نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۵، تابستان ۱۳۹۶
ص‌ص: ۱۱۷~۱۲۶

توالی یابی و بررسی تنوع ژنتیکی اگزون ۹ ژن گیرنده پرولاکتین در بز خلخالی و آنالیز بیوانفورماتیک این ژن در گونه ها ی مختلف دامهای اهلی

- **ویدا دولتی قره درویشلو**
دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
- **نعمت هدایت ایوریق** (نویسنده مسئول)
استادیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی.
- **سعید نیک بین**
استادیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
- **رضا بهمرام**
استادیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
- **بهرام فتحی**
استادیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
- **رضا سیدشریفی**
استادیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۴۵۳۳۵۱۹۴۱۹
Email: nhedayat@uma.ac.ir

چکیده

ژن گیرنده پرولاکتین به دلیل نقش حیاتی در انتقال علائم هورمون لاکتوژن به پروموتر پروتئین شیر از مهمترین ژن های کاندیدای مؤثر در تولید شیر شناخته شده است. تحقیق حاضر با هدف توالی‌یابی اگزون ۹ ژن گیرنده پرولاکتین در بز خلخالی و آنالیز بیوانفورماتیک این ژن در حیوانات اهلی انجام شده است. جهت آنالیزهای بیوانفورماتیک و مقایسه گونه‌ای، از توالی‌های ژنومی گونه‌های مختلف حیوانات اهلی استفاده شد. جهش مشاهده شده در جمعیت بزهای خلخالی باعث تغییر نوکلئوتید A به G در جایگاه اگزون ۹ ژن گیرنده پرولاکتین گردید که منجر به تغییر کدون ATG به GTG (به ترتیب کدکننده اسیدآمینه متیونین و والین) می‌شود. نتایج مربوط به مقایسه گونه های مزرعه‌ای، ۲۸ چندشکلی را نشان داد که منجر به ایجاد ۱۰ هاپلوتیپ مختلف با تنوع هاپلوتیپی ۰/۸٤ در گونه‌های مورد مطالعه شد. تنوع نوکلئوتیدی و میانگین تفاوت نوکلئوتیدی(k) در بین گونه‌ها نیز به ترتیب برابر ۰/۰٤٤ و ۱۰/٦٥ برآورد گردید. آنالیز تنوع ژنتیکی نشان داد گونه گوسفند بیشترین تنوع را نسبت به دیگر گونه‌های مورد بررسی دارد. همچنین، بررسی فاصله ژنتیکی بین گونه‌ها و آنالیز شبکه‌ای نشان داد که گونه گوسفند در مقایسه با گونه‌های دیگر به گونه بز نزدیکتر است و بز خلخالی با کاپراهیرکوس در یک شاخه قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: آنالیز بیوانفورماتیک، بز خلخالی، توالی یابی، ژن گیرنده پرولاکتین

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 117-126

Sequencing and Genetic variation investigation of exon 9 of Prolactine receptor (PRLR) gene and bioinformatics analysis of this gene in farm animals.

By: Vida Dolati Garehdarvishlu[1], Nemat Hedayat Evrigh[2], Saeed Nikbin[2], Reza Behmaram[2], Bahram Fathi[2], Reza Seyedsharifi[2]

1-MS student and 2 assistant prof, of Animal Sciences faculty of Mohaggeh Ardabily University

Received: May 2016 **Accepted: September 2016**

Due to a crucial role in transferring of Prolactin hormone signals to milk protein gene promoter, Prolactin receptor (PRLR) gene has been detected as the most important candidate gene. The present study investigated the genetic variation of exon 9 of PRLR gene and bioinformatics analysis of this gene in farm animals. For bioinformatics analysis, 37 samples of different farm animal species genomic sequences were obtained. A mutation was detected in exon 9 of Khalkhali goat PRLR gene that causes to the substitution of A to G nucleotide and, led to change ATG codon to GTG codon with the substitution of Metioning amino acid with Valin. The results of analyzing of Exon 9 led to identify 28 polymorphic sites in the PRLR gene that causes 10 haplotypes with 0.8408 haplotype diversity in studied species. Nucleotide diversity and average nucleotide differences among species were 0.04439 and 10.655 respectively. Analysis of genetic diversity showed that ovine species have the more diversity compared with other species. Also, analysis of species distance and network analyses showed that ovine is most closed species to Capra than other species, and Khalkhali goat belongs to the same phylum as Capra Hircus.

Key words: Bioinformatics analysis, Khalkhali goat, Sequencing, PRLR gene

مقدمه

بز اهلی (Capra Hircus) یکی از گونه‌های بسیار مناسب دام است که در کره خاکی بیشترین توزیع جغرافیایی را داشته و از تنوع نژادی بالایی برخوردار است (خالداری، 1382). این دام بازده عملکردی بالایی داشته و توانایی بسیاری در سازش با شرایط آب و هوایی مختلف دارد. بز یک حیوان چندمنظوره می‌باشد که علاوه بر تولید شیر، گوشت، پوست و الیاف، نقش مهمی در اقتصاد پرورش دهندگان دارند. به غیر از تولید محصولات متنوع، نقل و انتقال آسان بز آن را به یک عنصر کلیدی برای تضمین پایداری زندگی انسان در محیط های نامساعد تبدیل کرده است. در ایران هدف اصلی از پرورش بز تولید شیر است و تولید گوشت، کرک و مو در درجه دوم اهمیت قرار دارد (خالداری، 1382). بز خلخالی یکی از بزهای شیری و بومی ایران است که عمده محل پرورش آن دشت مغان، روستاهای اطراف شهرستان خلخال در استان اردبیل و بخش‌هایی از آذربایجان شرقی می‌باشد. در حال حاضرجمعیت این نژاد براساس آمار جهاد کشاورزی استان اردبیل به شدت کاهش یافته و ممکن است در آینده به خطر بیفتد. در حالی که دام‌های بومی به عنوان سرمایه‌های ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب شده و پس از هزاران سال انتخاب طبیعی و مصنوعی و با غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خود ادامه داده است. بنابراین، به عنوان بانک ژنهای سازگار با محیط بومی، مواد ژنتیکی پایه برای برنامه‌های اصلاح نژادی در زیستگاه خویش محسوب می شوند (علیجانی، 1388).

ژن‌های کاندیدای بسیاری شناخته شده‌اند که در تولید شیر پستانداران مؤثر می‌باشند که از بین آنها ژن گیرنده پرولاکتین به دلیل نقش حیاتی‌اش در انتقال علائم هورمون لاکتوژن به پروموتور در ژن مرتبط با پروتئین شیر مهمترین ژن کاندیدای مؤثر در تولید شیر می‌باشد (Bryme و همکاران، 2005) . به همین دلیل توجه ویژه ای به این ژن شده است و به صورت گسترده مطالعه شده است(Hou و همکاران، 2015).

ژن گیرنده هورمون پرولاکتین[1] متعلق به خانواده گیرنده هورمون رشد بوده و یکی از اعضای خانواده بزرگ سیتوکینن‌های گروه ۱ می باشد (Bole-Feysote و همکاران، 1998) که بر روی کروموزوم ۲۰ بز و گاو مکان یابی شده است (Hayes و همکاران، 1996). دو ایزوفرم مشخص از پرولاکتین وجود دارد که در اثر پیرایش رونویسی اولیه این ژن حاصل می‌شود (ایزوفرم طویل آن ۵۸۱ آمینواسید و ایزوفرم کوتاه آن ۲۹۶ آمینواسید دارد) (Viitala و همکاران، 2006) . دارای ۱۱ اگزون است که قسمت کد شونده این ژن بین اگزون‌های ۳ تا ۱۰ واقع شده است که در کل kb ۲۰۰ بوده و فقط ۱۷۴۶ جفت باز (KJ792813) بخش CDS می باشد (Arden و همکاران، 1990).

ژن گیرنده هورمون پرولاکتین به عنوان واسط عمل هورمون پرولاکتین نقش مهمی در عملکرد غدد پستانی و تولید شیر دارد (Viitala و همکاران، 2006). ارتباط بین چندشکلی های ژن PRLR با صفت تولید شیر در دام‌های اهلی به وفور گزارش شده است. بر اساس یک مطالعه ۵ نوع چند شکلی تک نوکلئوتیدی در ژن PRLR مشخص شد که با صفت تولید شیر در گاوها ی هلشتاین چینی مرتبط بود و ۴ SNP شناسایی شده منجر به تغیرات اسید آمینه‌ای می شود (Zhang و همکاران، 2008). در اسب نیز ۱۰ چندشکلی تک نوکلئوتیدی، در اگزون های شماره ۴، ۵ و ۹ گزارش شده که ۴ SNP موجب تغییر آمینواسیدی شده و در تولید شیر مؤثر می باشد (Abula و همکاران، 2013). یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی در اگزون شماره ۹ ژن PRLR در بز شیری سانن شناسایی شده است که باعث کاهش تولید شیر می‌شود (Sun و همکاران، 2008).

مطالعات مختلفی بر روی ژن گیرنده پرولاکتین در بز انجام گرفته است و نشان دادند که جهش های شناسایی شده ارتباط معنی داری با صفات تولیدشیر و تولید مثل دارد (An و همکاران، 2015؛ Trott و همکاران، 2014؛ Wu و همکاران، 2014؛ Di و همکاران، 2011).

تحقیق حاضر با هدف توالی یابی اگزون ۹ ژن گیرنده پرولاکتین در بز خلخالی و آنالیز بیوانفورماتیک این ژن در حیوانات اهلی انجام شده است.

مواد و روش ها

برای بررسی ژن گیرنده پرولاکتین نمونه‌گیری خون از سیاهرگ وداج 100راس بز خلخالی اردبیل در شهرستان خلخال با استفاده از ونوجکت حاوی ماده ضد انعقاد EDTA به عمل آمد و DNAژنومی با استفاده از کیت استخراج ATP bioscience شرکت آرش طب پیشرو پارس استخراج گردید (http://atpcoltd.ir/kits-and-consumables.html).

سپس جایگاه اگزون۹ ژن گیرنده پرولاکتین به طول ۴۶۵ جفت باز از طریق یک جفت پرایمر اختصاصی (Hou و همکاران، 2013) تکثیر شد (شکل ۱)

پرایمر رفت:5-CTTACCACAACATTGCTGAC-3

پرایمر برگشت:5-CCTTGGCTGGATTCTATGG-3

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن گیرنده پرولاکتین به ترتیب؛ دمای واسرشت شدن اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها ۵۹ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، تکثیر قطعه مورد نظر۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و یک سیکل دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه تنظیم و انجام شد.

غلظتهای مورد استفاده از مواد بعد از بهینه سازی برای انجام واکنش زنجیره پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ترکیبات با غلظت های ۷ میکرولیتر آب استریل دوبار تقطیر، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Fire Pol Master Mix) و ۱/۵ میکرولیتر DNA ژنومی و مابقی را تا رسیدن به حجم ۲۵µL از آب مقطر استفاده شد. جهت تعیین ژنوتیپ از روش SSCP محصولات

[1] prolactin receptor (PRLR)

PCR بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد و برای رنگ آمیزی از نیترات نقره استفاده شد.

توالی یابی جایگاه ژن گیرنده پرولاکتین و آنالیز توالی‌ها

بعد از تکثیر جایگاه اگزون ۹ ژن پرولاکتین و تعیین ژنوتیپ از هر الگوی مختلف سه نمونه جهت بررسی تنوع موجود در این جایگاه‌ها و شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) توالی-یابی گردید. همه توالی‌ها با استفاده از روش Clustal W در نرم افزار MEGA6 همردیف شده و تک نوکلئوتیدهای چندشکل از این طریق شناسایی شدند.

سپس با استفاده از نرم افزار DnaSp 5.10 هاپلوتیپ‌ها و فراسنجه‌های مربوط به تنوع ژنتیکی شامل تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیپی و غیره به دست آمدند. درخت فیلوژنتیکی با بیشترین درستنمایی بین گونه‌های مزرعه از طریق مدل جایگزینی نوکلئوتید تامورا ترسیم گردید (Tamura و همکاران، 2011). یکی از آزمون‌هایی که برای بررسی خنثی بودن یا اثر داشتن انتخاب (مصنوعی یا طبیعی) بر روی جهش یک ژن قابل استفاده می‌باشد آماره تاجیما D است. این آزمون تنوع نوکلئوتیدی حاصل از مشاهدات را با تنوع حاصل از فراوانی آللی در جایگاه‌های چند-شکل بررسی می‌کند (Tajima, 1989). فراسنجه‌های تمایز ژنتیکی، فاصله ژنتیکی و خلوص ژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA6.0 به دست آمدند. جهت آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپ‌های بدست آمده از نرم افزار Network V.4.64.613 (fluxus-engineering.com) استفاده شد و برای آنالیز بیوانفورماتیک ژن گیرنده پرولاکتین به تعداد ۳۷ توالی مربوط به ۵گونه دام اهلی انتخاب شدند و تمام توالی DNA آنها از پایگاه بانک اطلاعاتی داده‌ها (NCBI) استخراج گردید (جدول ۱).

جدول۱- توالی های ژن گیرنده پرولاکتین استخراج شده از پایگاه اطلاعاتیNCBI و کد دسترسی آنها.

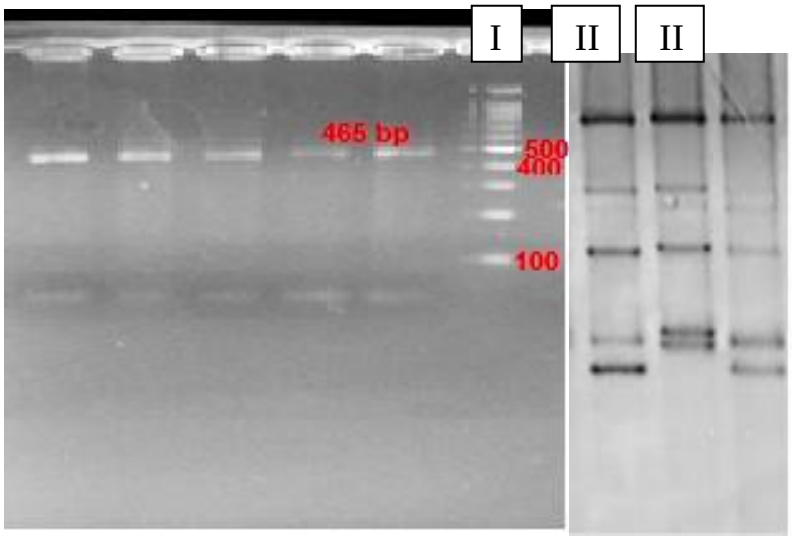
گونه دام	طولCDS	تعداد توالی‌ها	شماره دسترسی در بانک ژن
گاو	۳۷۹	۹	-|gi|982959468-|gi|402692615-|gi|402691953-|gi|84618406 -|gi|255988166-|gi|255988164-|gi|982959473-|gi|982959471| |gi|982959470
گاومیش	۳۷۹	۵	-|gi|594097503-|gi|373503621-|gi|253509230 |gi|594097506|gi|594097509
بزکاپراهیرکوس	۳۷۹	۱۰	-|gi|672354119-|gi|188571754-|gi|672354121-|gi|407186437 -|gi|926718587-|gi|926718585-|gi|926718583-|gi|528774680 |gi|926718591-|gi|926718589
گوسفند	۳۷۹	۱۰	-|gi|255988182-|gi|255988176- |gi|2773405-gi|255988180 -|gi|514257950-|gi|255988184-|gi|514257946-|gi|514257956 gi|514257964|gi|255988186
بز خلخالی	۳۷۹	۳	ab1693-ab1443-Ab160108

نتایج و بحث

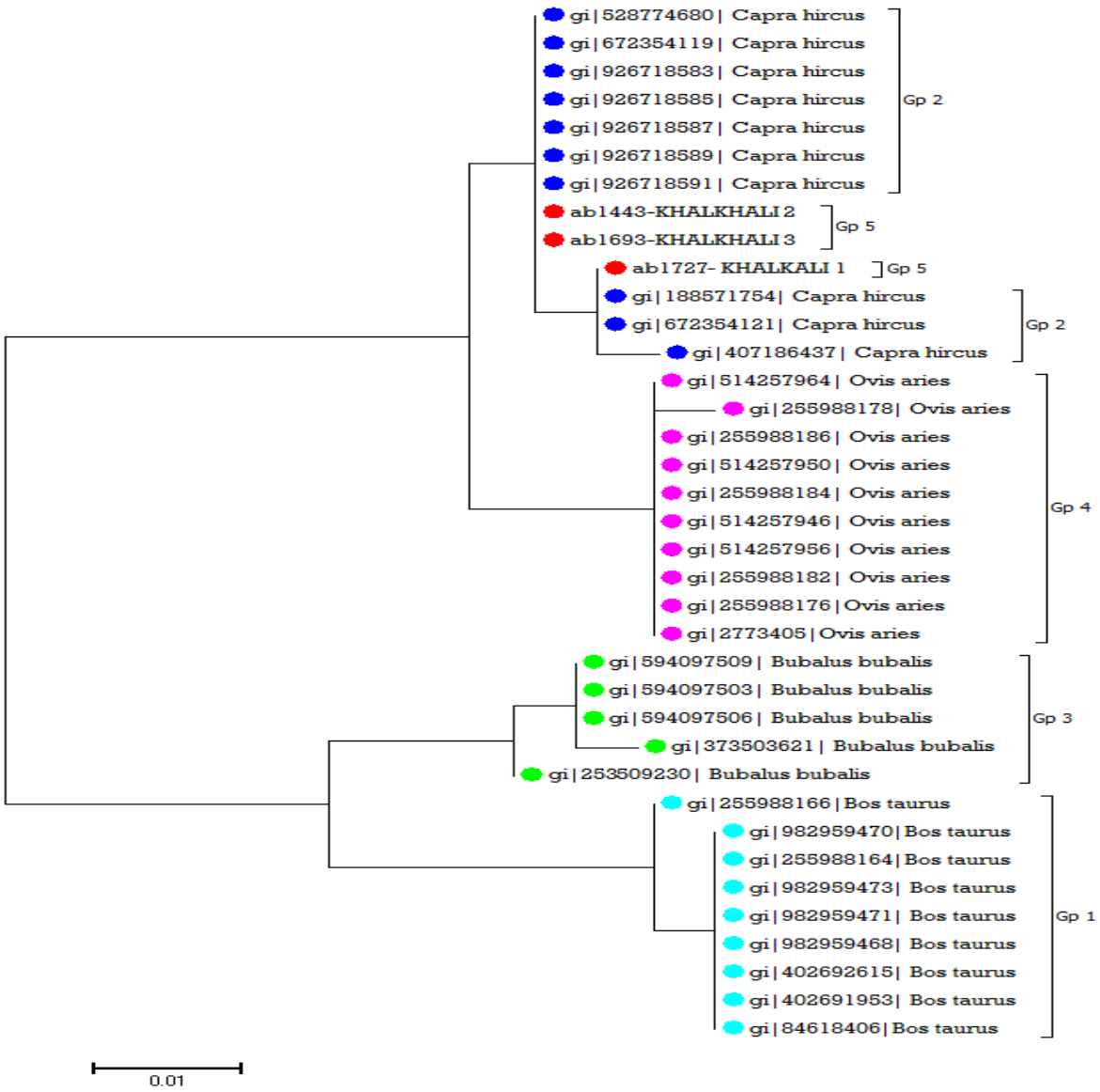
ژن گیرنده پرولاکتین با پرایمر اختصاصی به طول ۴۶۵ جفت بازی تکثیر و توالی‌یابی شدند. تعیین ژنوتیپ قسمت تکثیر شده با لی و همکاران (۲۰۱۰) ناحیه اینترون ژن گیرنده پرولاکتین را مورد بررسی قرار دادند که منجر به شناسایی دو ژنوتیپ در نژاد بزهای هایمن چینی شد و نشان دادند که این ژنوتیپ ها را می توان به عنوان ژن کاندیدا در بز استفاده کرد.

جهش های متفاوتی در اگزون ۱۰ (Sun و همکاران، ۲۰۰۸) و اگزون ۹ (Chen و همکاران، ۲۰۱۰) در بز و سایر حیوانات شناسایی شده است که باعث تغییر اسیدآمینه می شوند و اثر معنی داری بر روی صفات تولید شیر و تولیدمثل دارند. Hou و همکاران (۲۰۱۵) مطالعه ای را بر روی اگزون ۹ بزهای بوئر و Guanzhang با استفاده از روش PCR-RFLP انجام دادند که منجر به شناسایی دو جهش G به A در دو جایگاه ۱۴۵۷ و ۱۶۴۵ شد که به ترتیب باعث تغییر اسیدآمینه سرین به آسپارژین و والین به متیونین می شود و نشان دادند که جهش های حاصل علاوه بر صفات شیر تاثیر معنی داری بر روی صفت چندقلوزایی استفاده از روش SSCP منجر به شناسایی دو الگوی (دو ژنوتیپ) متفاوت گردید.

دارد. جهش مشاهده شده در این مطالعه مطابق با جهش شناسایی شده در جمعیت بز خلخالی است و با توجه به اینکه این جهش تاثیر معنی داری بر روی صفات عملکردی داشته است لذا ممکن است در جمعیت بزخلخالی نیز با صفات عملکردی در ارتباط باشد.مقایسه توالی استخراج شده از NCBI و با توالی های بدست آمده از بز خلخالی منجر به شناسایی ۲۸ چندشکلی شد که این تعداد تغییرات باعث ایجاد ۱۰ هاپلوتیپ مختلف شده است. فراوانی زیاد هاپلوتیپ در بین گونه‌ها مورد بررسی نشان دهنده تفاوت زیاد این ژن در بین گونه‌های اهلی است. آنالیز فیلوژنتیکی حاصل از این جهش نشان داد که خانواده بویدا در یک شاخه تکاملی قرار دارد و از بین آنها بزخلخالی در گروه بز کاپراهیرکوس قرار گرفته و با گوسفند در یک شاخه تکاملی قرار دارد و در شاخه‌های بعدی گاوسانان قرار داشتند(شکل۲).



شکل ۱- جایگاه ۴۶۵ جفت بازی (سمت چپ) و شناسایی الگهای مختلف اگزون ۹ ژن گیرنده پرولاکتین در بزهای خلخالی (سمت راست)
توالی یابی الگوهای مختلف از ژن گیرنده پرولاکتین منجر به شناسایی ۱ جایگاه جهش یافته شد که باعث تغییر باز آدنین به گوانین و در نهایت تغییر کدون ATG به GTG در موقعیت جایگاه ۲۷۵ گردید که این تغییر کدون باعث جایگزینی اسید آمینه والین به جای متیونین در ژن گیرنده پرولاکتین می شود.



شکل۲- درخت فیلوژنتیکی بین گونه‌های مختلف با استفاده از روش حداکثر درست نمایی.

بزخلخالی ● بز (کاپراهیرکوس) ●گوسفند ●گاو ● گاومیش

تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای

نتایج تجزیه تحلیل‌های نرم افزار DnaSp نشان داد که در قسمت انتخاب شده (در موقعیت بازی ۳۷۹-۱) تعداد جایگاههای متنوع ۲۸ باز بود. جایگاه متنوع نیز شامل ۳ جایگاه متنوع منفرد و ۲۵ جایگاه با آگاهی بخشی بالا[2] بود.

تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیپی و متوسط تفاوت‌های نوکلئوتیدی در بین گونه‌ها به ترتیب ۰/۰۴۴۳۹، ۰/۸۴۱ و ۱۰/۶۵۵ مشاهده شد (جدول ۲ و ۳).

[2] Parsimony informative site

جدول ۲- آماره‌های جمعیتی در حیوانات مزرعه ای بر اساس ژن گیرنده پرولاکتین

گونه دام	تعدادجایگاه	تعداد توالی	تعداد جایگاه چند-شکل	تعداد جایگاه منفرد	تعداد جهش منفرد	تعداد جهش چندگانه
گاو	۳۷۹	۹	۳	۳۷۳	۲	۱
گاومیش	۳۷۹	۵	۳	۲۹۲	۲	۱
بز	۳۷۹	۱۰	۲	۳۷۴	۱	۱
گوسفند	۳۷۹	۱۰	۱	۳۲۰	۱	۰
بز خلخالی	۳۷۹	۶	۱	۳۷۷	۰	۱

جدول ۳- آماره‌های جمعیتی بین گونه‌های مختلف حیوانات مزرعه‌ای بر اساس ژن گیرنده پرولاکتین.

گونه دام	تعداد هاپلوتیپ	تنوع نوکلئوتیدی	تنوع هاپلوتیپ	واریانس تنوع هاپلوتیپی
گاو	۳	۰/۰۰۳۲۲	۰/۴۱۷	۰/۰۳۶۳۵
گاومیش	۳	۰/۰۰۴۷۵	۰/۷۰۰	۰/۰۴۷۶۸
بزکاپراهیرکوس	۳	۰/۰۰۱۷۷	۰/۵۱۱	۰/۰۲۷۰
گوسفند	۲	۰/۰۰۰۶۲	۰/۲۰۰	۰/۰۲۳۷۶
بز خلخالی	۲	۰/۰۰۱۷۶	۰/۶۶۷	۰/۹۸۷۷

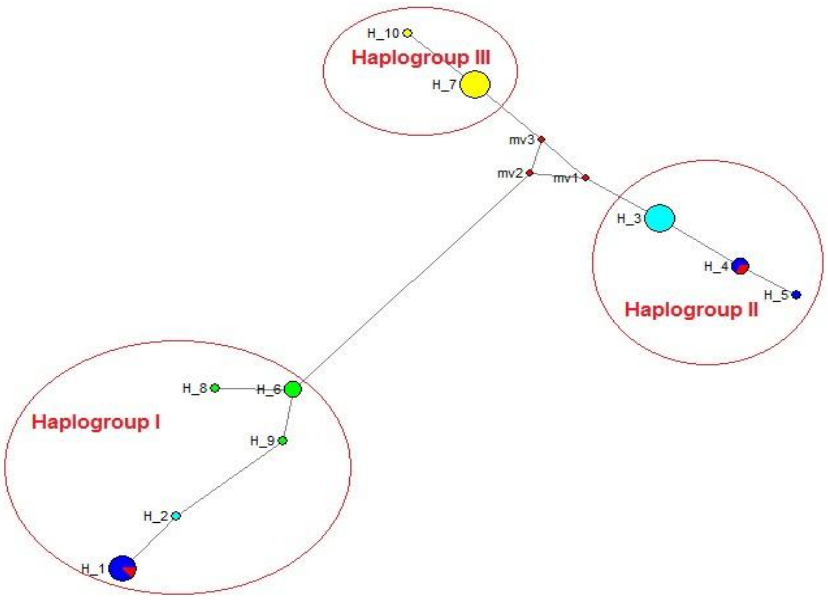
فاصله ژنتیکی حاصل از آنالیز توالی‌های مربوط به گونه‌های مختلف دام‌های اهلی در جدول ۴ آورده شده است . همان طور که مشاهده می‌شود بیشترین فاصله ژنتیکی بین گونه گوسفند و گاومیش، کمترین فاصله ژنتیکی بین بز کاپراهیرکوس و بز خلخالی ارائه شده است. گونه‌هایی که در رده بندی NCBI به هم نزدیک هستند فاصله ژنتیکی به دست آمده برای آنها پایین می‌باشد. همینطور مشخص شد که گاومیش بیشترین فاصله ژنتیکی و بز کاپراهیرکوس کمترین فاصله ژنتیکی را با بزخلخالی دارد که با نتایج رده بندی NCBI مطابقت دارد. آزمون Tajima در بین جمعیت بی‌معنی بود. آزمون تاجیما D بر اساس جهش‌های خنثی در توالی‌های مورد نظر می‌باشد. در زمانی که تاجیما D معنی دار نیست و برابر با صفر است نشان‌دهنده اندازه ثابت جمعیت و یا نبود هیچ انتخاب برای آن جایگاه می باشد که مطابق با نتایج خبیری و همکاران (۲۰۱۴) بود.

فواصل ژنتیکی نمایانگر میزان جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی های گونه های مورد بررسی می باشد. فاصله ژنتیکی بین دامنه ۰ تا ۱ تعریف شده است تمایز ژنتیکی F_{ST} و فاصله ژنتیکی D_{XY} میان گونه ها برای ژن گیرنده گرولاکتین به وسیله نرم افزار DnaSp محاسبه شد. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می شود فاصله ژنتیکی بین گونه بز با گاو نسبت به گوسفند کمتر می باشد و کمترین فاصله ژنتیکی بین گونه گاومیش و گوسفند دیده شد. تمایز ژنتیکی بین گوسفند و گاومیش کمترین و تمایز ژنتیکی بین گونه های بز با گاو در مقایسه با گوسفند کمتر بود در حالی که از نظر ژنتیکی اجداد گوسفند به بز نزدیک می باشد با توجه به اینکه میزان ترکیبات شیر در گاو و بز نزدیک بهم می باشد و این ژن در ارتباط مستقیم با ترکیبات شیر است بنابراین بنظر می رسد که میزان حفاظتی این ژن در گاو و بز نسبت بهم بیشتر از گوسفند باشد نتایج حاصل متفاوت از نتایج مربوط به مطالعه سانگ و همکاران (۲۰۱۵) براساس ژن MSTN می باشد.

جدول ٤- نتایج مربوط به فاصله ژنتیکی (D_{XY}) و تمایز ژنتیکی (F_{ST}) در بین دامهای مزرعه‌ای

Fst/Dxy	گاو	گاومیش	بز	گوسفند	بز خلخالی
گاو	۰	۰/۹۷۶۹۶	۰/۹۴۸۳۱	۰/۹۸۹۹۴	۰/۹۷۶۸۸
گاومیش	۰/۰۸۰۳۷	۰	۰/۹۵۳۵۹	۰/۹۰۳۷۰	۰/۲۵۰۰۰
بز	۰/۰۴۱۲۰	۰/۰۶۵۸۳	۰	۰/۹۶۹۷۰	۰/۹۵۳۳۹
گوسفند	۰/۰۸۷۴۵	۰/۰۱۸۷۵	۰/۰۶۸۷۵	۰	۰/۹۰۲۲۶
بز خلخالی	۰/۰۸۰۰۹	۰/۰۰۲۲۲	۰/۰۶۵۵۶	۰/۰۱۸۴۷	۰

۱۰ هاپلوتیپ مختلف با تنوع هاپلوتیپی ۰/۸۴۰۸ در گونه‌های مورد مطالعه مشخص شد. بررسی تنوع هاپلوتیپی در داخل گونه‌ها ۳ هاپلوتیپ درگاو، ۳ هاپلوتیپ در گاومیش، ۳ هاپلوتیپ در بز، ۲ هاپلوتیپ در گوسفند و ۲ هاپلوتیپ در بز خلخالی را مشخص کرد. شبکه روابط هاپلوتیپی در گونه‌ها با استفاده از نرم افزار Network نشان داده شده است (شکل ۳). علامت mvها در شبکه نشان دهنده وجود هاپلوتیپ بالقوه است که در نمونه‌های ما مشاهده نشده است. همانطور که از نتایج هاپلوتیپ ها و آنالیز شبکه های نشان می دهد که این ژن در بین دام‌های بررسی تنوع نسبتا بالایی دارد و لذا تنوع فنوتیپی موجود در پروتئین شیر در داخل و بین گونه‌ها می‌تواند به دلیل وجود گروه‌های هاپلوتیپی مختلف در گونه‌ها باشد به عنوان مثال براساس بررسی جمعیت بز و تنوع خیلی بالا در پروتئین شیر بز یک گروه هاپلوتیپی از لحاظ آنالیز شبکه‌ای با گاومیش در یک گروه قرار گرفته است (هاپلوگروه II) و گروه دیگر بیشتر با گروه گاو یک هاپلوگروه (هاپلوگروه I) را تشکیل داده اند.



بزخلخالی ● بز (کاپراهیرکوس) ●گوسفند ●گاو ● گاومیش

شکل ۳- آنالیز شبکه‌ای روابط هاپلوتیپی مربوط به ژن گیرنده پرولاکتین در گونه‌ها اهلی مزرعه‌ای

با توجه به جهش شناخته شده در ژن گیرنده پرولاکتین در این مطالعه که منجر به تغییر اسید آمینه می شود و این جهش و ارتباط معنی داری آن در جمعیت بزهای مختلف در جهان نیز مشاهده شده است و از طرف دیگر ژن گیرنده پرولاکتین به عنوان یک نشانگر ژنتیکی سودمند در برنامه های بهبود ارزش اصلاحی ژنتیکی مطرح است توصیه می شود ارتباط جهش مورد نظر با صفات تولیدی شیر در جمعیت بز خلخالی بررسی گردیده و در صورت معنی دار بودن در برنامه های اصلاح نژادی استفاده گردد.

منابع

خالداری، م.(۱۳۸۲). اصول پرورش گوسفند و بز.چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران.

علیجانی، ص. (۱۳۸۸). ردیابی ژنهای عمده در حیوانات مزرعه‌ای با استفاده از آمار بیزی و نشانگرهای مولکولی. پایان نامه دکتری. دانشکده کشاورزی کرج-دانشگاه تهران.

Abula, R., Zhang. H.L, Chen, Y. and Yao, X.K. (2013). Novel polymorphism detected in the prolactin receptor gene of Yilli horse (Equus caballus) by PCR-SSCP. *Journal of Animal and Feed Science*. 22: 70-76.

An, X., Hou, J., Gao, T., Lei, Y., Li, G., Song, Y., Wang, J. and Cao, B. (2015). Single-nucleotide polymorphisms g. 151435C> T and g. 173057T> C in PRLR gene regulated by bta-miR-302a are associated with litter size in goats. *Theriogenology*. 83, 1477-1483. e1471.

Arden, K.C., Boutin, J.M., Djiane, J., Kelly, P.A. and Cevenee, W.K. (1990). The receptor for Prolactin and Growth hormone are localize in the same region of the human chromosome 5. *Cyto Genetic Cell Genetic*. 53: 161-165.

Bole-Feysote, G., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. and Kelly, P.A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*. 19(3), 225-268.

Bryme, P., Kaminski, S. and Wojcikk, E. (2005). Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of bovin prolactin gene and its association with milk performance traits. *Journal of Applied Genetics*. 45: 179-185.

Chen, Y., Luo, Q.J., Yang, J.Q., Yang, F.Y., Zhang, Y. J., Li, D.Z. and Zhu, W.Y. (2010). Relationships between genetic polymorphisms of intron 9 and exon 10 of prolactin rceptor gene and litter size of sheep. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*. 37, 100-106.

Di, R., Yin, J., Chu, M., Cao, C.L., Feng, T., Fang, L., and Zhou Z.X. (2011). DNA polymorphism of introns 1 and 2 of Prolactin Receptor Gene and its association with litter size in goats. *Animal Science Papers and Reports*. 4:343-350

Hayes, H., Le Chalony, C., Goubin, G., Mercier, D., Payen, E., Bignon, C., & Kohno, K. (1996). Localization of ZNF164, ZNF146, GGTA1, SOX2, PRLR and EEF2 on homoeologous cattle, sheep and goat chromosomes by fluorescent in situ hybridization and comparison with the human gene map. *Cytogenetic and Genome Research*. 72(4), 342-346.

Hou, J.X., Fang, F., An, X.P., Yan, Y., Ma, T., Han, P., Meng, F., Song, Y.X., Wang, J.G. and Cao, B.Y. (2014). Polymorphisms of PRLR and FOLR1 genes and association with milk production traits in goats. *Genetics and Molecular Research.* 13 (2): 2555-2562.

Hou, J., An, X., Han, P., Peng, J., and Cao, B. (2015). Two missense mutations in exon 9 of caprine PRLR gene were associated with litter size. *Animal Genetics*. 46(1), 87-90.

Hou, J., An, X., Song, Y., Wang, J., Ma, T., Han, P. and Cao, B. (2013). Combined effects of four SNPs within goat PRLR gene on milk production traits. *Gene*. 529(2), 276-281.

Khabiri, A.A., Tahmoorespur, M., Nassiri, M.R., and Hadi, M. (2014). Sequencing and bioinformatics analysis of the partial promoter region of κ-casein (CSN3) gene in Iranian Bacterianus and Dromedaries camels. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2, 1719-1725.

Li, Y., Zhang, L., Shang, L., Wang, H., Zou, H., Zhang, H., and Ji, D. (2010). Genetic polymorphisms at three loci of PRLR and FSHR gene correlate with litter size in Chinese Haimen goat. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9(22), 2835-2838.

Song, X., Xu, C., Yue, Z., Wang, L., Wang, G., and Yang, F. (2015). Bioinformatic analysis based on the complete coding region of the MSTN gene within and among different species. *Genetics and molecular research: GMR*. 15(2).

Sun, R.P., Wang, L.X., Zhu, G.Q., Wang, J.G., Song, Y.X., Liang, Z.Y. and CAO, B.Y. (2008). Polymorphism of Exon 10 of Prolactin Receptor Gene and Its Relationship with Milk Performance of Xinong Saanen Dairy Goat. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 12, 004.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by dna polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*. 28(10):2731-2739..

Trott, J.F., Freking, B.A. and Hovey, R.C. (2014). Variation in the coding and 3′ untranslated regions of the porcine prolactin receptor short form modifies protein expression and function. *Animal Genetics*. 45, 74-86.

Viitala, S., Szyda, J., Blott, S., Schulman, N., Lidaure, M., Maki-Tanila, S., Georges, M. and Vilkki, J. (2006). The Role of the Bovine Growth Hormone Receptor and Prolactin Receptor Genes in Milk, Fat and Protein Production in Finnish Ayrshire Dairy Cattle. *Genetics*. 173: 2151–2164.

Wu, X.H., Mu, X.K., Lu, J.Y., Wang, Y. and Zi, X.D. (2014). mRNA expression, polymorphism of prolactin receptor gene and their association with prolificacy in Lezhi black goats. *Journal of Applied Animal Research* 42, 414-419.

Zhang, J.L., Zan. L.S., Fang. F., Zhang. F., Shen. G. and Tian. W.Q. (2008). Genetic variation of PRLR gene and association with milk performance traits in dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. 88: 33-39