



دانشگاه گیلان

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان

جلد ششم، شماره اول، ۱۳۹۷

<http://ejrr.gau.ac.ir>

بررسی چند شکلی ژن گیرنده هورمون گرلین و ارتباط آن با پارامترهای خونی و صفات لاشه در گوسفندان نژاد زل و شال

مهدی عباسی فیروزجایی^۱، حسن مهربانی یگانه^۲، *حسین مرادی شهربابک^۳ و رسول خدابخش زاده^۴

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد و ^۲استادیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج،

^۳دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه کرمان، کرمان

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۴

چکیده

سابقه و هدف: انتخاب ژنتیکی بر اساس ژنهای منحصربه‌فرد یک روش مطمئن برای بهبود ژنتیکی صفات مهم اقتصادی در حیوانات اهلی می‌باشد. گیرنده هورمون گرلین (GHSR^۱) به‌وسیله معده ترشح می‌شود که دو نقش مهم، تحریک ترشح هورمون رشد و تحریک مصرف خوراک دارد. در این پژوهش ارتباط چند شکلی ژن GHSR با پارامترهای خونی و صفات لاشه در گوسفندان نژاد زل و شال با استفاده از روش PCR^۲-SSCP^۳ و توالی‌یابی محصولات PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: استخراج DNA^۴ از ۵۱ نمونه بافت چربی به روش فنل کلروفرم انجام گرفت. قطعه ۴۵۲ جفت‌بازی از آگزون ۲ ژن GHSR با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده مورد تکثیر قرار گرفت. برای مشاهده چند شکلی فضایی تک رشته‌ای (SSCP) محصولات PCR از ژل اکریل آمید ۱۲ درصد و رنگ‌آمیزی نترات نقره استفاده گردید. پس از توالی‌یابی مشخص گردید یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP^۵) در این ژن در موقعیت نوکلئوتیدی باز ۳۲۷۸ تبدیل T به C رخ داده که برای اولین بار در این مطالعه شناسایی شد. در این تحقیق پس از تعیین ژنوتیپ تک تک دام‌ها برای جایگاه ژن GHSR این اطلاعات به‌همراه داده‌های مربوط به صفات مورد بررسی وارد برنامه SAS 9.1 شده و توسط رویه GLM تجزیه شدند.

یافته‌ها: اثر این SNP بر صفات قرمزی گوشت (P<۰/۰۰۵)، pH لاشه (P<۰/۰۰۲) در نژاد زل و شال معنی‌دار بود و ژنوتیپ CT نسبت به ژنوتیپ TT تأثیر بیشتری بر صفت قرمزی گوشت و pH لاشه داشت. همچنین اثر این SNP بر خاکستر نمونه (P<۰/۰۰۶) معنی‌دار بود و ژنوتیپ CT نسبت به ژنوتیپ CC ژنوتیپ مطلوب‌تری بود. نتایج نشان داد که جنسیت اثر معنی‌داری روی وزن گرم لاشه (P<۰/۰۰۰۱)، بازده لاشه (P<۰/۰۰۴)، PH (P<۰/۰۰۱)، نیروی برشی (P<۰/۰۰۱)، ظرفیت نگهداری آب درروز اول (P<۰/۰۰۵)، LDL (P<۰/۰۰۲)، درجه زردی (P<۰/۰۰۰۱)، درجه روشنایی (P<۰/۰۰۰۷) داشت. مقایسه میانگین حداقل مربعات اثر جنس بر وزن گرم لاشه در سطح (P<۰/۰۰۰۸)، (P<۰/۰۰۱)، pH، ظرفیت نگهداری آب در روز اول در سطح

*مسئول مکاتبه: hmoradis@ut.ac.ir

- 1- Growth hormone secretagogue receptor
- 2- Polymerase Chain Reaction
- 3- Single-Strand Conformational Polymorphism
- 4-Deoxy Nucleic Acid
- 5- Single nucleotide polymorphism

($P < 0.05$) و LDL در سطح ($P < 0.02$) اثر معنی‌دار بود. جنس نر بر وزن گرم لاشه و ظرفیت نگهداری آب در روز اول دارای اثر بیشتر و جنس ماده بر LDL، درجه زردی گوشت و درجه قرمزی گوشت دارای اثر بیشتری بود. در این پژوهش ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مذکور با اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در نژاد زل و شال مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ژن گیرنده هورمون گرلین (GHSR) به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی می‌تواند کاندید مناسبی برای انتخاب صفات رنگ قرمزی گوشت و اسیدیته گوشت در نژادهای زل و شال باشد.

واژه‌های کلیدی: چند شکلی، گوسفندان زل و شال، پارامترهای خونی، صفات لاشه، ژن GHSR

مقدمه

به‌عنوان ملاک انتخاب دام برتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، مشخص گردد.

علی‌رغم این‌که انتخاب فنوتیپی و استفاده از مدل‌های حیوانی، همواره توانسته پیشرفت ژنتیکی مناسبی را در نسل‌های آتی به وجود آورد اما نیاز به روش‌هایی که منجر به کاهش هزینه و افزایش دقت رکوردبرداری صفاتی که اندازه‌گیری آن‌ها مشکل یا پر هزینه می‌باشد، احساس می‌شود. یکی از راهکارهایی که در سال‌های اخیر به کار گرفته شده، استفاده از نقشه جایگاه‌های صفات کمی (QTL) در مزارع حیوانات تجاری است که هدف اصلی بهبود سودمندی در این مزارع برای انتخاب مصنوعی با استفاده از انتخاب به کمک نشانگر است (۸). ژن گیرنده هورمون گرلین (GHSR^۲) به‌عنوان QTL مورد توجه محققین قرار دارد و بر صفات مختلفی از جمله صفات رشد، چاقی و دیابت نوع ۲ تأثیر گذار است (۵ و ۷). بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که GHSR اثر زیادی در ترشح هورمون رشد، قدرت ماندگاری و ازدیاد سلول و تنظیم مصرف خوراک (۱۱)، متابولیسم گلوکز و چربی (۹) و تنظیم ترشحات دستگاه گوارش (۱۳) دارد. امروزه با توجه به رشد روز افزون جمعیت انسانی و نیاز به منابع پروتئین

گوسفند به‌عنوان یکی از اقتصادی‌ترین حیوانات نشخوارکننده به‌شمار می‌رود. به‌خاطر جثه کوچک و قدرت سازش زیاد و مقاومت بیشتر گوسفندان در مقابل بسیاری از بیماری‌ها و تحمل شرایط نامساعد محیطی، پرورش آن در مقایسه با سایر نشخوارکنندگان مقرون به صرفه بوده و تولیدات آن می‌تواند در تأمین بخشی از نیازهای کشور به محصولات دامی نقش اساسی داشته باشد. با توجه به این‌که در کشور ایران به‌دلایل مختلف، گوشت گوسفند دارای بالاترین میزان مصرف می‌باشد، بنابراین باید اول در جهت بهبود خصوصیات کمی گوشت تولید شده و سپس در جهت بهبود خصوصیات کیفی گوشت تولید شده اقدام کرد. لذا در جهت افزایش تولید عمودی باید کارهای اصلاح‌نژادی را در کنار بهبود شرایط تغذیه‌ای و بهداشتی برای اصلاح‌نژاد دام‌های بومی انجام داد. یکی از راه‌های افزایش تولیدات دام‌ها شناخت پتانسیل‌های ژنتیکی آن‌ها و انتخاب دام‌های با پتانسیل برتر می‌باشد. بنابراین تدوین یک برنامه اصلاح‌نژادی با استفاده از روش‌های کارآمد برای شناسایی این استعدادها لازم است. در این مسیر برآورد پارامترهای ژنتیکی بایستی انجام گیرد و صفات هدف و همچنین صفاتی که

1- Quantitative traits loci

2- Growth Hormone Secretagogue Receptor

رشد گاوها تأثیر دارد (۱۶). در پژوهشی دیگر زانگ و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی چند شکلی ژن GHSR گاو، پنج SNP شناسایی کردند که با صفات رشد در ارتباط بودند (۱۸).

با توجه به مطالب گفته شده استفاده از اطلاعات مربوط به مارکرهای مولکولی می‌تواند به همراه داده‌های متعارف و روش‌های آماری توسعه یافته باعث بهبود ارزیابی‌های ژنتیکی شود. لذا، هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط چند شکلی ژن گیرنده هورمون گرلین (GHSR) با پارامترهای خونی و صفات کیفی گوشت در گوسفندان نژاد زل و شال به روش PCR-SSCP و توالی‌یابی محصولات PCR بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از رکوردهای اندازه‌گیری شده و نمونه‌های بافت چربی شامل وزن زنده، وزن لاشه گرم، ترکیب اسیدهای چرب گوشت، صفات کیفی گوشت، ترکیبات شیمیایی گوشت، سن، جنس، و نژاد دام که توسط طرح‌های انجام شده توسط دانشجویان مقطع کارشناسی‌ارشد رشته ژنتیک و اصلاح دام پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران که از کشتارگاه صنعتی اخذ گردیده بود، استفاده شد. تعداد ۲۷ نمونه بافت چربی برای نژاد شال و برای نژاد زل از تعداد ۲۴ نمونه بافت چربی استخراج دزوکسی نوکلئیک اسید در آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک و اصلاح نژاد گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی کرج انجام شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA در این تحقیق از روش فنل کلروفرم (۱۲) استفاده شد. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از دو روش ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانو دراپ (مدل ۲۰۰۰ ساخت شرکت THERMO آمریکا) استفاده شد.

حیوانی، رشد سریع حیوانات اهلی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده است. در این بین گیرنده هورمون گرلین به‌عنوان هورمون پروتئینی که از معده ترشح می‌شود و در ترشح هورمون رشد و کنترل میزان مصرف خوراک تأثیرگذار می‌باشد، بهتر است مورد مطالعه قرار گیرد. GHSR برای نخستین بار توسط کوچیما و همکاران (۱۹۹۹) کشف شد (۱۰). ژن GHSR با شماره شناسایی gi417531964 به طول ۴۰۵۵ جفت باز مخصوص گونه گوسفند بوده که منطقه کد کننده آن در اگزون یک از باز ۶۶ تا باز ۸۶۱ و برای اگزون دو از باز ۳۱۲۴ تا باز ۳۴۲۸ بوده و همچنین مناطق کد کننده این ژن برای mRNA برای اگزون یک از باز ۱ تا باز ۸۶۱ و برای اگزون ۲ از باز ۳۱۲۴ تا باز ۴۰۵۵ توالی موجود در NCBI می‌باشد. اوکلا و همکاران (۲۰۰۱) سه جهش را در ژن گیرنده هورمون گرلین گزارش کرده‌اند که یکی از آن‌ها در محصول نهایی باقی می‌ماند که با چاقی در انسان مرتبط است. جانشینی G356A منجر به جایگزینی آرژنین به‌وسیله گلوتامین در کدون ۲۸ (آخرین اسید آمینه) گرلین بالغ می‌شود که حاملین آلل گلوتامین وزن پایین‌تری نسبت به حاملین آلل آرژنین دارند (۱۷). در پژوهشی دیگر دیکین و همکاران (۲۰۰۴) اگزون‌های ۱ و ۲ را در گوسفند و گاو توالی‌یابی کردند. تمام گاو و گوسفندانی که مطالعه شدند دارای ۲۷ اسید آمینه در پپتید نهایی بودند. تک معده‌ای‌ها دارای هر دو نوع فرم از GHSR هستند در حالی که نشخوارکنندگان به علت حذف شدن یکی از جایگاه‌های پیرایش، فقط یک شکل از آن را دارند (۶). شرمین و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهشی یک پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی A\G را در ژن گیرنده هورمون گرلین گزارش کردند که بر مصرف خوراک، ضریب تبدیل غذایی و به‌صورت جزئی در راندمان

بود از: (۱) ۶ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشت‌سازی اولیه DNA، (۲) انجام سه گامه زیر با ۳۵ چرخه تکرار: الف- ۱ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور تک رشته‌ای شدن DNA، ب- ۱ دقیقه دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به‌منظور اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای، پ- ۱ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌منظور بسط آغازگر (۳) ۹ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد با یک چرخه تکرار برای بسط نهایی. جهت ارزیابی محصولات PCR از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز با غلظت ۲ درصد استفاده شد.

بارگذاری محصولات PCR با ژل اکریل‌آمید به روش SSCP: جهت الکتروفورز محصولات SSCP از سیستم الکتروفورز عمودی دارای سیستم خنک کننده با آب استفاده شد. جهت انجام SSCP، از محلول اکریل‌آمید ۳۸/۵ درصد استفاده شد که در آن نسبت اکریل‌آمید به بیس اکریل‌آمید ۳۷/۵ به ۱ بود. مقدار ۱۸ میکرولیتر بافر بارگذاری را با ۲ میکرولیتر محصول PCR مخلوط و بعد از ورتکس مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه با استفاده از الکتروفورز عمودی روی ژل اکریل‌آمید ۱۲ درصد بارگذاری و با جریان برق (۶۰mA، ۳۰۰V) و به‌مدت ۱۸ ساعت الکتروفورز شد. برای بررسی SSCP و مشاهده قطعات حاصله از رنگ‌آمیزی به روش نترات نقره استفاده گردید (۴). در این مطالعه بر اساس الگوهای بانندی متفاوت، از هر الگو یک نمونه از محصولات PCR انتخاب و برای توالی‌یابی به‌صورت مستقیم به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. پس از دریافت نتایج توالی‌یابی، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار بایوآدیت نسخه ۷.0.5 (<ftp://iubio.bio.indiana.edu/molbio/seqpup>) جهت تعیین جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی به‌همراه

طراحی پرایمر GHSR: برای طراحی پرایمر از سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/ استفاده گردید که اگزون ۲ ژن GHSR با شماره شناسایی gi417531964 به طول ۴۰۵۵ جفت باز مخصوص گونه گوسفند روی کروموزوم ۱ را جستجو کرده و توالی کد کننده به‌صورت فایل FASTA در کامپیوتر ذخیره کرده و از سایت www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus.cgi برای طراحی پرایمر استفاده گردید. توالی آغازگرها عبارت بودند از:

F: 5'-CCATGTCTTCAAAAGAGACTG TG-3'
R: 5'-TGCTGTGCTATGGCTTCTGG-3'

تکنیک ژن GHSR با استفاده از PCR: برای تکثیر ژن GHSR قطعه‌ای به طول ۴۵۲bp از اگزون ۲ این ژن انتخاب شد که پرایمر پیش رونده طراحی شده بر روی باز ۳۰۴۹ تا ۳۰۷۱ اگزون دو نشسته و پرایمر برگشت بر روی باز ۳۴۸۱ تا ۳۵۰۰ نشسته و شروع به تکثیر قطعه اختصاصی اگزون ۲ کردند که کل اگزون ۲ ژن GHSR تکثیر شد.

جهت انجام واکنش PCR از کیت RED Tag DNA Polymerase (شرکت زیست فن‌آوری کوثر) استفاده گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر از DNA (غلظت / ng ۵۰ μl)، ۱/۵ میکرولیتر آب، ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (غلظت ۱۰ pM)، ۷/۵ میکرو لیتر Master mix در دستگاه ترموسایکلر مدل FTGRAD2D شرکت TECHNE ساخت انگلیس انجام شد. به‌منظور دستیابی به دمای اتصال بهینه جهت واکنش PCR برای جفت آغازگرهای مورد بررسی، از روش گرادیان دمایی استفاده شد. با توجه به کیفیت باندهای حاصل از دماهای در نظر گرفته شده، دمای بهینه اتصال برای آغازگرها ۶۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. برنامه حرارتی عبارت

تابعیت Y روی W (وزن دامها قبل از کشتار)، W_{ijkl} :
 وزن \bar{W}_{ijkl} دام قبل از کشتار، \bar{W} : میانگین وزن
 دامها قبل از کشتار، $Anim_m$: اثر تصادفی m امین
 حیوان، e_{ijklm} : اثر تصادفی باقیمانده
 پس از آنالیز واریانس ابتدا معنی‌داری یا عدم
 معنی‌داری مدل بر هر صفت تعیین شد، در صورت
 معنی‌دار بودن اثر مدل بر صفت مربوطه، معنی‌داری
 اثر هر یک از عوامل بر آن صفت مورد توجه قرار
 گرفت. در صورت معنی‌دار بودن اثر هر عامل ثابت
 قابل دسته‌بندی (ژن GHSR، سن، جنس، نژاد) بر
 صفت مربوطه، آزمون مقایسه میانگین حداقل مربعات
 (LS Means) سطوح مختلف آن عامل ثابت با آزمون
 توکی انجام گرفت.

نتایج و بحث

تعیین کیفیت و کمیته DNA استخراج شده: برای
 تعیین کیفیت و کمیته مقدار DNA از ژل آگارز ۱
 درصد و روش اسپکتوفتومتری استفاده گردید که اکثر
 نمونه‌ها بدون آلودگی استخراج شده بودند، همچنین
 نمونه‌های آلوده مجدداً استخراج شدند.
تعیین کیفیت قطعه GHSR تکثیر شده: برای بررسی
 محصول PCR قطعه تکثیر شده آگزون ۲ ژن
GHSR از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد که
 محصول تکثیر شده دارای کیفیت مناسب و بدون باند
 اضافه و پرایمر دایمر بود که نشان‌دهنده تکثیر
 اختصاصی این قطعه است (شکل ۱).

توالی‌های گزارش شده در NCBI^۱ هم‌تراز شده و
 مقایسه شدند.

صفات مورد بررسی: در این مطالعه از اطلاعات
 مربوط به ژنوتیپ‌ها به همراه داده‌های مربوط به وزن
 زنده، وزن لاشه گرم، ترکیب اسیدهای چرب گوشت،
 صفات کیفی گوشت، ترکیبات شیمیایی گوشت، سن،
 جنس، و نژاد دام استفاده شد.

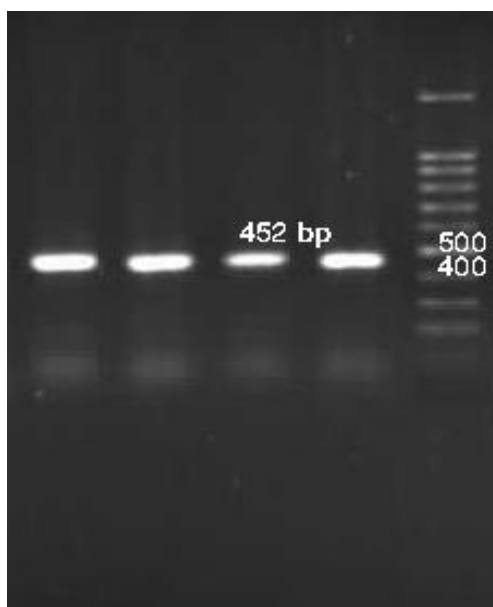
روش آماری: در این تحقیق پس از تعیین ژنوتیپ
 تک تک دامها برای جایگاه مورد بررسی این اطلاعات
 به همراه داده‌های مربوط به صفات مورد بررسی با
 استفاده از برنامه Excel ویرایش شده و با استفاده از
 برنامه SAS 9.1 (۱۵) مورد تجزیه و تحلیل قرار
 گرفتند و توسط رویه GLM تجزیه شدند. در نهایت
 برای تجزیه آماری داده‌های کشتارگاهی مدل‌های ۱ و
 ۲ استفاده شدند که مدل ۲ مربوط به صفات وزن لاشه
 و مدل ۱ مربوط به سایر صفات کشتاری هستند:

$$y1_{ijkl} = \mu + A_i + S_j + Gc_k + Anim_i + e_{ijkl} \quad \text{مدل ۱}$$

$$\text{مدل ۲}$$

$$y2_{ijkl} = \mu + A_i + S_j + Gc_k + b(W_{ijkl} - \bar{W}) + Anim_m + e_{ijklm}$$

$y1_{ijklm}$: هر یک از مشاهدات مربوط به صفات لاشه،
 صفات کیفی گوشت، ترکیب شیمیایی و ترکیب
 اسیدهای چرب گوشت، $y2_{ijklm}$: هر یک از مشاهدات
 مربوط به صفت وزن لاشه، μ : میانگین صفت در
 جمعیت، A_i : اثر آمین سن (سال) حیوان در هنگام
 کشتار، S_j : اثر j آمین جنس حیوان ($j=1$ و $j=2$),
 Gc_k : اثر k آمین ژنوتیپ ژن GHSR، b : ضریب

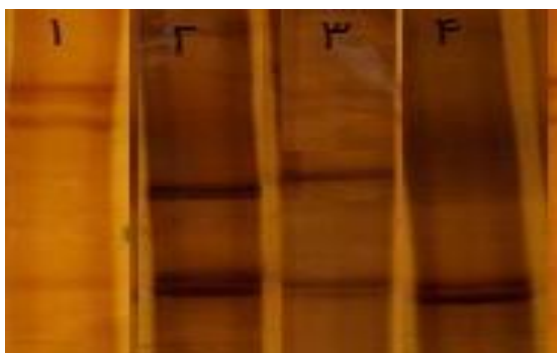


شکل ۱- نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از سایز مارکر ۱۰۰ bp.

Figure 1. Electrophoresis of PCR products by 100bp marker.

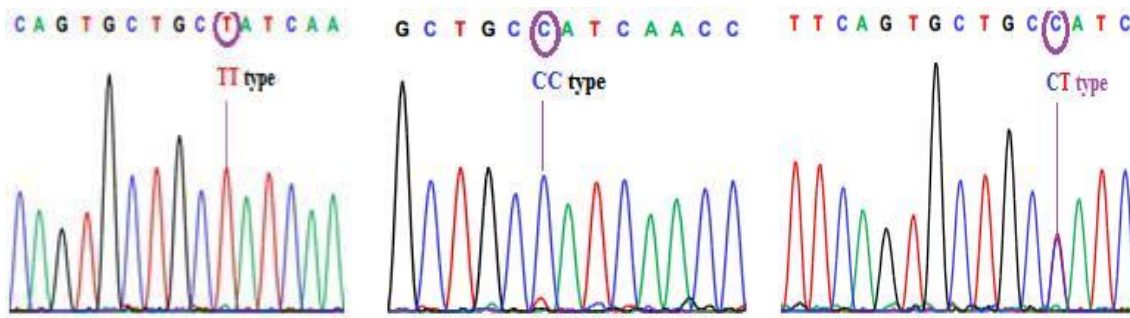
گرفت که الگوهای مشاهده را می‌توان به سبب جهش در اینترون نیز گزارش کرد. در جمعیت‌های مورد مطالعه یک جهش در اگزون ۲ ژن GHSR در باز ۳۲۷۸ این ژن یا باز شماره ۱۵۵ اگزون دوم توالی DNA رخ داد که این جهش فقط در الگوهای ۱، ۲، ۳ و ۵ دیده شد که ژنوتیپ آن‌ها به ترتیب به صورت CC، CT، CC و CC بودند ولی ژنوتیپ الگوی ۴ به صورت TT بود که مطابق با توالی موجود در سایت NCBI می‌باشد.

بررسی چند شکلی ژن GHSR در نژاد زل و شال: در جمعیت‌های مورد مطالعه ۵ الگو به روش SSCP-PCR مشاهده گردید که پس از توالی‌یابی مشخص گردید که گیرنده گرلین دارای ۳ ژنوتیپ CC، TT و CT است. یکی از دلایلی که پس از توالی‌یابی بیش از ۳ ژنوتیپ در جمعیت‌های مورد بررسی مشاهده نشد می‌توان به عدم خوانش توسط دستگاه‌های توالی‌یاب دانست زیرا دستگاه‌های توالی‌یاب معمولاً ۵۰bp ابتدایی و انتهایی توالی را خوب خوانش نمی‌کنند. در این مطالعه کل اگزون ۲ خوانش صحیح صورت



شکل ۲: تعیین الگوهای ژن GHSR با استفاده از روش SSCP.

Figure 2. Determining patterns of GHSR gene using PCR-SSCP.



شکل ۳: کروماتوگرام حاصل از نتایج توالی‌یابی برای الگوهای توالی‌یابی شده در گوسفندان زل و شال.

Figure 3. Chromatogram of the sequencing results for patterns sequenced in Zell and Shawl sheep breeds.

گردید و سپس فراوانی ژنی توسط نرم‌افزار (GeneAlex <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>) محاسبه گردید. فراوانی ژنوتیپی به صورت مستقیم محاسبه گردید که در جدول زیر آورده شده است.

اثر ژنوتیپ‌های حاصل از این جهش بر پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در نژاد زل و شال بررسی و ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. فراوانی آلی و ژنوتیپی: ژنوتیپ‌های جایگاه ژن GHSR پس از توالی‌یابی مشخص شد. الگوهای ژنی برای تمام حیوانات به روش PCR-SSCP مشخص

جدول ۱: تعیین فراوانی آلی و ژنوتیپی در گوسفندان زل و شال.

Table 1. Determining genotypic and allelic frequencies in Zell and Shawl sheep breeds.

فراوانی ژنوتیپی (genotypic frequency)			فراوانی آلی (allelic frequencies)			
CC	TC	TT	C	T		
0.86	0.07	0.07	0.88	0.12	(Zel)	زل
0.22	0.35	0.43	0.35	0.65	(Shawl)	شال
0.540	0.210	0.250	0.615	0.385	(Total)	مجموع دو جمعیت

۹۵۱ رشته CDS آن اگزون می‌باشد که باعث تبدیل کدون GCT به کدون GCC می‌شود که هر دوی آنها کدون‌های اسید آمینه آلانین هستند. با توجه به عدم تغییر اسید آمینه تغییری در ساختار پروتئین منجر نشد.

تأثیر برخی از عوامل ثابت و شناخته شده مؤثر بر پارامترهای خونی و صفات لاشه در جمعیت مورد مطالعه در جدول زیر ارائه شده است.

بررسی تغییرات اسید آمینه: برای بررسی تغییرات اسید آمینه در موقعیت جهش شناسایی شده ابتدا توالی نوکلئوتیدی خروجی از نرم افزار بایو ادیت با جهش رخ داده، در Blast x در سایت NCBI برای تشکیل فرم صحیح آن انجام شد. فرم صحیح فرم شماره ۲ بود که سپس برای مشاهده تغییر ساختار پروتئینی از نرم افزار CLC workbench 9.5.1 (www.clcbio.com/download) استفاده شد. جهش T به C در باز ۳۲۷۸ رشته DNA اصلی معادل با باز ۱۰۱۶ قطعه mRNA و یا معادل با باز شماره

جدول ۲: مقایسه میانگین حداقل مربعات اثر ژنوتیپ‌های GHSR و نژاد و جنس بر اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع در گوسفندان زل و شال

Table 2. Comparison of the Least squares means of breed, sex and GHSR genotypes impact on saturated and unsaturated fatty acids in Zel and Shal sheep breeds.

محتوی کل اسیدهای چرب غیراشباع با یک پیوند دوگانه MUFA	دکوزاهگزانوئیک اسید Dkvzahgzvyyk acid	میربستیک اسید Myristic acid	وزن گرم لاشه Hot carcass weight	وزن زنده Live weight		
45.9 ± 1.3	0.38 ± 0.04	4.3 ± 0.3	14.46 ± 1.04	41.39 ± 5.38	CC	ژنوتیپ (Genotype)
46.2 ± 2.01	0.16 ± 0.06	2.8 ± 0.4	16.8 ± 1.5	45.74 ± 42.74	CT	
41.9 ± 2.1	0.14 ± 0.06	3.4 ± 0.4	20.2 ± 1.7	45.02 ± 4.9	TT	
NS	NS	NS	NS	NS	سطح معنی داری a,b (Significance)	
41.51 ^b ± 2.01	0.18 ± 0.06	3.7 ^a ± 0.4	19.8 ± 1.5	43.12 ± 3.4	شال	نژاد (Breed)
47.8 ^a ± 1.1	0.29 ± 0.03	2.3 ^b ± 0.2	14.4 ± 0.8	44.9 ± 7.1	زل	
P < 0.01	NS	P < 0.002	NS	NS	سطح معنی داری a,b (Significance)	
43.19 ± 1.3	0.67 ^a ± 0.04	2.8 ± 0.3	19.14 ^a ± 1.1	47.1 ± 5.4	نر	جنس (sex)
46 ± 1.1	0.25 ^b ± 0.03	3.3 ± 0.2	15.11 ^b ± 0.8	40.9 ± 4.4	ماده	
NS	P < 0.04	NS	P < 0.002	NS	سطح معنی داری a,b (Significance)	

اثر ژنوتیپ بر صفات مورد مطالعه وزن گرم لاشه، میربستیک اسید، پالمیتیک اسید، پالمیتولئیک اسید، c17-1، c17، استئاریک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید، SFA¹، MUFA²، PUFA³، PUFA:SFA، n-6:n-3 PUFA لینولئیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید (P < 0/002) و دکوزاهگزانوئیک اسید (P < 0/04) اثر معنی داری داشت ولی بر روی بقیه صفات اثر معنی داری نداشت. جنس نر نسبت به جنس ماده دارای اثر بیشتر بود. عالی (۲۰۱۲) با استفاده از داده‌های به‌کار برده شده در این مطالعه بر اثر ژن کالپاستاتین و SCD گزارش کردند که ژن کالپاستاتین ارتباط معنی داری با پالمیتیک اسید و اولئیک اسید در نژاد زل دارد که با اثر معنی داری ژن GHSR بر روی اولئیک اسید در این مطالعه مطابقت داشت. کالپاستاتین دارای اثر معنی داری بر پالمیتیک اسید و آرشیدونیک اسید در نژاد شال داشت که با اثر معنی داری ژن GHSR بر پالمیتیک اسید در این مطالعه مطابقت داشت. همچنین در مطالعه آنها ارتباط

اثر ژنوتیپ بر صفات مورد مطالعه وزن گرم لاشه، میربستیک اسید، پالمیتیک اسید، پالمیتولئیک اسید، c17-1، c17، استئاریک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید، SFA¹، MUFA²، PUFA³، PUFA:SFA، n-6:n-3 PUFA لینولئیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید اثر معنی داری مشاهده نشد. اثر نژاد بر پروفایل اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع با اثر ژنوتیپ GHSR مورد مطالعه قرار گرفت که این عامل بر وزن گرم لاشه، پالمیتیک اسید، پالمیتولئیک اسید، استئاریک (P > 0/9)، اولئیک اسید (P > 0/6)، c17-1، c17، لینولئیک اسید، لینولئیک اسید، ایکوزاپنتانوئیک اسید، دکوزاهگزانوئیک اسید، SFA، PUFA، PUFA:SFA، PUF n-6:n-3 اثر معنی داری نداشت. نژاد اثر معنی داری بر میربستیک اسید (P < 0/02) و MUFA (P < 0/01) داشت که در

- 1- Saturated Fatty Acid
- 2- MonounSaturated Fatty Acid
- 3- PolyunSaturated Fatty Acid

معنی داری بین ژنوتیپ SCD با لینولئیک اسید، آراشیدونیک اسید، PUFA/SFA، PUFA در جمعیت زال و ارتباط معنی داری با استئاریک اسید، لینولئیک اسید، آراشیدونیک اسید، ایکوزا پنتانویک اسید، PUFA/SFA و PUFA در جمعیت شال گزارش شد (۲).

جدول ۳. مقایسه میانگین حداقل مربعات اثر ژنوتیپ‌های GHSR و نژاد و جنس بر صفات رشد و پارامترهای خونی در گوسفندان زال و شال.

Table 3. Comparison of the Least squares means of breed, sex and GHSR genotypes impact on growth traits and blood parameters in Zel and Shal sheep breeds.

خاکستر درصد Ash%	LDL	PH	بازده لاشه Carcass efficiency	وزن گرم لاشه Hot carcass weight	وزن زنده Live weight			
1.009 ^a ± 2.002	35.9±4.09	5.6 ^{ab} ±0.06	43.2±1.43	15.27±0.47	40.3±5.7	CC	ژنوتیپ	
0.99 ^b ±3.06	39.1 ± 5.1	5.7 ^a ± 0.1	42.9 ± 2.1	15.27 ± 0.7	47.5 ± 5.39	CT	(Genotype)	
0.8 ^{ab} ±3.11	33.8±5.6	5.5 ^a ± 0.1	43.8± 2.2	15.6 ± 0.73	44.1 ± 5.1	TT		
P>0.06	NS	P<0.02	NS	NS	NS		سطح معنی داری (Significance)	
3.9 ± 2.9	45.2 ^a ± 5.6	5.6 ^a ± 0.1	42.02 ^a ± 2.1	15.9 ^a ± 0.7	44.1 ± 5.1	شال	نژاد	
3.9 ± 1.8	27.4 ^b ± 3.3	0.05 ± 5.6 ^b	41.4 ^b ± 1.2	14.8 ^b ± 0.3	43.9 ± 3.7	زل	(Breed)	
NS	P<0.02	P<0.01	P<0.04	P<0.0001	NS		سطح معنی داری (Significance)	
1.9 ± 2.005	28.8 ^b ± 3.5	5.5 ^b ± 0.06	42.9 ± 1.47	15.4 ^a ± 0.4	46.9 ± 5.2	نر	جنس	
1.9 ± 1.7	43.7 ^a ± 2.7	5.7 ^a ± 0.05	43.1 ± 1.17	15.3 ^b ± 0.3	41.02± 4.37	ماده	(sex)	
NS	P<0.02	P<0.01	NS	P<0.0008	NS		سطح معنی داری (Significance)	
I [*] (درجه روشنایی)	b [*] (درجه زردی)	a [*] (درجه قرمزی)	ظرفیت نگهداری آب روز ۱ Water holding capacity at day 1					
42.6 ± 1.2	10.3 ± 0.5	14.2 ^{ab} ± 0.4	3.7 ± 0.3	CC	ژنوتیپ			
41.6 ± 1.9	10.7 ± 0.8	16.6 ^a ± 0.7	3.2 ± 0.5	CT	(Genotype)			
43.8 ± 2.07	11.3 ± 0.8	14.6 ^b ± 0.7	4.3 ± 1.1	TT				
NS	NS	P<0.005	NS				سطح معنی داری (Significance)	
14.8 ^b ± 0.7	10.2 ^b ± 0.8	42.08 ± 1.9	3.7 ^b ± 1.1	شال	نژاد			
16.3 ^a ± 0.3	11.3 ^a ± 0.4	43.02 ± 1.1	5.4 ^a ± 0.6	زل	(Breed)			
P< 0.007	P<0.0001	NS	P<0.05				سطح معنی داری (Significance)	
42.1 ± 1.3	10.2 ± 0.4	15.16 ± 0.4	4.2 ^a ± 0.5	نر	جنس			
43.01 ± 1.09	16.3 ± 0.4	16.03 ± 0.4	3.9 ^b ± 0.5	ماده	(Sex)			
NS	NS	NS	P<0.05				سطح معنی داری (Significance)	

بر PH (P<۰/۰۲)، خاکستر (P<۰/۰۶) و a^{*} (p<۰/۰۰۵) را دارا است. عالی (۲۰۱۲) با استفاده از داده‌های به‌کار برده شده در این مطالعه روی اثر اصلی

مقایسه میانگین حداقل مربعات ژن GHSR بر روی صفات رشد و پارامترهای خونی در جمعیت زال و شال نشان داد (جدول ۳) که ژنوتیپ اثر معنی داری

ساختار گوشت ارتباط داده شده است. محققین با ارزیابی اثر دوره رسانیدن بر توانایی حفظ آب در ماهیچه چنین اظهار داشتند که جمع شدگی میوفبریل‌ها در ساعات پس از کشتار به حرکت آب به ناحیه خارج سلولی و در نهایت خارج ماهیچه منتهی می‌گردد. فضای خارج سلولی اطراف فیبرهای ماهیچه تا ۲۴ ساعت پس از کشتار به‌طور مداوم افزایش می‌یابد. این در حالی است که فاصله میان فیبرها در بازه زمانی ۹ تا ۲۴ ساعت پس از کشتار کاهش پیدا می‌کند. به همین دلیل حداکثر مقدار رطوبت قابل استخراج در زمان ۲۴ ساعت پس از کشتار مشاهده می‌شود (۱).

در مطالعه‌ای که بر گوسفند جز رسکو مول کارا^۲ که نوعی از رومانوف است (۱۴)، تفاوت رنگ گوشت را در بین جنس در ارزش I^* به دلیل این حقیقت که نرهای این نژاد رشد زودتری داشتند و جوان‌تر بودند نسبت دادند. رنگ گوشت در وزن سبک‌تر بیشتر توصیف کننده روشنایی بالاتر لاشه و قرمزی پایین‌تر لاشه است. گوسفند ماده دارای چاقی لاشه بالاتر و درصد بالاتری از چربی دور کلیه دارد و همچنین گوسفند ماده دارای درصد بالاتری از چربی و درصد پایین‌تری از عضله است.

با در نظر گرفتن تولید گوشت بره به دلیل نیاز مصرف کنندگان برای گوشت دارای چربی کمتر به علت ارتباط بین سطوح بالای چربی‌های اشباع شده حیوانی در رژیم غذایی و بیماری‌های قلبی عروقی، بالا رفتن کلسترول خون، انسداد شراین، بالا رفتن فشار خون و چاقی مفرط به یکی از چالش‌های اساسی برای صنعت گوسفندداری تبدیل شده است. لذا به نظر می‌رسد که مطالعه برای پیدا کردن جهش در سایر ژن‌های با اثر عمده بر صفات کیفی گوشت در

ژن کالپاستاتین و SCD، ارتباط معنی‌داری بین ژن کالپاستاتین با وزن زنده قبل از کشتار و نیروی برشی در سطح ۵ درصد در نژاد شال و ارتباط معنی‌داری با سطح مقطع عضله و نیروی برشی در سطح ۵ درصد در نژاد زل گزارش کردند. همچنین در مطالعه آن‌ها ارتباط معنی‌داری با صفات مورد بررسی در ژن SCD در جمعیت زل و شال گزارش نشد (۲).

میانگین PH اندازه‌گیری شده در نژادهای زل و شال ۵/۶ بوده که از درجه کیفیت خوبی برای بازار پسندی دارا می‌باشد که نشان می‌دهد حیوانات قبل کشتار در شرایط خوب و بدون استرسی نگهداری شده‌اند.

هر چه PH بالاتر باشد نشان دهنده رنگ تیره لاشه است (۱۹). در این مطالعه میانگین قرمزی گوشت ۱۵/۲۵ بوده که نشان می‌دهد حیوانات در موقع کشتار در دارای سن پایین و جوان بوده و از درجه کیفی مطلوبی برخوردارند.

نژاد اثر معنی‌داری بر وزن گرم لاشه ($P < 0/0001$)، بازده لاشه ($P < 0/04$)، PH ($P < 0/01$)، نیروی برشی ($P < 0/001$)، ظرفیت نگهداری آب در روز اول ($P < 0/05$)، LDL ($P < 0/02$)، b^* ($P < 0/0001$)، I^* ($P < 0/007$) داشت (جدول ۳). مقایسه میانگین حداقل مربعات اثر جنس بر وزن گرم لاشه ($P < 0/008$)، ($P < 0/01$) PH ظرفیت نگهداری آب در روز اول ($P < 0/05$) و LDL ($P < 0/02$) اثر معنی‌دار بود (جدول ۳). جنس نر بر وزن گرم لاشه و ظرفیت نگهداری آب در روز اول دارای اثر بیشتر و جنس ماده بر LDL، b^* و I^* دارای اثر بیشتری بود. بهبود WHC^۱ به تجزیه پروتئولیتیکی پروتئین‌های سیتواسکتلی، تورم ماتریکس میوفبریلی و در نهایت افزایش نگهداری آب ماهیچه توسط

CC و TT دارای اثر بیشتری در صفت PH لاشه و رنگ قرمزی گوشت بود. در صفت خاکستر در این داده‌ها ژنوتیپ CC دارای اثر بیشتری به ژنوتیپ CT و TT بود. در این مطالعه جهش در باز شماره ۱۵۵ اگزون ۲ منجر به تغییر توالی اسید آمینه پروتئینی نشد ولی در نژاد زل و شال، اثر این جهش بر صفت PH لاشه، رنگ قرمزی گوشت (a^*) و خاکستر معنی‌دار بود. برای توجیه این مسئله می‌توان به اثر اپی ژنتیکی اشاره کرد به‌خاطر این‌که تغییرات قابل توارث طی تقسیمات سلولی در عملکرد ژن‌ها را نمی‌توان با تغییر در توالی DNA توضیح داد چون وقتی جهش صورت گرفته تغییر در توالی DNA رخ داده اما تغییری در محتوای اطلاعاتی آن که بتواند منجر به تغییر توالی پروتئین شود صورت نگرفته است.

نژادهای زل و شال و سایر نژادهای بومی کشور لازم باشد. از طرفی می‌توان با کشف و وارد نمودن این ژن‌ها و برنامه‌ریزی برای تکثیر و تثبیت جهش‌های اتفاق افتاده مرتبط با صفات کیفی گوشت کمک قابل توجهی به کاهش بیماری‌های قلبی عروقی و افزایش تقاضا برای گوشت‌های با کیفیت بهتر انجام داد.

نتیجه‌گیری کلی

در جمعیت‌های مورد مطالعه ۵ الگو به روش PCR-SSCP مشاهده گردید که وجود چندشکلی در ژن GHSR در نژاد زل و شال را نشان می‌دهد. در مطالعه داده‌های صفات رشد و پارامترهای خونی در نژاد زل و شال بین اثر ژنوتیپ بر صفت PH لاشه، رنگ قرمزی گوشت (a^*) و خاکستر ارتباط معنی داری وجود داشت که ژنوتیپ CT نسبت به ژنوتیپ

منابع

1. Abdullah, A.Y., and Qudsieh, R.I. 2009. Effect of slaughter weight and ageing time on the quality of meat from Awassi ram lambs. *Meat Science*. 82: 3.309-316.
2. Aly, M. 2012. Association variations of the polymorphism at Calpastatin (CAST) and Stearoyl-Coa desaturase (SCD) with Functional traits and Meat fatty acids profile in Lori Bakhtiari, Zell and Shawl sheep breeds. Master's thesis in the field of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. Karaj. (In Persian)
3. Bahrami, A., Miraei-Ashtiani, S.R., and Mehrabani-Yeganeh, H. 2012. Associations of growth hormone secretagogue receptor (GHSR) genes polymorphisms and protein structure changes with carcass traits in sheep. *Gene*. 505: 2.379-383.
4. Bassam, B.J., Anolles, G.C., and Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 196: 1.80-83.
5. Date, Y., Nakazato, M., Hashiguchi, S., Dezaki, K., Mondal, M.S., and Hosoda, H. 2002. Ghrelin is present in pancreatic alpha cells of human and rat stimulates insulin. *Secretion Diabetes*. 51: 1.124-9.
6. Dickin, J.C., Thue, T.D., and Buchanan, F.C. 2004. An alternative splice site in ghrelin is missing in ruminants. *Animal genetics*. 35: 5.411-412.
7. García-Fernández, M., Gutiérrez-Gil, B., García-Gómez, E., and Arranz, J.J. 2009. Genetic variability of the Stearoyl-CoA desaturase gene in sheep. *Molecular and cellular probes*. 23: 2.107-111.
8. Gomez-Raya, L., Olsen, H.G., Lingaas, F., Klungl, H., Våge, D.I., Olsaker, I., and Lien, S. 2002. The use of genetic markers to measure genomic response to selection in livestock. *Genetics*. 162: 3.1381-1388.

9. Hosoda, H., Kojima, M., and Kangawa, K. 2006. Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 100: 5. 398–410.
10. Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 402: 6762.656-660.
11. Kojima, M., and Kangawa, K. 2005. Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews*. 85: 2. 495-522.
12. Loparev, V.N., Cartas, M.A., Monken, C.E., Velpandi, A., and Srinivasan, A. 1991. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. *Journal of virological methods*. 34: 1.105-112.
13. Murray, C.D., Martin, N.M., Patterson, M., Taylor, S.A., Ghatei, M.A., Kamm, M.A., Johnston, C., Bloom, S.R., and Emmanuel, A.V. 2005. Ghrelin enhances gastric emptying in diabetic gastroparesis: A double blind, placebo controlled, crossover study. *Gut*. 54: 12.1693–1698.
14. Žgur, S., Cividini, A., Kompan, D., and Birtič, D. 2003. The effect of live weight at slaughter and sex on lambs carcass traits and meat characteristics. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)*. 68: 3.155-159.
15. SAS Institute. 2000. SAS Institute Inc., Cary.
16. Sherman, E.L., Nkrumah, J.D., Murdoch, B.M., Li, C., Wang, Z., Fu, A., and Moore, S.S. 2008. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. *Journal of Animal Science*. 86: 1.1-16.
17. Ukkola, O., Ravussin, E., Jacobson, P., Snyder, E.E., Chagnon, M., Sjostrom, L., and Bouchard, C. 2001. Rapid communications: mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86: 8.3996-3999.
18. Zhang, B., Chen, H., Guo, Y., Zhang, L., Zhao, M., and Lan, X. 2009. Associations of polymorphism within the GHSR gene with growth traits in Nanyang cattle. *Molecular biology reports*. 36: 8.2259-2263.
19. Zhang, S.X., Farouk, M.M., Young, O.A., Wieliczko, K.J., and Podmore, C. 2005. Functional stability of frozen normal and high pH beef. *Meat Science*. 69: 4.765–772.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Ruminant Research, Vol. 6(1), 2018

<http://ejrr.gau.ac.ir>

Study of growth hormone secretagogue receptor gene polymorphism and its association with blood parameters and carcass traits in Zell and Shal sheep breeds

M. Abbasi Firoozjaei¹, H. Mehrabani Yeganeh², *H. Moradi Shahrabak² and
R. Khodabakhshzadeh³

¹M.Sc. graduated, ²Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, University of Tehran, Karaj, Iran,

¹M.Sc. graduated, Kerman University, Kerman, Iran

Received: 10/12/2017; Accepted: 03/05/2017

Abstract

Background and objectives: Molecular genetics selection on individual genes is a promising method to genetically improve economically important traits in livestock. Growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene secreted by the stomach that has two important functions: the stimulation of the growth hormone production and the stimulation of feed intake. In this study, the association between gherlin receptor gene polymorphism (GHSR) with blood parameters and carcass traits in Zell and Shal sheep breeds were studied using PCR-SSCP and DNA sequencing.

Materials and methods: Genomic DNA was extracted from 51 adipose tissue samples using phenols chloroform method. The exon 2 (452 bp) of GHSR gene was amplified by specific primers. The single stranded conformation polymorphism (SSCP) patterns of PCR product were studied using 12% Acrylamid gel and silver staining method. Sequencing show a novel single nucleotide polymorphism in this gene on the nucleotide position 3278 converting T to C. In the present study, after revealing genotype of animals for the GHSR locus, this data along with data related to studied traits were analyzed by the least-squares method as applied in the General Linear Model (GLM) procedure of SAS 9.2 program.

Results: This SNP had a significant effect on red meat trait ($P<0.05$), carcass pH ($P<0.002$) and ash ($P<0.06$) in Zel and Shal breed in such a way that the CT genotype was more desirable than TT genotype in meat redness and carcass pH traits. The value of least square means of the CC genotype was higher than CT genotype in ash trait. Breed had significant effect on hot carcass weight ($P<0.0001$), carcass yield ($P<0.04$), pH ($P<0.01$), shear force ($P<0.001$), water holding capacity of the first day ($P<0.05$), LDL ($P<0.02$), meat yellowness ($P<0.0001$), meat lightness ($P<0.007$). The results showed that sex had a significant effect on hot carcass weight ($P<0.0008$), pH ($P<0.01$), water holding capacity on the first day ($P<0.05$) and LDL ($P<0.02$) traits. The effect of males was higher effect than females on hot body weight and water holding capacity on the first day. The females had higher effect in LDL, meat yellowness and meat lightness traits. In this study, there was no significant association between SNP and saturated and unsaturated fatty acids traits.

Conclusion: The results showed that the gherlin receptor gene (GHSR) could be regarded as a possible candidate gene for selection of meat redness and acidity in Zell and Shal sheep breeds.

Keywords: Polymorphism, GHSR gene, Carcass traits, Blood parameters, Zell and shal sheep

*Corresponding author; hmoradis@ut.ac.ir

