بررسی چند شکلی ژنتیکی و فراوانی آللی جایگاه ژنی *GHRH* (Growth-hormone-releasing hormone) در گاوهای سرابی ایران

مهدی خسروی[1*]، مهدی امین افشار[1]، محمد چمنی[1]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات تهران، گروه علوم دامی، تهران، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: mahdi_khossravi@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۲/۴/۱۶ پذیرش نهایی: ۹۲/۸/۲۳)

چکیده

انتخاب حیوان بر اساس نشانگرهای مولکولی یکی از جدیدترین روش‌های اصلاحی است که می‌تواند باعث بهبود صحت پیش‌بینی و پاسخ به انتخاب شود. *GHRH* (Growth-hormone-releasing hormone) یکی از ژن‌های برگزیده برای استراتژی‌های انتخاب بر اساس مارکر می‌باشد. بر اساس گزارشات موجود، چندشکلی‌های ژن به طور معنی‌داری با صفات اجزای شیر و تولید آن ارتباط دارد. به منظور بررسی چندشکلی (پلی‌مورفیسم) مکان ژنی *GHRH* در نژاد سرابی، از ۱۱۲ رأس گاو خونگیری انجام شد. DNA ژنومی نمونه‌های خون استخراج گردید و قطعه ۲۹۷ جفت باز از این ژن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. قطعه تکثیر شده به‌وسیله آنزیم محدودکننده *Hae*III مورد برش قرار گرفت و روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید. نتایج نشان داد که در این جایگاه دو آلل $GHRH^A$ و $GHRH^B$ وجود دارد که فراوانی آنها در کل جمعیت به‌ترتیب ۰/۱۹ و ۰/۸۱ محاسبه گردید. سه ترکیب ژنوتیپی $GHRH^A GHRH^A$، $GHRH^A GHRH^B$ و $GHRH^B GHRH^B$ شناسایی شدند که فراوانی‌های ژنوتیپی محاسبه شده آنها در کل جمعیت به‌ترتیب برابر ۰/۰۳۵۷، ۰/۳۰۳۷ و ۰/٦٦۰۷ بود. آزمون مربع کای تعادل هاردی- واینبرگ را در جمعیت نشان داد ($p>0/05$). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در نژاد گاو سرابی می‌تواند به برنامه‌های انتخابی آینده مخصوصاً انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی (MAS) کمک نماید.

مجله آسیب شناسی درمانگاهی دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۷، شماره ۲، پیاپی ۲٦، صفحات ۱۹۰٤-۱۸۹۸.
کلید واژه‌ها: گاو سرابی، *GHRH*، چند شکلی ژنتیکی

مقدمه

گاوهای بومی به عنوان ذخایر ژنتیکی کشور محسوب می‌شوند و شناسایی استعداد تولید آنها و تکثیرشان پس از اصلاح نژاد یک اصل مهم به شمار می‌رود. با توجه به اینکه گاو و گاومیش نقش مهمی در اقتصاد کشاورزی و دامپروری بسیاری از کشورهای جهان به ویژه کشورهای آسیایی دارند، و با توجه به نیاز به افزایش تولید عمودی، لازم است که تحقیقات کاملی در

این مورد انجام شود (Asri, 2002). توده گاو سرابی به عنوان یکی از ذخایر ژنتیکی مهم گاوهای بومی کشور به شمار می‌آید که حفاظت از آنها برای نسل‌های آینده نیز ضروری است زیرا در بسیاری موارد با گذشت زمان و پیشرفت علم و آگاهی بیشتر نسبت به اهمیت اقتصادی صفات مختلف، نیازهای جدید مطرح می‌شود که متخصصین اصلاح نژاد را بر آن می‌دارد تا از ژن‌های مربوط به حیوانات بومی که قبلاً اهمیت زیادی به آنها داده نمی‌شد، استفاده نمایند (Torbati, 2005). هیپوتالاموس نقش بسیار مهمی در ترشح هورمون‌ها بر عهده دارد هیپوتالاموس توسط ساقه‌ای به غده هیپوفیز وصل می‌شود. در این ساقه یک سیستم وریدی باب و همچنین آکسون‌های سلول‌های عصبی هیپوتالاموس وجود دارند که ارتباط این دو غده را برقرار می‌کنند. هورمون رشد (*GH*، سوماتوتروپین) توسط بخش پیشین غده هیپوفیز که یک غده درون‌ریز است، ترشح می‌شود و هیپوتالاموس توسط هورمون آزادکننده *GHRH* (*Growth Hormone-releasing Hormone*) و هورمون مهار کننده SRLF (سوماتوستاتین) ترشح هورمون رشد را از هیپوفیز قدامی کنترل می‌کند. هورمون محرک هورمون رشد *GHRH* (Somatoliberlin) یک هورمون آزادکننده پلی‌پپتیدی است که از غده هیپوتالاموس ترشح می‌شود و توسط سیستم وریدی باب در ساقه هیپوفیز به غده هیپوفیز می‌رسد. کار هورمون *GHRH* آزاد کردن و تحریک ترشح هورمون رشد از غده هیپوفیز است. این هورمون بر قسمت قدامی هیپوفیز یعنی هیپوفیز پیشین اثر می‌گذارد و باعث ترشح هورمون رشد از این غده می‌شود (Frohman et al., 1992). هورمون *GHRH* با یک‌سری گیرنده‌های ویژه که در هیپوفیز پیشین قرار گرفته است، باند شده و باعث ترشح هرمون رشد می‌گردد (Frohman et al., 1992). هورمون سوماتولیبرلین یک پلی‌پپتید شامل ٤٤ آمینو اسید می‌باشد. ژن *GHRH* گاوی بر روی کروموزوم ۱۳ واقع شده است (Barendse et al., 1994) و شامل ۵ اگزون است (Zhou et al., 2000). در سال ۱۹۹۵ برای اولین بار Moody و همکاران جایگاه ژنی *GHRH* را با استفاده از روش PCR-RFLP و آنزیم *Hae*III مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق رابطه بین آلل‌های حاصل از این جایگاه با صفات تولید شیر در گاوهای هلشتاین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج شان داد که ژنوتیپ $GHRH^{A}$ $GHRH^{A}$ رابطه معنی‌داری با افزایش تولید و درصد چربی شیر دارد (Moody et al., 1995). هدف از تحقیق حاضر، شناسایی چند شکل‌های موجود در ژن هورمون آزادکننده فاکتور رشد و برآورد میزان فراوانی فرم‌های آللی و ژنوتیپی مختلف آن برای این جایگاه در گاو های سرابی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

از تعداد ۱۱۲رأس گاوهای سرابی موجود در مرکز پشتیبانی گاو سرابی خونگیری به‌عمل آمد. برای جلوگیری از انعقاد خون به میزان ۰/۱ حجم نمونه‌ها، محلول EDTA (۰/۵ مولار با pH=۸) اضافه شد. استخراج DNA از ۱۰۰ میکرولیتر خون با استفاده از روش گوانیدین سیلیکا ژل انجام شد. این روش استخراج مبتنی بر استفاده از ایزوتیوسیانات گوانیدین به عنوان یک عامل لیز کننده سلول‌های خونی و جمع‌آوری DNA آزاد شده به کمک ذرات سیلیکا می‌باشد (Boom et al., 1989). جهت تعیین چند

شکلی از روش PCR-RFLP استفاده شد. قطعه ۲۹۷ جفت بازی جایگاه *GHRH* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی زیر تکثیر گردید (Moody et al., 1995).

GHRHF – 5'-TTCCCAAGCCTCTCAGGTAA-3'
GHRHR – 5'-GCGTACCGTGGAATCCTAGT-3'

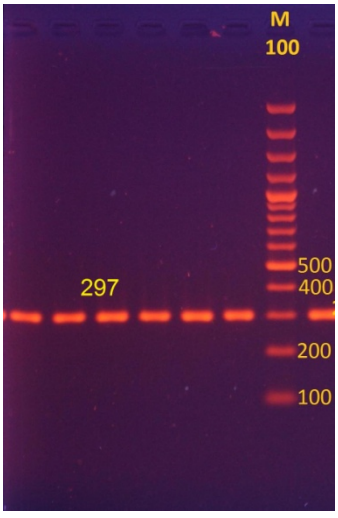
برنامه PCR شامل ۳۵ سیکل تکثیر با دمای واسرشت شدن اولیه ۹٤°c (به‌مدت ۵ دقیقه)، دمای واسرشت ثانویه ۹٤°c (به‌مدت ۱ دقیقه) ، دمای اتصال ٦۰°c (به‌مدت ۵۰ ثانیه) ، دمای تکثیر ۷۲°c (به‌مدت ۵۰ ثانیه) و تکثیر نهایی دمای ۷۲°c (به‌مدت ۵ دقیقه) است. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. فراوانی آلل‌ها، هتروزیگوسیتی و تعداد آلل مؤثر با استفاده از نرم افزار PopGen32 محاسبه شد.

هضم آنزیمی محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدودالاثر *Hae*III به مدت ۳ ساعت در دمای۳۷ درجه سلسیوس انجام گرفت. واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر و واکنشگرها شامل۵ میکرولیتر محصول PCR ، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۵ واحد آنزیم برشی و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر بودند. پس از هضم آنزیمی، محصولات هضم با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۲ درصد و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده شدند.

یافته‌ها

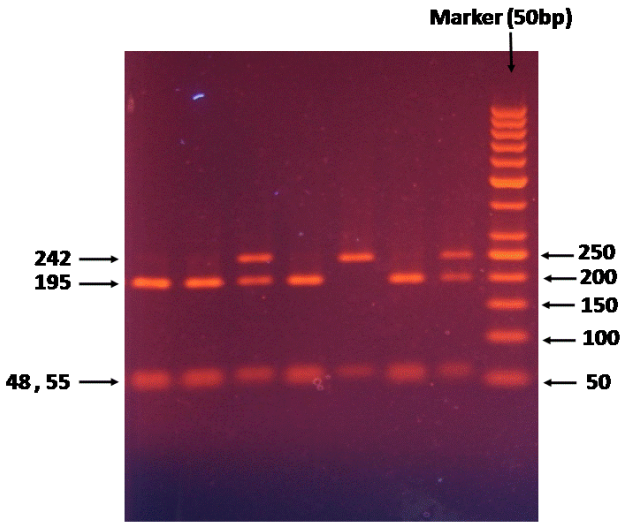
استخراج DNA با روش تیوسیانات گوانیدین سیلیکاژل مقادیر بالایی از DNA ژنومی (حدودng ۷۰) را حاصل کرد که با اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید.

نتیجه واکنش پلیمراز، تکثیر قطعه ۲۹۷ جفت بازی از ژن *GHRH* را تأیید می کند (شکل ۱). مقایسه باندهای موجود در نمونه‌های هضم شده با آنزیم *Hae*III با نشانگر وزنی M50bp بر روی ژل آگارز در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱- محصولات PCR ژن *GHRH* (قطعه۲۹۷ جفت‌بازی) روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ . نشانگر ملکولی مورد استفاده M100 می‌باشد.

با بررسی قطعات حاصل از هضم سه ژنوتیپ $GHRH^{A}\ GHRH^{A}$، $GHRH^{A}\ GHRH^{B}$ و $GHRH^{B}\ GHRH^{B}$ شناسایی شد (شکل ۲).



شکل۲- الگوهای باندی حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۲درصد

در آلل $GHRH^{A}$ از قطعه تکثیر یافته، یک جایگاه و در آلل $GHRH^{B}$ دو جایگاه برش برای آنزیم *Hae*III وجود دارد. در نتیجه، هضم آنزیمی آلل $GHRH^{A}$ محصولات هضمی ۵۵ bp و ۲۴۲ را تولید می‌نماید و محصولات هضمی آلل $GHRH^{B}$ شامل باندهای ۴۸ bp، ۵۵ و ۱۹۵ است. در نتیجه ژنوتیپ $GHRH^{A}\ GHRH^{A}$ دارای دو باند ۵۵ bp و ۲۴۲ ، ژنوتیپ $GHRH^{B}\ GHRH^{B}$ دارای سه باند ۴۸ bp، ۵۵ و۲۴۲ و ژنوتیپ $GHRH^{A}\ GHRH^{B}$ دارای چهار باند ۴۸ bp، ۵۵، ۱۹۵ و۲۴۲ می‌باشند. ژنوتیپ $GHRH^{B}\ GHRH^{B}$ بیشترین تعداد و فراوانی را در گله مورد بررسی نشان داد. فراوانی آللی برای آلل‌های $GHRH^{A}$ و $GHRH^{B}$ به ترتیب ۰/۱۹ و ۰/۸۲ بدست آمد. آزمون مربع کای، برقراری تعادل هاردی واینبرگ را در گله نشان داد (جدول ۱).

جدول۱- فراوانی ژنوتیپی و آللی ژن *GHRH* و آزمون‌های مربع کای

ژنوتیپ	تعداد	فراوانی ژنوتیپی ٪	فراوانی آللی		آزمون مربع کای (χ^2)
			$GHRH^{A}$	$GHRH^{B}$	
$GHRH^{A}\ GHRH^{A}$	٤	۳/۵۷	۰/۱۹	۰/۸۱	۰/۰۰۷^{ns}
$GHRH^{A}\ GHRH^{B}$	۳٤	۳۰/۳٦			
$GHRH^{B}\ GHRH^{B}$	۷٤	٦٦/۰۷			

ns: χ^2 غیر معنی‌دار (p>۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

در سال ۲۰۰۶ مطالعه‌ای روی ۸۸۱ رأس گاو سیاه و سفید لهستان انجام گرفت، که فراوانی‌های ژنوتیپی محاسبه شده برای سه ترکیب ژنوتیپی $GHRH^{A}$ $GHRH^{B}$، $GHRH^{A}$ $GHRH^{A}$ و $GHRH^{B}$ $GHRH^{B}$ در کل جمعیت به‌ترتیب برابر با ۰/۰۵۴۵، ۰/۳۱۳ و ۰/۶۳۲ بود. در این پژوهش محققان ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مرفیسم جایگاه ژنی *GHRH* و تولید شیر پیدا نکردند (Dybus et al., 2006). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۳ روی ۱۳۰ راس گاو لیموزین صورت گرفت فراوانی ژنوتیپی برای ژنوتیپ‌های $GHRH^{A}$ $GHRH^{A}$، $GHRH^{A}$ $GHRH^{B}$ و $GHRH^{B}$ $GHRH^{B}$ به ترتیب ۰/۰۱۵۴، ۰/۱۶۹۲ و ۰/۸۱۵۴ بود (Dybus et al., 2003).

آزمون مربع کای، برقراری تعادل هاردی واینبرگ را در گله نشان داد که گویای این مطلب است که هیچگونه انتخابی در جمعیت در جهت افزایش یا کاهش ژنوتیپ‌های ژن *GHRH* صورت نگرفته است (جدول ۱).

میزان تغییرات ژنتیکی در داخل یک جمعیت با اندازه‌گیری هتروزیگوسیتی و تعداد آلل مؤثر مکان ژنی مورد مطالعه تعیین می‌شود. در تحقیق حاضر هتروزیگوسیتی مشاهده شده، ۰/۳۰۳ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۳۰۶ بود که این مقادیر بسیار نزدیک به هم است و نشان‌دهنده بالا بودن تنوع ژنتیکی این مکان ژنی در نژاد سرابی است. این ممکن است نشان‌دهنده آن باشد که جمعیت مورد مطالعه در یک ساختار با جفت‌گیری تقریباً تصادفی حفظ شده و هیچ برنامه انتخابی سازمان‌یافته‌ای در این جمعیت صورت نگرفته است (جدول ۲). در مطالعه‌ای که روی گاو سیاه و سفید لهستان صورت گرفت، مقدار هتروزیگوسیتی بالایی گزارش شد که مشابه تحقیق حاضر بود (Dybus et al., 2006) ولی در مطالعه روی نژاد هلشتاین مقدار هتروزیگوسیتی پایین‌تری گزارش شده است که نشان دهنده تنوع ژنتیکی پایین در جمعیت گاوهای هلشتاین مورد بررسی می‌باشد (Kmiec et al., 2007). تعداد آلل مؤثر، تعداد آلل‌هایی است که هتروزیگوسیتی یکسان ایجاد می‌نماید. این پارامتر در جدول ۳ آورده شده است. تعداد آلل مؤثر برای ژن *GHRH* در این گله گاو سرابی مقدار ۱/۴۳ به‌دست آمد.

جدول۲- هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار جایگاه ژنی *GHRH*

جایگاه ژنی	هتروزیگوسیتی موردانتظار	هتروزیگوسیتی مشاهده شده
GHRH	۰/۳۰۶	۰/۳۰۳

جدول ۳- اندازهٔ مؤثر آللی برای جایگاه ژنی *GHRH*

جایگاه ژنی	اندازه مؤثر آللی	تعداد نمونه
GHRH	۱/۴۳	۱۱۲

نتایج این مطالعه نشان داد که چندشکلی ژنتیکی در جایگاه ژنی *GHRH* برای نژاد سرابی وجود دارد. بر اساس گزارشات موجود، چندشکلی‌های ژن به طور معنی‌داری با صفات اجزای شیر و تولید آن ارتباط دارد. از وجود این چندشکلی‌ها، جهت بررسی ارتباط بین چندشکلی ژنتیکی با صفات تولیدی از قبیل ترکیب و تولید شیر به عنوان مارکر ژنتیکی می‌توان استفاده نمود. Moody و همکاران رابطه بین آلل‌های حاصل از این جایگاه با صفات تولید شیر در گاوهای هلشتاین را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ $GHRH^{A}$ $GHRH^{A}$ رابطه معنی‌داری با افزایش تولید و درصد چربی شیر دارد (Moody et al., 1995). نتایج حاصل از تحقیقی که توسط Kmiec و همکاران، روی ۷۱۹ راس گاو نژاد هلشتاین صورت گرفت، نشان داد که ژنوتیپ $GHRH^{A}$ $GHRH^{A}$ با افزایش تولید شیر ارتباط معنی‌داری دارد (Kmiec et al., 2007). همانطور که ملاحضه می‌شود، در بسیار از تحقیقات این ناحیه به‌عنوان مارکر انتخابی جهت افزایش تولید و ترکیب شیر شناسایی شده است. بنابراین می‌توان از این مارکر در برنامه‌های اصلاح نژادی در جهت کیفیت بهتر و دقت بیشتر در انتخاب استفاده نمود. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در این نژاد می‌تواند به برنامه‌های انتخابی آینده مخصوصاً انتخاب به کمک نشانگر MAS (Marker Assisted Selection) یاری نماید.

منابع

- عصری، م. (۱۳۸۰). همایش گاو و گاومیش؛ نقطه تلاقی علم و تجربه. مجله دامداران ایران، دوره ۲۷، شماره ۳، صفحه ۷۱-۶۵.
- تربتی، ف. (۱۳۸۳). بررسی پلی‌مورفیسم و فراوانی آللی اگزون ۲ در جایگاه ژنی BoLA-DRB3 در گاوهای نجدی و سرابی، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی. دانشگاه فردوسی.

- Asri, M. (2002). Conference of cattle and buffaloes: Intersection of science and experience. Journal of Iranian farmers, 27(3): 65-71 [In Farsi].
- Barendse, W., Armitage, S.M. and Kossarek, L.M (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. Nature Genetics, 6: 227-235.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E. and Van Der Noordaa, J. (1989). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology, 28(3): 495-503.
- Dybus, A. and Grzesiak, W. (2006). GHRH/HaeIII gene polymorphism and its associations with milk production traits in Polish Black-and-White cattle Arch. Tierz, Dummerstorf, 49(5): 434-438.
- Dybus. A., Kmiec, M., Sobek, Z. and Pietrzyk, W. (2003). Associations between polymorphisms of growth hormone releasing hormone (GHRH) and pituitary transcription factor 1 (PIT1) genes and production traits of Limousine cattle. Arch. Tierz, Dummerstorf, 46(6): 527-534.
- Frohman, L.A., Bowns, T.R. and Chomeszynski, P. (1992). Regulation of growth hormone secretion. Front. Neuroendocrinology, 13: 344 - 405.

- Kmiec, M., Luczak, I.K., Kulig, H. and Terman, A. (2007). Associations between GHTH/HaeIII restriction polymorphism and milk production traits in a herd of dairy cattle. Journal of Animal and Veterinary Advances, 6(11): 1298-1303.
- Moody, D.E., Pomp, D. and Barendse, W. (1995). Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine growth hormone-releasing hormone gene. Journal of Animal Science, 73: 37-89.
- Torbati, F. (2005). Study of polymorphism of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Alleles in Najdi and Sarabi Cows. M.Sc. thesis. College of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad-Iran [In Farsi].
- Zhou, P., Kazmer, G.W. and Yang, X. (2000). Bos taurus growth hormone releasing hormone gene, complete cds. GenBank, AF 24: 28-55.

Study of polymorphism of Growth Hormone-releasing Hormone (*GHRH*) Alleles in Iranian Sarabi Cows

Khosravi, M.[1*], Aminafshar, M.[1], Chamani, M.[1]

1- Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[*] Corresponding author email: mahdi_khossravi@yahoo.com
(Received: 2013/7/7 Accepted: 2013/11/14)

Abstract

Selection based on molecular markers is one of the new methods that may improve progress and accuracy of selection in animal breeding programs. The *GHRH* gene (Growth Hormone-releasing Hormone) is a candidate gene for marker-assisted selection strategies. Polymorphs of *GHRH* gene are reported to be significantly associated with milk production and constituent traits. In order to study the polymorphism of *GHRH* gene, blood samples were collected from 112 Sarabi cows. Genomic DNA was extracted and a fragment of 297 bp in size was amplified using polymerase chain reaction. The amplified fragments were subjected to restriction digestion with *Hae*III endonuclease enzyme and the resultant digested products were run on 2% Agarose gel. The results revealed the existence of two alleles of $GHRH^{A}$ and $GHRH^{B}$ for the examined locus with frequencies of 0.19 and 0.81 respectively. Three different genotypic variants including $GHRH^{A}$ $GHRH^{A}$, $GHRH^{A}$ $GHRH^{B}$ and $GHRH^{B}$ $GHRH^{B}$ were identified with genotypic frequencies of 0.0357, 0.3037 and 0.6607 respectively. The $\chi 2$ test showed that population is in Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$). These data provide evidence that sarabi cattle breed have a genetic variability, which opens interesting prospects for future selection programs, especially marker-assistant selection.

Key words: Sarabi cows, *GHRH*, Polymorphism