استخراجی بود (شکل۱).



شکل۱- نمونه‌هایی از DNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد (شماره‌ها از چپ به راست) نمونه‌های استفاده شده در آزمایش

در واکنش PCR ژن هورمون رشد، که یک قطعه‌ای به طول ۳۹۱ جفت باز بود، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد (شکل۲).

نتایج حاصل از SSCP و رنگ‌آمیزی با ژل پلی‌آکریلامید حاکی از دو الگوی باندی متفاوت در نمونه‌های مورد مطالعه بود (شکل۳). در مرحله توالی‌یابی محصولات PCR، یک جهش تک نوکلئوتیدی C>A در فاصله ۸۷ جفت بازی قطعه مورد نظر (g.87C>A) یافت شد. در شکل (۴) ردیف‌های نوکلئوتیدی و جهش مشاهده شده (g.87C>A) در پروموتور ژن هورمون رشد برای سه نمونه توالی‌یابی شده (شماره ۲،۳ و ۴) و توالی مرجع (۱) قابل رویت می‌باشد. دو ژنوتیپ CC و CA برای دو الگوی باندی متفاوت مشخص شد در حالی‌که ژنوتیپ AA در نمونه‌ها یافت نشد. فراوانی ژنوتیپ‌های CC و CA به ترتیب برابر با ۰/۷۲ و ۰/۲۸ به دست آمد (جدول۱). در این جایگاه فراوانی آلل C (تیپ وحشی) و A (آلل موتان) به ترتیب برابر با ۰/۸۶ و ۰/۱۴ برآورد شد.

محققان با تکثیر نواحی مختلف این ژن آلل‌های مختلفی از آن مشاهده کردند. در بررسی صورت گرفته در ژن هورمون رشد گوسفند مرینو استرالیایی دو آلل به روش *RFLP-TaqI* و چهار آلل به روش *RFLP-PvuII* گزارش شد (Parsons et al. 1996). در بررسی چندشکلی اگزون ۵ ژن هورمون رشد در گوسفند بلوچی با روش PCR-SSCP سه الگوی باندی متفاوت مشاهده شد (Valeh et al. 2009). در مطالعه‌ای دیگر که بر روی ژن هورمون رشد در۵۸۴ رأس بز نژاد چینی صورت گرفت بیشترین فراوانی ژنوتیپی مربوط به ژنوتیپ AB در جایگاه اول و ژنوتیپ CC در جایگاه دوم گزارش شد (Zhang et al. 2011). اما در تحقیقی، با استفاده از روش PCR-SSCP در ۹۰ رأس بز نژاد تالی چندشکلی موجود در اگزون چهار ژن هورمون رشد بررسی و شش الگوی باندی حاصله، حاکی از وجود چندشکلی این ژن بود (Nassiri and Ghiasi 2009).

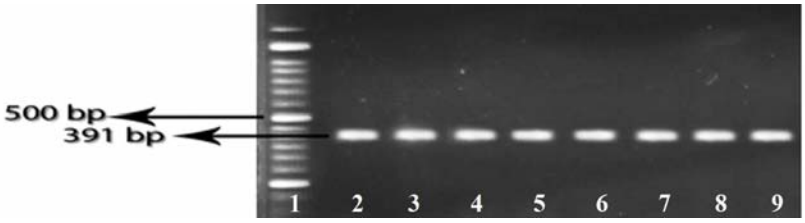
در تحقیق حاضر میزان شاخص شانون (I) و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار با استفاده از شاخص نئی[2] برابر با ۰/۴۰ و ۰/۲۴۰ برآورد شد که نشان‌دهنده وجود چندشکلی ژنتیکی بالایی در پروموتور ژن هورمون رشد در این جمعیت بود (جدول ۱). آماره کای اسکور ۳/۸۶ بیانگر عدم تعادل هاردی-واینبرگ در این جمعیت بود ($P<0/05$). از دلایل مؤثر در انحراف از تعادل ژنی در جمعیت می‌توان به اندازه جمعیت، نوع جهش، میزان جهش، مهاجرت، انتخاب و نوع آمیزش افراد اشاره کرد (Khani et al. 2014). نتایج آنالیز آماری در جدول ۲ نشان داد که شکم زایش با نرخ بروز دوقلوزایی دارای رابطه معنی‌داری بود ($P<0/01$)، اما اثر ژنوتیپ‌های مشاهده شده بر نرخ بروز دوقلوزای تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$). برآورد نسبت احتمال (ORs) در شکم زایش اول نسبت به دوم و سوم به ترتیب برابر با ۱/۱۲ ($P>0/05$)، ۵/۱۴ ($P<0/1$) و در شکم زایش دوم نسبت به سوم نیز ۵/۸۱ ($P<0/05$) برآورد شد.

[1] Nei index

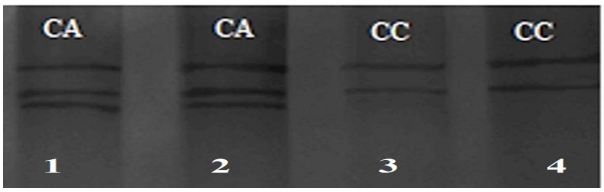
[2] Odds ratio

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.2.2]

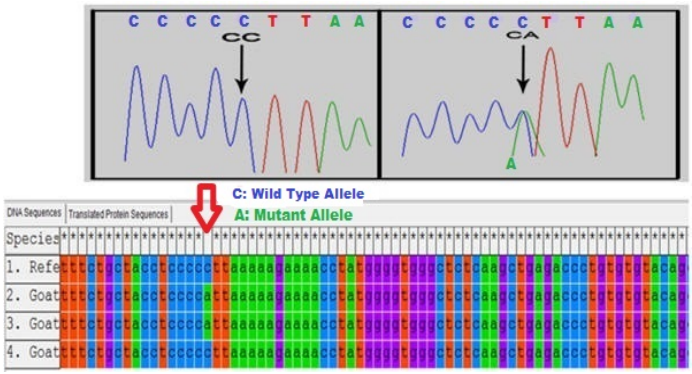


شکل۲- تکثیر قطعه ۳۹۱ جفت بازی ژن هورمون رشد در نژاد بز مرخز. چاهک ۱) Marker Ladder 50 bpY؛ چاهک ۲ تا ۹) نمونه‌هایی از PCR انجام شده.



شکل۳- دو الگوی باندی متفاوت مربوط به ناحیه پروموتور ژن هورمون رشد در نژاد بز مرخز. چاهک۱ و ۲ دارای الگوی مشابه ۱ و با ژنوتیپ CA؛ چاهک ۳ و ۴ دارای الگوی مشابه ۲ با ژنوتیپ CC.

بنابر نتایج حاصله نرخ دوقلوزایی در شکم‌های مختلف بز مرخز به صورت زایش ۳< زایش۲< زایش ۱ می‌باشد. این نتایج با مطالعه‌ای که با هدف بررسی چند شکلی ژن میوستاتین با نرخ بروز دوقلوزایی در بز مرخز انجام شد، مطابقت داشت (Khani et al. 2014) که علت این روند کاهشی را عواملی مانند تنش در هنگام آبستنی‌های اول و پارامترهای متابولیکی بیان کردند. یکی دیگر از دلایل این روند کاهشی نرخ دوقلوزایی را اختلالات فیزیولوژیکی تولیدمثل در زایش اول نسبت به زایش‌های بالاتر گزارش کرده‌اند (Rao and Notter 2000). اما مطالعات صورت گرفته بر روی بزهای گوشتی بیانگر، اثر معنی‌دار شکم زایش بر بروز دوقلوزایی تحت‌تأثیر اثرات مادری و عوامل غیرژنتیکی (افزایش سن، عوامل محیطی) بوده‌است (Haldar et al. 2014). برآورد آماره کای اسکور و نسبت احتمال برابر ۰/۰۴ و ۱/۰۳۵ نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده در پروموتور ژن هورمون رشد با نرخ بروز دوقلوزایی وجود ندارد (P>۰/۰۵). قابل ذکر است که گزارشی در مورد بررسی ژن هورمون رشد و ارتباط آن با دوقلوزایی، در ناحیه پروموتور در بزهای بومی ایران گزارش نشده‌است. در تحقیقی که ارتباط ژن هورمون رشد با نرخ تخمک‌ریزی و دوقلوزایی در بزهای بوئر و ماتو انجام گرفت تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف ژن هورمون رشد مشاهده شد و ژنوتیپ‌های CC و AB دارای اثر دوقلوزایی بیشتری بودند (Zhang et al. 2011). اما در پی پژوهش صورت گرفته بر روی گوسفندان نژاد زل ایرانی که در آن سه الگوی باندی (A، B و C) مشاهده شد، رابطه معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده و نرخ بروز دوقلوزایی بیان نشد (Yousefi and Rasouli 2012).



شکل۴- توالی متفاوت (g.87C>A) مربوط به ناحیه پروموتور ژن هورمون رشد در بزهای نژاد مرخز (شماره ۲، ۳ و ۴)

برخی پژوهشگران عقیده دارند که با کاهش تدریجی مقدار هورمون‌رشد، بلوغ جنسی آغاز می‌شود. به عبارت دیگر اگرچه تأثیر مستقیم هورمون رشد بر ترشح و آزاد شدن LH نشان داده نشده ولی به نظر می‌رسد که کاهش غلظت هورمون رشد به عنوان یک عامل متابولیکی محسوب شده و احتمالاً از طریق محور هیپوتالاموس- هیپوفیز باعث تأثیر بر فاکتورهای آزاد کننده هورمون‌های گونادوتروپین و نهایتا روند فرایند تولیدمثلی در حیوانات اهلی می‌شود (Hull and Harvey 2001). برخی پژوهشگران نیز همین روند را در هورمون‌های GH، GHR، IGF-I،IGF-II و IGFBPs بررسی کرده، که نتایج آن نشان داد که علاوه بر نقش خود هورمون‌ها، بیان ژن این هورمون‌ها می‌تواند به عنوان تحریک کننده توسعه فولیکول‌های آنترال، بلوغ

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.2.2]

جدول ۱- فراوانی آللی، ژنوتیپی و تعادل هاردی- واینبرگ ناحیه پروموتور ژن هورمون رشد در نژاد بز مرخز

فراوانی آللی		فراوانی ژنوتیپی		میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار	شاخص شانون (I)	آماره‌کای اسکور
C	A	CC(۱۰۸)	CA(۴۲)			
۰/۸۶	۰/۱۴	۰/۷۲	۰/۲۸	۰/۲۴	۰/۴۰	۳/۸۶

جدول۲- برآوردی از Odds ratios وآماره کای‌اسکور مربوط به شکم زایش و ژنوتیپ های مختلف برای بروز دوقلوزایی

متغیر مدل	برآورد نسبت احتمال(Odds Ratio)	آماره کای اسکور	$P > ChiSq$
شکم زایش		۸/۱۹	۰/۰۱۶**
زایش۱ / زایش۲	۱/۱۲	۰/۶۰	۰/۴۳
زایش۱ / زایش۳	۵/۱۴	۲/۹۳	۰/۰۸*
زایش۲ / زایش۳	۵/۸۱	۳/۳۴	۰/۰۵**
ژنوتیپ		۰/۰۴	۰/۰۴
CC / CA	۱/۰۳۵	۰/۰۴	۰/۶۳

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطوح پنج و یک درصد

تخمک و فولیکول‌های ثانویه از طریق گنادوتروپین‌ها، در روند باروری نقش مهمی را ایفا کند (Haldar et al. 2014). اضافه بر مطالب بیان شده، تحقیقات انجام گرفته به وسیله مارکرهای میکروساتلایت در سطح ژنومی نشان داده که روی جایگاه ژنومی کرموزوم ۱۹ در بزهای نژاد بوئر، سانن و آنقوره QTLهایی برای صفات (رشد، شیر و تولیدمثل) در فواصل ۵۵ و ۹۷ سانتی-مورگانی وجود دارد (Visser et al. 2010). از آنجا که تا به حال گزارش کاملی بر روی ژن هورمون رشد و ارتباط آن با نرخ دوقلوزایی در بزها، به ویژه بزهای بومی ایران گزارش نشده، نمی‌توان اظهار کرد که ژن هورمون رشد در باروری، تکامل فولیکول و صفات تولیدمثلی موثر نمی‌باشد. جهت اطمینان کامل می‌بایست مطالعات تکمیلی با تعداد نمونه بیشتر و دیگر جایگاه-های چند شکل این ژن انجام شود.

میزان افزایش رشد فولیکول در تخمدان، افزایش سلول‌های گرانولوزا در تکامل فولیکول‌های قبل و پیش از تخمک‌اندازی تحت‌تأثیر برخی ژن‌های کاندیدای دیگر مثل ژن برولا (*FecB* یا *BMPR-1B* یا *ALK-6*)، *GDF-9* (یا *FecG*)، *BMP15* (یا *FecX*) قرار می‌گیرد (Juengel et al. 2004). مطالعاتی در خصوص وجود پلی‌مورفیسم در این ژن‌ها و ارتباط آنها با دوقلوزایی در نژادهای مختلف گوسفندان خارجی و ایرانی و به میزان کمتر در بزهای بومی انجام شده‌است. در گوسفند شال مدارکی دال بر نبود پلی-مورفیسم در نواحی $FecX^L$، $FecX^G$، *GDF-9* و $FecX^B$ وجود دارد (Ghaffari et al. 2007; Zare et al. 2007). همچنین در گوسفند نژاد لری بختیاری جهشی در ژن‌های $FecX^L$ و *FecB* مشاهده نشده‌است (Amiri et al. 2007). اما در گوسفندان بلوچی مشخص شد که علی‌رغم نبود موتاسیون در *FecB* و $FecX^G$، ژن *GDF-9* در چند ناحیه دارای چند شکلی است و نیز برای اولین بار، ارتباط معنی‌داری بین این ژن و دوقلوزایی در این نژاد بیان شد (Moradband et al. 2011). همچنین با مطالعه ژن *FecX* در گوسفندان نژاد سنجابی مشاهده شد که دام‌های با ژنوتیپ NN در ژن *BMP15* به طور معنی‌داری، صفت دو قلوزایی را بیشتر از دام‌های با ژنوتیپ MM بروز می‌دهند (Solimani et al. 2011). در تحقیقی جهش گزارش شده در ژن *BMPR-1B* و مهمترین چند شکلی‌های ژن *FecX* گوسفند، در ۶ نژاد بز دو قلوزا مطالعه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.2.2]

شد و هیچ یک از این جهش‌ها در جمعیت رویت نشد و بیان شد که احتمال بسیار زیاد ژن‌های کنترل کننده باروری و دوقلوزایی در گوسفند و بز متفاوت بوده و مکانیسمی دیگر حاکم است و باید ژن‌های دیگری، دوقلوزایی در بز را تحت تاثیر قرار دهند (Hua et al. 2008). در برخی نژادهای بز بومی ایران (بزهای نجدی، بومی خوزستان و سرخ جبال بارز) نیز مشخص شد که در ژن‌های *BMP15* و *FecB* چندشکلی وجود ندارد (Alinaghizadeh et al. 2010; Mohammadi and Alimahmoudi 2011). اگرچه در بزهای نژاد چینی دو ناحیه چند شکل در ژن *BMPR-1B* شناسایی شد ولی هیچ کدام با دو قلوزایی در این بزها در ارتباط نبود (Chu et al. 2010). بنابراین به نظر می‌رسد برای یافتن ژن‌های مرتبط با دو قلوزایی و باروری بالا در بزها باید دیگر ژن‌های مرتبط با باروری نیز مدنظر قرار گیرد به طوری‌که در مطالعه بزهای مرخز، ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی ژن میوستاتین و دوقلوزایی گزارش شد (Khani et al. 2014).

در مطالعه حاضر، با وجود چندشکلی در ژن هورمون رشد، تفاوتی بین ژنوتیپ‌های مختلف برای صفت دوقلوزایی مشاهده نشد. شاید مطالعه نواحی دیگر این ژن و یا ژن‌های کاندیدای دیگر بتواند در یافتن مکانیسم باروری در بز راه‌گشا شده و بتوان از نتایج حاصله در برنامه‌های اصلاحی این نژاد بومی ارزشمند بهره جست. علی‌رغم اینکه صفات تولیدمثلی تحت‌تأثیر ژن‌های عمده‌ای هستند که عامل افزایش تعداد تخمک‌ها در هر چرخه و به دنبال آن تعداد نتاج در هر زایش می‌باشند، اعمال فلاشینگ در زمان جفت‌گیری نیز می‌تواند کمک شایانی برای پرورش دهندگان در جهت بهبود دوقلوزایی در گله و جلوگیری از انقراض بزهای بومی منطقه باشد.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم ایستگاه تحقیقات اصلاح نژاد سنندج که در انجام این تحقیق ما را یاری دادند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Alinaghizadeh H, Mohammad Abadi MR, Zakizadeh S (2010) Exon 2 of BMP15 gene polymorphismin Jabal Barez Red Goat. Agricultural Biotechnology Journal 2: 69-80 (In Farsi).

Amiri S, Rahimi G, Vatankhah M (2007) No incidence of allelic mutation in Booroola (FecB) and Inverdale ($FecX^I$) genes in Lori-Bakhtiari sheep breed. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. p. 495 (In Farsi).

Bahrami A, Behzadi S, Miraei-Ashtiani S, Roh SG, Katoh K (2013) Genetic polymorphisms and protein structures in growth hormone, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 1 and leptin in Mehraban sheep. Gene 527: 397-404.

Chu MX, Zhao XH, Zhang YJ, Jin M, Wang JY, Di R, Cao GL, Feng T, Fang L, Ma YH, Li K (2010) Polymorphisma of BMPR-1B gene and their relation ship with litter size in goats. Molecular Biology Reports 37: 4033-4039.

Davoren JB, Hsdeh AJ (1986) Growth hormone increases ovarian levels of immonoreactive somatomedin c/insulin-like growth factor I *in vivo*. Endocrinology 118: 888-890.

Ghaffari M, Nejati-Javaremi A, Rahimi G (2007) Detection of polymorphism in oocyte derived growth factor (GDF-9) gene associated with twining in Shal sheep breed. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. p. 475 (In Farsi).

Gong J (2002) Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. Domestic Animal Endocrinology 23: 229-241.

Greene AD, Patounakis G, Segars JH (2014) Genetic associations with diminished ovarian reserve: a systematic review of the literature. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 1-12.

Haldar A, Pal P, Datta M (2014)Prolificacy and its relationship with age, body weight, parity, previous litter size and body linear type traits in meat-type goats. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 27: 628-634.

Hawkins AJ, Day AJ (1996) The metabolic basis of genetic differences in growth efficiency among marine animals. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 203: 93-115.

Hua G, Chen S, Yu J,Cai KL, Wn CJ, Li AL, Yang LG (2009) Polymorphism of the growth hormone gene and its association with growth traits in Boer goat bucks. Meat Science 81: 391-395.

Hua GH, Chena SL, Ai JT, Yang LG (2008) None of polymorphism of ovine fecundity major genes FecB and FecX was tested in goat. Animal Reproduction Science 108: 279-286 (In Farsi).

Hull K, Harvey S (2001) Growth hormone: roles in female reproduction. Journal of Endocrinology 168: 1-23.

Joudrey E, Lechniak D, Petrik J, King W (2003) Expression of growth hormone and its transcription factor, Pit1, in early bovine development. Molecular Reproduction and Development 64: 275-283.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.2.2]

Juengel JL, Hudson NL, Whiting L, McNatty KP (2004) Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. Biology of Reproduction 70: 557-561.

Khani K, Abdolmohammadi A, Foroutanifar S, Zebarjadi A (2014) Association of Polymorphism in5UTR and Exon1 Regions of myostatin Gene with twining trait in Markhoz goat breed. Genetics in the 3rd millennium 2: 3536-3543(In Farsi).

Mizobuchi M, Downs TR, Frohman LA (1995) Growth hormone-releasing hormone immunoreactivity in mouse placenta, maternal blood, and amniotic fluid: molecular characterization and secretion from primary cell cultures in vitro. Endocrinology 136: 1731-1736.

Mohammadi GH, Alimahmoudi M (2011) Determination of polymorphism of FecB gene in Najdi and native goats of Khouzestan province by PCR-RFLP. Journal of Veterinary Medicine and Laboratory 3: 13-20 (In Farsi).

Moradband F, Rahimi G, Gholizadeh M (2011) Association of Polymorphisms in Fecundity Genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with Litter Size in Iranian Baluchi Sheep. Asian-Australian Journal of Animal Science 24: 1179- 1183.

Nassiri MR, Ghiasi H (2009) Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Agricultural Biotechnology Journal 7: 51-53.

Ola SI, Ai JS, Liu JH, Wang Q, Wang ZB, Chen DY, Sun QY (2008) Effects of gonadotrophins, growth hormone, and activin A on enzymatically isolated follicle growth, oocyte chromatin organization, and steroid secretion. Molecular Reproduction and Development 75: 89-96.

Parsons Y, Cooper D, Piper L (1996) Genetic variation in Australian Merino sheep. Animal genetics 27: 223-8.

Rao S, Notter D (2000) Genetic analysis of litter size in Targhee, Suffolk, and Polypay sheep. Journal of Animal Science 78: 2113-2120.

Silva J, Figueiredo J, Van den Hurk R (2009) Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. Theriogenology 71: 1193-1208.

Solimani B, Rahimi Mianji Gh ,Chaharaein B (2011) The segregation of exon 2 BMP15 gene on twining and traits of weight in Sanjabi sheep. Iranian Biology Journal 24: 487-493 (In Farsi).

Valeh MV, Tahmoorespour M, Ansari M, Nassiry MR, Karimi D, Taheri A (2009) Association of growth traits with SSCP polymorphisms at the growth hormone receptor (GHR) and growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR) genes in the Baluchi Sheep. Journal of Animal and Veterinary Advances 8: 1063-1069.

Visser C, Crooijmans R, Van Marle Köster E (2010) A genetic linkage map for the South African Angora goat. Small Ruminant Research 93: 171-179.

Yousefi S, Rasouli SZ (2012) Association of Growth Hormone gene with twining and milk composition in Zel sheep. The new topics first national conference on agriculture. Islamic Azad University of Saveh (In Farsi).

Zare Y, Nejati-Javaremi A, Rahimi G (2007) Detection of polymorphisms in two point of gene associated with Twinning (BMP15) in Shal sheep. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. p. 483 (In Farsi).

Zhang C, Liu Y, Huang K, Zeng W, Xu D, Wen Q, Yang L (2011) The association of two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in growth hormone (GH) gene with litter size and superovulation response in goat-breeds. Genetics and Molecular Biology 34: 49-55.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.2.2]