Animal Production Research

Vol. 11, No. 2, 2022 (81-92)
doi: 10.22124/AR.2022.21423.1679
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Association of the *THRSP* gene exon 1 polymorphism with body weight traits and litter size in Markhoz goats

M. Ghasemi[1], P. Zamani[2*], R. Abdoli[3], A. Moradalian[1]

1. Former MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
3. Assistant Professor, Iran Silk Research Centre, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gilan, Iran

(Received: 01-01-2022 – Accepted: 07-03-2022)

Introduction: Generally, genetic markers, associated with metabolic pathways, might be used in marker-assisted selection to improve production and reproduction traits in farm animals. Especially, some traits with low heritabilities, such as reproduction and health traits could not be easily improved by classic selection strategies. However, the use of genetic markers and marker-assisted selection are considered powerful tools for the genetic improvement of low-heritable traits. Thus, detection of genetic markers associated with production and reproduction traits is an effective way to save endangered indigenous breeds, such as the Markhoz goat, a mohair-producing breed in Iran. The thyroid hormone-responsive (*THRSP*) gene is a candidate gene involved in thyroid hormone functions and the lipogenesis process. This gene is a protein-coding gene, with two exons, located on chromosome 29 in goats. There are some reports on the association of *THRSP* with production traits in farm animals. There are limited studies on metabolic pathways of *THRSP* and its associations with important economic traits in small ruminants and no study on the association of *THRSP* and reproduction traits was found in the literature. The aim of the present study was the investigation of the *THRSP* gene polymorphism and its association with body weight and litter size traits in Markhoz goats.

Materials and methods: A total of 140 blood samples of Markhoz goats were randomly collected from the Research and Breeding Station in Kurdistan province in western Iran. Genomic DNA was extracted from whole blood samples. A pair of primers were designed using the Primer 3 online software to amplify a 486 bp fragment in *THRSP* gene exon 1. The designed primers were as follows:

Forward: 5'-AGTCTGCGGGACTCCATATG-3'

Reverse: 5'-AAAATGGGACAGGCCATGT-3'

Polymorphism of the amplified fragment was investigated using the single-strand conformational polymorphism (SSCP) method and sequencing of three random samples for each SSCP pattern. The observed sequences were aligned to the GenBank reference sequence using the MegAlign module of DNAStar software and compared based on the Clustal W method. The sequences were translated by the Translate section of the ExPASy website (us.expasy.org/translatetool). Associations of body weight traits, including birth weight, three-month, six-month, nine-month, and 12-month body weights, with the observed genotypes were investigated using a general linear model, fitting genotype, birth year, birth type, and dam age as the fixed factors. The association of the observed genotypes with litter size was investigated using a two-way Chi-squared test. The SAS 9.4 program was employed for the association analyses.

* Corresponding author: pzamani@basu.ac.ir

CC BY

Results and discussion: In the studied samples, two different SSCP patterns and two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected in 148 and 173 bp locations of the studied fragment, as g.148G>A (resulting in Arginine to Glutamine amino acids exchange) and g.173A>G (a synonymous mutation), both as heterozygous loci. In the studied population, the frequency of the double-homozygous genotype, GG/AA (0.743), was noticeably higher than the double-heterozygous genotype, which is GA/AG (0.257). The alleles G and A had high frequencies, both equal to 0.871 in the 148 and 173 bp loci, respectively. Both loci had a significant deviation from Hardy-Weinburg equilibrium (P<0.0001). Polymorphism of the studied fragment did not have any significant effect on body weight traits. A significant association was observed between the detected genotypes and litter size. Whereby, litter size in double-heterozygous does (1.21) was significantly higher than the double-homozygous individuals (1.04), (P = 0.015). The present study is probably the first report on the association of the *THRSP* gene with litter size in goats. The THRSP is a protein which involves in thyroid hormone function and therefore might affect many metabolic pathways. However, a significant association of the observed genotypes with prolificacy is probably due to the role of THRSP in lipids metabolism and the association of lipids metabolism with reproduction performance.
Conclusions: The *THRSP* exon 1 is polymorphic in Markhoz goats. The studied fragment did not have any significant associations with body weight traits, but it had a significant effect on litter size. Based on the results of this study, the *THRSP* gene could be considered a candidate gene for litter size, and the detected SNPs at 148 and 173 bp of the studied fragment, could be used for marker-assisted selection in Markhoz goats. However, more studies on possible associations between *THRSP* polymorphism and production and reproduction traits are still needed in other goat breeds.
Keywords: Marker-assisted selection, Fertility, Reproduction, Single-nucleotide polymorphism, Candidate gene
Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of Bu-Ali Sina University, Iran.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.
Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.
Funding: The authors received no specific funding for this project.

How to cite this article:

Ghasemi M., Zamani P., Abdoli R. and Moradalian A. 2022. Association of the *THRSP* gene exon 1 polymorphism with body weight traits and litter size in Markhoz goats. Animal Production Research, 11(2): 81-92. doi: 10.22124/AR.2022.21423.1679

تحقیقات تولیدات دامی

سال یازدهم/شماره دوم/تابستان ۱۴۰۱ (۹۲-۸۱)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

ارتباط چندشکلی اگزون ۱ ژن *THRSP* با صفات وزن بدن و تعداد فرزند در هر زایش در بزهای مرخز

مریم قاسمی[۱]، پویا زمانی[۲*]، رامین عبدلی[۳]، علی مرادعلیان[۱]

۱ – دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۳- استادیار، مرکز تحقیقات ابریشم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گیلان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۶)

چکیده

ژن پروتئین واکنشی هورمون تیروئید (*THRSP*) یکی از ژن‌های کاندید در فرآیندهای لیپوژنز و مرتبط با صفات تولیدی در جانوران است. پژوهش حاضر با هدف بررسی چندشکلی اگزون ۱ ژن *THRSP* و ارتباط آن با صفات وزن بدن و تعداد فرزند در هر زایش در بزهای مرخز انجام شد. از تعداد ۱۴۰ بز مرخز به‌طور تصادفی نمونه‌های خون تهیه و DNA آن‌ها استخراج شد. برای تکثیر یک قطعه ۴۸۶ جفت بازی از اگزون ۱ ژن *THRSP*، یک جفت آغازگر طراحی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. چندشکلی بخش تکثیر شده، با روش‌های چندشکلی فضایی تک رشته‌ای (SSCP) و توالی‌یابی DNA مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه‌های مورد مطالعه، دو الگوی باندی متفاوت SSCP و دو چندشکلی تک نوکلئوتیدی به‌صورت g.148G>A (منجر به تغییر اسید آمینه آرژنین به گلوتامین) و g.173A>G (جهش هم‌معنی)، هر دو به‌صورت جایگاه‌های هتروزیگوت شناسایی شدند. اثر چندشکلی این ژن روی صفات وزن بدن معنی دار نبود، اما تعداد فرزند در هر زایش به‌طور معنی‌داری در افراد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت مضاعف به میزان ۰/۱۷ بالاتر از افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت مضاعف بود ($P<۰/۰۵$). بر اساس نتایج می‌توان ژن *THRSP* را به عنوان یک ژن کاندید برای صفت تعداد فرزند در هر زایش در نظر گرفت و از چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در انتخاب به کمک نشانگر بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی: انتخاب به کمک نشانگر، باروری، تولیدمثل، چندشکلی تک نوکلوتیدی، ژن کاندید

* نویسندهٔ مسئول: pzamani@basu.ac.ir

doi: 10.22124/AR.2022.21423.1679

مقدمه

در بررسی‌های انجام شده روی ساز و کارهای ژنتیکی سوخت و ساز چربی در حیوانات و ژن‌های مرتبط با برخی آنزیم‌ها (Wakil and Abu-Elheiga, 2009) و هورمون‌ها (Etherton, 2000; Paracchini *et al*., 2005)، تعدادی نشانگر مولکولی مرتبط با محتوای چربی گوشت یافت شده‌اند که می‌توانند برای بهبود ویژگی‌های اقتصادی مهم در نژادهای بز به‌کار برده شوند (Esmaeelkhanian *et al*., 2007).

نقش پروتئین واکنشی هورمون تیروئید (THRSP) در فرآیند لیپوژنز باعث جلب توجه پژوهش‌گران شده است (Zhou *et al*., 2011). در ابتدا، هورمون THRSP به عنوان یک پروتئین کلیدی در مطالعات بررسی‌کننده اثر هورمون تیروئید بر بیان mRNA کبدی موش صحرایی شناسایی شد (Seelig *et al*., 1981). تحقیقات بیشتر در جوندگان نشان داد که این هورمون در کبد یا بافت چربی به شدت به وسیله محرک‌های لیپوژنیک مانند تغذیه رژیم‌های پرکربوهیدارت فعال می‌شود (LaFave *et al*., 2006). این ژن به‌طور عمده در غده پستانی، چربی و کبد بیان می‌شود و یک پروتئین اسیدی کوچک را کد می‌کند (Zhan *et al*., 2006).

ژن پروتئین واکنشی هورمون تیروئید (*THRSP*) یک ژن کدکننده پروتئین است. این ژن در بز دارای دو اگزون است و در موقعیت ۱۷/۴ میلیون جفت باز روی کروموزوم ۲۹ قرار دارد (ncbi.nlm.nih.gov/gene/102178144). پروتئین کد شده به وسیله این ژن با محصول ژن S14 در موش مشابه است که در کبد، غدد پستانی و بافت چربی بیان می‌شود و بیان آن تحت تأثیر عوامل هورمونی و تغذیه‌ای قرار دارد (Schering *et al*., 2017).

در انسان، ارتباط ژن *THRSP* با چاقی (Chagnon *et al*., 1998)، رشد و تمایز سلول‌های سرطانی سینه (Sanchez-Rodriguez *et al*., 2005) نشان داده شده است. همچنین، بیان mRNA ژن *THRSP* همبستگی بالایی با محتوای چربی عضلانی گاوهای آمیخته Wagyu × Hereford داشته است (Wang *et al*., 2009). بیان بیش از حد ژن *THRSP* باعث افزایش سطوح تری آسیل گلیسرول در سلول‌های اپی‌تلیال پستانی گاو و میزان بیان ژن‌های لیپوژنز شامل ژن سنتز اسید چرب (FAS)، ژن گیرنده فعال‌کننده پروکسی‌زوم گاما (PPARγ) و پروتئین متصل‌کننده عنصر تنظیم‌کننده کلسترول نوع ۱ (SREBP1) شد (Cui *et al*., 2015). در طیور نیز اثر ژن *THRSP* بر سوخت و ساز چربی نشان داده شده است (Breuker *et al*., 2010) و با توجه به ارتباط چندشکلی-های تک نوکلئوتیدی این ژن با ذخیره چربی در طیور (Wang *et al*., 2004) و خوک (Chen *et al*., 2011)، ممکن است این ژن برای انتخاب به کمک نشانگرها در این گونه‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در پژوهش دیگری نیز ارتباط چندشکلی‌های ژن *THRSP* با فاصله از شیرگیری تا فحلی در خوک گزارش شده است (Rempel *et al*., 2012).

در پژوهشی روی سه نژاد بز سانن، گوانژونگ و بوئر، ژن *THRSP* به عنوان یک ژن کاندیدای قوی و موثر بر صفات رشد مطرح و ارتباط SNP تشخیص داده شده در این ژن با صفات رشد مورد بررسی قرار گرفت که نتایج ارتباط ژنوتیپ-های متفاوت با وزن بدن و ابعاد سینه در نژاد بز بوئر معنی‌دار بود (An *et al*., 2012). در پژوهشی روی بزهای نژاد مرخز، چندشکلی اگزون دو این ژن مورد بررسی قرار گرفت که در آن، با وجود سه چندشکلی تک نوکلئوتیدی در بخش مورد بررسی، هیچ ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی‌های مشاهده شده با صفات تولیدی و تولیدمثلی بز مرخز مشاهده نشد (Moradalian *et al*., 2018).

مطالعات انجام شده روی تاثیر ژن *THRSP* در مسیرهای سوخت و ساز و صفات تولیدی و تولیدمثلی نشخوارکنندگان کوچک (گوسفند و بز) بسیار محدود هستند و بسیاری از ابعاد ارتباط چندشکلی‌های موجود در این ژن با صفات مهم اقتصادی در این گونه‌ها هنوز نامشخص است. از سوی دیگر، با توجه به ارتباط THRSP با عملکرد هورمون تیروئید و نقش آن در سوخت و ساز چربی‌ها، ممکن است که این ژن با صفات اقتصادی دیگر نیز ارتباط داشته باشد. در بررسی منابع، هیچ پژوهشی در رابطه با اثر این ژن روی صفات تولیدمثلی یافت نشد. با توجه به گزارش موجود در رابطه با چندشکلی اگزون ۲ این ژن در بز (Moradalian et al., 2018)، پژوهش حاضر با هدف شناسایی چندشکلی اگزون ۱ ژن *THRSP* و بررسی ارتباط آن با صفات وزن و تعداد فرزند در هر زایش در بزهای نژاد مرخز انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد بررسی: برای مطالعه حاضر از گله موجود در ایستگاه تحقیقات پرورش و اصلاح نژاد بز مرخز استان کردستان، شهرستان سنندج استفاده شد. بز نژاد مرخز یکی از نژادهای در معرض انقراض در کشور است و بر اساس شواهد موجود، به نظر می‌رسد که کمتر از ۵۰۰ رأس از این نژاد باقی مانده باشد. گله مورد بررسی زیر شرایط مدیریتی نیمه متمرکز با سیستم آمیزش کنترل شده قرار دارد. آمیزش‌ها در این گله معمولاً در ماه‌های مهر و آبان انجام می‌شوند و دام‌ها از اوایل ماه اردیبهشت تا آذر از مراتع و پس‌چر مزارع تغذیه شده و پس از آن به‌صورت دستی به آنها خوراک داده می‌شود (Zamani and Almasi, 2017). در شجره جمعیت مورد بررسی، تا ۱۲ نسل گذشته، مجموعاً ۵۱۳۷ بز، شامل ۲۳۵ پدر و ۱۴۸۱ مادر وجود داشت.

نمونه‌گیری و استخراج DNA: برای انجام پژوهش حاضر از ۱۴۰ راس بز ماده مرخز سه تا هفت ساله دارای رکوردهای تولیدی به‌طور تصادفی نمونه خون تهیه شد. خون‌گیری از سیاهرگ وداجی گردن و با استفاده از لوله‌های ونوجکت حاوی ماده ضد انعقاد خون EDTA انجام گرفت و نمونه‌ها با فلاسک یخ به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه بوعلی سینا انتقال داده شد و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت استخراج DNA از کیت DNP™ شرکت سیناژن ایران استفاده شد.

طراحی آغازگر و PCR: براساس توالی ثبت شده در پایگاه NCBI (شماره بانک ژن XM_005699494.3) و با استفاده از نرم افزار برخط Primer 3، یک جفت آغازگر رفت و برگشت برای تکثیر یک قطعه ۴۸۶ جفت بازی از اگزون ۱ ژن *THRSP* طراحی شدند. توالی آغازگرها به‌صورت زیر بودند:

5’-AGTCTGCGGGACTCCATATG-3’ F
5’-AAAATGGGACAGGCCATGT-3’R

آغازگرها به وسیله شرکت سیناژن ایران، تولید شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Life Technologies و بر اساس برنامه دمایی و زمانی تکثیر جایگاه مورد نظر به صورت واسرسته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد.

هر واکنش تکثیر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس شرکت Ampliqon، یک میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر، یک میکرولیتر DNA ژنومی استخراج شده با غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر و هفت میکرولیتر آب استریل دو بار تقطیر آماده شد. پس از انجام واکنش PCR، برای اطمینان از صحت تکثیر محصولات، از الکتروفورز افقی روی ژل آگارز دو درصد، همراه با خط‌کش مولکولی ۵۰ جفت بازی ساخت شرکت سیناژن ایران استفاده شد.

چندشکلی فضایی تک رشته‌ای (SSCP): به منظور انجام روش SSCP روی قطعات تکثیریافته حاصل از PCR، مقدار پنج میکرولیتر از محصولات با مقدار پنج میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (شامل برم‌فنل‌بلو ۰/۰۵ درصد، گزیلن سیانول ۰/۰۵ درصد، فرمامید ۹۵ درصد و EDTA ۲۰ میلی‌مولار) به نسبت یک به یک به مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سلسیوس تک‌رشته‌ای شدند، سپس به مدت پنج دقیقه جهت جلوگیری از دو رشته‌ای شدن، که بلافاصله پس از این مرحله و به جهت ممانعت از چسبیدن رشته‌های مکمل انجام شد، به سرعت در ظرف حاوی یخ قرار داده شدند. در پایان، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی مدل PRO-21*22 ساخت شرکت پایاپژوهش پارس ایران روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد به مدت ۱۴ ساعت، با ولتاژ ۱۵۰ ولت و در دمای پنج درجه سلسیوس تفکیک شدند. جهت مشاهده و بررسی باندهای حاصل، از روش رنگ‌آمیزی با نیترات نقره ۰/۱ درصد استفاده شد (Sanguinetti *et al*., 1994).

تعیین توالی DNA: پس از رنگ‌آمیزی و شناسایی الگوهای متفاوت باندی حاصل از انجام روش SSCP روی ژل آکریلامید، سه نمونه از هر الگوی SSCP به مقدار ۲۰ میکرولیتر همراه با مقادیر مورد نیاز از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول در هر میکرولیتر برای توالی-یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی فرستاده شدند.

بررسی‌های بیوانفورماتیکی: نتایج حاصل از مقایسه توالی‌یابی الگوهای متفاوت با توالی مرجع ژن *THRSP* بز موجود در سایت NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) به شماره ژن بانک XM_005699494.3 با استفاده از بخش MegAlign نرم افزار DNAStar و روش Clustal W انجام شد. پس از شناسایی تغییرات و جهش‌های موجود در توالی‌های DNA، این توالی‌ها با بخش Translate tool سایت ExPASy (www.expasy.org) به توالی‌های اسیدهای آمینه ترجمه شدند.

بررسی فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی: محاسبه ساختارهای جمعیتی و ژنتیکی شامل فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی مشاهده شده و تطابق آنها با تعادل هاردی-واینبرگ با آزمون کای‌دو (Zamani, 2020) و با نرم افزار SAS ویرایش ۹/۴ (SAS Institute, 2014) انجام شد.

ارتباط با صفات: از مدل خطی زیر برای بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده با برخی صفات تولیدی شامل وزن تولد، وزن سه ماهگی، وزن شش ماهگی، وزن نه ماهگی و وزن یک‌سالگی استفاده شد:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + BY_j + BT_k + DA_l + e_{ijkl}$$

در این مدل، Y_{ijkl}= ارزش فنوتیپی صفات تولیدی مورد بررسی، μ میانگین جمعیت، G_i= اثر ژنوتیپ iام (دو سطح)، BY_j= اثر سال تولد (۸۹-۸۷، ۹۰، ۹۱، ۹۲ و ۹۴-۹۳)، BT_k= اثر نوع تولد (تک قلو و دوقلو-سه قلو)، DA_l=اثر سن مادر (۲، ۳، ۴، ۵ و ۶-۷ سال) و e_{ijkl}= آثار باقی‌مانده هستند. تجزیه مدل خطی عمومی و محاسبه میانگین‌های کمترین مربعات با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ (SAS Institute, 2014) انجام شد.

برای بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده با صفت تعداد بزغاله در هر زایش از آزمون کای‌دو (Chi-Square) با رویه FREQ در نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ (SAS, 2014) استفاده شد.

نتایج

تکثیر محصولات PCR: نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR قطعه ۴۸۶ جفت بازی اگزون ۱ ژن *THRSP* روی ژل آگارز دو درصد در شکل ۱ نشان داده شده است. درستی تکثیر قطعه مورد نظر و وجود باندهای واضح و متمایز، در شکل ۱ نمایان است.

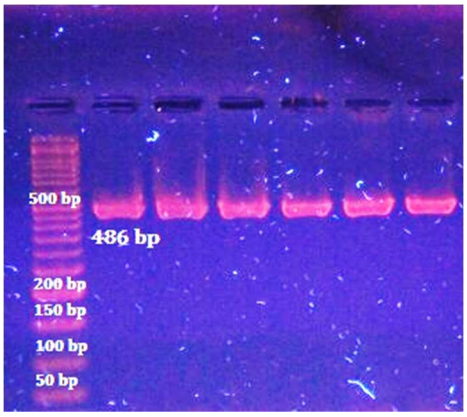

Fig. 1. The electrophoresis results of the PCR amplified products of the 486 bp fragment in the *THRSP* gene exon 1

شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات تکثیر شده حاصل از PCR قطعه ۴۸۶ جفت بازی اگزون یک ژن *THRSP*

الگوهای حاصل از SSCP: نتایج حاصل از واسرشته‌سازی محصولات PCR قطعه ۴۸۶ جفت بازی اگزون ۱ ژن *THRSP* نشان‌دهنده دو الگوی متفاوت باندی روی تمامی نمونه‌های حاصل از اعمال روش چندشکلی فضایی تک رشته‌ای روی ژل اکریلامید ۱۰ درصد بود (شکل ۲).

تعیین توالی و ترجمه: نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی نمونه‌ها، دو چندشکلی تک نوکلئوتیدی A/G را در جایگاه‌های ۱۴۸ و ۱۷۳ جفت بازی قطعه مورد بررسی نشان دادند. در مقایسه با توالی مرجع (با شماره ژن بانک XM_005699494.3)، در جایگاه ۱۴۸ و ۱۷۳ به ترتیب جهش‌های g.148G>A و g.173A>G به‌صورت هتروزیگوت مشاهده شدند (شکل ۳). همچنین، افراد در هر دو جایگاه یا به‌صورت هموزیگوت وحشی (GG/AA) و یا به‌صورت هتروزیگوت دارای جهش (GA/AG) بودند. در شکل ۴ نیز نتایج حاصل از هم‌ترازی توالی‌ها با یکدیگر و مقایسه با توالی مرجع (با شماره ژن بانک XM_005699494.3) نشان داده شده است. نتایج حاصل از ترجمه توالی‌ها نیز نشان‌دهنده تغییر اسید آمینه‌ای آرژنین به گلوتامین در جایگاه ۴۴ از توالی پروتئینی (p.44R>Q) مربوط به جهش شناسایی شده در جایگاه ۱۴۸ (g.148G>A) بود (شکل ۵). جهش مشاهده

شده در جایگاه ۱۷۳ (g.173A>G) خنثی و بدون ایجاد تغییر در توالی اسیدآمینه‌ای بود.

فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی و تعادل هاردی واینبرگ: فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی مشاهده شده در جمعیت مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. در جمعیت مورد بررسی، فراوانی افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت مضاعف GG/AA (۰/۷۴۳) به‌طور قابل توجهی از فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت مضاعف دارای جهش یعنی GA/AG (۰/۲۵۷) بالاتر بود. همچنین، در جایگاه‌های ۱۴۸ و ۱۷۳ قطعه مورد بررسی به ترتیب، آلل‌های G و A فراوانی بالاتری داشتند (جدول ۱). در بررسی تعادل هاردی واینبرگ، با توجه به عدم مشاهده هفت ژنوتیپ از نه ژنوتیپ ممکن، فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده تفاوت معنی‌داری با فراوانی‌های مورد انتظار در تعادل هاردی واینبرگ داشتند ($P<۰/۰۰۰۱$).

ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفات رشد و تعداد فرزند در هر زایش: در تجزیه مدل‌های خطی عمومی، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده و صفات وزن بدن مشاهده نشد. نتایج ارتباط ژنوتیپ‌های مشاهده شده با صفات وزن تولد و وزن‌های بدن در سنین سه، شش، نه و ۱۲ ماهگی در جدول ۲ نشان داده شده است. این در حالی است که در آزمون کای دو، ژنوتیپ‌های مشاهده شده ارتباط معنی‌داری با تعداد فرزند در هر زایش داشتند ($P<۰/۰۵$). میانگین تعداد فرزند در هر زایش در افراد دارای ژنوتیپ GA/AG (۱/۲۱ فرزند در هر زایش) به‌طور معنی‌داری بالاتر از افراد دارای ژنوتیپ GG/AA (۱/۰۴ فرزند در هر زایش) بود (جدول ۲). بنابراین در افراد دارای جهش‌های مشاهده شده، میانگین تعداد فرزند در هر زایش از افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت مضاعف بدون جهش حدود ۱۶ درصد بالاتر بود.

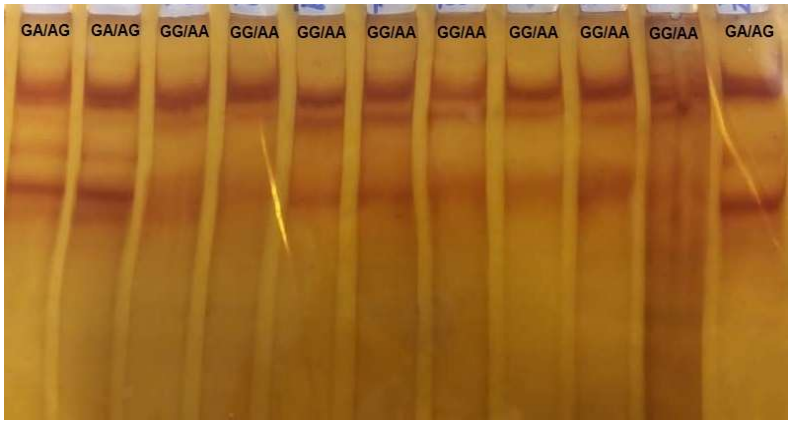

Fig. 2. Two different SSCP patterns of the 486 bp fragment in the *THRSP* gene exon 1

شکل ۲- دو الگوی متفاوت SSCP قطعه ۴۸۶ جفت بازی اگزون یک ژن *THRSP*

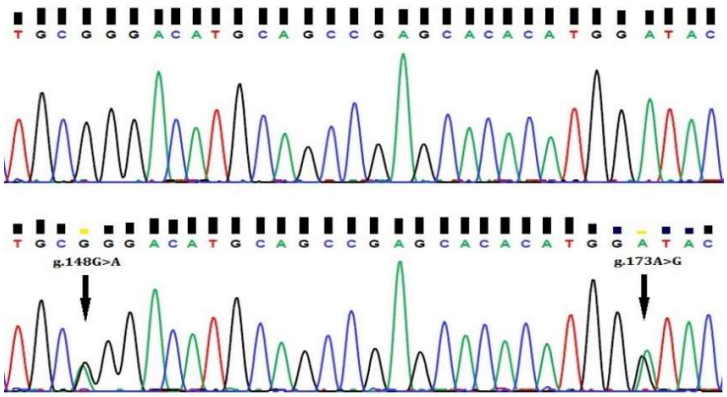

Fig. 3. Chromatogram of the detected SNPs (g.148G>A and g.173A>G) in the *THRSP* gene exon 1

شکل ۳- کروماتوگرام SNPهای شناسایی شده (g.148G>A و g.173A>G) در اگزون ۱ ژن *THRSP*

جدول ۱- فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی مشاهده شده در جایگاه‌های ۱۴۸ و ۱۷۳ جفت باز در جمعیت مورد بررسی و آزمون تعادل هاردی واینبرگ

Table 1. Genotypic and allelic frequencies observed at the 148 and 173 bp loci in the studied population and the Hardy-Weinburg equilibrium test

Genotype (148/173)	Number	Genotypic frequency (%)	Locus (bp)	Allelic frequency
GG/AA	104	0.743	148	f(G) = 0.871, f(A) = 0.129
GA/AG	36	0.257	173	f(A) = 0.871, f(G) = 0.129
Total	140		HW Chi-Sq = 177.55	$P < 0.0001$

HW chi-Sq: Chi-squared value for the Hardy-Weinberg equilibrium test; Allelic frequency equals to the corresponding homozygous plus half of the heterozygous genotypic frequencies.

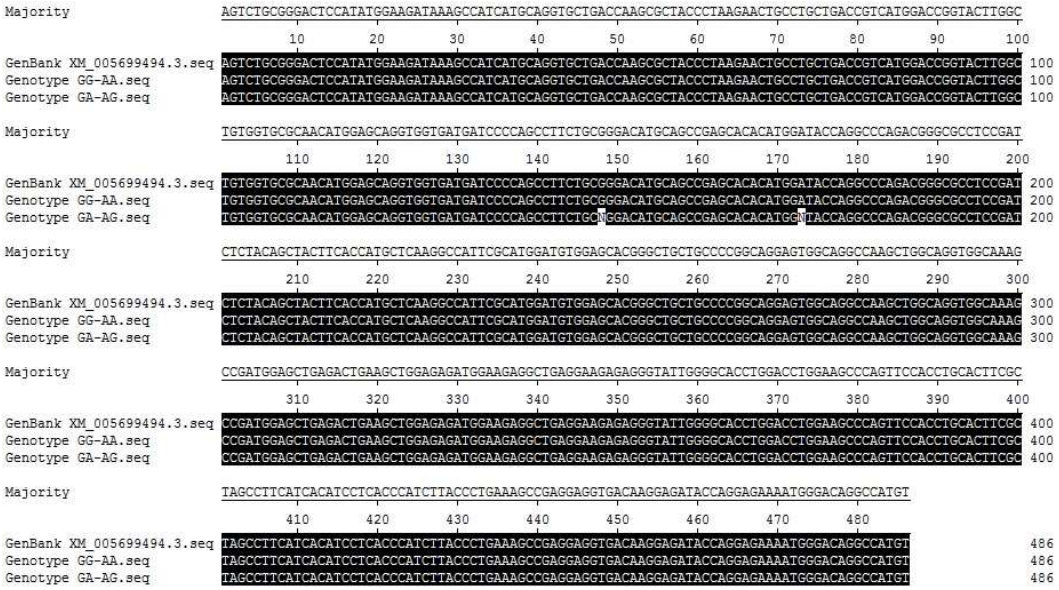

Fig. 4. Alignment of sequencing results of the 486 bp fragment in the *THRSP* gene exon 1 in different SSCP patterns and comparing with the goat sequence recorded in the NCBI database (GenBank No. XM_005699494.3); N shows the heterozygous genotype

شکل ۴- هم‌ترازی نتایج توالی‌یابی قطعه ۴۸۶ جفت بازی اگزون یک ژن *THRSP* در الگوهای متفاوت SSCP و مقایسه با توالی ثبت شده بز در پایگاه اطلاعاتی NCBI (شماره ژن‌بانک XM_005699494.3)؛ حرف N نشان‌دهنده ژنوتیپ هتروزیگوت است

جدول ۲- ارتباط ژنوتیپ‌های مشاهده شده با صفات وزن بدن و تعداد فرزند در هر زایش (میانگین ±انحراف استاندارد)

Table 2. Association of the observed genotypes with body weight and litter size traits (average ±standard deviation)

Genotype	BW0±SD	BW90±SD	BW180±SD	BW270±SD	BW365±SD	LS±SD
GG/AA	2.24±0.49	9.50±2.27	14.62±2.77	15.54±2.75	17.53±3.95	1.04±0.18
GA/AG	2.20±0.42	9.82±1.87	15.11±3.07	15.56±2.55	16.57±3.24	1.21±0.32
P-value	0.628	0.539	0.447	0.967	0.154	0.015*

BW0, BW90, BW180, BW270, BW365 and LS are birth weight, body weights 90, 180, 270 and 365 days of age and litter size, respectively. Means of the body weights traits are declared as least-squares means. *: The *P*-value of the Chi-square test.

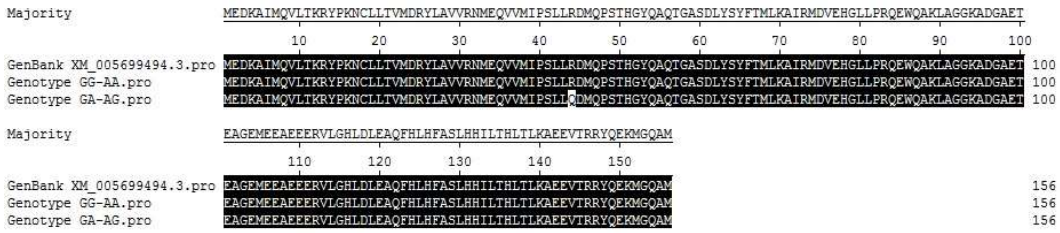

Fig. 5. Alignment of the codified polypeptide sequences by the studied fragment with the recorded polypeptide sequence for goat in the NCBI database (GenBank No. XM_005699494.3). The mutation detected in the 148 bp locus of the studied fragment deduced an amino acid exchange in the place 44 of the polypeptide chain (p.44R>Q)

شکل ۵- هم‌ترازی زنجیره‌های پلی پپتیدی کد شده به وسیله بخش مورد بررسی با توالی پلی‌پپتیدی ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI (ژن‌بانک XM_005699494.3)؛ جهش شناسایی شده در جایگاه ۱۴۸ جفت بازی بخش مورد بررسی سبب تغییر اسید آمینه آرژنین (R) به گلوتامین (Q) در جایگاه ۴۴ زنجیره پلی پپتید کد شده (p.44R>Q) شد

بحث

ژن‌های زیادی با تنظیم فیزیولوژیکی صفات کمّی در ارتباط هستند و هر یک از این ژن‌ها ممکن است به عنوان یک ژن کاندید مهم برای بررسی تنوع ژنتیکی صفات اقتصادی در حیوانات مزرعه‌ای باشند (Wu *et al*., 2008; An *et al*., 2010). دستیابی به اطلاعات ژنتیکی، به ویژه جایگاه‌های ژنتیکی مرتبط با صفات عملکردی، یکی از مراحل مهم در طراحی برنامه‌های اصلاح نژادی است (An *et al*., 2012). بنابراین، با استفاده از فن‌آوری‌های ژنتیک مولکولی می‌توان افراد را برای تعداد زیادی از صفات در سنین پایین و حتی در دوره جنینی ارزیابی نمود و دقت پیش‌بینی عملکرد افراد را افزایش داد (Selvaggi *et al*., 2009).

THRSP پروتئینی است که با توجه به ارتباط با عملکرد هورمون تیروئید، می‌تواند بر بسیاری از فرآیندهای سوخت و ساز تأثیرگذار باشد. این پروتئین نقش مهمی در سوخت و ساز چربی‌ها ایفا می‌کند و مطالعات زیادی، دخالت این ژن را در سوخت و ساز چربی در گونه‌های مختلف دام‌های اهلی شامل تک‌معده‌ای‌ها (Wang *et al*., 2004؛ Chen *et al*., 2011) و نشخوارکنندگان (Yao *et al*., 2016؛ Schering *et al*., 2017؛ Polasik *et al*., 2021؛ Wang *et al*, 2021) نشان داده‌اند. نقش دقیق این پروتئین در سوخت و ساز چربی‌ها کاملاً شناخته شده نیست، با این وجود، تولید آن با هورمون تیروئید، مصرف کربوهیدرات، تمایز بافت چربی و شیردهی افزایش یافته و با گلوکاگون و لینولئیک اسید مزدوج کاهش می‌یابد. آنزیم سازنده اسیدهای چرب (Fatty acid synthase) در بافت‌های چربی، کبد و پستان نیز با بیان آن همراه است (Kuemmerle and Kinlaw, 2011).

مطالعات زیادی روی چندشکلی ژن *THRSP* در حیوانات اهلی انجام شده است. در پژوهشی مشاهده شد که ژن *THRSP* در جوجه به‌صورت تکرار شده است و دو شکل این ژن شامل *THRSPα* و *THRSPβ*، در این گونه حضور دارد. در این بررسی هر دو پارالوگ دارای چندشکلی‌های ایندل (درج-حذف) بودند و واریانت‌های *THRSPα* با ذخیره چربی شکمی در جوجه‌ها ارتباط داشتند (Wang *et al*., 2004). در خوک‌ها، SNP یافت شده در ناحیه ’5 تنظیمی ژن *THRSP* با متوسط ضخامت چربی پشتی، متوسط رشد روزانه و ناحیه کمر ارتباط دارد (Wang *et al*., 2020). در گاوها نیز، چندشکلی در ناحیه کد کننده این ژن و ارتباط آن با صفات گوشت و لاشه، و ترکیب اسیدهای چرب در گوشت مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان دادند که ژنوتیپ‌های متفاوت *THRSP* با ظرفیت نگهداری آب و تردی گوشت در گاوهای Qinchuan و با اسیدهای چرب غیراشباع، اسیدهای چرب غیراشباع دارای یک باند دوگانه و چند نوع اسیدهای چرب در گوشت گاوهای Hanwoo ارتباط دارد (Zhang *et al*., 2009; Oh *et al*., 2014). در گاوهای شیری ایتالیایی هم ارتباط واریانت‌های *THRSP* با برخی صفات تولید شیر گزارش شده است (Fontanesi *et al*., 2014). اخیراً نیز نقش *THRSP* به عنوان یک مهارکننده ساخت چربی در بافت چربی گاوهای هلشتاین نزدیک زایش نشان داده شده است (Salcedo-Tacuma *et al*., 2020). در مطالعه‌ای دیگر، به منظور بررسی چندشکلی‌ها

و تجزیه و تحلیل میزان بیان ژن *THRSP* در نژادهای گوسفند دم‌دار و دنبه‌دار، نتایج نشان‌دهنده نقش تنظیمی این ژن در لیپوژنز گوسفندان نژاد دنبه بزرگ بود (Sun *et al*., 2021).

در بررسی منابع، مطالعات انجام شده در رابطه با چندشکلی ژن *THRSP* و ارتباط آن با صفات تولیدمثلی در نشخوارکنندگان بسیار محدود هستند. در تنها گزارش یافت شده روی بز، چندشکلی اگزون ۲ این ژن در بز مرخز بررسی شده است که در آن، سه چندشکلی تک نوکلئوتیدی به صورت g.530C>T، g.735G>A و g.752C>T مشاهده شدند، اما ارتباط چندشکلی‌های مشاهده شده با صفات تولیدی و تولیدمثلی گزارش نشد (Moradalian *et al.*, 2018). به نظر می‌رسد پژوهش حاضر، نخستین گزارش مبتنی بر ارتباط چندشکلی ژن *THRSP* با چندقلوزایی در بز باشد.

اثر ژن *THRSP* بر چندقلوزایی ممکن است ناشی از ارتباط سوخت و ساز چربی با باروری باشد، چرا که بر اساس گزارش‌های موجود (Lobaccaro *et al.*, 2012)، سوخت و ساز چربی‌ها با باروری در نرها و ماده‌ها در ارتباط است، به گونه‌ای که افزایش ذخیره چربی می‌تواند کاهش باروری را به دنبال داشته باشد (Hansen *et al.*, 2013). در پژوهش‌های گذشته، ارتباط صفات باروری با چندشکلی چندین ژن درگیر در سوخت و ساز چربی، شامل DGTA1، SCD1، DECR1، CRH، CBFA2T1، GH، LEP و NPY گزارش شده است (Wathes *et al.*, 2012).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به‌دست آمده، بخش مورد بررسی در اگزون ۱ ژن *THRSP* در جمعیت بزهای مرخز دارای چندشکلی بود. چندشکلی‌های مشاهده شده در این پژوهش، ارتباطی با صفات وزن بدن نداشتند، اما بر چندقلوزایی مؤثر بودند، به‌گونه‌ای که میزان چندقلوزایی در افراد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت مضاعف به‌طور معنی‌داری بالاتر از افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت مضاعف بود. بر اساس نتایج پژوهش حاضر می‌توان ژن THRSP را به عنوان یک ژن کاندید برای تعداد فرزند در هر زایش در نظر گرفت. همچنین، یافته‌های این پژوهش را می‌توان برای انتخاب با کمک نشانگرها برای بهبود بازده تولیدمثلی در بز مرخز توصیه نمود. با این حال، برای اطمینان از درستی نتایج این طرح، پیشنهاد می‌شود که ارتباط چندشکلی این ژن با صفات تولیدی و تولیدمثلی نژادهای دیگر بز نیز مورد بررسی قرار گیرد.

فهرست منابع

An X., Zhao H., Bai L., Hou J., Peng J., Wang J., Song Y. and Cao B. 2012. Polymorphism identification in the goat *THRSP* gene and association analysis with growth traits. Archives Animal Breeding, 55: 78-83.

Breuker C., Moreau A., Lakhal L., Tamasi V., Parmentier Y., Meyer U., Maurel P., Lumbroso S., Vilarem M. J. and Pascussi J. M. 2010. Hepatic expression of thyroid hormone-responsive Spot 14 protein is regulated by constitutive androstane receptor (NR1I3). Endocrinology, 151: 1653-1661.

Chagnon Y. C., Pérusse L. and Bouchard C. 1998. The human obesity gene map: The 1997 update. Obesity Research, 6: 76-92.

Chen H. Q., Zhou Q. Q., Wei H. Q., Qin J., Chen H. and Zhang Y. P. 2011. Association of polymorphism in the coding region of *THRSP* gene with lipogenesis capability in Pigs. Progress in Biochemistry and Biophysics, 38: 84-90.

Cui Y., Liu Z., Sun X., Hou X., Qu B., Zhao F., Gao X., Sun Z. and Li Q. 2015. Thyroid hormone responsive protein spot 14 enhances lipogenesis in bovine mammary epithelial cells: *In vitro* cellular and developmental biology. Animal, 51: 586-594.

Esmaeelkhanian S., Aliabad A. J. and Seyedabadi H. 2007. Genetic relationships among six Iranian goat population based on random amplified polymorphic DNA markers. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10: 2955-2959.

Etherton T. D. 2000. The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. The Journal of Nutrition, 130: 2623-2625.

Fontanesi L., Calò D. G., Galimberti G., Negrini R., Marino R., Nardone A., Ajmone-Marsan P. and Russo V. A. 2014. Candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle. Animal Genetics, 45: 576-580.

Hansen M., Flatt T. and Aguilaniu H. 2013. Reproduction, fat metabolism, and life span: what is the connection? Cell Metabolism, 17: 10-19.

Kuemmerle N. B. and Kinlaw W. B. 2011. THRSP (thyroid hormone responsive). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 15: 480-482.

Lobaccaro J. M. A., Brugnon F., Volle D. H. and Baron S. 2012. Lipid metabolism and infertility: is there a link? Clinical Lipidology, 7: 485-488.

LaFave L. T., Augustin L. B. and Mariash C. N. 2006. S14: Insights from knockout mice. Endocrinology, 147: 4044-4047.

Moradalian A., Zamani P. and Abdoli R. 2018. Polymorphism of the *THRSP* gene exon 2 in Markhoz goats. The 8th Iranian Congress of Animal Science, Kurdistan University, Sanandaj, Iran. (In Persian).

Oh D. Y., Lee Y. S., La B. M., Lee J. Y., Park Y. S., Lee J. H., Ha J. J., Yi J. K., Kim B. K. and Yeo J. S. 2014. Identification of exonic nucleotide variants of the thyroid hormone responsive protein gene associated with carcass traits and fatty acid composition in Korean cattle. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 27: 1373-1380.

Paracchini V., Pedotti P. and Taioli E. 2005. Genetics of leptin and obesity: A HuGE rview. American Journal of Epidemiology, 162: 101-114.

Polasik D., Golińczak J., Proskura W., Terman A. and Dybus A. 2021. Association between THRSP gene polymorphism and fatty acid composition in milk of dairy cows. Animals, 11: 1144.

Rempel L. A., Nonneman D. J. and Rohrer G. A. 2012. Polymorphism within thyroid hormone responsive (THRSP) associated with weaning-to-oestrus interval in swine. Animal Genetics, 43: 364-365.

Salcedo-Tacuma D., Parales-Giron J., Prom C., Chirivi M., Laguna J., Lock A. L. and Contreras G. A. 2020. Transcriptomic profiling of adipose tissue inflammation, remodeling, and lipid metabolism in periparturient dairy cows (*Bos taurus*). BMC Genomics, 21: 824.

Sanchez-Rodriguez J., Kaninda-Tshilumbu J. P., Santos A. and Perez-Castillo A. 2005. The spot 14 protein inhibits growth and induces differentiation and cell death of human MCF-7 breast cancer cells. Biochemical Journal, 390: 57-65.

Sanguinetti C. J., Dias Neto E. and Simpson A. J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. BioTechniques, 17: 914-921.

SAS Institute. 2014. Users Guide, Version 9.4: Statistics. SAS Institute, Cary, NC, USA.

Schering L., Albrecht E., Komolka K., Kühn C. and Maak S. 2017. Increased expression of thyroid hormone responsive protein (THRSP) is the result but not the cause of higher intramuscular fat content in cattle. International Journal of Biological Sciences, 13: 532-544.

Seelig S., Liaw C., Towle H. C. and Oppenheimer J. H. 1981. Thyroid hormone attenuates and augments hepatic gene expression at a pretranslational level. Proceedings of the National Academy of Sciences, 78: 4733-4737.

Selvaggi M., Dario C., Normanno G., Celano G. V. and Dario M. 2009. Genetic polymorphism of STAT5A protein: relationships with production traits and milk composition in Italian Brown cattle. Journal of Dairy Research, 76: 441-445.

Sun Q., Liu Q., Di R., Wang Y., Gan S., Liu S., Wang X., Hu W., Cao X., Pan Zh., Guo X., Yang Y., Rushdi H. E. and Chu M. 2021. Polymorphism and comparative expression analysis of THRSP gene in fat-tailed and thin-tailed sheep breeds. Pakistan Journal of Zoology, 53: 545-553.

Wakil S. J. and Abu-Elheige L. A. 2009. Fatty acid metabolism: Target for metabolic syndrome. Journal of Lipid Research, 50: 138-143.

Wang Y. H., Bower N. I., Reverter A., Tan S. H., De Jager N., Wang R., McWilliam S. M., Cafe L. M., Greenwood P. L. and Lehnert S. A. 2009. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. Journal of Animal Science, 87: 119-130.

Wang X. F., Carre W., Zhou H. J., Lamont S. J. and Cogburn L. A. 2004. Duplicated Spot 14 genes in the chicken: characterization and identification of polymorphisms associated with abdominal fat traits. Gene, 332: 79-88.

Wang X., Cheng J., Qin W., Chen H., Chen G., Shang X., Zhang M., Balsai N. and Chen H. 2020. Polymorphisms in 50 proximal regulating region of *THRSP* gene are associated with fat production in pigs. 3 Biotech, 10: 267.

Wang S., Pan C., Ma X., Yang C., Tang L., Huang J., Wei X., Li H. and Ma Y. 2021. Identification and functional verification reveals that miR-195 inhibiting THRSP to affect fat deposition in Xinyang buffalo. Frontiers in Genetics, 12: 736441.

Wathes D. C., Clempson A. M. and Pollott G. E. 2012. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow. Reproduction, Fertility and Development, 25: 48-61.

Yao D. W., Luo J., He Q. Y., Wu M., Shi H. B., Wang H., Wang M., Xu H. F. and Loor J. J. 2016. Thyroid hormone responsive (THRSP) promotes the synthesis of medium-chain fatty acids in goat mammary epithelial cells. Journal of Dairy Science, 99: 3124-3133.

Zamani P. 2020. Statistical designs in animal sciences (with SAS software instructions). 3rd edition. Bu-Ali Sina University Publication, Hamedan, Iran. (In Persian).

Zamani P. and Almasi M. 2017. Estimation of autosomal and sex-linked heritabilities for growth related traits in Markhoz breed of goats. Iranian Journal of Animal Science, 48: 109-117. (In Persian).

Zhan K., Hou Z. C., Li H. F., Xu G. Y., Zhao R. and Yang N. 2006. Molecular cloning and expression of the duplicated thyroid hormone responsive Spot 14 (THRSP) genes in ducks. Poultry Science, 85: 1746-1754.

Zhang X. B., Zan L. S., Wang H. B., Hao R. J. and Yang Y. J. 2009. Correlation of C184T mutation in *THRSP* gene with meat traits in the Qinchuan cattle. Scientia Agricultura Sinica, 42: 4058-4063.

Zhou Q. Q., Chen H. Q., Wei H. Q., Qin J., Chen H. and Zhang Y. P. 2011. Association of polymorphism in the coding region of THRSP gene with lipogenesis capability in pigs. Progress in Biochemistry and Biophysics, 38: 84-90.