

## 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<sup>۱\*</sup>، زهرا نوروزی<sup>۲</sup>، رضا سیدشریفی<sup>۳</sup> و حسین عبدی<sup>۴</sup>

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 به ترتیب 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 به طوری‌که 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. به ترتیب استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده مهندسی علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی،

اردبیل، ایران

Email: nhedayat@uma.ac.ir

\* نویسنده مسوول

www.SID.ir

هورمون رشد گزارش شده است. تزریق استروژن و آندروژن پاسخ به هورمون رشد را افزایش می‌دهد. در حضور هورمون رشد هورمون‌های جنسی IGF-I پلازما افزایش می‌یابد 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 هترودايمر گیرنده هورمون رشد و گیرنده پرولاکتین در بافت سینه می‌شود که در نهایت 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 متابولیسمی مانند رشد، تولید مثل، پیری و پاسخ‌های ایمنولوژیکی 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 غدد پستانی مؤثر می‌باشد. به دلیل اثر افزایش‌دهنده استروژن بر ترشح هورمون رشد اثر هورمون رشد در جنس ماده بیش‌تر از جنس نر است.

مطالعات مختلفی اخیراً بر روی بررسی تنوع ژنتیکی در ژن هورمون رشد در گونه‌های مختلف مزرعه‌ای مانند گاو هراندز 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 (DirEx™ 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

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 آلباین 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 هیپوتلاموس ترشح و دارای چندین نقش و وظایف مهم در بدن از جمله تأثیر بر رشد، میزان شیردهی، سلامتی و غیره است (Ayuk and Sheppard, 2006). علاوه بر 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., 2001; Malveiro et al., 2003). تنوع بالای ژنتیکی در اگزون‌های ۴ و ۵ در نژادهای بنگال (Bangal goat)، سیروهی (Sirohi goat) و جاکرانا (Jakhrana goat) گزارش شده است (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 کاتابولیسیم عمومی و آزادسازی مواد غذایی از بافت‌های هدف مثل کاهش گلوکز، اسید آمینه و اسید چرب و همچنین افزایش لیپولیسیم، گلیلیکو ژئولیز، گلوکونئولیسیم می‌باشد (An et al., 2010).

گیرنده‌های هورمون یا در سطح سلول یا در داخل سلول می‌باشند. به‌طور کلی گیرنده‌های سطح سلولی اعمال هورمون‌های پلی پپتیدی کاتیکول آمین‌ها و پروستوگلانندین‌ها را میانجی می‌نمایند. اثر متقابل بین هورمون‌های جنسی و

بارگذاری شد. و با روش نیترا نقره رنگ آمیزی شد. سپس الگوهای مختلف بانندی در ژن های مورد بررسی ارزیابی و مشخص شد.

### توالی یابی جایگاه ژن هورمون رشد و آنالیز توالی ها

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 کره جنوبی توالی یابی گردید. توالی های به دست آمده با نرم افزار BioEdit هال (Hall, 2004) و با الگوریتم روش Clustal W در نرم افزار هم ردیف شده و چندشکلی های تک نوکلئوتیدی شناسایی شدند. سپس با نرم افزار DnaSp 5.10 لیبرادو و روزاس (Librado and Rozas, 2009) هاپلوتیپ ها و فراسنجه های مربوط به تنوع ژنتیکی شامل تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیپی و غیره محاسبه گردید. جهت بررسی اثر جهش های ایجاد شده بر روی تغییرات احتمالی اسید آمینه 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 چندشکلی های مشاهده شده با

#### صفات مختلف

بررسی اثر هاپلوتیپ های مشاهده شده با صفات تولیدی و اقتصادی صفات شیر در جمعیت بزهای خلخال با رویه GLM نرم افزار SAS 9.2 و مدل زیر واکاوی شد:

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

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

$\mu$ : میانگین کل صفات مورد بررسی

$G_i$ : 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 این که رکوردها از حیوانات هم سن و دوره شیری مشابه استفاده شد لذا این عوامل در معادله مدل آورده نشد اثر چندقلو زایی به دلیل معنی دار نبودن از معادله مدل حذف گردید عوامل دیگری نیز در دسترس نبود. تجزیه اثر هاپلوتیپ ها بر صفت چندقلو زایی با استفاده از آزمون کای اسکور در رویه Logistic نرم افزار SAS 9.2 انجام گرفت. مقایسه میانگین ها در

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) اندازه گیری شد. هم چنین داده های مربوط به تولید شیر و تیپ زایش (تک قلو، دو قلو و سه قلو بودن) که توسط مرکز اصلاح نژاد کشور در طرح اصلاح نژاد بزهای خلخال بر اساس ۷۰ روز شیردهی ثبت شده بود، دریافت گردید. داده های 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'-ATTACAGCTGCCTGCCCTT-3' و برگشت 5'-CACATCTGCTTACCTTACCCG-3 که در مطالعه بهرامی و همکاران (Bahrami et al., 2013) گزارش شده است یک قطعه ۲۹۵ جفت بازی از اگزون ۴ از جایگاه ژن هورمون رشد (GH) بر اساس برنامه حرارتی، دمای واسرشت شدن اولیه ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه به ترتیب واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها ۶۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و بسط ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر شد.

مقادیر مورد استفاده از مواد بعد از بهینه سازی برای تکثیر جایگاه ژن هورمون رشد برای انجام PCR به ترتیب ۲/۵ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۵ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از ماستر میکس شرکت زیست فناوری پیشگام (Taq DNA Polymerase Mix Red-MgCl2 (1.5mM) (با غلظت 1.5mM کلرید منیزیم MgCl2 و ۱ واحد آنزیم Taq پلی مراز و 0.2mM از dNTP و بافر 1x)، مابقی را تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر از آب مقطر استفاده شد. برای تعیین الگوهای و چندشکلی موجود قطعه تکثیر شده از روش PCR-SSCP استفاده شد. برای انجام SSCP، ۱۲ میکرولیتر محلول دای (-) 0.025% xylene-10mM، 98% formamide (EDTA-cyanol) 0.025% bromophenol را با ۵ میکرولیتر محصول PCR مخلوط کرده سپس در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد سپس جهت تثبیت تک رشته ای DNA سریع بر روی یخ انتقال داده به مدت ۱۰ دقیقه در فریز ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید نمونه ها تثبیت شده در ژل اکریل آمید ۱۲ درصد به طول ۱۶ سانتی متر

اسید آمینه‌ای از سیستئین به گلیسین مشاهده شد. اسید آمینه گلیسین یک نوع اسید آمینه غیرقطبی و آبگریز است ولی اسید آمینه سیستئین یک اسید آمینه قطبی و از طریق ایجاد پیوند هیدروژنی قابل حل در آب است. درحالی که دو نوع تغییر دیگر نیز در یک گروه اتفاق افتاده است به این صورت که تغییر تیروزین به سیستئین یک تغییر در گروه اسید آمینه‌های قطبی و تغییر لوسین به پرولین یک تغییر در گروه اسید آمینه‌های 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 مورد مطالعه منجر به شناسایی چهار هاپلوتیپ در جامعه شد که مشابه الگوهای مشاهده شده در آنالیز SSCP است میزان تنوع ژنتیکی و تنوع هاپلوتیپی به ترتیب ۰/۰۰۷۸ و ۰/۹۰ به دست آمد.

#### ارتباط هاپلوتیپ‌های شناسایی شده با صفت چندقلوزایی

با توجه به این که بزها تنوع زیادی از لحاظ چندقلوزایی دارند و چندقلوزایی یک صفت اقتصادی مهم در بز به شمار 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  $\chi^2$  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).

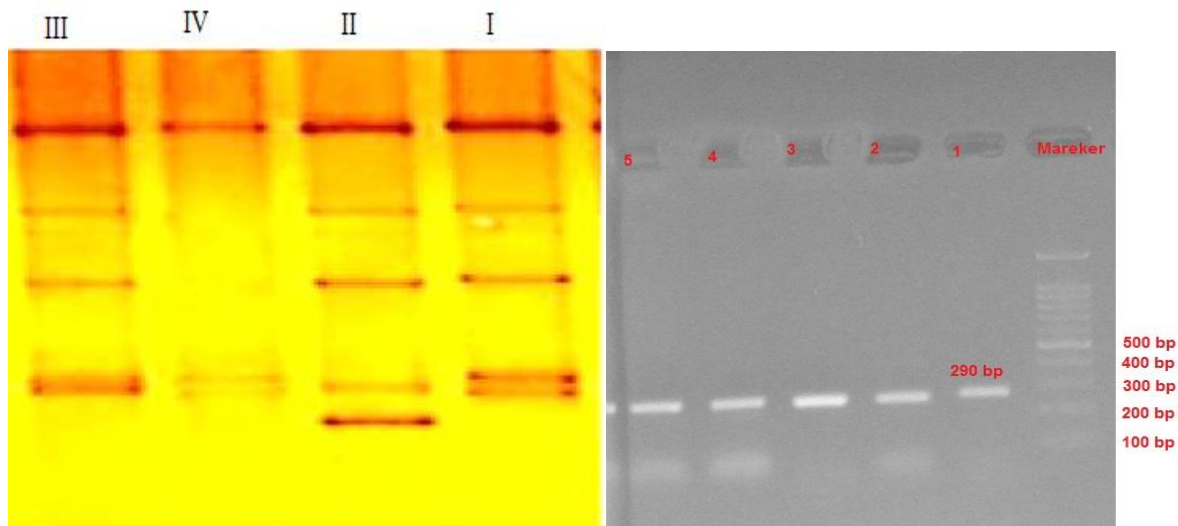
صفات تولیدی شیر با روش حداکثر اختلاف معنی‌دار توکی رویه GLM انجام گرفت.

#### 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 Nejad et al., 2012) بود. میزان فراوانی ژنوتیپ‌ها برای ژنوتیپ I, II, III و IV به ترتیب ۰/۲۴، ۰/۴۶، ۰/۱۷ و ۰/۱۳ به دست آمد که نشان‌دهنده میزان فراوانی مناسب از هر کدام 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.

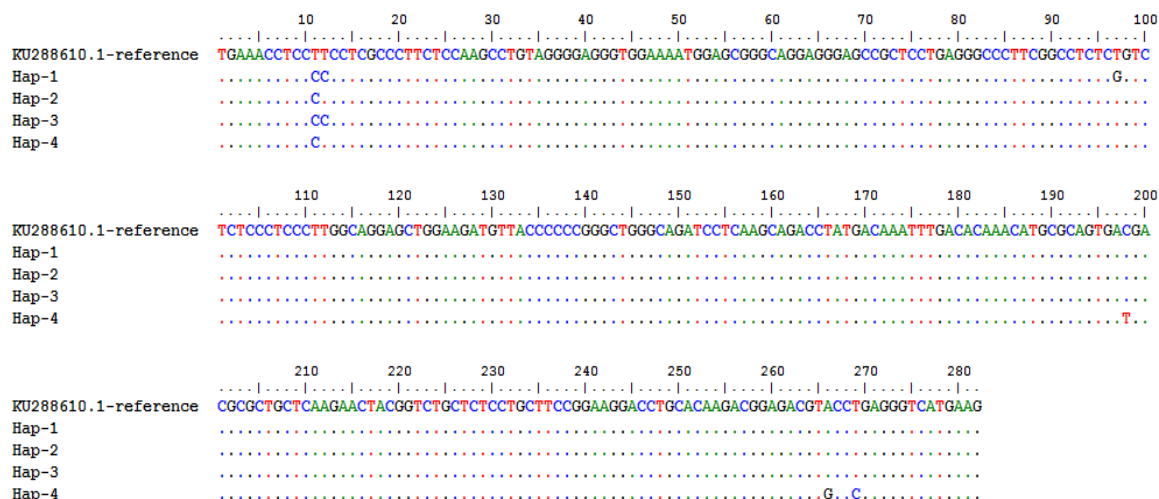
نتایج حاصل از آنالیز توالی‌یابی منجر به شناسایی ۵ جایگاه جهش در ناحیه ۲۹۰ جفت بازی ژن هورمون رشد گردید که باعث ایجاد چهار هاپلوتیپ با ترکیب ژنوتیپی مختلف شد (شکل ۲). با توجه به این که برنامه اصلاح نژادی مدونی برای بزهای خلخالی در ایران انجام نگرفته است و با توجه به واریانس بالا در فنوتیپ‌های تولید شیر به نظر 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 کاپاکازین 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 به ترتیب باعث جایگزینی نوکلئوتیدهای C به T, T به G, C به T, A به G و T به C به ترتیب 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). همان‌طور که 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. همان‌طور که 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



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 اسید آمینه 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	سستین 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 سستین 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 compstion and littersize in Khalkhali goats

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

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

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 فولیکوژنیزس 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 هورمون 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 به دلیل عدم تعادل لینکاژی تأثیر معنی داری در اصلاح دام‌های مزرعه‌ای دارد به نظر 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.

همان‌طور که مشاهده می‌شود هاپلوتیپ‌های شناسایی شده تأثیر متفاوتی بر صفت چندقلوزایی داشتند. براساس نتایج به‌دست آمده، هاپلوتیپ II (۲/۱۵۹ قلو) بهترین هاپلوتیپ برای صفت چندقلوزایی بوده ولی تفاوت معنی داری با هاپلوتیپ‌های I و III ندارد ولی نسبت به هاپلوتیپ IV (۱/۴۰ قلو) تفاوت معنی داری 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. طوری که 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، فولیکوژنیزس و بلوغ اووسیت باعث بهبود باروری می‌شود. در استئیدوژنز تغییرات زمانی ترشح استرادیول و پروژسترون برای



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 به صورت 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.

## 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. همان‌طور که 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

## منابع:

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