بررسی چندشکلی ژن پرولاکتین در برخی توده‌های مرغان بومی خوزستان با روش PCR-RFLP

صدیقه ایسوندی[۱*]، محمدتقی بیگی‌نصیری[۲]، هدایت‌اله روشنفکر[۳] و جمال فیاضی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۸

چکیده

پرولاکتین هورمونی است که نقش مهمی در رفتار کرچی پرندگان دارد. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که ژن پرولاکتین می‌تواند ژن کاندیدا برای کرچی باشد و تنوع موجود در بخش‌های مختلف این ژن، پتانسیل ویژه‌ای برای استفاده به عنوان نشان‌گرهای ژنتیکی از خود نشان داده و می‌تواند به بهبود ژنتیکی جمعیت‌ها کمک کند. هدف از این مطالعه، بررسی چندشکلی ژن پرولاکتین در برخی توده‌های مرغان بومی خوزستان با روش PCR-RFLP بود. برای این منظور از تعداد ۱۰۰ قطعه مرغ بومی ایستگاه تکثیر و اصلاح نژاد مرغ بومی نهاده‌های دامی جهاد استان خوزستان (شهرستان باوی)، به صورت تصادفی خون‌گیری انجام شد. با استفاده از روش تغییر یافته استخراج نمکی، DNA نمونه‌ها استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۴۳۹ جفت بازی ژن پرولاکتین توسط آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. قطعه تکثیر شده به وسیله‌ی آنزیم برشی *Alu*I هضم شد. فراوانی آلل‌های C و T به ترتیب ۰/۶۵۵ و ۰/۳۴۵ و فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CT و CC به ترتیب ۰/۱۰، ۰/۴۹ و ۰/۴۱ برآورد شدند. با استفاده از آزمون کای مربع (X^2) مشخص شد که فراوانی آلل‌ها در این جایگاه ژنی در حالت تعادل هاردی - وینبرگ نمی‌باشد. نتایج نشان داد که ژن پرولاکتین در منطقه‌ی مورد بررسی دارای چندشکلی می‌باشد و روش PCR-RFLP برای تعیین ژنوتیپ‌های ژن پرولاکتین مرغان مورد مطالعه، مناسب می‌باشد.

کلمات کلیدی: چند شکلی، ژن، پرولاکتین، کرچی، مرغ بومی

مقدمه

یکی از اهداف مهم پرورش مدرن صنعت طیور، ایجاد عملکرد بالای لاین‌ها و نژادهای مرغ در دو جهت اصلی بهره‌وری گوشت و تخم‌مرغ می‌باشد. پژوهش‌های مداوم روی ژن‌ها، مسیرهای فیزیولوژیکی زیادی را در برمی‌گیرد که به تشخیص ماهیت مولکولی تولید صفات مفید کمک می‌کنند. استفاده از این نشان‌گرهای ژنتیکی مولکولی، به طور بالقوه تا حد زیادی شدت انتخاب را افزایش خواهد داد و پتانسیل تولیدی پرندگان را به طور مؤثر کشف خواهد کرد. علاوه بر این، مطالعه ژن‌های کاندیدا و تأثیر آن‌ها روی تظاهرات فنوتیپی مورد مطالعه محققین، مبنای انتخاب براساس نشان‌گرها (MAS[1]) می‌باشد (Kulibaba and Podstreshnyi 2012).

پرولاکتین یکی از هورمون‌های هیپوفیز است که تنظیم کننده‌ی عملکردهای فیزیولوژیکی مهم از قبیل اثرات شناخته شده در تولید مثل پستانداران، تنظیم فشار اسمزی در ماهی‌ها و رفتار آشیانه‌ای (کرچی) در پرندگان می‌باشد (Elkins et al. 2000). هورمون پرولاکتین مرغ نقش بسیار مهمی در تولید تخم‌مرغ و رفتار کرچی ایفا می‌کند،

[۱*] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده‌ی علوم دامی‌و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
E-mail: s.isvandi@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] استاد گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
[۳] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

1- Marker assisted selection

زیرا شروع رفتار کرچی با یک افزایش در ترشح پرولاکتین القا می‌شود (Shimida et al. 1991). افزایش غلظت پرولاکتین پلاسما، با وقوع کرچی همراه است. در مدت جوجه‌کشی، mRNA پرولاکتین به بالاترین سطح می‌رسد که این دلالت بر این دارد که پرولاکتین در حفظ کرچی مهم است (Zhou et al. 2001). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهند که پپتید روده‌ای محرک عروق (VIP)، آزاد کننده‌ی پرولاکتین در پرندگان است. هورمون دوپامین نیز از طریق مسدود کردن عملکرد VIP، نقش مهمی در کنترل ترشح پرولاکتین ایفا می‌کند (Wilkanowska et al. 2014). ژن کد کننده‌ی هورمون پرولاکتین طیور روی کروموزوم شماره‌ی ۲ واقع شده است. طول توالی آن ۶۱۶۳ جفت باز می‌باشد. این ژن دارای پنج اگزون و چهار اینترون می‌باشد که طول پنج اگزون ۲۸، ۱۸۲، ۱۰۸، ۱۸۰ و ۱۹۲ و طول چهار اینترون آن ۱۵۰۲، ۴۰۸، ۱۳۴۸ و ۱۹۰۹ جفت باز می‌باشد (Au and Leung 2002). با توجه به پذیرش فن‌آوری جوجه‌کشی مصنوعی، در تولید مدرن طیور دیگر کرچی مورد نیاز نیست. اگر چه بروز کرچی را می‌توان به طور مؤثر توسط انتخاب مصنوعی کاهش داد، ولی روند ریشه‌کن کردن آن کند است (Jiang et al. 2005). به جز نژاد لگهورن سفید که تحت انتخاب مصنوعی طولانی مدت برای به حداقل رساندن بیان فنوتیپی این رفتار است، کرچی در بیش‌تر نژادهای اهلی مرغ مشاهده می‌شود. علاقه قابل توجهی به کنترل ژنتیکی کرچی در مرغ وجود دارد. کرچی صفت مهم اقتصادی است که حداقل توسط دو ژن اتوزومال (غیرجنسی) کنترل می‌شود (Romanov et al. 2002). مطالعات گسترده روی مکانیسم کرچی، جهت مهار رفتار جوجه‌کشی انجام شده است که باعث بهبود تولید تخم‌مرغ در مرغ اهلی شده است (March et al. 1994).

در مطالعه‌ای ارتباط پلی‌مورفیسم ژن پرولاکتین و گیرنده‌ی آن با صفت کرچی در طیور بررسی شد (Jiang et al. 2005) در این پژوهش که روی جمعیت‌هایی از مرغان لگهورن سفید، های‌لاین، بلوشل، شئوگوانگ، بیجینگ یوا، آوین کبابی و تاهی سیلک صورت گرفت، از ۱۵ پرایمر برای تکثیر توالی نوکلئوتیدی پروموتور ژن پرولاکتین و اگزون‌های گیرنده‌ی ژن پرولاکتین استفاده شد. طی این پژوهش که با استفاده از تکنیک PCR-SSCP صورت گرفت، وجود پلی مورفیسم در مناطق مذکور مشخص شد. نتایج نشان داد که پلی‌مورفیسم‌های کشف شده در اگزون‌های ۳ و ۶ گیرنده‌ی ژن پرولاکتین با کرچی مرتبط نیستند ولی پلی‌مورفیسم کشف شده در منطقه‌ی پروموتور این ژن با صفت کرچی مرتبط می‌باشد.

در پژوهشی که برای بررسی پلی‌مورفیسم ناحیه‌ی طرفین ′۵ ژن پرولاکتین مرغ انجام شد، جمعیتی از مرغان بومی شامل یهوانگ چینی، تاهی‌سیلک و مرغان لگهورن سفید مورد مطالعه قرار گرفتند که چهار پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در موقعیت C-۲۴۲۵T، T-۲۲۱۵C، A-۲۰۶۳G و G-۱۹۶۷A مشخص شد. همچنین برای حذف و اضافه‌ی ۲۴ جفت بازی و توالی پلی A نیز پلی‌مورفیسم مشاهده شد. نتایج نشان داد که ممکن است مکان‌های پلی‌مورف با کرچی در مرغ مرتبط باشند (Liang et al. 2006).

Rashidi و همکاران در سال ۲۰۱۲ در پژوهشی، ارتباط بین ژن پرولاکتین و اگزون ۲ و ۵ ژن گیرنده‌ی پرولاکتین را با صفات اقتصادی مرغان مادر مرغ بومی مازندران بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در اگزون ۲ ژن گیرنده با وزن بدن در زمان تخم‌گذاری و با سن در زمان بلوغ جنسی و همچنین بین SNP در اگزون ۵ ژن گیرنده‌ی پرولاکتین با تعداد تخم‌مرغ وجود دارد.

در مطالعات مختلف مشخص شد که حضور اضافه‌ی ۲۴ جفت بازی در منطقه‌ی پروموتور ژن پرولاکتین مرغ، همبستگی مستقیمی با شدت فعالیت تخم‌گذاری و رفتار کرچی در پرندگان دارد (Kulibaba and Podstreshnyi 2012). هدف از این مطالعه، بررسی چندشکلی ژن

پرولاکتین در برخی توده‌های مرغان بومی خوزستان با استفاده از روش PCR-RFLP بود.

مواد و روش کار

در مجموع از ۱۰۰ قطعه مرغ بومی ایستگاه تکثیر و اصلاح نژاد مرغ بومی نهاده‌های دامی جهاد استان خوزستان (شهرستان باوی) که به صورت تصادفی انتخاب شدند، نمونه‌ی خون تهیه گردید و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج DNA از خون کامل با استفاده از روش استخراج نمکی Miller و همکاران ۱۹۸۸ صورت گرفت. مقدار ۳ سی‌سی خون کامل که حاوی ماده‌ی ضد انعقاد EDTA بود، داخل لوله‌های پلاستیکی ۱۵ میلی‌لیتر ریخته شد. دو برابر حجم خون، بافر جداکننده (Tris-HCl ۵ میلی‌مولار با pH=7.5، $MgCl_2$ ۵ میلی‌مولار، Sucrose ۰/۳۲ میلی‌مولار و Triton 100X ۱۰ میلی‌مولار) به خون اضافه و سپس ورتکس (Vortex) شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به آرامی جدا شد. مرحله‌ی ذکر شده تا رسیدن به یک رسوب کاملاً سفید تکرار شد. ۳ میلی‌لیتر بافر لیز کننده (Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار، Na_2EDTA ۲ میلی‌مولار و NaCl ۴۰۰ میلی‌مولار با pH=8.2) به رسوب اضافه و ورتکس شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱۰ درصد و ۱۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز–K به محلول اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در حمام آب گرم (بن ماری) قرار داده شد. یک میلی‌لیتر محلول NaCl اشباع (۴ مولار) به محلول اضافه و سپس ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک لوله پلاستیکی استریل منتقل شده و هم حجم آن، کلروفرم اضافه و با تکان دادن با محلول مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز آبی بالایی که حاوی DNA بود با احتیاط جدا و به لوله‌ی پلاستیکی جدیدی منتقل شد. برای متراکم‌تر نمودن DNA، به اندازه ۰/۱ حجم محلول استات سدیم ۳ مولار اضافه گردید. دو برابر حجم محلول به دست آمده، اتانل مطلق اضافه و لوله به آهستگی چند بار وارونه گردید تا رشته‌های DNA ظاهر شد. کلاف DNA، با میله‌ی شیشه‌ای جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت هوا قرار گرفت. DNA حاصله دو بار با اتانل ۷۰ درصد شستشو داده شد و در نهایت در ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر حل گردید. تیوب‌های حاوی DNA، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند، سپس به دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

در این پژوهش از آغازگرهای زیر که مطابق با مقاله‌ی Cui و همکاران در سال ۲۰۰۶ می‌باشد استفاده شد:

5FA: forward 5′-AGAGGCAGCCCAGGCATTTTAC-3′
Reverse5′-CCTGGGTCTGGTTTGGAAATTG-3′

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۲۰۰-۱۵۰ نانوگرم DNA، بافر یک x واکنش PCR، یک میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۱۰ پیکومول پرایمر، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز صورت گرفت. برنامه‌ی دوره‌های حرارتی دستگاه PCR به صورت یک مرحله‌ی ابتدایی واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بهینه شد.

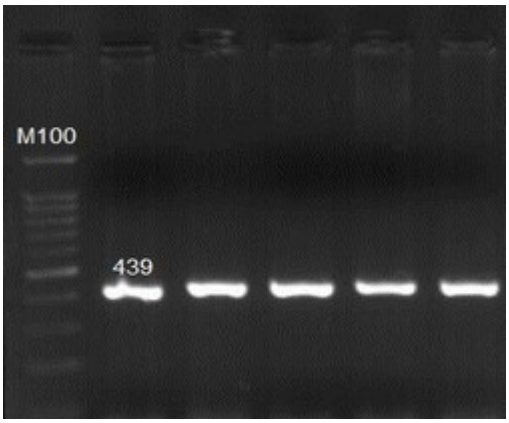
از آنزیم برشی *Alu*I جهت هضم محصولات PCR استفاده شد. برای این منظور از ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، دو میکرولیتر بافر آنزیم، یک میکرولیتر آنزیم برشی (۱۰ unit)، ۱۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و در مجموع حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر استفاده شد. واکنش برش آنزیمی به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی

سانتی‌گراد صورت گرفت. محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

با استفاده از نرم‌افزار GenAlex6/3، فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های شناسایی شده در جمعیت بررسی شد، همچنین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و نیز اندازه‌ی آلل مؤثر و شاخص شانون محاسبه گردید. بررسی تعادل هاردی–وینبرگ نیز با استفاده از نرم‌افزار ذکر شده و آزمون کای مربع (X^2) انجام شد.

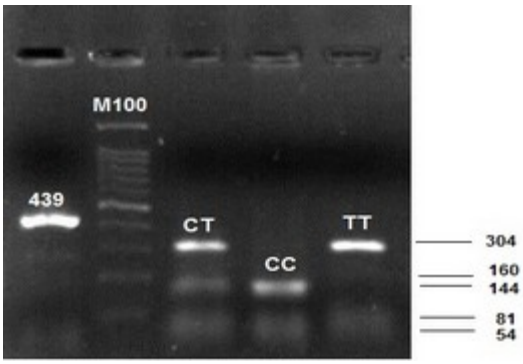
نتایج

جهت تعیین غلظت و خلوص DNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد. با استفاده از آغازگرهای منتخب برای واکنش PCR، تکثیر قطعات ۴۳۹ جفت بازی از ژن پرولاکتین صورت گرفت. جهت حصول اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند که صحت این تکثیر در شکل ۱ نمایش داده شده است.



شکل ۱: قطعات ۴۳۹ جفت بازی تکثیر شده به وسیله‌ی PCR

در این پژوهش از آنزیم برشی *Alu*I جهت شناسایی ژنوتیپ‌ها استفاده شد. با هضم آنزیمی قطعه‌ی تکثیر شده، سه ژنوتیپ TT، CT و CC در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد که ژنوتیپ TT شامل قطعات ۳۰۴، ۸۱ و ۵۴ جفت بازی، ژنوتیپ CT شامل قطعات ۳۰۴، ۱۶۰، ۱۴۴، ۸۱ و ۵۴ جفت بازی و ژنوتیپ CC نیز شامل قطعات ۱۶۰، ۱۴۴، ۸۱ و ۵۴ جفت بازی بود (شکل ۲). فراوانی ژنوتیپ‌های TT، CT و CC به ترتیب ۰/۱۰، ۰/۴۹ و ۰/۴۱ و فراوانی آلل‌های C و T نیز به ترتیب ۰/۶۵۵ و ۰/۳۴۵ برآورد شد (جدول ۱).



شکل ۲: ژنوتیپ‌های مختلف بر اساس هضم آنزیمی قطعه‌ی ۴۳۹ جفت بازی.

ژنوتیپ CT شامل قطعات ۳۰۴، ۱۶۰، ۱۴۴، ۸۱ و ۵۴ جفت بازی، ژنوتیپ CC شامل قطعات ۱۶۰، ۱۴۴، ۸۱ و ۵۴ جفت بازی، ژنوتیپ TT شامل قطعات ۳۰۴، ۸۱ و ۵۴ جفت بازی.

جدول ۱: فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی ژن پرولاکتین در مرغان بومی خوزستان

ژنوتیپ	TT	CT	CC
فراوانی ژنوتیپی	۰/۱۰	۰/۴۹	۰/۴۱
آلل	T	–	C
فراوانی آللی	۰/۳۴۵	–	۰/۶۵۵

میزان هتروزیگوسیتی معمول‌ترین معیار تنوع ژنتیکی در یک جمعیت می‌باشد که به دوصورت هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار یا هاردی – وینبرگی (H_e) گزارش می‌شود. هتروزیگوت‌ها طیف وسیعی از ژنوتیپ‌ها را تولید می‌کنند و از نظر صفات مهم اقتصادی مانند رشد، باروری و مقاومت به بیماری‌ها اهمیت زیادی دارند (Cui et al. 2005). اگر یک جایگاه ژنی، هتروزیگوسیتی بیش‌تر از ۰/۱ داشته باشد چند شکل بوده و اگر این مقدار بیش از ۰/۷ باشد،

به شدت چند شکل می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده ژن پرولاکتین در جمعیت مورد مطالعه نسبتاً بالا بوده است.

از دیگر معیارهای بررسی تنوع ژنی اندازه‌ی آلل مؤثر و شاخص شانون می‌باشند. اندازه‌ی آلل مؤثر و کارآمد (Ne) در این جایگاه برابر ۱/۸۲۵ بود که فاصله‌ی کم آن با تعداد آلل واقعی نشان دهنده‌ی کارایی بالای آلل‌ها در به وجود آمدن چند شکلی و تنوع ژنتیکی در این جایگاه ژنی است. شاخص شانون برآورد شده مقدار نسبتاً بالایی از تنوع ژنتیکی را در جمعیت مورد بررسی نشان می‌دهد (جدول ۲).

جدول ۲: پارامترهای آماری و ژنتیکی برآورد شده‌ی ژن پرولاکتین در مرغان بومی خوزستان

هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	اندازه آلل مؤثر	شاخص شانون
۰/۴۹۰	۰/۴۵۲	۱/۸۲۵	۰/۶۴۴

بحث

مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی چند شکلی ژن پرولاکتین در مرغان بومی خوزستان با استفاده از روش PCR-RFLP انجام گرفت. با توجه به نتایج جدول ۱، در این تحقیق سه ژنوتیپ و دو آلل از جایگاه مورد بررسی به دست آمد. از بین ژنوتیپ‌های حاصل، ژنوتیپ CT دارای بیش‌ترین فراوانی می‌باشد.

در پژوهشی که توسط Bagheri Sarvestani و همکاران در سال ۲۰۱۳ به منظور بررسی ارتباط منطقه‌ی پروموتور ژن پرولاکتین با تولید تخم‌مرغ انجام شد، با استفاده از روش PCR-RFLP سه ژنوتیپ TT، CT و CC در جایگاه T-۲۴۰۲C و سه ژنوتیپ GG، CG و CC در جایگاه G-۲۱۶۱C مشاهده شد و همچنین با قرار دادن مستقیم محصول PCR روی ژل، سه ژنوتیپ II، ID و DD برای حذف و اضافه‌ی ۲۴ جفت بازی در ناحیه‌ی ۳۵۸- مشخص شد. در مجموع سه پلی‌مورفیسم در پروموتور ژن پرولاکتین مرغ بومی فارس کشف شد که بین ژنوتیپ‌های به دست آمده و تولید تخم‌مرغ همبستگی معنی‌داری نشان داده شد. در مرغ بومی فارس فراوانی آللی در جایگاه T-۲۴۰۲C برای آلل‌های C و T به ترتیب ۰/۶۶ و ۰/۳۴ برآورد شد که با توجه به جدول ۱، مشابه با فراوانی‌های به دست آمده این دو آلل در جمعیت مورد مطالعه‌ی خوزستان در پژوهش حاضر می‌باشد. از جمله دلایل این شباهت می‌توان به احتمال مهاجرت بین جمعیت‌های مذکور و نیز تشابه بیش‌تر شرایط منطقه‌ای اشاره کرد.

Li و همکاران در سال ۲۰۰۹ در پژوهشی ارتباط پلی‌مورفیسم در اینترون ۱ ژن پرولاکتین با عملکرد تولید تخم در مرغابی را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که دو ناحیه به وسیله‌ی آنزیم *dra*I در اینترون ۱ ژن پرولاکتین قابل تشخیص می‌باشد، اما فقط یکی از آن‌ها پلی‌مورفیسم گزارش شد.

طی پژوهشی که توسط Kulibaba و Podstreshnyi در سال ۲۰۱۲ جهت بررسی پلی‌مورفیسم ژن پرولاکتین و ژن هورمون رشد در لاین‌های منتخب مرغ در اوکراین انجام شد، یک پلی‌مورفیسم به صورت حذف و اضافه ۲۴ جفت بازی در منطقه‌ی پروموتور و یک پلی‌مورفیسم در موقعیت ۲۴۰۲- ژن پرولاکتین مشخص شد.

Cui و همکاران در سال ۲۰۰۶ در پژوهشی ارتباط پلی‌مورفیسم در ناحیه‌ی پروموتور ژن پرولاکتین مرغ با تولید تخم‌مرغ را مورد مطالعه قرار دادند. این مطالعه روی ۱۷۷ قطعه مرغ از نژادهای لگهورن سفید، راک سفید، یانگ‌شان، تاهی‌سیلک و نون‌گادا انجام شد. در این مطالعه هفت پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی مشخص شد. با استفاده از تکنیک PCR-RFLP شش ژنوتیپ، با استفاده

از تکنیک PCR-SSCP ۱۵ ژنوتیپ و برای حذف و اضافه‌ی ۲۴ جفت بازی نیز سه ژنوتیپ مشاهده شد. آنالیز آماری نشان داد که حذف و اضافه‌ی ۲۴ جفت بازی و آلل‌های G، T و C بیش‌ترین سودمندی را برای تولید تخم‌مرغ دارند. در مطالعه‌ی حاضر نیز دو آلل C و T از قطعه‌ی مورد بررسی ژن پرولاکتین به دست آمد که برش آنزیمی این قطعه همان طور که در شکل ۲ آمده است با برش آنزیمی این قطعه در سایر پژوهش‌های انجام شده مطابقت دارد. از جمله این پژوهش‌ها می‌توان به پژوهش انجام شده توسط Cui و همکاران در سال ۲۰۰۶، Alipanah و همکاران در سال ۲۰۱۰ و Bagheri Sarvestani و همکاران در سال ۲۰۱۳ اشاره کرد. بنابراین می‌توان گفت که آنزیم *Alu*I می‌تواند در برش مکان‌های دارای چند شکلی قطعه‌ی ۴۳۹ جفت بازی از ژن پرولاکتین مرغان بومی، آنزیمی کارآمد باشد. جفت آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه، با آغازگرهای پژوهش‌های مذکور یکسان می‌باشند که این می‌تواند نشان‌دهنده‌ی سودمندی این جفت آغازگر در مطالعات مشابه مربوط به بررسی تنوع ژنتیکی این قطعه از ژن پرولاکتین در مرغ بومی باشد.

مقدار کای مربع (X^2) محاسبه شده در این پژوهش نشان داد که جمعیت در حال تعادل هاردی - وینبرگ نمی‌باشد. عدم تعادل مشاهده شده در این جمعیت می‌تواند در نتیجه‌ی غیرتصادفی بودن آمیزش‌ها، کوچک بودن نمونه‌ی گرفته شده از جمعیت و نیز حضور برخی عوامل بر هم زننده‌ی تعادل، از جمله انتخاب و مهاجرت باشد.

تنوع ژنتیکی از شاخصه‌های بسیار مهم در حفظ ذخایر ژنتیکی محسوب می‌شود. کاهش تنوع ژنتیکی حیوانات و یکسان شدن خزانه‌ی ژنتیکی آن‌ها می‌تواند در آینده سبب بروز برخی مشکلات غیرقابل پیش‌بینی گردد. با توجه به این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که ژن پرولاکتین در این توده دارای چندشکلی نسبتاً بالا می‌باشد و روش PCR-RFLP جهت بررسی چند شکلی این ژن در جمعیت مورد مطالعه مناسب می‌باشد. از آن جایی که در تحقیق حاضر رکوردی از نمونه‌های مورد آزمایش ثبت نشده است، نمی‌توان در مورد اثرات آلل‌های C و T بر صفات تولیدی در این جمعیت قضاوت کرد. جهت پیش‌بینی عملکرد آلل‌ها، نیازمند ثبت رکورد و مشخصات این جمعیت هستیم. با توجه به اهمیت ژن پرولاکتین در تولید تخم‌مرغ، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی روی این جمعیت، ثبت رکورد و استفاده از تعداد بیش‌تر نمونه و همچنین سایر بخش‌های ژن پرولاکتین مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از اعضای محترم شرکت نهاده‌های دامی جاهد و سرکار خانم صدر مسئول آزمایشگاه مرکزی دانشگاه رامین خوزستان، به دلیل همکاری‌های صمیمانه، ابراز می‌دارند.

منابع

Alipanah, M.; Shojaian, K. and Khani Bandani, H. (2010). The polymorphism of prolactin gene in native chicken Zabol region. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9 (24): 3005-3007.

Au, W.L. and Leung, F.C.C. (2002). Rapid communication complete nucleotide sequence of the chicken prolactin gene. Journal of Animal Science, 80: 1381.

Bagheri Sarvestani, A.S.; Niazi, A.; Zamiri, M.J. and Dadpasand Taromsari, M.J. (2013). Polymorphisms of prolactin gene in a native chicken population and its association with egg production. Iranian Journal of Veterinari, 14 (12): 113-119.

Cui, J.X.; Du, H.L.; Liang, Y.; Deng, X.M.; Li, N. and Zha, X.Q. (2006). Association of polymorphism Polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production. Poultry Science, 85: 26-31.

Cui, J.Z.; Shen, X.Y.; Yang, G.P.; Gong, Q.L. and Gu, Q.Q. (2005). Characterization of mictostatelalite DNAs in *Takifugu rubripes* genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. Rubripes* and *T.Pseudommus*. Aquaculture. 250: 129-137.

Elkins, P.A.; Christinger, H.W.; Sandowski, Y.; Sakal, E.; Gertler, A.; de Vos, A.M. and Kossiakoff, A.A. (2000). Ternary complex between placental lactogen and the extracellular domain of the prolactin receptor. Nature Structure Biology, 7: 808-815.

Jiang, R.S.; Xu, G.Y.; Zhang, X.Q. and Yang, N. (2005). Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens. Poultry Science, 84: 839- 845.

Kulibaba, R.A. and Podstreshnyi, A.P. (2012). Prolactin and growth hormone gene polymorphisms in chicken lines of Ukrainian selection. Tsitol Genet Journal, 46(6): 75-82.

Li, H.F.; Zhu, W.Q.; Chen, K.W.; Zhang, T.J. and Song, W.T. (2009). Association of polymorphism in the intron 1 of duck prolactin with egg performance. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 33 (3): 193-197.

Liang, Y.; Cui, J.; Yang, G.; Leung, F.C.C. and Zhang, X. (2006). Polymorphisms of 5′ flanking region of chicken prolactin gene. Domestic Animal Endocrinology, 30: 1-16.

March, J.B.; Sharp, P.J.; Wilson, P.W. and Sang, H.M. (1994). Effect of active immunization against recombinant-derived chicken prolactin fusion protein on the onset of broodiness and photoinduced egg laying in bantam hens. Journal of Reproduction and Fertility, 101: 227-233.

Miller, S.A.; Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out precedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16: 1215.

Rashidi, H.; Rahimi Mianji, GH.; Farhadi, A. and Gholizadeh, M. (2012). Association of prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms with economic traits in breeder hens of indigenous chickens of Mazandaran province. Iranian Journal of Biotechnology, 10 (2): 129-135.

Romanov, M.N.; Talbot, R.T.; Wilson, P.W. and Sharp, P.J. (2002). Genetic control of incubation behavior in the domestic hen. Poultry Science, 81: 928-931.

Shimida, K.; Ishida, H.; Sato, K.; Seo, H. and Matusi, N. (1991). Expression of prolactin gene in incubating hens. Journal of Reproduction and Fertility, 91: 147-154.

Wilkanowska, A.; Mazurowski, A.; Mroczkowski, S. and Kokoszynski, D. (2014). Prolactin (PRL) and prolactin receptor (PRLR) genes and their role in poultry production traits. Folia Biologica (Kraków), 62: 1-8.

Zhou, M.; Zhang, X.Q.; Shi, Z.D. and Cao, Y.C. (2001). Cloning and sequencing of prolactin gene cDNA in three chicken breeds. Acta Genetica Sinica, 28: 614-620.

Evaluation of Prolactin gene (PRL) polymorphism in Khouzestan native chickens using PCR-RFLP some masses

Isvandi, S.[1]; Beigi-Nassiri, M.T.[2]; Roshanfekr, H.[3] and Fayazi, J.[3]

Received: 17.11.2015 Accepted: 07.06.2016

Abstract

Prolactin is a hormone which has an important role in the behavior of bird's broodiness. Several studies have shown that prolactin gene could be a candidate gene for broodiness. The variations in the different parts of this gene, have potential usefulness as genetic markers and could help in the genetic improvement of populations. The aim of this research was to investigate the prolactin gene polymorphism using PCR-RFLP method on some masses Khouzestan native chicken. Therefore, random blood sampling from 100 chickens of native chickens in Khuzestan province breeding and Jihad livestock inputs (Bavi city) was performed. Genomic DNA was extracted from these samples, using modified salting out method. Polymerase chain reaction was used to amplification of 439 bp fragments of prolactin gene promoter by specific primers. Allele frequency for C and T, 0.655 and 0.345 and genotype frequencies of CC, CT and TT 0.41, 0.49 and 0.10 were estimated respectively. Using the chi-square (X^2) showed that the locus allele frequencies is not in Hardy-Weinberg equilibrium. The results showed that prolactin gene is polymorphic in the studied area and PCR-RFLP method is proper for genotype determination of prolactin gene chicken studies.

Key words: Polymorphism, Prolactin gene, broodiness, native chickens

1- MSc Graduated of Animal Genetics and Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin University of Agriculture and Natural Resources of Khouzestan, Iran

2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin University of Agriculture and Natural Resources of Khouzestan, Iran

3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin University of Agriculture and Natural Resources of Khouzestan, Iran

Corresponding Author: Isvandi, S., E-mail: s.isvandi@gmail.com