Effect of growth hormone Locus polymorphism on weight gain of gosling

Ghorban Elyasi Zarringhabaie[1]*

1- Animal Science Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.

Introduction: Compared to other poultry, geese are more resistant to adverse environmental factors, so they are less likely to get sick. Geese are fast-growing poultry, and they are easy to raise. Due to the importance of goose meat due to its high calorie content compared to the meat of other poultry species and its high palatability, as well as its resistance to many diseases, it is necessary to raise this bird on an economic scale. According to the need in industrial goose breeding, meat, egg and even dual-purpose strains should be created so that depending on the purpose of breeding, they will answer the breeding costs and create the necessary productivity for the industry. Therefore, according to the importance of the economic coefficients of breeding and the relative selection of the product, the breeding population and herds should be considered in the four main ways of high weight gain, reduction of food conversion ratio, increase in the number of eggs and high egg fertility. Paying attention to the negative correlation coefficient with the egg production trait should be done in terms of management and breeding sciences, because an increase in one trait will decrease the values of another trait. Among the effective strategies in breeding, the selection is based on genetic markers that lead to the reduction of the generation gap and increase in production. Due to the ever-increasing growth of the population, a lot of effort is needed to overcome unfavorable environmental conditions, including biological and non-biological factors, and to increase the quantity and quality of the product. In recent years, many advances have been made in the field of molecular biology and biotechnology, which has provided a powerful tool for the genetic study of animals. Considering that the growth hormone gene (GH indicator) is one of the candidate genes for various traits, especially weight gain, but it has not been used in goose breeding programs so far. Therefore, in order to determine the contribution of this gene in goose breeding, its relationship with the weight gain trait of chickens should be determined, which is actually the purpose of designing and implementing this research.

Materials and Methods: In order to implement this research, 300 gosling hatched from eggs of Malekan research station geese and reared for 5 months. The hatched goose chicks were kept and fed according to breeding standards Gosling weighted monthly and blood samples was collected from them in vacuum tubes containing EDTA at end of raising period. Genomic DNA was extracted by Pronase procedure. A spectrophotometer was used to determine the quality of the extracted DNA, and for this purpose, a wavelength of 260 nm was used to determine the amount and concentration of DNA, and a wavelength ratio of 260/280 was used to determine the purity and quality of the extracted DNA. Amplification of the desired region from exon 2 of the growth hormone gene was done by thermocycler using the designed primers GH-G F and GH-G R to amplify 162 base pairs. 2% agarose gel with ethidium bromide staining was used to identify PCR products. The SSCP technique was used to determine the genotypes of the growth hormone gene. Denatured SSCP products was electrophoresed on 10% polyacrylamide gel and stained by silver nitrate. Effects of GH gene on growth performance were analyzed by SPSS software version 23 in CRD design.

Results and Discussion: Genotypes pattern of 1, 2 and 3 were recognized. Frequencies of 1, 2 and 3 patterns resulted 48.15, 44.44 and 7.15 percent, respectively. Results indicated that GH genotypes affected live weight of gosling in 1 and 2 month of age, the 3th pattern had heavier live weight in these periods. Despite of heavier live weight in pattern 3, for months of

3, 4 and 5 no significant differences observed among them. Low frequency of pattern 3, that affected live weight in gosling, can be increased in study population in favor of this pattern. The results of this research showed that the growth hormone gene and especially exon 2 of this gene can be considered as a genetic marker in the selection of geese for the weight gain trait.

Conclusion: Considering that the economic coefficient of egg production in geese is of great importance and is more important than the increase in the weight of breeding geese, and the economic activities of the station are more in line with increasing the number of chicks produced per breeding goose, considering The negative correlation between egg production and weight gain in geese implies the low frequency of the effective genotype on the weight gain of geese in this station, because the selection in Malekan station was mainly aimed at increasing the egg laying rate and just opposite to the growth rate of geese, which caused an increase in the frequency of the effective genotype. It has been effective on laying eggs and reducing the frequency of genotypes on the weight gain of goose chicks.

Keywords: Body weight, Geese, Genotype, Growth hormone, SSCP.

نسخه پیش انتشار

تأثیر جایگاه ژنی هورمون رشد بر افزایش وزن غازهای بومی

قربان الیاسی زرین‌قبایی[1*]

۱- عضو هیأت علمی بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، تبریز، ایران.

چکیده:

هدف از این تحقیق بررسی اثر ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه اگزون ۲ هورمون رشد بر وزن زنده غاز می باشد. برای اجرای این تحقیق ابتدا تعداد ۳۰۰ قطعه جوجه غاز از تخم تولیدی گله تحقیقاتی ایستگاه ملکان جوجه‌کشی شده و به مدت ۵ ماه پرورش یافت. غازهای پرورشی ماهانه به صورت انفرادی وزن‌کشی شده و در پایان دوره پرورش از آن‌ها خونگیری به عمل آمد. پس از اخذ نمونه خون و استخراج DNA ژنومی، ناحیه مورد نظر از اگزون ۲ ژن هورمون رشد با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. چندشکلی ژن هورمون رشد و ژنوتیپ غازها برای این ژن با روش SSCP و با استفاده از الکتروفورز محصولات PCR واسرشته شده بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۰٪ رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره تعیین گردید. تأثیر ژن هورمون رشد بر روی عملکرد رشد غاز با استفاده از نرم‌افزار SPSS و در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل گردید. در این تحقیق فراوانی الگوهای ژنوتیپی ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۴۸/۱۵، ۴۴/۴۴ و ۷/۴۱ درصد حاصل گردید. با توجه به نتایج به دست آمده، تأثیر چندشکلی حاصل بر رشد جوجه غازها در سنین ۱ و ۲ ماهگی معنی‌دار بوده و الگوی ژنوتیپی سوم میانگین وزن زنده بیشتری را نشان داد. درصورتی‌که در ماه‌های ۳، ۴ و ۵ علی‌رغم بالا بودن وزن زنده در غازهایی با ژنوتیپ سوم، اختلاف معنی‌داری حاصل نگردید. با توجه به پایین بودن فراوانی الگوی مؤثر در افزایش وزن جوجه غازها، انتظار می‌رود که افزایش فراوانی این ژنوتیپ در گله‌های پرورشی موجب افزایش میانگین وزن زنده جوجه غازها در مدت پرورش گردد.

کلیدواژه‌ها: ژنوتیپ، غاز، هورمون رشد، وزن بدن، SSCP.

مقدمه

غازها نسبت به سایر طیور در برابر عوامل نامساعد محیطی مقاومت بیشتری داشته و از ۸ هفتگی که رشد پرها تقریباً تکمیل می‌شود مقاومتشان نسبت به عوامل محیطی نامناسب افزایش می‌یابد. غازها از ماکیان سریع‌الرشد هستند و پرورش آن‌ها به‌آسانی صورت می‌گیرد، زیرا گله‌های غاز احتیاج به جایگاه‌های پُرهزینه و تغذیه‌ی کاملا دستی نداشته و با هزینه پایین می‌تواند پرورش یابد. در مکان‌هایی که مراتع سبز و چراگاه‌های خوب وجود دارد، گله‌های غاز می‌توانند به‌جز فصول سرد و زمستان، غذای خود را از محوطه چراگاه بدون هیچ‌گونه مشکلی به دست آورند (Ghelich, 1998). نظر به اهمیت گوشت غاز به دلیل داشتن مقدار کالری بالا نسبت به گوشت سایر گونه‌های طیور و خاصیت خوش‌خوراکی بسیار زیاد آن و همچنین مقاومت در برابر بسیاری از بیماری‌ها ایجاب می‌کند که این پرنده در مقیاس اقتصادی مورد پرورش قرار گیرد (Sarhangi *et al*, 2001). غازها ازنظر تبدیل علوفه دارای الیاف خام بالا به پروتئین حیوانی قابل مصرف در تغذیه‌ی انسان، می‌توانند گزینه‌ی مناسبی به‌جای نشخوارکنندگان باشند، با توجه به ضرورت موجود در پرورش صنعتی غاز، باید سویه‌های گوشتی، تخمی و حتی دومنظوره به وجود آید تا بسته به هدف پرورش جوابگوی هزینه‌های پرورش بوده و بهره‌وری لازم برای صنعت را ایجاد نماید. لذا با توجه به اهمیت ضرایب اقتصادی پرورش و انتخاب نسبی محصول باید جمعیت و گله‌های پرورشی در چهار مسیر اصلی افزایش وزن بالا، کاهش ضریب تبدیل غذایی، افزایش تعداد تخم و میزان بالای باروری تخم مورد توجه قرار گیرد، که استفاده از صفت افزایش وزن با

توجه به ضریب همبستگی منفی با صفت تولید تخم باید با لحاظ علوم مدیریتی و اصلاح نژادی صورت پذیرد چرا که افزایش در یک صفت موجب کاهش مقادیر صفت دیگر خواهد شد.

از جمله راهکارهای مؤثر در اصلاح نژاد، انتخاب بر اساس نشانگرهای ژنتیکی است که منجر به کاهش فاصله نسلی و افزایش تولید می‌گردد. به دلیل رشد روزافزون جمعیت تلاش زیادی برای غلبه بر شرایط نامساعد محیطی، اعم از عوامل زیستی و غیرزیستی و افزایش کمیت و کیفیت محصول لازم است. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و زیست‌فناوری صورت گرفته است، اطلاعات به دست آمده از نشانگرهای DNA امروزه کاربردهای گسترده‌ای یافته‌اند که عمده‌ترین آن‌ها در پزشکی، پزشکی قانونی، تشخیص والدین، تشخیص بیماری‌های گیاهی و جانوری، مطالعات ژنتیک تکاملی و فیلوژنتیک، طبقه‌بندی موجودات زنده و اصلاح‌نژاد دام و طیور می‌باشد (Elyasi *et al*, 2012). نشانگرهای ژنتیکی یا به عبارتی نشانگرهای DNA در مدت دو دهه تکامل شگرف و حیرت‌آوری داشته‌اند که در این میان انواع مختلف نشانگرهای DNA با تفاوت‌های زیادی ازنظر تکنیک و روش تولید، نحوه کاربرد، امتیازدهی، تجزیه، تحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع و معرفی شدند. در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA، ابداع و معرفی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[1] بیشترین نقش را داشته است چرا که تکثیر قطعه خاصی از DNA توسط این واکنش اصول بسیاری از تکنیک‌های مولکولی است که به سرعت به‌عنوان یک ابزار قدرتمندی در ژنتیک مولکولی و روش‌های آزمایشگاهی به کار گرفته شده و کاربردهای آن روز به روز در حال توسعه و تکامل است (Elyasi *et al*, 2012).

نشانگرهای ژنتیکی متصل به جایگاه‌های ژنی صفات مهم اقتصادی را تحت تأثیر قرار می‌دهند بنابراین می‌توانند سرعت و کارآمدی برنامه‌های اصلاحی در حیوانات را بهبود ببخشند. هنگامی‌که ارتباطی بین چندشکلی DNA و یک صفت آشکار می‌گردد، چندشکلی DNA می‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی کاندیدا برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر[2] مورد استفاده قرار گیرد (Chang *et al* 2012) چرا که عموماً توالی آمینواسیدها در پروتئین‌ها تعیین کننده بیان، تکرار و عملکرد آن‌ها می‌باشد لذا جهش‌هایی که ساختمان اولیه پروتئین را تغییر می‌دهند می‌توانند این پارامترها را تحت تأثیر قرار دهند. وقتی که ناحیه کد کننده تغییراتی مانند حذف‌شدگی، اضافه‌شدگی، جابجایی و یا وارونگی را در خود می‌بینند این عمل ممکن است باعث تغییرات عملکردی در بیان ژن گردد (Yang *et al* 2007).

هورمون رشد یک پلی‌پپتید ساده است که از گرانولوسیت‌های ائوزینوفیلی[3] هیپوفیز قدامی ترشح می‌گردد (Kato *et al* 2002)، و دارای عملکردهای فیزیولوژیکی متعددی در حیوانات است (Ma *et al*, 2012) که می‌توان به تحریک رشد عضلات، تشکیل استخوان، تنظیم میزان چربی، متابولیسم، تولیدمثل، پیری و ... اشاره نمود که همگی مرتبط با رشد و تکامل حیوانات هستند (Millar *et al*, 2010). بنابراین رشد در حیوانات یک ویژگی چندعلتی است که از اثرات متقابل مولکولی و ژنتیکی پیچیده‌ای برخوردار بوده و یک نقش اصلی در مهره‌داران در این خصوص بازی می‌کند. در کنار وظیفه اصلی آن در تنظیم رشد موجودات، در چند فرایند فیزیولوژیکی دیگر که متابولیسم چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد شرکت می‌کند (Moller and Norreland, 2003). همچنین ثابت شده است که در پایداری سیستم ایمنی نقش مهمی دارد (Jeay *et al*, 2002). این اثرات پلیوتروپی هورمون رشد معمولاً با واسطه‌گری عامل رشد شبه انسولین ۱[4] به صورت غیرمستقیم انجام می‌پذیرد، که در کبد و سایر بافت‌ها در پاسخ به تحریک هورمون رشد ساخته می‌شود.

---

1 (PCR) Polymerase Chain Reaction
2 Marker-Assisted Selection (MAS)
3 Eosinophilic Granulocytes
4 insulin-like growth factor I (IGF-I)

مطالعه واریانت‌های اللی ژن هورمون رشد به صورت گسترده به عنوان روشی برای توضیح نقش ژن در فعالیت‌های پلیوتروپی در حیوانات اهلی به کار گرفته شده است (Chang *et al*, 2012). در پستانداران ژن هورمون رشد دارای ۶-۵ اگزون و به تبع آن ۵-۴ اینترون است (Mao *et al*, 1995). cDNA حاصل از آن در حدود ۱۲۰۰-۸۰۰ جفت باز بوده و طول پروتئین با ساختمان اولیه آن متشکل از ۲۷-۱۶ اسیدآمینه و طول پروتئین کامل از ۱۹۱-۱۸۶ اسیدآمینه تشکیل شده است (Harvey and Doughaday, 1995). ژن هورمون رشد در طیور دارای ۵ اگزون و ۴ اینترون است که دارای چندشکلی بالا در طیور می‌باشد (Chang *et al*, 2012)(Qiao *et al*, 2011 ;.

بسیاری از مطالعات مربوط به ارتباط نشانگر با صفات در گونه‌های مختلف گزارش گردیده است و در این میان مطالعه با استفاده از ریزآرایه cDNA بر روی اردک نشان داد که هورمون رشد یکی از ترانسکریپت‌های بیان شده متفاوت در غده هیپوفیز اردک است (Chang *et al*, 2007). این محققین متوجه شدند که ژن هورمون رشد یک ژن هدف ارزشمند برای پیدا کردن جایگاه صفات اقتصادی است.

کاناساکو و همکاران (Kansaku *et al*, 2008) گزارش کردند که ژن GH اردک ۵/۲۵ کیلوباز بوده و دارای ۵ اگزون و ۴ اینترون می‌باشد. این محققین بیان داشتند که این ژن ازنظر ساختمانی به ژن‌های GH مرغ و پستانداران شباهت دارد. در این ژن ۵ جایگاه چندشکل تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتور ژن هورمون رشد اردک تعیین گردید ولی ارتباط این چندشکلی با صفات تولیدی ارائه نشده است. گروه دیگری (Chang *et al* 2012) تصمیم گرفتند تا بررسی‌های بیشتری بر روی ژن هورمون رشد اردک انجام دهند، بنابراین بر روی نواحی اگزون متمرکز گردیدند تا چندشکلی‌های موجود در آن را تعیین نمایند. اثر چندشکلی هورمون رشد بر روی صفات تولیدمثلی در اردک (Chang *et al* 2012) مطالعه و مشخص گردید که جهش در ناحیه C3169T با میزان باروری و حداکثر میزان قابلیت باروری در ارتباط است که اردک‌هایی با ژنوتیپ CC دارای میزان باروری و مدت زمان باروری بیشتری در مقایسه با CT هستند و همچنین در جایگاه C3700T اردک‌هایی CC دارای مدت زمان باروری بیشتری در مقایسه با TT می‌باشند.

اطلاعات کمی در خصوص ژن هورمون رشد غاز در مقایسه با اردک و مرغ وجود دارد (Zhan and Yang 2005) و به‌ویژه این که مطالعات سیستماتیک بسیار اندکی در ارتباط با چندشکلی ژن هورمون رشد و عملکرد تولیدی غاز وجود دارد. با توجه به این که هیچ روش ایمونولوژیکی برای ارزیابی سطوح هورمون رشد در پلاسمای غازها وجود ندارد، که مانع مطالعه تنظیم غدد درون‌ریز در این گونه می‌شود. چن و همکاران (Chen *et all*, 2022) روش ELISA ساندویچ را برای تعیین غلظت هورمون رشد در پلاسمای غازها ایجاد کردند که می‌تواند به طور موثر تفاوت در غلظت هورمون رشد در نمونه‌های پلاسما غازها در مراحل مختلف فیزیولوژیکی را تشخیص دهد بنابراین، برای مطالعه آینده رشد و متابولیسم آنها مفید خواهد بود.

همولوژی هورمون رشد غاز با مرغ و اردک در کل توالی آن‌ها به ترتیب ۷۷/۵۴ و ۹۲/۳۸ درصد و برای توالی CDS آن‌ها به ترتیب ۹۷/۶ و ۹۹/۹ درصد حاصل گردیده است (Zhao *et al*, 2011a). این محققین تعداد SNP را در ناحیه کد شونده ۶ عدد به ازای هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید و در ناحیه اینترون‌ها ۲ عدد به ازای هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید گزارش نمودند. این در حالی است که نقشه تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که در ژنوم مرغ در حدود ۲/۸ میلیون SNP وجود دارد که در هر ۱۰۰۰ نوکلئونید به‌طور متوسط ۵ جهش پراکنده شده است (Nachman, 2001).

مدارک موجود در چند نژاد غاز سفید پیشنهاد کرده است که اگزون دوم ژن هورمون رشد غاز دارای طول زیادی است درصورتی‌که ۴ اگزون دیگر کوتاه می‌باشند، و تمام SNP های کشف شده بر روی اگزون ۲ قرار دارند که این اگزون را برای مطالعات ژنتیکی منطقی می‌داند (Dong *et al*, 2010)، که بعدها چندشکلی ژن هورمون رشد غاز نژاد هایووان[1]

1 Huoyan

با استفاده از PCR-SSCP به دست آمد (Zhang *et al*, 2014). که می‌تواند معیاری برای مطالعه مقایسه‌ای ژن هورمون رشد سایر نژادهای غاز قرار گیرد. لذا با توجه به این که ژن هورمون رشد (نشانگر GH) یکی از ژن‌های کاندید برای صفات مختلف و به خصوص افزایش وزن می‌باشد ولی تاکنون در برنامه‌های اصلاح نژادی غاز به کار برده نشده است. لذا جهت تعیین سهم این ژن در پرورش غاز باید ارتباط آن با صفت افزایش وزن جوجه‌ها مشخص گردد. در این میان استفاده از فناوری‌های نوین و بویژه زیست فناوری به جهت تسریع در فرایند و کاهش هزینه‌های اصلاح نژادی شایان توجه است که در واقع هدف طراحی و اجرای این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای تهیه جوجه غازها تعداد ۳۰۰ عدد جوجه از تخم‌های تولیدی گله غاز ایستگاه تحقیقات ملکان جوجه‌کشی گردید. جوجه غازهای تفریخ شده بر اساس استاندارد پرورشی نگهداری و تغذیه شدند. پس از نصب شماره پا، در پایان هر ماه به صورت انفرادی وزن‌کشی گردیدند. پس از گذشت ۵ ماه و رسیدن غازها به وزن کشتار (مشاهده تغییرات کم در روند افزایش وزن)، خونگیری از آن‌ها در لوله‌های تحت خلأ حاوی EDTA (جهت جلوگیری از انعقاد خون) صورت گرفت. پس از خون‌گیری، نمونه‌های خون به آزمایشگاه منتقل‌شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری‌گردید.

استخراج DNA از نمونه‌های خون از ۱۰ میکرولیتر خون مطابق روش بایلس و همکاران (Bailes *et al*, 2007) و با استفاده از آنزیم پروناز به شرح زیر انجام گرفت. جهت تعیین کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید، که برای این منظور از طول موج ۲۶۰ نانومتر برای تعیین مقدار و غلظت DNA و از نسبت طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ برای تعیین میزان خلوص و کیفیت DNA استخراج شده استفاده گردید. تکثیر ناحیه مورد نظر از اگزون ۲ ژن هورمون رشد توسط دستگاه ترموسایکلر و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده GH-G F و GH-G R توسط نرم‌افزار اولیگو ۷ از ژنوم غاز با شماره دسترسی XM_005021748.1 برای تکثیر ۱۶۲ جفت باز با توالی زیر صورت گرفت.

GH-G F 5'- GTCGTGGTTTTCTCCTCTC - 3'
GH-G R 5'- AACTCTTTGTACGTCTCTGC - 3'

به منظور تعیین دقیق دمای اتصال آغازگرها از شیب حرارتی[1] استفاده شده و سپس مرحله اصلی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با ۳۵ چرخه (۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشته کردن[2]، ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال[3] آغازگرها و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه برای بسط[4] زنجیره DNA در دستگاه ترموسایکلر[5] و در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (بافر PCR 1X، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومول مخلوط dNTPs، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۱ واحد Taq DNA Polymerase، ۷۵ نانوگرم DNA استخراج شده) صورت گرفت. جهت تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز ۲٪ با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید. برای تعیین ژنوتیپ‌های ژن هورمون رشد، از تکنیک SSCP استفاده گردید که ۵ میکرولیتر از محصولات تکثیر شده با ۱۰ میکرولیتر بافر SSCP به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شده و سپس به سرعت بر روی یخ منتقل گردیدند. محصولات SSCP بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۰٪ به مدت ۱۶ ساعت و با ۷۵ ولت الکتروفورز شده و با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند.

1 Gradient
2 Denaturation
3 Annealing
4 Extension
5 Thermo cycler

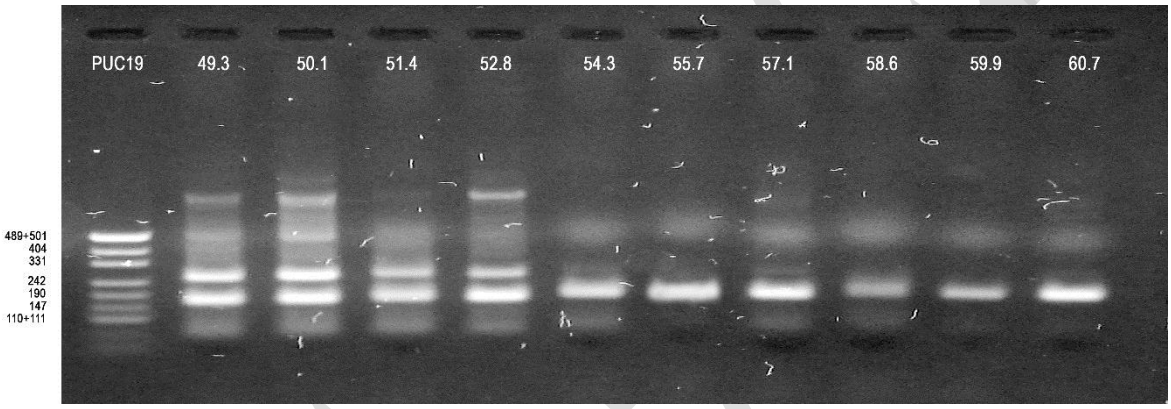
ارتباط ژنوتیپ‌های ژن هورمون رشد با وزن جوجه غاز با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ۲۳ و در قالب طرح کاملاً تصادفی با مدل آماری زیر تجزیه و تحلیل گردید:

$$Yij = \mu + GHj + eij$$

که در این معادله Yij عملکرد مورد نظر، μ میانگین جمعیت، GHj اثر ثابت ژنوتیپ حاصله و Eij اثر تصادفی خطای آزمایشی است.

نتایج و بحث

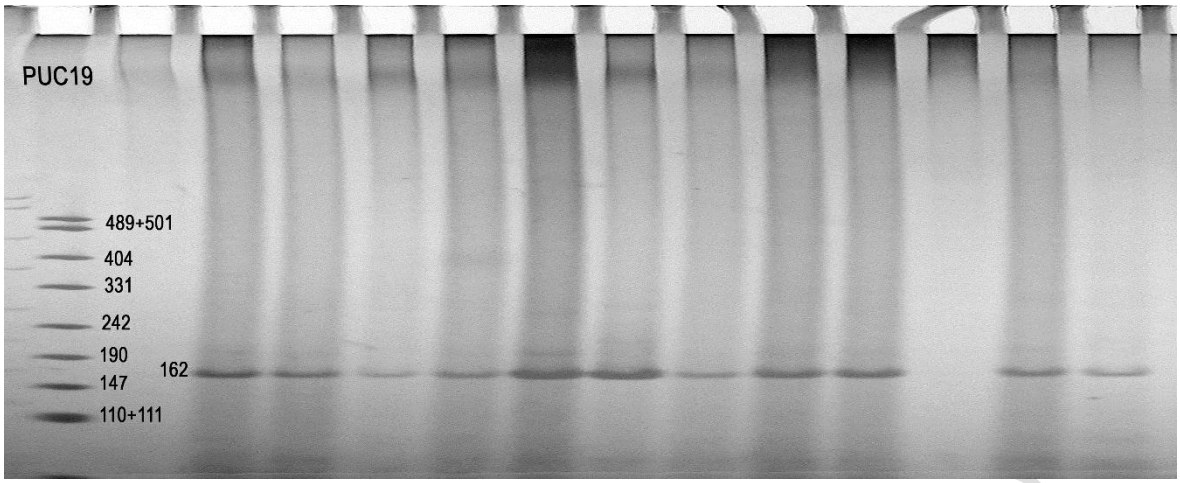
به‌منظور تعیین بهترین دمای اتصال آغازگرها به ناحیه هدف از Gradient PCR استفاده گردید و محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲٪ با ۱۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت الکتروفورز گردید. نتایج حاصل از شیب حرارتی برای تعیین دمای اتصال آغازگرها (شکل ۱) نشان داد که دمای مناسب اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که با داشتن بیشترین میزان تکثیر ناحیه مورد نظر به طول ۱۶۲ جفت باز، هیچ‌گونه باند ناخواسته در این دما مشاهده نگردید.



شکل ۱- تکثیر قطعه ۱۶۲ جفت بازی از ژن هورمون رشد غاز با استفاده از شیب حرارتی

Figure 1- Amplification of 162 bp fragment of goose growth hormone gene using thermal gradient

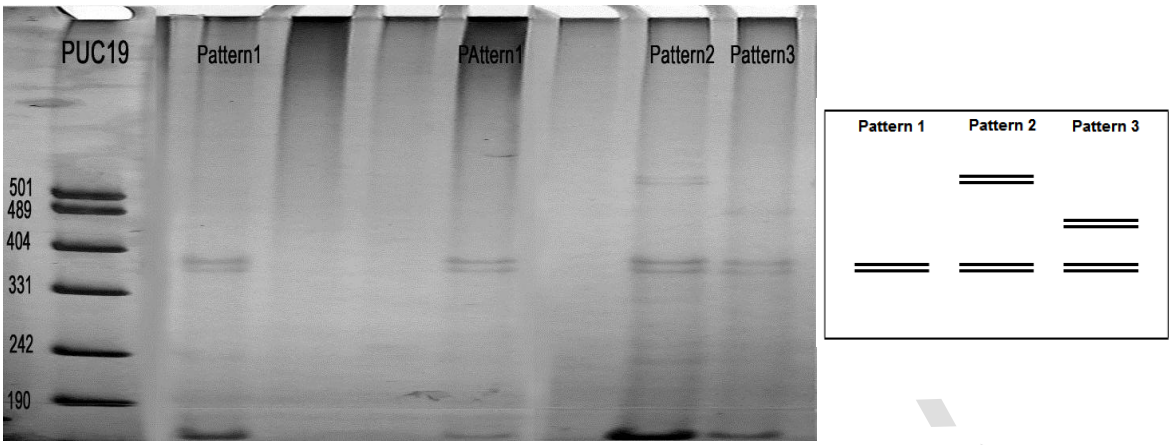
با توجه به دقت و حساسیت بالای ژل پلی‌آکریلامید، جهت اطمینان از صحت تکثیر در هنگام کار با نمونه‌های اخذ شده غاز، تعدادی از محصولات تکثیر شده بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۰٪ به مدت ۱۶ ساعت و ۷۵ ولت الکتروفورز گردید که در شکل ۲ قابل رؤیت می‌باشد همان‌گونه که مشاهده می‌گردد تکثیر اگزون ۲ از ژن هورمون رشد غاز به درستی صورت گرفته است چراکه از روی توالی موجود در سایت NCBI و آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق انتظار می‌رفت قطعه ۱۶۲ جفت بازی تکثیر گردد.



شکل ۲- محصولات تکثیر شده قطعه ۱۶۲ جفت بازی از ژن هورمون رشد غاز

Figure 2- Amplified products of 162 bp fragment of goose growth hormone gene

پس از تکثیر کلیه نمونه‌های مورد آزمایش، روش SSCP بر روی آن‌ها انجام گردید. شکل ۳ الکتروفورز محصولات حاصل از SSCP را بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۰٪ نشان می‌دهد که به مدت ۱۶ ساعت با ۷۵ ولت بارگذاری و با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد در این تحقیق سه الگوی باندی متفاوت به دست آمد که به عنوان ژنوتیپ‌های حاصل از تکنیک SSCP در نظر گرفته شد. فراوانی الگوهای ۱، ۲ و ۳ در این تحقیق به ترتیب ۴۸/۱۵، ۴۴/۴۴ و ۷/۴۱ درصد حاصل گردید. ژائو و همکاران (Zhao *et al*, 2011b) برای اولین بار ژن هورمون رشد غاز را به‌طور کامل کلون کردند که شامل تمام جهش‌های موجود در نواحی کد کننده و توالی اینترون آن بود که ۱۱ SNP با روش PCR-SSCP و توالی‌یابی شناسایی گردید. این نتایج نشان داد که فراوانی جهش در ژن هورمون رشد غاز نسبت به همولوگ آن در مرغ بیشتر بوده و عمدتاً بر پایه جهش‌های مترادف استوار گردیده است و نتیجه‌گیری کردند که ژن هورمون رشد به صورت خیلی محافظه‌کارانه‌ای از لحاظ فیلوژنتیکی محافظت می‌گردد، که این حالت حفاظت شده ژن هورمون رشد نشان می‌دهد که این ژن، از لحاظ عملکردی برای طیور بسیار مهم بوده و یک نقش کلیدی در رشد و تکامل طیور بازی می‌کند (Wong *et al*, 2004). ژائو و همکاران (Zhao *et al*, 2011b) ۴ الل را در اگزون ۲ ژن هورمون رشد غاز گزارش نمودند که دارای ۱۰ الگوی ژنوتیپی بودند و برای اگزون ۴ همین ژن ۲ الل با ۴ ژنوتیپ معرفی نمودند. با توجه به این که در طول سال‌های فعالیت ایستگاه تحقیقات غاز ملکان انتخاب غازها برای صفات مختلف صورت گرفته است، لذا کاهش تنوع ژنتیکی در این گله تحقیقاتی و در جایگاه‌های ژنی قابل تصور بوده و کاهش تعداد آلل‌ها و الگوهای ژنوتیپی دور از ذهن نمی‌باشد.



شکل ۳- الگوهای حاصل از SSCP برای ناحیه مورد نظر از ژن هورمون رشد غاز

Figure 3- Patterns resulting from SSCP for the target region of the goose growth hormone gene

تجزیه واریانس با استفاده از الگوهای باندی به دست آمده نشان داد که تأثیر ژنوتیپ بر وزن زنده در ماه‌های اول و دوم معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). در ماه اول پرورش الگوی ژنوتیپی ۱ کمترین وزن زنده را به خود اختصاص داده است که تفاوت معنی‌داری با دو ژنوتیپ دیگر نشان می‌دهد و الگوی باندی ۳ دارای بیشترین وزن زنده می‌باشد که برای پرورش غاز مناسب می‌باشد (جدول ۱). با توجه به اینکه فراوانی این ژنوتیپ در جمعیت در حداقل می‌باشد لذا به نظر می‌رسد انتخاب غازهای بر اساس این نشانگر و افزایش میزان فراوانی این الگو می‌تواند معیاری برای وزن غازهای پرورش باشد. چراکه با توجه به نتایج بدست آمده در ماه اول، افزایش فراوانی الگوی سوم در گله مورد آزمایش می‌تواند تا ۴۰ درصد وزن زنده را در گله افزایش دهد. تحقیقات آئو و همکاران (Ao *et al*, 2006) ارتباط SNP های موجود در غاز نژاد Rhine در ناحیه اینترون ۲ را با وزن بدن و صفات لاشه معنی‌دار نشان داد. فنگ و همکاران (Feng *et al* 1997) گزارش کردند که نشانگر RFLP در ژن هورمون رشد مرغ با سن در اولین تخم‌گذاری و میزان تخم‌گذاری روزانه مرغ‌ها در ارتباط است. بررسی ارتباط بین چندشکلی موجود در ژن هورمون رشد غازها ارتباط معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ارائه نموده بود (Zhao *et al*, 2011b). نتایج ارائه شده برای ماه دوم نشان می‌دهد که الگوی ژنوتیپی سوم دارای بیشترین مقدار وزن زنده می‌باشد (P≤۰/۰۵) و همانند ماه اول پرورش با داشتن کمترین فراوانی می‌تواند در جهت اصلاح نژاد غاز برای وزن زنده مورد استفاده قرار گیرد لذا انتخاب جوجه‌های تفریخ شده در راستای این ژنوتیپ و افزایش فراوانی آن در جمعیت موجب افزایش وزن غازهای پرورشی خواهد بود.

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد تأثیر ژنوتیپ‌های اگزون ۲ ژن هورمون رشد بر وزن زنده غازهای پرورش در ماه‌های ۳، ۴ و ۵ معنی‌دار نشده است، ولی علیرغم آن، وجود اختلاف معنی‌دار بین الگوهای حاصل، الگوی باندی ۳ دارای بیشترین وزن زنده می‌باشد که اختلاف وزن قابل قبولی نسبت به دو ژنوتیپ دیگر از خود نشان داده است. آنالیز واریانس با استفاده از داده‌های افزایش وزن هفتگی در نژادهای مختلف نشان داده است که نتایج بر اساس نژاد غازهای مورد بررسی متفاوت بوده است (Zhao *et al*, 2011b). لذا نتایج حاصل از مطالعات مختلف علیرغم داشتن جهت همسو و هماهنگ می‌تواند اعداد متفاوت داشته و بر سطح معنی‌داری و یا غیر معنی‌داری مطالعه تاثیر داشته باشد.

جدول ۱- تأثیر ژنوتیپ‌های اگزون ۲ ژن هورمون رشد بر وزن زنده جوجه غاز (گرم)

Table 1- The effect of exon 2 genotypes of the growth hormone gene on live weight of goose chicks (grams(

ژنوتیپ Genotype	تعداد Number	۳۰ روزگی 30 days	۶۰ روزگی 60 days	۹۰ روزگی 90 days	۱۲۰ روزگی 120 days	۱۵۰ روزگی 150 days
الگوی ۱	117	745.09±54.95[b]	1624.73±299.61[b]	2477.97±288.96	3246.13±378.54	3321.17±398.89

3328.73±400.39	3260.32±360.38	2488.80±275.10	1688.94±206.26[b]	996.28±150.80[a]	108	Pattern 1 الگوی ۲ Pattern 1
3424.10±186.89	3355.23±365.72	2561.24±279.17	1810.78±265.37[a]	1036.33±321.82[a]	18	Pattern 1 الگوی ۳ Pattern 1
3327.71±385.56	3360.52±366.09	2488.95±279.45	1742.75±249.55	996.96±245.65	248	جمع کل Total
0.820	0.798	0.795	0.050	0.031		ارزش P P Value

میانگین هر ستون با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی دار در سطح ۰٫۰۵ می باشد

The average of each column with different letters has a significant difference at the 0.05 level

در مطالعه ژانگ و همکاران (Zhang *et al*, 2014) ارتباط چندشکلی هورمون رشد با برخی صفات تولیدی گزارش گردید. در این مطالعه چهار آلل (آلل D غالب بود) با ۱۰ ژنوتیپ برای اگزون دوم ژن هورمون رشد حاصل شده که نتیجه دو تغییر در موقعیت بازهای ۳۹ و ۷۴ بوده که هر دوی آن‌ها جایگزینی C به‌جای T بوده که در جایگاه ۳۹ جهش خاموش بدون تأثیر در تغییر اسیدآمینه بوده و در جایگاه ۷۴ جایگزینی آلانین با والین در موقعیت اسیدآمینه ۲۵ بیان گردید. همچنین در مطالعه اخیر دو تغییر در ژن هورمون رشد غاز در جایگاه های C123T و C158T ارتباط معنی داری با صفات وزن بدن در غاز نشان دادند که ژنوتیپ های CT برای جایگاه ۱۲۳ و ژنوتیپ TT برای جایگاه ۱۵۸ برای صفات وزن بدن غاز مناسب می باشند (Abdel Moniem *et al*, 2021). با توجه به تاثیر چندشکلی حاصل بر روی میزان رشد غازها در مطالعه حاضر انتظار می‌رود که این چندشکلی بتواند بر توالی پروتئین هورمون رشد تاثیر داشته باشد چرا که جهش‌های خاموش و بی‌معنی نمی‌توانند بر فعالیت بیولوژیکی موجودات تاثیر چندانی داشته باشند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ژن هورمون رشد و بخصوص اگزون ۲ این ژن می‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی در انتخاب غازها برای صفت افزایش وزن مورد توجه قرار گیرد. با این وجود روش‌های دیگری نیز مانند سنجش ارتباط غلظت هورمون‌های تولیدمثلی با صفات وزن بدن به کار گرفته شده است که می‌تواند از طریق اندازه قسمت‌های مختلف بدن (دور گردن، طول گردن، فاصله شرمگاهی و دور شکم) غازهای پر تولید ولانق[1] را انتخاب نماید (Liu *et al*, 2022).

طی بررسی‌های انجام‌یافته در سال‌های ۱۳۷۵ تا ۱۳۸۰ از طریق تکمیل پرسشنامه از نواحی و بخش‌ها با توجه به آمار منتشره، پرورش غاز و استفاده از محصولات متنوع آن، پس از طیور و بوقلمون در جایگاه سوم ماکیان قرار داشته و توانسته است پای خود را به سبد غذایی مردم در نواحی خاص و بخصوص روستاهای کشور باز کند. با توجه به تقاضای روزافزون برای گوشت سفید غیر از گوشت مرغ در سال‌های اخیر و از طرفی دیگر، اصرار شدید برای مصرف فراورده‌های سالم غذایی و حتی محصولات ارگانیک که عاری از سموم، هورمون‌ها و بقایای آنتی‌بیوتیک‌هاست، انتظار می‌رود که در سال‌های آتی مصرف گوشت غاز با توجه به عدم نیاز این صنعت به آنتی‌بیوتیک به دلیل مقاومت بالای غاز به بیماری روند افزایشی طی نماید. لذا استفاده از پتانسیل‌های پرورشی بالای غاز نسبت به سایر ماکیان ایجاب می‌کند که در آینده پرورش غاز به صورت صنعتی مورد توجه قرار گیرد و برای حصول این امر استفاده از فناوری‌های نوین زیستی و اصلاح نژادی جایگاه ویژه‌ای را جهت هموار نمودن مسیر و کاهش زمان رسیدن به هدف ضروری است (Chang *et al* 2012).

نتیجه‌گیری کلی

[1] Wulong

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در ناحیه مورد نظر از اگزون ۲ ژن هورمون رشد غاز ۳ ژنوتیپ با فراوانی‌های ۴۸/۱۵، ۴۴/۴۴ و ۷/۴۱ درصد وجود دارد، که الگوی ژنوتیپی سوم با فراوانی ۷/۴۱ درصد تأثیر مثبتی بر روی وزن زنده غاز از خود نشان داده است. با توجه به این که ضریب اقتصادی تولید تخم در غاز از اهمیت زیادی برخوردار بوده و اهمیت بیشتری نسبت به افزایش وزن غازهای مولد به خود اختصاص داده است بکارگیری شاخص انتخابی که بتواند وزن مناسبی به صفات تخم‌گذاری و افزایش وزن بدهد و انتخاب غازهای پرورشی و گوشتی در راستای این ژنوتیپ به منظور انتخاب و پرورش غازهای سنگین‌تر موجب تسریع در اصلاح نژاد غازهای بومی خواهد شد.

فهرست منابع

Abdel Moniem, H., Yusuf, M. S., & Chen, G. (2021). Ecology and population structure of some indigenous geese breeds and the impact of four GH and Pit-1 SNPs on their body weights. Environmental Science and Pollution Research, 28(28), 37603-37615. https://doi.org/10.1007/s11356-021-13402-x

Ao, J. X., Li, H., Wang, Q. G. and Wang, Y. X. (2006). Polymorphism of intron 2 of growth hormone gene and its relationship with body weight and carcass traits in goose. Chinese Journal of Animal Science, 42: 9-11.

Bailes, S. M., Devers, J. J., Kirby, J. D. and Rhoads, D. D. (2007). An expensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction. Immuno pathol. 749:145-152. https://doi.org/10.1093/ps/86.1.102

Chang, M. T., Cheng, Y. S. and Huang, M. C. (2012). The SNP genotypes of growth hormone gene associated with reproductive traits in Tsaiya ducks. Reproduction in domestic animals, 47(4): 568-573. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01918.x

Chang, M., Yang, K., Lin, C., Chen, C., Pan, C., Liou, J., Rouvier, R. (2007). Investigation of differentially expressed transcripts in pituitary glands of post-laying brown Tsaiya ducks using cDNA microarray. J Chin Soc Anim Sci, 36: 94.

Chen, R., Guo, R. H., Lei, M. M., Zhu, H. X., Yan, L. Y., & Shi, Z. D. (2022). Research Note: Development of a sandwich ELISA for determining plasma growth hormone concentrations in goose. *Poultry Science*, *101*(3), 101631. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101631

Dong, B., Wang, J., Duan, X., Sun, G., Zhu, S. and Li, X. (2010). Polymorphism of the exons of growth hormone (GH) gene in goose. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 26(5): 1020-1025.

Elyasi Zarringhabaie, G., Javanmard, A. and Pirahary, O. (2012). Random Amplified Polymorphic Markers as Indicator for Genetic Conservation Program in Iranian Pheasant (*Phasianus colchicus*). The Scientific World Journal, Volume 2012, Article ID: 640381. https://doi.org/10.1100/2012/640381

Feng, X., Kuhnlein, U., Aggrey, S., Gavora, J. and Zadworny, D. (1997). Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain. Poultry science, 76(12): 1770-1775. https://doi.org/10.1093/ps/76.12.1770

Ghelichi, R. (1998). Goose breeding Native Poultry and Other Poultry Department, Vice-Chancellor of Livestock Affairs, Ministry of Jihad and Agriculture. Pages 3-4. (In Persian)

Harvey, S. and Daughaday, W. (1995). Growth hormone release: profiles. Growth Hormone, 193-223.

Hasani, A.R., Houshmand Shamsai, A., Afraz, F., Asadpour, M.R., and Sarhangi, Y. (2001). Investigating the distribution, breeding status and production and phenotypic characteristics of geese in the Azerbaijan region. The final report of East Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center. (In Persian)

Jeay. S., Sonenshein, G. E., Postel-Vinay, M. C., Kelly, P. A. and Baixeras, E. (2002). Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. Molecular and Cellular Endocrinology, 188: 1-7. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00014-X

Kansaku, N., Soma, A., Furukawa, S., Hiyama, G., Okabayashii, H., Gue´mene,´ D., Kuhnlein, U. and Zadworny, D. (2008). Sequence of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) growth hormone-encoding gene and genetic variation in the promoter region. Anim Sci J, 79: 163-170. https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2008.00513.x

Kato, Y., Murakami, Y., Sohmiya, M. and Nishiki, M. (2002). Regulation of human growth hormone secretion and its disorders. Internal medicine, 41(1): 7-13. https://doi.org/10.2169/internalmedicine.41.7

Liu, J., Zhang, D., Zhang, Z., Chai, W., Zhang, J., Li, M. & Zhu, M. (2022). Comparison of body size and reproductive hormones in high-and low-yielding Wulong geese. *Poultry Science*, *101*(3), 101618. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101618

Ma, Q., Liu, S., Zhuang, Z., Lin, L., Sun, Z., Liu, C. and Tang, Q. (2012). Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the growth hormone (GH) gene in female and male Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Gene, 493(1): 92-104. https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.015

Millar, D. S., Horan, M., Chuzhanova, N. A. and Cooper, D. N. (2010). Characterization of a functional intronic polymorphism in the human growth hormone (GHI) gene. Human genomics, 4(5): 289. https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-5-289

Moller N, Norrelund H. (2003). The role of growth hormone in the regulation of protein metabolism with particular reference to conditions of fasting. Hormone Research, 59 (Suppl 1): 62-68. https://doi.org/10.1159/000067827

Mou, L., Liu, N., Zadworny, D., Chalifour, L. and Kuhnlein, U. (1995). Presence of an additional PstI fragment in intron 1 of the chicken growth hormone-encoding gene. Gene, 160(2): 313-314. https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)96895-8

Nachman, M. W. (2001). Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans. Trends Genet, 17: 481-485. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02409-X

Qiao, N., Chen, Q., Cheng, J. H. and Xu, Q. (2011). Comparative genomic analysis of growth hormone gene in geese. Animal science journal, 82(1): 62-66. https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00812.x

Sarhangi, Y., Nazeradl, K., Lotfolahian, H., Kamali, M.A., Hasani, A.R. and Asadpour, M.R. (2001). Investigating the effect of different levels of protein and energy on the efficiency of meat production in native geese of Azerbaijan. The final report of East Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center. (In Persian)

Wong, G. K., Liu, B., Wang, J., Zhang, Y., Yang, X., Zhang, Z., Meng, Q., Zhou, J., Li, D. and Zhang, J. (2004). International Chicken Polymorphism Map Consortium: A genetic variation map for chicken with 2. 8 million single-nucleotide polymorphisms. Nature 432, 717-722. https://doi.org/10.1038/nature03156

Yang, F. P., Chen, Y. Q., Li, S. P., Li, Q. S., Wang, J. Y. (2007). Study on the single nucleotide polymorphism of Myostatin gene's coding region in three domestic goose. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 28: 29-32.

Zhan, K. and Yang, N. (2005). Effects of polymorphism in the coding region of GH gene on serum GH, T3 levels and body weight of ducks. Paper presented at the Proceedings of the 3rd World Waterfowl Conference, Guangzhou ,China.

Zhang, Y., Zhu, Z., Xu, Q. and Chen, G. (2014). Association of polymorphisms of exon 2 of the growth hormone gene with production performance in huoyan goose. International journal of molecular sciences, 15(1): 670-683. https://doi.org/10.3390/ijms15010670

Zhao, W. M., Qiao, N., Wang, X. B., Chen, Q., Cheng, J. H., Xu, Q. and Chen, G. H. (2011a). Comparative genomic analysis of growth hormone gene in geese. Animal Science Journal, 82: 62-66. https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00812.x

Zhao, W. M., Zaoe, R. X., Qiao, N., Xu, Q., Huang, Z. Y., Li, X., Zhang, Y. and Chen, G. H. (2011b). Association of GH polymorphisms with growth traits in goose. Journal of Animal and Veterinary Advances, 10 (6): 692-697.