بررسی تنوع ژنتیکی اینترون ۴ ژن هورمون رشد در ماکیان بومی استان آذربایجان غربی با استفاده از روش PCR-RFLP

کاوه خاکپور[۱]، کریم مردانی[۲] و علی هاشمی[۳]

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۴/۲۵

خلاصه

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد ماکیان بومی مرکز پرورش و اصلاح نژاد استان آذربایجان غربی مورد بررسی قرار گرفت. از ۹۰ قطعه ماکیان خون‌گیری از ورید بالی انجام شد و DNA ژنومی به روش عمومی استخراج نمکی از نمونه‌های خون استخراج گردید. قطعه‌ای به اندازه ۱۱۷۰ جفت باز از ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد ماکیان مورد مطالعه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. قطعات تکثیر شده بوسیله آنزیم محدود کننده *Msp*I برش داده شدند و محصولات حاصل از برش آنزیمی بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردیدند. نتایج حاکی از وجود سه نوع آلل A، B و C در این جایگاه بود که فراوانی آنها در کل جمعیت به ترتیب ۳۴/۴۴٪، ۳۲/۲۲٪ و۳۳/۳۳٪ محاسبه شد. شش ترکیب ژنوتیپی AA، AB، BB، AC، BC و CC شناسایی شدند که فراوانی‌های ژنوتیپی محاسبه شده آنها در کل جمعیت به ترتیب برابر ۱۱/۱۱٪، ۲۳/۳۳٪، ۱۲/۲۲٪، ۲۳/۳۳٪، ۱۶/۶۶٪ و ۱۳/۱۳٪ به دست آمد. شاخص هتروزیگوتی و تعداد آلل موثر برای این جایگاه در کل جمعیت به ترتیب ۰/۶۶ و ۲/۹۹ به دست آمد. آزمون‌های مربع کای (χ^2) و جی (G^2) برای توده ماکیان بومی مرکز پرورش و اصلاح نژاد استان آذربایجان غربی نشان داد جامعه در حالت تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارد. بر اساس این نتایج می‌توان گفت که ژنوتیپ‌های لوکوس مورد مطالعه، تحت تأثیر عوامل تغییر دهنده فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی مانند انتخاب، جهش و یا مهاجرت نبوده است. این تحقیق یک آزمایش مقدماتی برای انجام مطالعات بعدی جهت بهبود عملکرد تولیدی مرغان بومی استان آذربایجان غربی می‌باشد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، ژن هورمون رشد ماکیان بومی، آذربایجان غربی

مقدمه

امروزه در بیشتر روستاهای کشور با کمترین هزینه و امکانات، پرورش مرغان بومی به صورت گله‌های کوچک انجام می‌شود. هر چند این گله‌ها معمولاً به علل کمبود امکانات بهداشتی، تغذیه‌ای و پایین بودن ارزش اصلاحی، تولید و بازده کمی دارند و نقش آنها در اقتصاد و تغذیه روستائیان محدود می‌باشد ولی با توجه و عنایت خاص وزارت جهاد کشاورزی به امر حفظ و بهبود ژنتیکی مرغان بومی کشور و راه‌اندازی شش مرکز اصلاح نژادی در استان‌های اصفهان، آذربایجان غربی، خراسان رضوی، فارس، مازندران و یزد و مراکز پشتیبانی و ترویج در دیگر استان‌ها، زیر نظر معاونت بهبود تولیدات دامی، هم اکنون بیش از دو دهه از فعالیت این مراکز می‌گذرد. اهداف اصلی این مراکز، حفظ ذخایر ارزشمند ژنتیکی و بهبود ژنتیکی صفات تولیدی مرغان بومی کشور می‌باشد که با تولید و توزیع جوجه‌های یک روزه، نیمچه‌ها و تخم مرغ نطفه‌دار بومی، افزون بر رونق دوباره تولید و پرورش مرغان بومی، به امر اشتغال‌زایی، بهبود وضعیت اقتصادی و تغذیه‌ای مناطق روستایی کشور نیز کمک می‌شود.

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
[۲] دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
[۳] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
E-mail: kmardani@yahoo.com (نویسنده مسئول)

مرکز پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی آذربایجان غربی در ۲۷ کیلومتری شهرستان ارومیه واقع در جاده طلا تپه با مساحت ۱۱ هکتار در سال ۱۳۶۳ احداث گردید. این مرکز فعالیت خود را در سال ۱۳۶۷ با جمع‌آوری مرغ و خروس از دورترین نقاط این استان که انتظار کمترین احتمال اختلاط با مرغ‌های صنعتی و نژادهای رنگی خارجی می‌رفت، آغاز کرد. تا سال ۷۲ این مرکز به گزینی را فقط به صورت گله‌ای انجام می‌داد و جوجه‌های یک روزه را به ایستگاه‌های خود در شهرستان‌های اطراف می‌فرستاد و آن واحدها نیز نیمچه‌ها را ما بین متقاضیان توزیع می‌کردند. این مرکز از سال ۱۳۷۳ کار اصلاحی را به صورت رکورد برداری و ثبت شجره و براساس عملکرد خود مرغ یا خروس و شجره آنها ادامه داده است (۱). در زمان اجرای این تحقیق، فعالیت این مرکز در نسل سیزدهم ادامه داشت. بر اساس مطالعات مربوط به ژن‌ها، انتخاب می‌تواند با دقت بالاتری صورت گیرد و در امر به‌گزینی نیز باعث کوتاه شدن فاصله بین نسلی به ویژه برای صفات اقتصادی می‌شود. امروزه ژنتیک مولکولی اهمیت زیادی جهت انتخاب و اصلاح نژاد دام‌ها یافته است زیرا امکان انتخاب دقیق‌تر و دستیابی به پاسخ سریع‌تر را نسبت به ژنتیک کمی ممکن می‌سازد (۲).

هورمون رشد (GH)[1] یک هورمون پلی‌پپتید بسیار مهم در حیوانات می‌باشد. این هورمون به همراه هورمون‌های دیگر با محور سوماتوتروپیک، نقش‌های مهمی در تحریک رشد، رشد پیوسته ماهیچه و پروتئین و کاتابولیسم چربی ایفا می‌کند (۸). مطالعات روی حیوانات، نشان داده است که درمان و معالجه با GH در محیط آزمایشگاه و روی حیوان زنده، متوسط افزایش وزن روزانه، راندمان تبدیل غذایی و تولید شیر را افزایش و ذخیره چربی را کاهش می‌دهد (۱۲، ۱۵ و ۲۶). در پستاندارانی همچون خوک، هورمون رشد تقسیم‌بندی مواد مغذی را میان بافت‌های چربی و ماهیچه‌های اسکلتی در جهت تحریک رشد ماهیچه و کاهش ذخیره چربی تنظیم می‌کند (۷). مطالعات PCR-RFLP[2] روی ژن هورمون رشد گاوهای نری که برای تلقیح مصنوعی استفاده می‌شدند، نشان داد که پلی‌مورفیسم ژن GH با عملکرد تولیدمثلی و تولید اسپرم گاوهای نر ارتباط دارد (۱۸).

هورمون رشد ماکیان یک هورمون پلی‌پپتیدی است که در سلول‌های سوماتوتروپ غده هیپوفیز قدامی تولید می‌گردد. این ژن ساختار چندشکلی زیادی دارد و روی وظایف فیزیولوژیکی متنوعی از قبیل رشد و تکامل جوجه، تولید تخم مرغ، ترکیب بدن، کنترل اشتها، پیری، تولید مثل (۴، ۵ و ۲۵) و پاسخ‌دهی سیستم ایمنی بدن مؤثر است (۱۴). ژن هورمون رشد جوجه (cGH)[3]، اولین بار توسط Lamb و همکاران (۱۹۸۸) شناسایی و تعیین توالی شد (۱۷). این ژن روی کروموزوم شماره ۱۲ ماکیان قرار دارد (۶) و اندازه آن حدود ۴ کیلو باز می‌باشد و دارای پنج اگزون و چهار اینترون است (۲۳) که کدکننده یک پروتئین بالغ هورمون رشد ۱۹۱ آمینواسیدی و یک پپتید ۲۵ آمینواسیدی می‌باشد (۲۲). ژن cGH با ژن‌های هورمون رشد پستانداران مشابه هست ولی توالی‌های نوکلئوتیدی اینترون‌های ژن cGH نسبت به اگزون‌ها، در مقایسه با پستانداران طویل‌تر هستند (۱۳). این ژن، چندشکلی‌هایی دارد که از طریق برش با آنزیم‌های *Msp*I و *Sac*I قابل شناسایی می‌باشند. این چندشکلی‌ها ممکن است ارتباط معنی‌داری با صفات مهم اقتصادی جوجه داشته باشند (۱۰ و ۲۴). در مقایسه با دیگر حیوانات، نواحی اینترون ژن هورمون رشد جوجه، دارای چندشکلی بیشتری هستند و مطالعات با استفاده از روش PCR-RFLP، ارتباط این چندشکلی‌ها را با صفات تولید گوشت، چربی بطنی، تولید تخم مرغ و مقاومت به بیماری مارک یا لوکوز طیور نشان داده است (۹، ۱۰، ۱۶ و ۱۹).

1- Growth Hormone
2- Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
3- Chicken Growth Hormone

هورمون رشد یک ژن کاندیدا برای صفات تولیدی ماکیان می‌باشد و چندشکلی‌های این ژن ممکن است در آنالیز فیلوژنتیک و طراحی برنامه‌های انتخاب به کمک مارکر[1] (MAS) مفید باشند (۱۳ و ۱۶). هدف از تحقیق حاضر، شناسایی چندشکلی‌های موجود در ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد ماکیان بومی مرکز پرورش و اصلاح نژاد استان آذربایجان غربی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و نیز تعیین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی برای این جایگاه در جمعیت مذکور می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

در این تحقیق تعداد ۹۰ قطعه مرغ و خروس بومی (۵۹ مرغ و ۳۱ خروس) از جمعیت ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی استان آذربایجان غربی به صورت تصادفی و به شکل انفرادی انتخاب گردیدند. مقدار یک میلی‌لیتر خون از ورید بالی پرنده اخذ و در لوله‌های حاوی K_2EDTA و در مجاورت یخ به آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل گردیدند و تا زمان استخراج DNA در دمای $-20^{\circ}C$ نگهداری شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون با روش استخراج نمکی عمومی و سریع ارائه شده توسط الجنابی و مارتینز (۳) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری و ژل آگارز ۱/۵ درصد ارزیابی گردید. با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی پیشنهاد شده توسط Kuhnlein و همکاران (۱۶)، یک قطعه ۱۱۷۰ جفت بازی از جایگاه اینترون ۴ ژن هورمون رشد بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده بر اساس توالی پرایمرهای استفاده شده توسط Kuhnlein و همکاران (۱۶) به صورت زیر بود.

توالی پرایمر	نام پرایمر
5′-CTA AAG GAC CTG GAA GAA GGG-3′	PMPS1-F (پرایمر رفت)
5′-AAC TTG TCG TAG GTG GGT CTG-3′	PMPS1-R (پرایمر برگشت)

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۵ میکرومول dNTP، ۰/۲۵ میکرومول از هر یک از پرایمرها، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (سیناژن، ایران)، ۲ میلی‌مول $MgCl_2$، یک واحد آنزیم Taq پلی‌مراز (سیناژن، ایران) و حدود ۱۵۰ نانوگرم DNA ژنومی انجام گرفت. تکثیر قطعه مورد نظر در دستگاه PCR (Quanta Biotech, UK) با استفاده از یک مرحله ابتدایی واسرشته‌سازی $95^{\circ}C$ به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ چرخه دمایی شامل واسرشته‌سازی در $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها $62^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه و دمای توسعه $72^{\circ}C$ به مدت ۹۰ ثانیه انجام گرفت و در پایان یک دمای توسعه $72^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه جهت گسترش نهایی زنجیره استفاده شد (۱۶). محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با استفاده از دستگاه ژل داک (Syngene, UK) مشاهده و عکس‌برداری شدند.

واکنش هضم آنزیمی (RFLP)

قطعات تکثیر شده بوسیله آنزیم محدودگر *Msp*I هضم شدند. واکنش برش آنزیمی در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۵ واحد آنزیم *Msp*I، ۲ میکرولیتر بافر Tungo و ۵ میکرولیتر محصول PCR آماده گردید و در دمای $37^{\circ}C$

1- Marker Assisted Selection

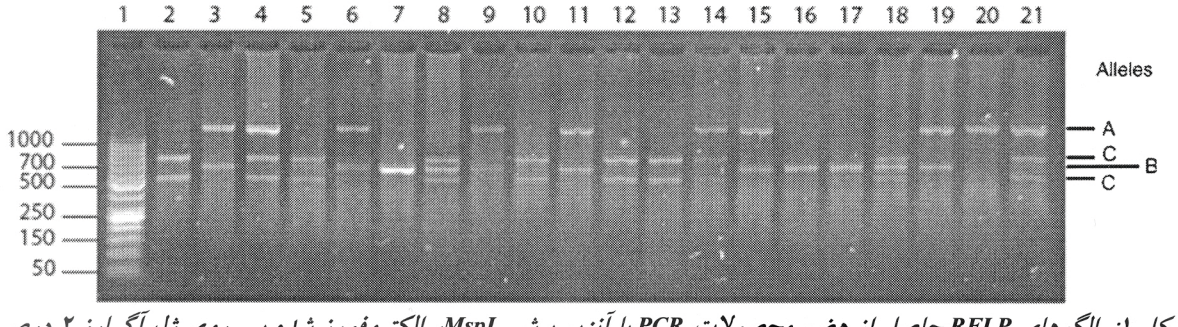
به مدت سه ساعت مورد برش آنزیمی قرار گرفتند. بعد از برش، محصولات برش داده شده با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد حاوی اتیدیوم برماید الکتروفورز گردیدند و برای مشاهده باندها از دستگاه ژل داک استفاده شد.

آنالیز چندشکلی‌های مشاهده شده

چندشکلی‌های ژنوتیپی مشاهده شده به کمک نرم افزار PopGene32 مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند. تعداد آلل‌های مؤثر بر اساس رابطه Hartl D و Clark A (۱۹۸۹) و معیار هتروزیگوتی بر اساس رابطه تنوع ژنی Nei (۱۹۷۳) محاسبه گردید (۲۰).

نتایج

DNA ژنومی استخراج شده دارای کیفیت خوبی بود. محصولات PCR شامل قطعه‌ای به طول ۱۱۷۰ جفت باز از اینترون ۴ ژن هورمون رشد بود که توسط پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردیدند و باند غیراختصاصی مشاهده نگردید. بر اساس الگوهای حاصل از برش آنزیمی، ژنوتیپ هر حیوان تعیین گردید (شکل ۱). نتایج برش آنزیمی محصولات PCR نشان داد که اینترون ۴ ژن cGH دارای سه نوع آلل A، B و C بود که فراوانی آنها در کل جمعیت به ترتیب ۳۴/۴۴٪، ۳۲/۲۲٪ و ۳۳/۳۳٪، در مرغ‌ها ۳۵/۵۹٪، ۲۷/۹۷٪ و ۳۶/۴۴٪ و در خروس‌ها ۳۲/۲۶٪، ۴۰/۳۲٪ و ۲۷/۴۲٪ محاسبه شد (جدول ۱). این آلل‌ها در شش ترکیب ژنوتیپی AA، AB، BB، AC، BC و CC دسته‌بندی شدند که فراوانی‌های آنها در جدول ۲ ارائه شده است. شاخص هتروزیگوتی و تعداد آلل موثر برای این جایگاه در کل جمعیت به ترتیب ۰/۶۶ و ۲/۹۹، در مرغ‌ها ۰/۶۶ و ۲/۹۶ و در خروس‌ها ۰/۶۵ و ۲/۹۲ به دست آمد (جدول ۱). آزمون‌های مربع کای (χ^2) و جی (G^2)در جمعیت طیور بومی استان آذربایجان غربی نشان داد که جمعیت در حالت تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارد (جدول ۲).



شکل ۱: الگوهای RFLP حاصل از هضم محصولات PCR با آنزیم برشی MspI، الکتروفورز شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک ۱: نشانگر مولکولی bp ۱۰۰ (سیناژن ایران)، چاهک‌های ۲، ۵، ۱۰، ۱۲و ۱۳: ژنوتیپ CC، چاهک‌های ۳، ۶، ۹، ۱۱، ۱۵ و ۱۹: ژنوتیپ AB، چاهک‌های ۴، ۱۴ و ۲۱: ژنوتیپ AC، چاهک‌های ۷، ۱۶ و ۱۷: ژنوتیپ BB، چاهک‌های ۸ و ۱۸: ژنوتیپ BC، چاهک ۲۰: ژنوتیپ AA

جدول ۱: فراوانی آللی، اندازه موثر آللی و شاخص هتروزیگوتی در مرغان بومی استان آذربایجان غربی

آلل	فراوانی آللی (٪)			اندازه موثر آللی(ne)			شاخص هتروزیگوتی(Nei)		
	کل جمعیت خروس مرغ			کل جمعیت خروس مرغ			کل جمعیت خروس مرغ		
A	۳۵/۵۹	۳۲/۲۶	۳۴/۳۴	۲/۹۶	۲/۹۲	۲/۹۹	۰/۶۶	۰/۶۵	۰/۶۶
B	۲۷/۹۷	۴۰/۳۲	۳۲/۲۲						
C	۳۶/۴۴	۲۷/۴۲	۳۳/۳۳						

جدول ۲: فراوانی‌های ژنوتیپی و مقادیر مربع کای (χ^2) و جی (G^2) برای بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در مرغان بومی استان آذربایجان غربی

ژنوتیپ	فراوانی ژنوتیپی						فراوانی ژنوتیپی (٪)		
	مشاهده شده (O)			مورد انتظار (E)					
	مرغ	خروس	کل جمعیت	مرغ	خروس	کل جمعیت	مرغ	خروس	کل جمعیت
AA	۶	۴	۱۰	۷/۳۵	۳/۱۱	۱۰/۵۶	۱۰/۱۶	۱۲/۹۰	۱۱/۱۱
AB	۱۴	۷	۲۱	۱۱/۸۴	۸/۱۹	۲۰/۰۸	۲۳/۷۲	۲۲/۵۸	۲۳/۳۳
BB	۶	۵	۱۱	۴/۵۱	۴/۹۱	۹/۲۳	۱۰/۱۶	۱۶/۱۲	۱۲/۲۲
AC	۱۶	۵	۲۱	۱۵/۴۳	۵/۵۷	۲۰/۷۸	۲۷/۱۱	۱۶/۱۲	۲۳/۳۳
BC	۷	۸	۱۵	۱۲/۱۲	۶/۹۶	۱۹/۴۴	۱۱/۸۶	۲۵/۸۰	۱۶/۶۶
CC	۱۰	۲	۱۲	۷/۷۱	۲/۲۲	۹/۸۸	۱۶/۹۴	۶/۴۵	۱۳/۳۳
مربع کای(χ^2)							۳/۹۹^{ns}	۰/۶۶^{ns}	۱/۸۷^{ns}
Probability							۰/۲۶	۰/۸۸	۰/۵۹
G^2							۴/۲۸^{ns}	۰/۶۴^{ns}	۱/۹۱^{ns}
Probability							۰/۲۳	۰/۸۸	۰/۵۹

ns: non significant

بحث

در تحقیق حاضر سه آلل A، B و C و شش ترکیب ژنوتیپی برای ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد در ماکیان بومی استان آذربایجان غربی، شناسایی شد که آلل A با فراوانی ۰/۳۴ دارای بیشترین فراوانی و آلل‌های C و B به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۳۳ و ۰/۳۲ در رده‌های بعدی قرار داشتند. آلل‌های D و E که در مطالعات انجام گرفته توسط جعفری و همکاران (۱۳۸۷) در ماکیان بومی مازندران (۱) و Nei و همکاران (۲۰۰۲) در ماکیان بومی چین (۲۱) شناسایی گردیدند، در جمعیت ماکیان بومی آذربایجان غربی مشاهده نشدند. وجود آلل‌های D و E در جمعیت ماکیان بومی مازندران و ماکیان بومی چین می‌تواند بیانگر وقوع جهش‌های جدید در ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد و ایجاد محل‌های جدید برش برای آنزیم *Msp*I باشد و بر این اساس می‌توان گفت که چند شکلی و تنوع ژنتیکی این ناحیه از ژن هورمون رشد در جمعیت ماکیان بومی مازندران و ماکیان بومی چین نسبت به جمعیت ماکیان بومی آذربایجان غربی بالاتر می‌باشد.

در مقایسه بین مرغ‌ها و خروس‌های بومی آذربایجان غربی مشخص گردید که فراوانی آلل‌های A و C در مرغ‌ها بیشتر از خروس‌ها و فراوانی آلل B در خروس‌ها بیشتر از مرغ‌ها می‌باشد که تفاوت موجود در فراوانی آللی مرغ‌ها و خروس‌ها ممکن است بیانگر تفاوت در صفات فنوتیپی و نیز تفاوت در تعداد مرغ‌ها و خروس‌های انتخاب شده به عنوان والدین نسل بعد باشد.

Nie و همکاران (۲۰۰۲) پلی‌مورفیسم اینترون ۴ ژن هورمون رشد را در ۲۰ جمعیت ماکیان شامل مرغان بومی چین، هیبریدهایی از نژادهای بومی چین و نژادهای گوشتی غیربومی، جمعیت‌هایی از نژادهای گوشتی و نژادهای تخم‌گذار مطالعه کردند و هشت الگوی هضم آنزیمی را شناسایی و فراوانی‌های آللی متفاوتی مشاهده کردند (۲۱). آنها در نژاد های-لاین[1] دو آلل A و B، در نژادهای گوشتی (AP^2 و KL^3)، چهار آلل A، B، C و D،

1- Hy-Line
2- Avian Parental
3- Kabir Line

در هیبریدهایی از نژادهای بومی چین و نژادهای گوشتی غیربومی سه آلل A، B و C و در نژادهای بومی چین هم پنج آلل A، B، C، D و E را شناسایی کردند (۲۱).

بر اساس فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده در مطالعه‌ای که توسط جعفری و همکاران (۱۳۸۷) روی اینترون ۴ ژن هورمون رشد در ماکیان بومی استان‌های اصفهان و مازندران انجام گرفت (۲)، فراوانی‌های آللی، شاخص هتروزیگوتی، اندازه مؤثر آللی و مربع کای برای این دو جمعیت از مرغان بومی به کمک نرم‌افزار PopGene32 محاسبه گردید (جدول ۳). مطابق با داده‌های موجود در این جدول، در مرغان بومی مازندران و آذربایجان غربی، آلل A و در مرغان بومی اصفهان، آلل C دارای بیشترین فراوانی می‌باشند، همچنین آلل‌های D و E فقط در مرغان بومی مازندران مشاهده شده‌اند ولی فراوانی آنها در حد بسیار پایینی بوده است که همین فراوانی‌های آللی پایین برای آلل‌های D و E، باعث شده که اندازه مؤثر آللی در مرغان بومی مازندران بیشتر از اندازه مؤثر آللی در مرغان بومی اصفهان و آذربایجان غربی باشد. شاخص هتروزیگوتی در هر سه جمعیت ماکیان بومی، بالا بوده که نشان دهنده تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا در آنها می‌باشد. آزمون مربع کای (χ^2) برای این جایگاه در مرغان بومی اصفهان و آذربایجان غربی معنی‌دار نبوده (P>۰/۰۵) ولی در مرغان بومی مازندران معنی‌دار بوده (P<۰/۰۵) که نشان‌دهنده وجود عوامل تغییر دهنده فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر در این جمعیت می‌باشد.

جدول ۳: فراوانی‌های آللی، ژنوتیپی، مربع کای (χ^2)، اندازه موثر آللی و شاخص هتروزیگوتی در مرغان بومی استان‌های آذربایجان غربی، اصفهان و مازندران

جمعیت	ژن cGH (اینترون۴)	تعداد نمونه	فراوانی آللی (٪)					χ^2	Probability	اندازه موثر آللی (ne)	شاخص هتروزیگوتی (Nei)
			A	B	C	D	E				
مرغان بومی آذربایجان‌غربی	cGH	۹۰	۳۴/۴۴	۳۲/۲۲	۳۳/۳۳	–	–	^{ns}۱/۸۷	۰/۵۹۸۳	۲/۹۹	**۰/۶۶**
مرغان بومی اصفهان	cGH	۹۱	۲۸/۰۲	۳۰/۷۷	۴۱/۲۱	–	–	^{ns}۱/۰۱	۰/۷۹۷۹	۲/۹۱	**۰/۶۵**
مرغان بومی مازندران	cGH	۴۳	۳۷/۲۲	۲۳/۲۶	۳۷/۲۱	۱/۱۶	۱/۱۶	*۲۲/۸۴	۰/۰۱۱۳	۳/۰۱	**۰/۶۶**

فراوانی‌های آللی به دست آمده در این مطالعه تا حدودی با فراوانی‌های آللی مرغان بومی اصفهان و مازندران نزدیک می‌باشد که می‌تواند تا حدودی شباهت این نژادها را به هم نشان دهد ولی در مقایسه با فراوانی‌های آللی که Nie و همکاران (۲۰۰۲) به دست آورده بودند، تفاوت چشمگیری را نشان می‌دهند که با توجه به شرایط جغرافیایی و یکسان بودن برنامه‌های انتخاب و اصلاح نژادی مرغان بومی در سطح کشور، شباهت و نزدیک بودن فراوانی‌های آللی در جمعیت مرغان بومی استان‌های اصفهان، مازندران و آذربایجان غربی و متفاوت بودن آنها با مرغان بومی چین دور از انتظار نیست. در بین همه نژادهای مورد مطالعه Nie و همکاران و حتی مرغان بومی مازندران و آذربایجان غربی غیر از مرغان بومی اصفهان، آلل A دارای بیشترین فراوانی می‌باشد و می‌توان آنرا به عنوان آلل غالب در بین همه این نژادها، غیر از مرغان بومی اصفهان در نظر

گرفت. با توجه به اینکه در نژادهای-لاین، به عنوان یک لاین خالص از نظر تخم‌گذاری، آلل A دارای فراوانی بسیار بالایی (۹۴/۸٪) می‌باشد و در نژادهای گوشتی از فراوانی آلل A کم شده و به فراوانی آلل‌های دیگر خصوصاً آلل C افزوده شده است (۲۱) می‌توان حدس زد که فراوانی بالای آلل A و نبود آلل‌های C، D و E با عملکرد تخم‌گذاری ارتباط داد و نتیجه گرفت که در بین مرغان بومی مازندران، آذربایجان غربی و اصفهان، بیشترین عملکرد تخم‌گذاری مربوط به مرغان بومی مازندران و بیشترین عملکرد تولید گوشت مربوط به مرغان بومی اصفهان می‌باشد و مرغان بومی آذربایجان غربی حالتی حد واسط در بین مرغان بومی مازندران و اصفهان را دارا می‌باشند که متأسفانه به دلیل نداشتن اطلاعات تولیدی آنها، نمی‌توان به طور قطع در این خصوص اظهار نظر نمود و لازم است که مطالعات بیشتری در این زمینه صورت گیرد، ولی در کل، تفاوت چندانی در فراوانی‌های آللی بین مرغان بومی فوق‌الذکر وجود ندارد و می‌توان گفت که این طیور حالتی دو و یا چندمنظوره از نظر عملکرد تخم‌گذاری، تولید گوشت، مقاومت به بیماری‌ها، شرایط نامساعد محیطی و مدیریتی و غیره دارند. ظهور آلل‌های D و E نیز ممکن است با این صفات ارتباط داشته باشد که امید است بتوان در تحقیقات بعدی، بیشتر به مطالعه ارتباط‌های آللی و ژنوتیپی با این صفات پرداخت.

در بعضی از این نژادها، آلل‌های D و E نیز مشاهده شده است ولی دارای کمترین فراوانی بوده‌اند که ممکن است این آلل‌ها در اثر وقوع جهش، مهاجرت، انتخاب و یا سایر عوامل به وجود آمده باشند و در نتیجه محل‌های برش جدیدی برای آنزیم *Msp*I ایجاد شده و منجر به شناسایی این آلل‌ها گشته است.

تفاوت بین فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار برای بررسی تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از آزمون‌های مربع کای (χ^2) و جی (G^2) در جمعیت مورد مطالعه معنی‌دار نبود که نشان می‌دهد جمعیت در حالت تعادل قرار دارد (P>۰/۰۱)، لذا می‌توان گفت که آلل‌های موجود در این جایگاه از عوامل تغییر دهنده فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی از جمله انتخاب، مهاجرت و جهش به دور بوده‌اند و ظاهراً انتخابی در این جمعیت در جهت افزایش یا کاهش صفات فنوتیپی مورد نظر صورت نگرفته است. فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار مرغ‌ها و خروس‌های استان آذربایجان غربی به طور جداگانه از طریق آزمون‌های مربع کای (χ^2) و جی (G^2) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل بیانگر عدم انحراف مرغ‌ها و خروس‌ها از حالت تعادل هاردی-واینبرگ بود.

با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان گفت که ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد طیور بومی استان آذربایجان غربی چند شکلی بالایی دارد و تنوع ژنتیکی در این جایگاه در این جمعیت نسبتاً بالا است به طوری که می‌توان از آن در برنامه‌های انتخاب و اصلاح نژادی آینده و نیز به عنوان ذخایر ارزشمند ژنتیکی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از مسئولین مرکز پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی استان آذربایجان غربی جهت همکاری در اخذ نمونه‌های خون و معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه که هزینه تحقیق حاضر را فراهم نمودند اعلام می‌دارند. همچنین از آقایان عبدالباسط پیریونسی، ناصر محمودی‌اقدم، مهندس بستانچی و مهندس فرهنگ‌پژوه که در این تحقیق ما را یاری نموده‌اند سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱- بستانچی پرویز (۱۳۸۸). تاثیر سطوح مختلف ویتامین E در جیره مرغان مادر بومی روی صفات تولیدمثلی، پایان‌نامه شماره ۱۲۵۴، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه. صفحات ۴۹-۴۷.

۲- جعفری اعظم، پاکدل عباس و اسماعیل‌خانیان سعید (۱۳۸۷). بررسی چندشکلی ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد در مرغ‌های بومی استان‌های اصفهان و مازندران. مجله ژنتیک نوین، دوره ۴، شماره ۳، صفحات ۴۳-۳۷.

3- Aljanabi S.M. and Martinez L. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, 25: 4692-93.

4- Apa R., Lanzone A. and Micheli F. (1994). Growth hormone induces invitro maturation of follicle and cumulus-enclosed rat oocytes. Molecular Cell Endocrinology, 106: 207-212.

5- Byatt J.C., Staten N.R., Salsgiver W.J., Kostelec J.C. and Collier R.J. (1993). Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone gene. American Journal Physiology, 264: 986-992.

6- Darabi A., Fayazi J., Roshanfekr H. and Nasiry M.T. (2010). Investigation of growth hormone gene polymorphism using PCR-RFLP technique in native poultry in khouzestan province. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9 (2): 255-257.

7- Etherton T.D. (2001). Porcine growth hormone: a central metabolic hormone involved in the regulation of adipose tissue growth. Nutrition, 17: 789 –792.

8- Etherton T.D. and Bauman D.E. (1998). Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. Physiology Review, 78: 745-761.

9- Feng X.P., Kuhnlein U., Aggrey S.E., Gavora J.S. 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: 1770-75.

10- Fotouhi N., Karatzas C.N, Kuhnlein U. and Zadworny D. (1993). Identification of growth hormone DNA polymorphisms which respond to divergent selection for abdominal fat content in chickens. Theoretical and Applied Genetics, 85:931-936.

11- Hartl D.L. and Clark A.G. (1989). Principles of population genetics. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, M.A. p: 125.

12- Hoj S., Fredholm M., Larsen N.J. and Nielsen V.H. (1993). Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. Animal Genetics, 24: 91–95.

13- Ip S.C., Zhang X. and Leung F.C. (2001). Genomic growth hormone gene polymorphism in native Chinese chicken. Experimental Biology and Medicine, 226: 458–462.

14- Kelley S.M. and Felton D.L. (1995). Experimental basis for neural immune interactions. Physiology Review, 75: 77-106.

15- Klindt J., Buonomo F.C., Wise T. and Yen J.T. (1996). Endocrine and metabolite responses to porcine growth hormone administered by sustained release implant for different lengths of time in male pigs. Endocrinology, 137: 3689–95.

16- Kuhnlein U.N., Liu S., Weigend J.S., Gavora W., Fairfull and Zadworny D. (1997). DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. Animal Genetics, 28: 116-123.

17- Lamb L.C., Galehouse D.M. and Foster D.N. (1988). Chicken growth hormone cDNA sequence. Nucleic Acids Research, 16: 9339.

18- Lechniak D., Machnik G., Szydlowski M. and Switonski M. (1999). Growth hormone gene polymorphism and reproductive performance of AI bulls. Theriogenology, 52: 1145-52.

19- Liu H.C., Kung H.J., Fulton J.E., Morgan R.W. and Cheng H.H. (2001). Growth hormone interacts with the Marek's disease virus SORF2 protein and is associated with disease resistance in chicken. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 9203-08.

20- Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 70: 3321-23.

21- Nie Q., Ip S.C.Y., Zhang X. and Yang G. (2002). New variations in intron 4 of growth hormone gene in chinese native chickens. The Journal of Heredity, 93: 277-279.

22- Nie Q., Sun B., Zhang D., Luo C., Ishag N.A., Lei M. and et al. (2005). High Diversity of the Chicken Growth Hormone Gene and Effects on Growth and Carcass Trait. Journal of Heredity 96: 698-703.

23- Tanaka M., Hosokawa Y., Watahiki M. and Nakashima K. (1992). Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. Gene, 112: 235-239.

24- Thakur M.S., Parmar S.N., ToJenkhomba T.C., Srivastava P.N., Joshi C.G., Rank D.N. and et al. (2006). Growth hormone gene polymorphism in Kadaknath breed of poultry. Indian Journal of Biotechnology, 5: 189-194.

25- Thakur M.S., Parmar S.N., Chaudhari M.V. and Bhardwaj J.K. (2009). Growth hormone gene polymorphism and its association with egg production in Kadaknath chicken. Livestock Research for Rural Development. 21(8): 132.

26- Vasilatos-Younken R. (1995). Proposed mechanism for the regulation of growth hormone action in poultry: Metabolic effects. The Journal of Nutrition, 125: 1783-89.