Archive of SID

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۴ (ص ۴۰۶-۳۹۹)

تعیین ویژگی توالی و تنوع ژن هورمون رشد در شترهای دوکوهانه و یک‌کوهانهٔ ایران

نعمت هدایت ایوریق[1*]، سید رضا میرائی آشتیانی[2]، محمد مرادی شهر بابک[3] و صابر محمد مقصودی[4]
۱. استادیار، گروه علوم دامی دانشکدهٔ علوم کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی
۲، ۳ و ۴. استادان و دانشجوی دکتری گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۷/۴)

چکیده

شتر گونه‌ای بسیار مقاوم در برابر خشکی است که در سخت‌ترین شرایط آب‌وهوایی، محصولاتی مانند شیر و گوشت تولید می‌کند. با توجه به اینکه تعداد شترهای ایران در حال کاهش است، برای حفظ و بهبود تولیدات این گونه، مطالعات کاربردی ژنتیکی ضروری است. یکی از جایگاه‌های مهمی که اثر آن در سایر گونه‌ها روی صفات اقتصادی مشخص شده، جایگاه ژن کدکنندهٔ هورمون رشد است که در تحقیق حاضر بررسی شده است. در پژوهش حاضر از ۲۵ نمونه شتر دوکوهانه (ایستگاه جهادآباد) و ۵۰ نمونه شتر تک‌کوهانهٔ مناطق مختلف، به ترتیب ۱۵، ۲۰، ۱۵ نمونه از ایستگاه یزد، ایستگاه طرود و شترهای تک‌کوهانهٔ سمنان جهت تکثیر ژن هورمون رشد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. با مطالعهٔ توالی‌یابی نمونه‌هایی از هر گروه ژنتیکی پس از هم‌ردیفی آن‌ها در ۷ جایگاه از این ژن جهش مشاهده گردید که ۲ جهش به تغییر اسیدآمینه در ساختار پروتئین هورمون رشد منجر می‌شدند. آنالیز فاصلهٔ ژنتیکی این جایگاه نشان داد که فاصلهٔ ژنتیکی بین شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه بیشترین بود. در جمعیت‌های تک‌کوهانه نیز دو جمعیت یزد و سمنان دارای بیشترین فاصله بودند و جمعیت طرود فاصلهٔ کمتری با هر دو جمعیت یادشده داشت.

واژه‌های کلیدی: جهش، شترهای تک‌کوهانه، شترهای دوکوهانه، فاصلهٔ ژنتیکی، هورمون رشد.

مقدمه

شتر یکی از گونه‌های منحصربه‌فرد است که در شرایط خشک و نیمه‌خشک و با مصرف خوراکی که قابل‌مصرف سایر نشخوارکنندگان نیست، قادر به تولید گوشت و شیر است (Ahmad *et al*., 2010). دو گونه شتر از جنس *Camelus* وجود دارد؛ شتر تک‌کوهانه که بیشتر در مناطق خشک خاورمیانه و آفریقا وجود دارد و به شرایط گرم و خشک مقاوم است و شتر دوکوهانه که بیشتر در مناطق مرکزی آسیا و چین یافت می‌شود و بیشتر به شرایط سرد و خشک مقاوم است (Kadim *et al*., 2008).

با توجه به فرایند فیزیولوژیکی، هورمون رشد (GH)[1] یک ژن کاندیدای خوب برای تأثیرگذاشتن بر انواع مختلف صفات اقتصادی مهم در دام‌های اهلی به شمار می‌رود که ازجمله می‌توان به ترکیبات لاشه و تولید شیر اشاره کرد. نقش مهم بیولوژیکی هورمون رشد، کنترل رشد بعد از تولد است؛ اگرچه مشخص شده است که روی تنظیم متابولیک، شیردهی و تولیدمثل نیز تأثیرگذار است (Sejrsen *et al*., 1999; Louveau & Gondret, 2004)، در بیشتر پستانداران هورمون رشد به‌وسیلهٔ تک ژن کنترل می‌شود (Forsyth & Wallis, 2002). مطالعه در گاوهای نر برانگوس چندشکلی‌هایی را در هورمون رشد و

* تلفن: ۰۹۱۴۱۹۷۳۶۸۱
E-mail: nhedayat@uma.ac.ir
1. Growth Hormone

www.SID.ir

Archive of SID

فاکتورهای تنظیم‌کنندهٔ آن مشخص کرد که می‌تواند روی صفات رشد و لاشه در این‌گونه تأثیر بگذارد (Thomas *et al.*, 2007). ارتباط بین صفات لاشه و چندشکلی‌های موجود در ژن هورمون رشد در خوک نیز گزارش شده است (Geldermann, 1996) به‌علاوه Katoh *et al.* (2008) نشان دادند که ژنوتیپ‌های هورمون رشد در گوساله‌های ژاپنی سیاه با وزن بدن و ترشح عملکردی هورمون رشد مرتبط بوده است. Bižienė *et al.* (2011) اثر ژن هورمون رشد را با استفاده از روش PCR-RFLP به کمک آنزیم محدودکنندهٔ FokI در خوک بررسی کردند و نشان دادند که حیوانات با ژنوتیپ GG در مقایسه با ژنوتیپ AA و AG دارای مقدار چربی کمتر و درصد ماهیچهٔ بیشتر هستند. Zhang *et al.* (2011) تأثیر دو جهش تک‌نوکلئوتید (A-781G و A-1575G) ژن هورمون رشد را روی سوپراوولاسیون در نژادهای بزهای ماتو[1] و بوئر[2] با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی کردند که در هر دو جایگاه دو ژنوتیپ (AA، AB و CC، CD) در دو جمعیت شناسایی شد و آنالیزهای پیوستگی نشان داد که بزهای با ژنوتیپ‌های AB یا CD در مقایسه با بزهای AA و CC چندقلوزایی بیشتری دارند. همچنین هر دو نژاد با ترکیب ژنوتیپ ABCD بیشترین چندقلوزایی را در مقایسه با ترکیب متفاوت دیگر ژنوتیپ‌ها داشتند.

Fontanesi *et al.* (2012) با توالی‌یابی قسمتی از ژن هورمون رشد به طول ۱۳۳۷ نوکلئوتید دو جهش (C-78T، A-33G) در قسمت 5'UTR در ۱۴ نژاد خرگوش شناسایی کردند. آنالیزهای پیوستگی نشان داد که جهش موجود در ناحیهٔ ۷۸ ارتباط معناداری با وزن پایانی دارد و خرگوش‌هایی با ژنوتیپ CT در مقایسه با ژنوتیپ‌های TT و CC در ۷۰ روزگی به وزن بیشتری می‌رسند. در مطالعه‌ای روی شتر نیز همبستگی معناداری بین نرخ رشد و تولید گوشت و پلی‌مورفیسم در ژن هورمون رشد گزارش شده است (Afifi *et al.*, 2014).

شتر یکی از منابع تولید گوشت و شیر در ایران است و تعداد آن در ایران مطابق آمارهای FAO در سال‌های اخیر رو به کاهش نهاده است (تخمین زده شده که تعداد شترهای ایران از ۸۵۰۰۰ نفر شتر در سال ۲۰۱۲ به ۶۶۰۰۰ نفر شتر در سال ۲۰۱۳ رسیده است) (FAO, 2014)؛ بنابراین با توجه به اهمیت بهبود شاخص‌های تولیدی این دام، یکی از راه‌حل‌های سریع، شناسایی جهش‌ها در ژن‌های مرتبط با صفات تولیدی است و از بین این ژن‌ها هورمون رشد بر بیشتر صفات تأثیرگذار است. تحقیق حاضر روی توالی‌یابی و آنالیز توالی‌های جایگاه ژن هورمون رشد (GH) جهت بررسی سطح هتروزیگوسیته، جهش‌های این ژن و فاصلهٔ ژنتیکی بین نژادها و جمعیت‌ها و کلاستربندی آن‌ها متمرکز شده است تا از اطلاعات ارزشمند به‌دست‌آمده از کلاستربندی بتوان در برنامه‌ریزی استراتژی‌های تلاقی‌گری برای ایجاد دورگ‌گیری و استفاده از هتروزیس بیشتر بهره جست.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

از ۲۵ نفر از شترهای دوکوهانهٔ اردبیل (ایستگاه جهادآباد)، ۱۵ نفر شتر تک‌کوهانهٔ ایستگاه یزد، ۲۰ نفر شتر تک‌کوهانهٔ ایستگاه طرود و ۱۵ نفر شتر تک‌کوهانهٔ سمنان با استفاده از ونوجکت حاوی مادهٔ ضدانعقاد EDTA از سیاهرگ وداج نمونه‌گیری خون شد. مقدار خون به‌دست‌آمده از هر شتر در ونوجکت ۴ میلی‌لیتر بود. نمونه‌های خون در محیط سرد بلافاصله پس از استحصال به آزمایشگاه منتقل و در فریزر ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان استخراجDNA نگهداری شدند و DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراجی DNA از خون پستانداران شرکت RBC (Real Corporation, RBC, South Korea Biotech) استخراج شد (Hedayat-Evrigh *et al.*, 2013).

تکثیر جایگاه ژن هورمون رشد

تکثیر ژن هورمون رشد با استفاده از چهار جفت پرایمر اختصاصی طراحی‌شده با نرم‌افزار Primer 3، برای تکثیر جایگاه‌های 5'-UTR [3]، اگزون ۲-۴، اگزون ۵ و قسمت 3'-UTR [4] انجام گرفت (جدول ۴-۳).

1. Matou
2. Boer
3. Five Prime untranslated region
4. Three prime untranslated region

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. پرایمرهای استفاده‌شده برای تکثیر ژن هورمون رشد و دمای اتصال آن‌ها

قطعهٔ مورد نظر	پرایمر رفت 3'-5'	پرایمر برگشتی 3'-5'	دمای اتصال
5' UTR	GAAAATAAGTGGGGGCAGAG	AGTTTCCTCCCATTATGCAG	۶۵
اگزون ۲-۴	CTGGCTGCTGACACCTACAA	ACCAGGCTGTTGGTGAAGAC	۶۳
اگزون ۵	ATCCTGGGTAGCCTTCTCTC	GCACTGGAGTGGCACTTT	۶۲
3' UTR	TCCTCAGGCAAACCTACGAC	TGATGCAACCTCATTTTATTAGGA	۵۷

برنامهٔ حرارتی برای تکثیر ژن هورمون رشد به ترتیب شامل دمای واسرشت‌شدن اولیه ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل دمای واسرشت ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها ۶۵-۵۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵-۳۵ ثانیه، تکثیر قطعهٔ مورد نظر ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و یک سیکل دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم و اجرا شد.

غلظت‌های استفاده‌شده از مواد بعد از بهینه‌سازی برای PCR به ترتیب ۱/۶ میکرولیتر ۲۵mM $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۱/۶ میکرولیتر mM ۱۰ dNTP، ۱۸ پیکومول از هر جفت پرایمر، ۱/۲۵ واحد Taq DNA Polymerase، ۱/۵ میکرولیتر DNA ژنومی بود و تا رسیدن به حجم ۲۵µL از آب مقطر استفاده شد.

توالی‌یابی جایگاه ژن هورمون رشد (GH) و آنالیز توالی‌ها

بعد از تکثیر جایگاه‌های مختلف هورمون رشد برای هر جایگاه ۲۵ نمونه شتر دوکوهانه (ایستگاه جهادآباد اردبیل) و ۵۰ نمونه شتر تک‌کوهانهٔ مناطق مختلف، به ترتیب ۱۵، ۲۰، ۱۵ نمونه از ایستگاه یزد، ایستگاه طرود و شترهای تک‌کوهانهٔ سمنان جهت بررسی تنوع موجود در این جایگاه‌ها و شناسایی چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) توالی‌یابی شد. همهٔ توالی‌ها با استفاده از روش W در نرم‌افزار BioEdit Version 7.0.5 و نرم‌افزار MEGA5، هم‌ردیف و تک‌نوکلئوتیدهای چندشکل از این طریق شناسایی شدند.

تجزیه‌های آماری

چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده ابتدا با نرم‌افزار MEGA 5.1 با استفاده از روش W هم‌تراز شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار DnaSp 5.10 هاپلوتیپ‌ها و فراسنجه‌های مربوط به تنوع ژنتیکی شامل تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیپی و غیره به دست آمدند. بر اساس هاپلوتیپ به‌دست‌آمده بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتید در نرم‌افزار MEGA 5.1 (Tamura *et al*., 2011) شناسایی شد و با استفاده از روش حداقل درست‌نمایی، درخت فیلو ژنتیکی با بیشترین درست‌نمایی بین هاپلوتیپ‌های مختلف ترسیم گردید. یکی از آزمون‌هایی که برای بررسی خنثی‌بودن یا اثرداشتن انتخاب (مصنوعی یا طبیعی) روی جهش یک ژن قابل استفاده است، آمارهٔ D تاجیما است. این آزمون تنوع نوکلئوتیدی حاصل از مشاهدات را با تنوع حاصل از فراوانی آللی در جایگاه‌های چندشکل بررسی می‌کند (Tajima, 1989). فراسنجه‌های تمایز ژنتیکی، فاصلهٔ ژنتیکی و خلوص ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.1 به دست آمدند. برای آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپ‌های به‌دست‌آمده از نرم‌افزار Network V.4.6.1.2 (fluxus-engineering.com) استفاده شد. این نرم‌افزار که جهت ترسیم شبکهٔ فیلوژنیکی به کار گرفته می‌شود، قادر است زمان اشتقاق هاپلوتیپ‌ها را نیز تخمین بزند.

نتایج و بحث

ژن هورمون رشد با استفاده از چهار جفت پرایمر اختصاصی طراحی‌شده، تکثیر شد و بخش‌های مختلف این ژن جداگانه تکثیر و توالی‌یابی شدند. از قسمت تکثیرشده در کل ۱۷۹۴ نوکلئوتید توالی‌یابی گردید و در آن ۶ جایگاه جهش‌یافته مشاهده شد.

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌کنید، بیشتر جهش‌های مشاهده‌شده در ناحیهٔ غیرکدکننده هستند

www.SID.ir

Archive of SID

(در اینترون ۱ و ۴). هرچند این جهش‌ها به تغییر در توالی اسیدآمینه‌ای هورمون رشد منجر نمی‌شوند، ولی ممکن است در تنظیم بیان این ژن و فرایند اسپلایسینگ دخالت داشته باشند (Eberhardt *et al.*, 1996) مطالعات در سایر گونه‌ها نیز نشان داده است که جهش در ناحیهٔ اینترونی هورمون رشد با صفات مرتبط با رشد و لاشه ارتباط دارد (Nie *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2007).

جدول ۲. جهش‌های تشخیص داده‌شده در ژن هورمون رشد در شترهای تک و دوکوهانه

جایگاه ژن	ناحیه	تعداد جهش هاپلوتیپ	تنوع هاپلوتیپی	جایگزینی	موقعیت	تغییر اسیدآمینه	تغییر کدون	تاجیما D
اینترون ۱	۱۵۲-۳۹۴	۲	۰/۶۰۱	A → G T → C	۲۶۷ ۲۸۹	-	-	۰/۷۳۳^{ns}
اگزون ۴	۱۱۵۴-۱۳۱۵	۲	۰/۴۴۳	G → C A → G	۱۱۶۵ ۱۲۷۴	گلوتامات به گلوتامین گلوتامات به گلیسین	CAG GAG → GGG GAG →	۱/۵۳۴*
اینترن ۴	۱۳۱۶-۱۵۹۱	۳	۰/۴۴۳	C → A C → T A → G	۱۳۶۹ ۱۴۱۸ ۱۵۴۵	-	-	۱/۷۶۱*
کل	۱-۱۷۹۴	۷	۰/۷۰۴	-	-	-	-	

ns معنادار نیست، * در سطح ۵ درصد معنادار است.

دو جهش دیگر در ناحیهٔ اگزون است که تغییر دو نوکلئوتید در آن، به تغییر دو اسیدآمینه در ساختار پروتئینی هورمون رشد می‌انجامد. در اگزون ۴ در موقعیت ۱۱۶۵ جایگزینی نوکلئوتید G با نوکلئوتید C، موجب جایگزینی اسیدآمینهٔ اسید گلوتامیک با گلوتامین شده است. همچنین در همین اگزون در موقعیت ۱۲۷۴ جایگزینی باز G با باز C، موجب جایگزینی اسیدآمینهٔ اسید گلوتامیک با گلیسین شده است. مطالعه‌ای روی ۶ نژاد از شترهای سودانی برای تعیین جایگاه‌های دارای جهش در هورمون رشد نسبت به توالی استاندارد بانک ژن (AJ575419) انجام گرفت که در این مطالعه فقط یک جهش مشاهده شد که در موقعیت g.419 اینترون ۱، نوکلئوتید C با T جایگزین شده بود (Ishag *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۴ نژاد شتر سودانی برای همبستگی بین پلی‌مورفیسم‌های ژن هورمون رشد و وزن بدن، ۱۴ جهش مشاهده شد؛ ۷ جهش در موقعیت 5'-UTR و ۵ جهش در اینترون ۱ و یک جهش در اگزون ۲ و یک جهش در اینترون ۲ که اغلب جهش‌ها در نژاد مجاهیم[1] سودان شناسایی شدند (Afifi *et al.*, 2014).

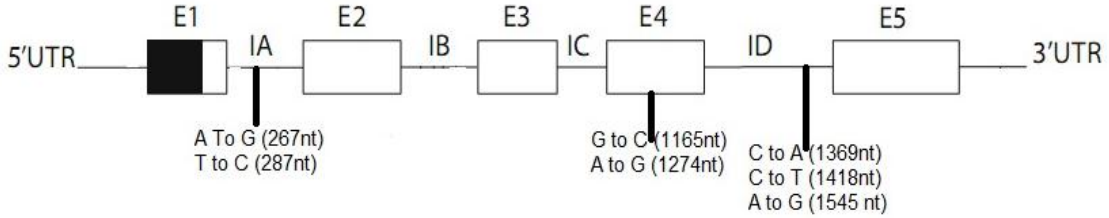
هیچ‌کدام از جهش‌های گزارش‌شده در مطالعهٔ Afifi *et al.* (2014) در مطالعهٔ حاضر مشاهده نشد. در مطالعه روی ژن MYF5 در جمعیت‌های شتر ایران دو جهش متفاوت در ناحیهٔ اگزون ۱ مشاهده شد که باعث تغییر نوکلئوتید A به G و G به A در موقعیت ۹۹ و ۳۶۷ می‌شود؛ با توجه به اینکه این ژن نیز از فاکتورهای مهم در رشد به شمار می‌رود، به نظر می‌آید جمعیت‌های شتر ایران تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی در جایگاه ژن‌های عملکردی دارند که می‌توان از تنوع موجود بعد از ارزیابی ارتباط‌سنجی برای مدیریت برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده کرد (Hedayat-Evrigh *et al.*, 2013).

همان‌طور که از جدول ۲ مشخص است آمارهٔ D برای جهش‌های به‌وجودآمده در اگزون ۴ و اینترون ۴ به‌طور معناداری مثبت است که نشان‌دهندهٔ این است که احتمالاً این جایگاه‌ها تحت انتخاب طبیعی یا مصنوعی بوده‌اند (Tajima, 1989). مطالعهٔ ارتباط جهش‌ها در اگزون ۴ و اینترون ۴ که دارای آمارهٔ D مثبت هستند با صفات تولیدی و تولیدمثلی، همانند مطالعات قبلی (Zhang *et al.*, 2011; Fontanesi *et al.*, 2012; Afifi *et al.*, 2014) می‌تواند توصیه شود.

1. Majaheem

www.SID.ir

Archive of SID

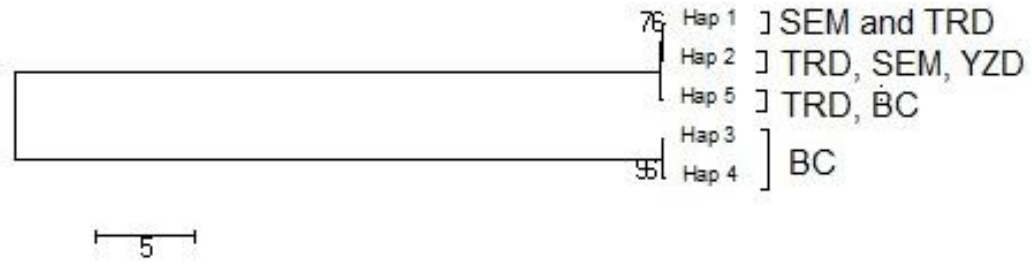


شکل ۱. ساختار ژن هورمون رشد در شتر و محل جایگاه‌های دارای پلی‌مورفیسم در آن

درخت فیلوژنتیکی نمونه‌های مطالعه‌شده بر اساس هاپلوتیپ‌های به‌دست‌آمده در جمعیت‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود دو نوع هاپلوگروپ در جمعیت‌ها مشاهده شده است که یک هاپلوگروپ ویژهٔ شترهای دوکوهانه و شامل هاپلوتیپ‌های Hap3 و Hap4 است؛ البته هاپلوتیپ Hap 5 در بین شترهای دوکوهانه و تک‌کوهانه مشترک است. همان‌طور که مشخص است اشتراک بین شترهای دوکوهانه و تک‌کوهانه فقط در بین جمعیت طرود مشاهده شده است که احتمالاً به این دلیل است که این مرکز از مناطق مختلف شتر جمع‌آوری کرده و در بین نمونه‌ها شترهای دورگهٔ تک‌کوهانه و دوکوهانه وجود داشته است. در واقع ممکن است مخزن ژنی شترهای دوکوهانه از طریق حیوانات دورگ در جمعیت طرود توزیع شده باشد.

بیشترین فراوانی هاپلوتیپی به هاپلوتیپ Hap 2 و Hap 4 به‌ترتیب در جمعیت شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه مربوط است. سه نوع هاپلوتیپ در جمعیت شترهای تک‌کوهانه مشاهده شد که در یک هاپلوگروپ قرار دارند و تنها هاپلوتیپ Hap 2 که بیشترین فراوانی را دارد، در بین سه جمعیت یزد، طرود و سمنان مشترک است. هاپلوتیپ Hap1 فقط در جمعیت طرود و استان سمنان مشاهده شد که می‌تواند به علت نزدیکی این دو جمعیت باشد. آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپ‌ها و جایگاه‌های چندشکلی در شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه در شکل ۳ ارائه شده است و همان‌طور که مشخص است، تفاوت بین این دو گونه در ۵ جایگاه تقریباً مشخص است. آنالیز شبکه‌ای، دو کلاستر اصلی در جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. موقعیت جهش‌های ایجادکنندهٔ کلاستر در شکل نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است وجود ۵ جهش باعث تمایز کلاسترها از هم شده است؛ البته تفاوت کلاستری باید در مورد ایجاد تفاوت فنوتیپی نیز بررسی شود تا از این طریق در صورت معناداربودن تفاوت فنوتیپی بتوان از هرکدام از کلاسترها براساس اهداف مورد نظر در برنامه‌های بهبود جمعیت‌های شتر ایران استفاده کرد.

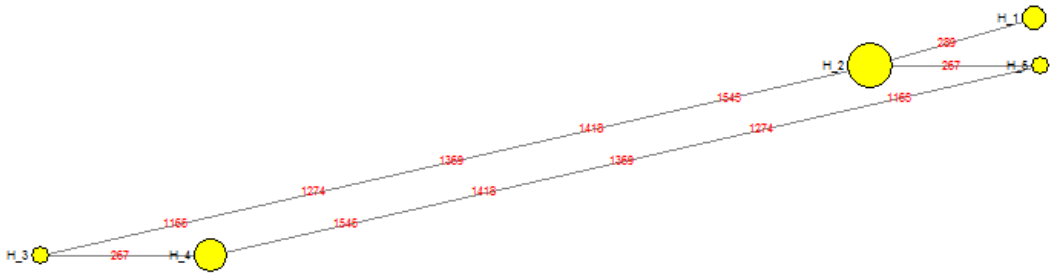
آنالیز تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها، تنوع کمی را در جایگاه ژن هورمون رشد نشان داد. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده، جمعیت ایستگاه یزد از خلوص ژنتیکی بالایی برای این جایگاه برخوردار بوده است و برای جمعیت‌های دیگر نیز تفاوت هاپلوتیپ‌ها با هاپلوتیپ اصلی فقط از طریق یک جهش ایجاد شده است (شکل ۳).



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی بین جمعیت شترهای ایران با استفاده از اطلاعات به‌دست‌آمده از هاپلوتیپ‌ها (شترهای دوکوهانهٔ (BC) جمعیت یزد (YZD)، جمعیت طرود (TRD) و جمعیت سمنان (SEM)).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپ‌های مشاهده‌شده در جمعیت شترهای ایران

جدول ۳. آنالیز تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های شتر در ایران

جمعیت	تعداد هاپلوتیپ	تنوع هاپلوتیپی	تنوع نوکلئوتیدی	آزمون تاجیما D
شترهای تک‌کوهانه (مجموع سه جمعیت طرود، یزد و سمنان)	۳	۰/۶۵۵	۰/۰۰۲۸	^{ns}-۰/۱۵۷۸
شترهای دوکوهانه	۳	۰/۵۱۱	۰/۰۰۰۸	-۱/۴۹۳
شترتک‌کوهانهٔ طرود	۳	۰/۷۵۶	۰/۰۰۳۱	-۰/۶۱
شترتک‌کوهانهٔ یزد	۱	۱	-	-
شترتک‌کوهانهٔ سمنان	۲	۰/۸	۰/۰۰۲۴	-۱/۲۲۲

با توجه به شناسایی دو کلاستر متفاوت در جمعیت شترهای دوکوهانه و وضعیت خطرناک و در حال انقراض آن در کشور به نظر می‌رسد که بتوان از طریق طراحی استراتژی‌های مختلف آمیزشی، تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت را حفظ کرد و در مسیر ارتقا قرار داد. با توجه با اینکه تعداد جمعیت اندک بوده و ممکن است دچار باتل نک[1] شود که می‌تواند به هم‌خونی شدید در جمعیت بینجامد و در نهایت تنوع ژنتیکی موجود از بین برود، با شناخت کلاسترهای مختلف در جمعیت موجود و تلاقی بین آن‌ها و جلوگیری از تلاقی داخل کلاستری می‌توان از شدت هم‌خونی کاست و با ایجاد هتروزیگوسیتی بیشتر، علاوه بر حفظ تنوع زیستی از نتایج هتروزیس آن نیز در راستای بهبود صفات تولیدی بهره جست.

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، آمارهٔ D برای جمعیت‌های مختلف منفی است. کم‌بودن تعداد، کاهش‌های ناگهانی تعداد افراد جمعیت[2] (Maruyama and Fuerst 1985)، تغییر مسیر انتخاب و گسترش یا افزایش اندازهٔ جمعیت باعث منفی‌شدن آمارهٔ D می‌شود (Charlesworth *et al.*, 1993). آمارهٔ D نشان‌دهندهٔ فاصلهٔ ژنتیکی استاندارد است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، فاصلهٔ ژنتیکی (آمارهٔ D) بین جمعیت شترهای تک‌کوهانه، کم و بین ۰/۰۰۰۲ تا ۰/۰۰۰۳ است و فاصلهٔ ژنتیکی برای شترهای دوکوهانه در مقایسه با جمعیت‌های شترهای تک‌کوهانه، بیشتر و در دامنهٔ ۰/۰۰۳۵ تا ۰/۰۰۳۸ است.

تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس Fst در جدول ۴ آمده است. در این ژن همان‌طور که انتظار داریم بین جمعیت شترهای دوکوهانه و تک‌کوهانه تمایز ژنتیکی زیادی وجود دارد. به دلیل فاصلهٔ مکانی زیاد بین جمعیت یزد و سمنان، تمایز ژنتیکی این دو نژاد (Fst =۰/۲) در بین شترهای تک‌کوهانه بیشترین است. جمعیت طرود با توجه به اینکه مرکز ذخایر ژنتیکی شتر در کشور به حساب می‌آید و شترهای آن از مناطق مختلف جمع‌آوری شده است، در مجموع در مقایسه با شترهای تک‌کوهانه، تمایز ژنتیکی کمی نشان می‌دهد که در مقایسه با جمعیت سمنان و یزد به دلیل ارتباط ژنتیکی بیشتر می‌توان این جمعیت را از نظر جایگاه موردمطالعه بین دو جمعیت دیگر دانست (با جمعیت یزدFst=۰/۰۷۴ و با جمعیت سمنان Fst=۰/۰۸۹).

وجود Fst منفی می‌تواند به دو سبب باشد: نخست اینکه جایگاه چندشکلی دارای آلل تفکیکی در دو

1. Bottle neck
2. Bottlenecks

www.SID.ir

Archive of SID

جمعیت موردبررسی بوده باشد، در حالی که توزیع فراوانی آلل‌ها بین دو جمعیت متفاوت نباشد که در این حالت در نظر گرفتن عدم تمایز ژنتیکی می‌تواند منطقی باشد. دوم اینکه Fst منفی زمانی می‌تواند مشاهده گردد که توزیع فراوانی آلل‌ها در جایگاه نشانگر به مقدار زیادی چولگی نشان دهد. این چولگی زمانی ایجاد می‌شود که جایگاه نزدیک به حالت مونومورف باشد و چندشکلی توسط تعداد کمی از افراد مشاهده شود که نتیجه آن در نظر گرفتن عدم تمایز ژنتیکی است (Roesti *et al.*, 2012).

جدول ۴. آنالیز تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های شتر در ایران

جمعیت	شترهای دوکوهانهٔ اردبیل	شترتک‌کوهانهٔ طرود	شترتک‌کوهانهٔ یزد	شترتک‌کوهانهٔ سمنان
شتر دوکوهانهٔ اردبیل	-	۰/۸۲۴	۰/۸۷۲	۰/۸۳۲
شتر تک‌کوهانهٔ طرود	۰/۰۰۳۶	-	۰/۰۷۴	۰/۰۸۹
شتر تک‌کوهانهٔ یزد	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۰۲	-	۰/۲
شتر تک‌کوهانهٔ سمنان	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۲	-

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه ۶ جهش و ۵ هاپلوتیپ در ژن هورمون رشد در شترهای بومی ایران مشاهده شد که ۲ جهش به تغییر اسیدآمینه‌ای می‌انجامد. از نظر فاصلهٔ ژنتیکی جایگاه کدکنندهٔ هورمون رشد، شترهای دوکوهانه بیشترین فاصلهٔ ژنتیکی را به ترتیب از جمعیت‌های سمنان، کل جمعیت‌های تک‌کوهانه، طرود و یزد داشته‌اند. با توجه به اینکه جهش ایجادشده باعث تغییر اسیدآمینه می‌شود، ممکن است باعث تغییر در فنوتیپ کل حیوانات شود؛ بنابراین به نظر می‌رسد بعد از ارزیابی ارتباط‌سنجی با صفات تولیدی و در صورت معناداربودن، می‌توان در مدیریت برنامه‌های اصلاح نژادی (انتخاب به کمک ژن) از این جهش‌ها استفاده کرد.

REFERENCES

1. Afifi, M., Metwali, E. & Brooks, PH. (2014). Association between growth hormone single nucleotide polymorphism body weight in four Saudi camel (*Camelus dromedarius*) breed. *Pakistan Veterinary Journal*. (PRINT), 2074-7764 (ONLINE).
2. Ahmad, S., Yaqoob, M., Hashmi, N., Ahmad, S., Zaman, MA. & Tariq, M. (2010). Economic importance of camel: unique alternative under crisis. *Pakistan Veterinary Journal* 30(x): xxx.
3. Bižienė, R., Miceikienė, I., Baltrėnaitė, L. & Krasnopiorova, N. (2011) Association betwwen growth hormone gene polymorphism economic tratis in pig. *Veterinarija ir Zootechnika*, (78), 27-31.
4. Charlesworth, B., Morgan, MT. & Charlesworth, D. (1993). The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics*, 134, 1289-1303.
5. Eberhardt, NL., Jiang, SW., Shepard, AR., Arnold, AM. & Trujillo,, MA. (1996) Hormonal cell-specific regulation of the human growth hormone chorionic somatomammotropin genes. *Progress in Nucleic Acid Research Molecular Biology*, 54, 127-163.
6. Fontanesi, L., Dall'Olio, S., Spaccapaniccia, E., Scotti, E., Fornasini, D., Frabetti, A. & Russo, V. (2012). A single nucleotide polymorphism in the rabbit growth hormone (GH1) gene is associated with market weight in a commercial rabbit population. *Livestock Science*, 147(1-3), 84-88
7. FAO. (2014). FAOSTAT. Food and Agricultural Commodities Production. Available at http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QA/E Accessed 13 AUG 2014.
8. Forsyth, IA. & Wallis, M. (2002). Growth hormone prolactin-molecular functional evolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(3), 291-312.
9. Geldermann, H. (1996). Analysis of gene effects on performance characteristics. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 103(10), 378.
10. Hedayat-Evrigh, N., Ashtiani, SRM. & Moradi Shahrbabak, M. (2012). Comparison of Iranian one and two humped camels based on MYF5 gene associated with growth traits. *Agricultural Biotechnology*, 3(2), 33-40. (in Farsi)
11. Ishag, IA., Reissmann, M., Peters, KJ., Musa, LM-A. & Ahmed, M-KA. (2010). Phenotypic molecular characterization of six Sudanese camel breeds. *South African Journal of Animal Science*, 40(4), 319-326.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Kadim, IT., Mahgoub, O. & Purchas, RW. (2008). A review of the growth of the carcass meat quality characteristics of the one-humped camel (*Camelus dromedaries*). *Meat Science*, 80, 555-569.
13. Katoh, K., Kouno, S., Okazaki, A., Suzuki, K. & Obara, Y. (2008). Interaction of GH polymorphism with body weight endocrine functions in Japanese black calves. *Domestic Animal Endocrinology*, 34(1), 25-30.
14. Louveau, I. & Gondret, F. (2004). Regulation of development metabolism of adipose tissue by growth hormone the insulin-like growth factor system. *Domestic Animal Endocrinology*, 27(3), 241-255
15. Maruyama, T. & Fuerst, PA. (1985). Population bottlenecks non-equilibrium models in population genetics II number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*, 111, 675-689.
16. Nie, Q., Sun, B., Zhang, D., Luo Ishag, NA., Lei, M., Yang, G. & Zhang, X. (2005). High diversity of the chicken growth hormone gene effects on growth carcass traits. *Journal of Heredity*, 96(6), 698-703
17. Roesti, M., Salzburger, W. & Berner, D. (2012). Uninformative polymorphisms bias genome scans for signatures of selection. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 94.
18. Sejrsen, K., Purup, S., Vestergaard, M., Weber, M. & Knight, C. (1999). Growth hormone mammary development. *Domestic Animal Endocrinology*, 17(2), 117-129.
19. Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by dna polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595
20. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*, 28(10), 2731-2739.
21. Thomas, MG., Enns, RM., Shirley, KL., Garcia, MD., Garrett, AJ. & Silver, GA. (2007). Associations of DNA polymorphisms in growth hormone its transcriptional regulators with growth carcass traits in two populations of Brangus bulls. *Genetics Molecular Research*, 6, 222-237
22. 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 superovulation response in goat-breeds. *Genetics Molecular Biology*, 34(1), 49-55.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Animal Science, Vol. 46, No. 4, Winter 2016

Characterization and diversity of growth hormone gene sequences in Iranian dromedary and Bactrian Camels

Nemat Hedayat ivarigh[1*], Seyed Reza Miraei-Ashtiani[2], Mohammad Moradi Shahrbabak[3] and Saber Mohammad Maghsoodi[4]

1. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, University of Mohaghegh Ardabili, Daneshgah Street, Ardabil, Post Code 519911367, I.R. Iran

2, 3, 4. Professors and Ph. D. Student, Department of Animal Science, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Post Code 31587-77871, I.R. Iran

(Received: Jan. 12, 2015 - Accepted: Sep. 26, 2015)

ABSTRACT

Camel is a resistant species to drought and cold weather and produces milk and meat in harshest environmental condition. Camel population in Iran has been decreasing during last decades, and genetic studies are quite necessary for considering the conservation and productivity of this species. In this study growth hormone gene influencing growth, milk production and reproduction was considered. The blood samples were collected from 25 Bactrian (Ardebil province) and 50 dromedary camels (Yazd province (n=15), Toroud Camel Research Station (n=20) and Semnan province (n=15)), and DNA was extracted. Using sequencing and alignment method, seven mutations were detected in GH gene. Two of them were substitution mutation and changed amino acid sequence of growth hormone protein. The results of genetic distance analysis showed that the genetic distance between Bactrian and one-humped camel was the highest. Within dromedary camels, the camels of Yazd and Semnan provinces showed biggest genetic distance and camels of the Toroud camel research station were Intermediate of two populations.

Keywords: bactrian camels, dromedary camels, genetic distance, growth hormone, mutation, substitution mutation.

* Corresponding author E-mail: nhedayat@uma.ac.ir Tel: +98 914 1973681

www.SID.ir