نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰، ص. ۳۱۰-۳۰۴

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 3, No. 3, Fall 2011, p. 304-310

اثر چندشکلی آللی برخی از ژن های کاندید محور هورمون رشد روی صفات تولید تخم در مرغان بومی مازندران

بابک عنایتی[۱*]- قدرت ا... رحیمی میانجی[۲]

تاریخ دریافت:۹۰/۵/۱۶
تاریخ پذیرش:۹۰/۸/۲۱

چکیده

در این مطالعه چند شکلی آللی ژن های هورمون رشد (GH)، گیرنده هورمون رشد (GHR) و فاکتور موثر بـر رشـد بتـا ۳ (TGFβ3) شناسـایی و ارتباط آن ها با صفات تولید تخم مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های خون به طور تصادفی از مرغان مولد ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران تهیه و با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه انتقال یافت. بعد از استخراج دی ان ای، جایگاه های مورد نظر با استفاده از آغازگرهـای اختصاصـی تکثیـر و تعیـین ژنوتیپ توسط روش PCR-RFLP انجام گرفت. فراوانی هر یک از آلل های (+) و (-) در جایگاه ژنی GH به ترتیب برابـر بـا ۰/۷۹۸۱ و ۰/۲۰۱۹، در جایگاه GHR برابر با ۰/۹۹۳۷ و ۰/۰۰۶۳ و برای جایگاه ژنی TGFβ3 برابر ۰/۸۰۳۷ و ۰/۱۹۶۱ برآورد شد. در دو جایگـاه GH و TGFβ3 ژنوتیـپ هتروزایگوس مشاهده شد، اما تمامی نمونه ها در جایگاه GHR دارای ژنوتیپ هموزایگوس بودند. آزمون χ^2 تعـادل هـاردی واینبـرگ را در دو جایگـاه ژنی GH و TGFβ3 در جمعیت مورد مطالعه تایید نمود. آنالیز آماری داده ها نشان داد که جایگاه GH بر روی ارزش فنوتیپی وزن تخم مرغ در زمـان بلوغ جنسی و ارزش اصلاحی سن در زمان اولین تخم گذاری اثر معنی دار داشته است. مقایسه میانگین ها نشان داد که مـرغ هـای بـا ژنوتیـپ -/- در جایگاه ژنی GH دارای ارزش فنوتیپی وزن تخم مرغ در زمان بلوغ جنسی بیشتری هستند، اما ارزش اصلاحی سن در زمان اولـین تخـم گـذاری پـایین تری داشتند. اثر جایگاه GHR، TGFβ3 و اثر متقابل بین GH×TGFβ3 روی ارزش های فنوتیپی و اصلاحی صفات مورد نظر معنی دار نبود.

واژه های کلیدی: GH، GHR، TGFβ3، چند شکلی، مرغ بومی

مقدمه

برنامه های انتخاب کلاسیک که بـر اسـاس مشـاهدات فنـوتیپی صورت می پذیرند در بسیاری از موارد ایده آل نمـی باشـند، چـرا کـه برخی از صفات در ابتدای زندگی موجود بیان نمی شوند، تنها در یـک جنس بیان می شوند و یا این که در مـواردی خـاص، رکـوردگیری از صفات بعد از مرگ حیوان قابل انجام است. در نتیجـه اسـتفاده از داده های ژنوتیپی به عنوان یک منبع انتخاب، ابزار نیرومندی خواهـد بـود که می تواند در رفع موانع یاد شده موثر واقـع شـود. اگـر چـه صـفات تولیدی در دام های اهلی تحت تاثیر ژن های زیادی قرار می گیرنـد، اما در سال های اخیـر گـرایش قابـل تـوجهی بـرای شناسـایی و بـه کارگیری ژن های عمده مرتبط با صفات تولیدی و تولید مثلـی در دام و طیور انجام گرفته است (۱۹). از ژن های با اثـر عمـده کـه تـاکنون شناسایی گردیده اند، می توان به ژن هورمـون رشـد (GH[۳])، گیرنـده هورمون رشد (GHR[۴]) و خانواده فاکتور موثر بر رشد بتـا (TGFβ[۵]) اشاره کرد.

هورمون رشد طیور یک هورمون پلی پپتیدی است که از هیپـوفیز پیشین تولید و ترشح می شود و قادر است تغییرات وسیعی در عملکرد فیزیولوژیکی مانند رشد، وضعیت بدن، تولید تخم، پیری، تولید مثل (۱ و ۳)، و پاسخ های ایمنی ایجاد نماید (۸). لذا ژن مسئول این هورمون می تواند به عنوان یک ژن کاندید در انتخاب براساس نشـانگر جهـت بهبود عملکرد تولید در طیور مطرح باشد (۹). ژن هورمـون رشـد روی کروموزوم شماره ۱ قرار دارد و دارای ۵ اگـزون و ۴ اینتـرون و ۴۱۰۱ جفت باز می باشد (۲۷). با شناسایی نشانگرهای RFLP[۶] در اینتـرون

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشـکده کشـاورزی، دانشـگاه مازندران
(*- نویسنده مسئول: Email: bkenayati@gmail.com)
۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دام و آبزیان، دانشگاه علـوم کشـاورزی و منابع طبیعی ساری

3 - Growth Hormone
4 - Growth Hormone Receptor
5 -Transforming Growth Factor β
6 - Restriction Fragment Length Polymorphism

های ژن GH در سه سایت برش Msp1 و یک سایت برش Sac1 و تعیین فراوانی آللی در ۱۲ سویه غیر همخون از سه پایه ژنتیکی مشخص در مرغ لگهورن و بررسی ارتباط این نشانگرها با صفات تولید تخم، جایگاه هورمون رشد را در زمره ژن های عمده قرار داده است (۹). نشانگرهای PCR-RFLP هورمون رشد در جمعیت های مختلف مرغان بومی چین مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که وجود چند شکلی در جایگاه برش Msp1 اینترون شماره یک این ژن با تخمگذاری مرتبط است (۲۶).

کارکرد بیولوژیکی مختلف هورمون رشد از طریق گیرنده اختصاصی آن کنترل می شود. گزارش شده است که هورمون رشد به همراه گیرنده هورمون رشد و فاکتور رشد شبه انسولینی، با ایجاد یک سیستم کنترلی سبب افزایش سرعت رشد فولیکول ها در مرغان تخمگذار می شود (۲۲ و ۲۹). بنابراین جایگاه GHR که ممکن است عملکرد تخمگذاری در طیور را تحت تاثیر قرار دهد، می تواند به عنوان یکی از ژن های کاندید مطرح باشد. با انجام تحقیق در یک سویه مرغ تخمگذار نشان داده شد که RFLP های که به کمک آنزیم HindIII در اینترون قبل از اگزون ۳ مشخص شده اند، با وزن بدن در ۱۴۰ روزگی مرتبط بودند، که ممکن است به دلیل وجود جهش در جایگاه GHR و یا ژن هایی باشد که در نزدیکی آن قرار دارند (۵). در نتیجه RFLP های حاصل از آنزیم HindIII در اینترون قبل از اگزون ۳ مربوط به ژن GHR مشابه با RFLPهای حاصل از آنزیم SacI در اینترون ۴ و MspI در اینترون ۱ مربوط به ژن GH به عنوان نشانگر مولکولی مبتنی بر دی ان ای برای صفات تولید تخم در مرغان تخمگذار و چربی حفره شکمی در مرغان گوشتی مورد توجه محققین قرار گرفتند. ژن GHR روی کروموزوم Z قرار دارد.

خانواده TGFβ نقش مهمی را در تقسیم سیتوپلاسم بعد از تقسیم هسته و نیز نقش چندگانه ای در پیغام رسانی بین سلولی جهت هموستازی و توسعه بافتها ایفا می نمایند (۲۰). از میان مهمترین اثرات بیولوژیکی TGFβ ها می توان به تمایز، تکثیر و رشد سلولی، شکل گیری ماتریکس خارج سلولی و ایمنی اشاره داشت (۲، ۱۰، ۱۱، ۲۱ و ۲۳). ژن TGFβ3 شامل هفت اگزون و شش اینترون است که طولی به اندازه ۱۶۰۰۰ جفت باز را در ژنوم مرغ ها به خود اختصاص داده است (۴). ژن TGFβ3 روی کروموزوم شماره ۵ قرار دارد (۱۲).

بررسی منابع ژنتیکی و استفاده از روش های نوین اصلاح نژاد یکی از راه های موثر در افزایش کیفی و بهره برداری تولیدات دامی هر کشور محسوب می شود. مرغ های بومی هر کشور با توجه به سازگاری با محیط و اقلیم منطقه جزء ذخایر استراتژیک آن کشور محسوب شده و در صورت مطالعه و شناخت بیشتر این منابع و به تبع آن افزایش تولید و بهره وری مناسب، می توان موثرتر از نژادها یا سویه های وارداتی عمل کنند. مرغان بومی مازندران، مرغانی گوشتی- تخمی بوده و به منظور حفظ ذخایر ژنتیکی و افزایش تولید در یکی از چهار ایستگاه پرورش مرغ بومی که توسط معاونت امور دام جهادکشاورزی در مازندران، اصفهان، فارس و آذربایجان غربی ایجاد گردیده، مورد رکوردگیری و اصلاح نژاد قرار می گیرند.

هدف از این مطالعه، بررسی چند شکلی قسمتی از بخش انتهای انترون ۴، کل اگزون ۵ و بخش کوچکی از اینترون ۵ ژن TGFβ3، اینترون ۴ ژن GH و اینترون ۲ ژن GHR به کمک نشانگر PCR-RFLP و بررسی ارتباط بین چند شکلی های احتمالی با ارزش های فنوتیپی و اصلاحی صفات تولید تخم در مرغان ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران به منظور شناخت بهتر این توده و طراحی بهتر برنامه های اصلاحی جهت افزایش تولید بوده است.

مواد و روش ها

نمونه برداری و انجام واکنش PCR

تعداد ۱۶۰ نمونه خون از مرغان ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران (۲۹ قطعه خروس و ۱۳۱قطعه مرغ) به طور تصادفی تهیه و استخراج DNA از ۵۰ میکرولیتر خون تام به روش «نمکی بهینه یافته» انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب به وسیله روش های اسپکتروفتومتری و ژل الکتروفورز تعیین و مورد ارزیابی قرار گرفت. تکثیر قطعات مورد نظر در جایگاه های ژن GH و گیرنده آن به ترتیب در اندازه های ۱۰۵۰ جفت باز و ۷۱۸ جفت باز و جایگاه ژن TGFβ3 به اندازه ۲۹۵ جفت باز توسط آغازگرهای اختصاصی و با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) انجام گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای هر یک از جایگاهای ژنی

نام جایگاه	توالی(۳' ------ ۵')	شماره دسترسی	منابع
GH	CTAAAGGACCTGGAAGAAGGG AACTTGTCGTAGGTGGGTCTG	۱۰۴۶۴D	۷ ,۵
GHR	GGCTCTCCATGGGTATTAGGA GCTGGTGAACCAATCTCGGTT	۲۵۴۹۵۲۱AF	۱۳,۵
TGFβ3	TCAGGGCAGGTAGAGGGTGT GCCACTGGCAGGATTCTCAC	۶۰۰۹۱X	۱۲

غلظت مواد مورد استفاده در PCR شامل بافر ۱X، ۰/۱ مولار Mgcl2، ۰/۲ مولار dNTP، ۰/۵ میکرو مولار از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت، ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۱ واحد آنزیم تک پلی مراز و سپس حجم محلول توسط آب دوبار تقطیر به ۲۵ میکرو لیتر رسانده شد. دما و زمان های استفاده شده در سیکل حرارتی برای هر یک از جایگاه ها در جدول ۲ نشان داده شد. پس از انجام واکنش محصولات PCR به کمک ژل آگارز ۰/۸ درصد به مدت ۲۵ دقیقه با ولتاژ ۸۵ الکتروفورز و با رنگ آمیزی توسط اتدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مقایسه قطعات تکثیر شده و اندازه گیری طول قطعات از مارکر ۵۰ جفت بازی (SMO371 کمپانی فرمنتاز) استفاده شد.

جدول ۲- برنامه دمایی به کار گرفته شده در واکنش PCR برای هر یک از جایگاه های GH، GHR و TGFβ3

زمان (ثانیه)	دما (^oC)	مراحل	ژن
۲۴۰	۹۴	واکنش آغازین	
۳۰	۹۲	واسرشته سازی	
۱۲۰	۶۲	اتصال	GH
۹۰	۷۲	بسط	
۴۲۰	۷۲	بسط انتهایی	
۳۰۰	۹۴	واکنش آغازین	
۳۰	۹۲	واسرشته سازی	
۸۰	۵۹	اتصال	GHR
۹۰	۷۲	بسط	
۶۰۰	۷۲	بسط انتهایی	
۱۸۰	۹۴	واکنش آغازین	
۶۰	۹۴	واسرشته سازی	
۶۰	۵۸	اتصال	TGFβ3
۶۰	۷۲	بسط	
۶۰۰	۷۲	بسط انتهایی	

جهت هضم آنزیمی محصولات حاصل از واکنش PCR از ۶ تا ۸ میکرولیتر محصول PCR، ۰/۷ میکرولیتر آنزیم برشی، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش آنزیمی (۱۰X) و ۸/۸ تا ۱۰/۸ میکرولیتر آب دیونیزه استفاده شد. از آنزیم های برشی SacI، HindIII و BsiYI به ترتیب برای ژن GH، GHR و TGFβ3 استفاده شد. محصولات PCR بعد از هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲/۵ درصد با ولتاژ ۱۱۵ و زمان ۹۰ دقیقه الکتروفورز و به کمک رنگ آمیزی با اتدیوم بروماید رویت سازی شدند. با شناسایی آلل ها، ژنوتیپ هر یک از نمونه ها تعیین و برآورد وفور ژنی و ژنوتیپی به کمک نرم افزار POPGEN نسخه ۱/۳۱ انجام گرفت (۳۰).

پیش بینی ارزش های اصلاحی

ارزش های اصلاحی حیوانات برای صفات وزن تخم در زمان بلوغ (EWM[1])، تعداد تخم (EN[2]) و سن جوجه در اولین تخمگذاری (AFE[3]) با استفاده از اطلاعات شجره ای مرغان بومی مرکز اصلاح نژاد مرغ مازندران از سال ۱۳۷۵ به بعد بدست آمد. فایل داده ها شامل ۴۰۰۰۰ رکورد بوده است که از مرغان مربوط به ۹ نسل حاصل شده بود. پیش بینی ارزش های اصلاحی به صورت چند صفتی به کمک نرم افزار DFREML انجام گرفت (۱۴). برای پیش بینی ارزش های اصلاحی صفات EN و AFE از مدل آماری شماره ۱ استفاده شد. با توجه به این که سن بلوغ جنسی می تواند صفت وزن تخم در زمان بلوغ را تحت تاثیر قرار دهد، لذا برای برآورد ارزش اصلاحی صفت یاد شده، عامل AFE به عنوان یک اثر تصادفی در مدل در نظر گرفته شد.

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{X}_i\mathbf{b}_i + \mathbf{Z}_{1i}\mathbf{a}_i + \mathbf{Z}_{2i}\mathbf{m}_i + \mathbf{e}_i \qquad (\text{مدل } ۱)$$

$\mathbf{y}_i$= بردار مشاهدات i امین صفت، $\mathbf{b}_i$= بردار اثر عوامل ثابت بر مشاهدات i امین صفت، $\mathbf{a}_i$= بردار ارزش اصلاحی، $\mathbf{e}_i$= بردار اثر باقیمانده موثر بر مشاهدات i امین صفت، $\mathbf{X}_i$= ماتریس ضرایب مربوط به بردار b، $\mathbf{Z}_{1i}$= ماتریس ضرایب مربوط به بردار a، $\mathbf{Z}_{2i}$ = ماتریس ضرایب مربوط به بردار $\mathbf{m}$ و i=۳،۲،۱ به ترتیب، صفات EWM، EN و AFE می باشد. بردار $\mathbf{b}_1$ تا $\mathbf{b}_4$ حاوی اثرات ثابت گسسته سال – هچ و اثر جنس، و اثر ثابت پیوسته AFE و بردارهای $\mathbf{a}_1$ تا $\mathbf{a}_4$ اثرات تصادفی ژنتیکی (ارزش اصلاحی) صفات EWM، EN و AFE و بردار m_1 تا m_4 بردار اثرات مادری صفات EWM، EN و AFE می باشند.

تعیین اثر ژنوتیپ

بررسی اثر ژنوتیپ ها با داده های فنوتیپی و ارزش های اصلاحی با استفاده از مدل های شماره ۲، ۳ و ۴ به کمک رویه GLM نرم افزار SAS (V9.1) انجام شد (۲۴). مدل های شماره ۲ برای دو صفت EN و AFE و مدل ۳ برای صفت EWM استفاده شد.

$$y_{ijklm}= \mu+g_i+ T_j+h_k+s_l+\varepsilon_{ijklm} \qquad (\text{مدل } ۲)$$

$\mathbf{y}_{ijkl}$ = مقدار فنوتیپی صفت مورد بررسی، μ= میانگین کل، g_i= اثر ژن GH، T_j= اثر ژن TGFβ3 ، h_k= اثر هچ، $\mathbf{s}_l$= اثر جنس و $\boldsymbol{\varepsilon}_{ijklm}$= اثر تصادفی باقی مانده.

$$y_{ijklm}= \mu+g_i+T_j+h_k+s_l+b(x_{ijkl}-xb)+\varepsilon_{ijklm} \qquad (\text{مدل } ۳)$$

y_{ijklm} = مقدار فنوتیپی صفت مورد بررسی، μ= میانگین کل، g_i= اثر ژن GH، T_j= اثر ژن TGFβ3، h_k= اثر هچ، $\mathbf{s}_l$= اثر جنس،

1 - Egg wieght at Puberty
2 - Egg Number
3 - Age at First laying Egg

ε_{ijklm}= اثر تصادفی باقی مانده b= ضریب تابعیت صفت AFE روی صفت EWM، x_{ijk}= صفت AFE، xb= میانگین تصحیح شده صفت AFE.

برای یافتن رابطه بین ژنوتیپ های حاصل از ژن GH با ارزش‌های اصلاحی صفات مورد بررسی از مدل شماره ۴ استفاده شد.

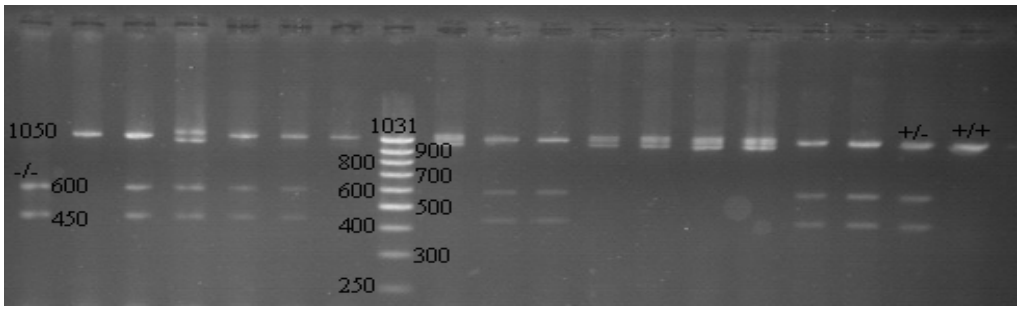
$y_{ij} = \mu + g_i + T_j + e_{ij}$ (مدل ۴)

y_{ij}= ارزش اصلاحی صفت مورد بررسی، μ= میانگین کل، g_i= اثر ژن GH، T_j= اثر ژن TGFβ3، e_{ij}= اثر تصادفی باقی مانده.

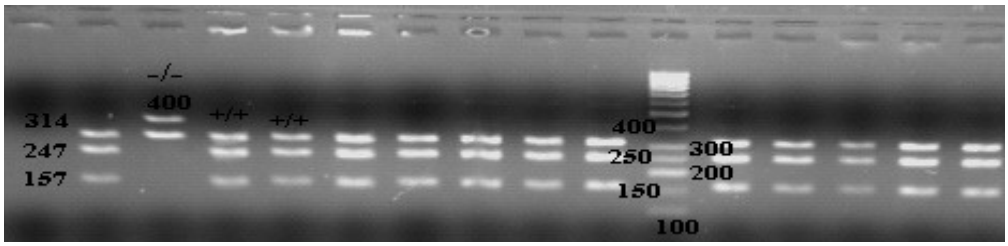
به کمک آزمون حداقل مربعات، میانگین ها تصحیح و به کمک آزمون مقایسه میانگین ها اختلاف بین آن ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

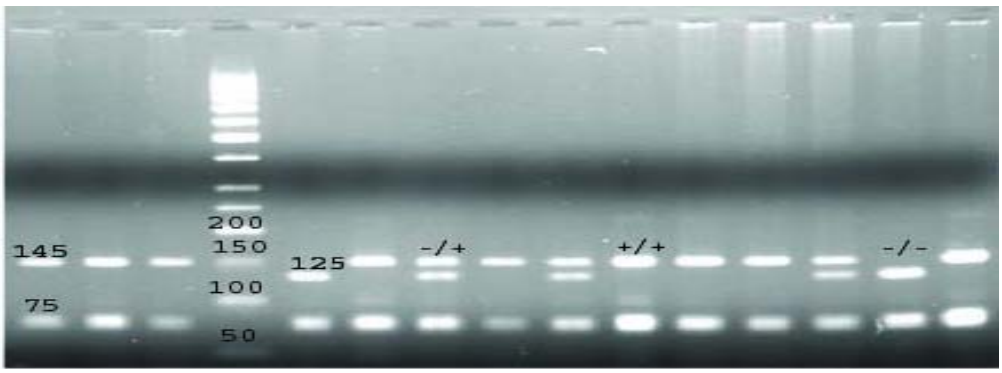
اندازه قطعات تکثیر شده بعد از انجام واکنش PCR برای سه ژن GH، GHR و TGFβ3 به ترتیب برابر ۱۰۵۰، ۷۱۸ و ۲۹۵ جفت باز بوده است. هضم آنزیمی به کمک آنزیم های *Sac*I، *Hind*III و *BsiY*I به ترتیب روی محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن های GH، GHR و TGFβ3 انجام گرفت. در اثر برش هر یک از آنزیم ها، قطعات ۱۰۵۰، ۶۰۰ و ۴۵۰ جفت بازی برای ژن GH، قطعات ۳۱۴، ۲۴۷ و ۱۵۷ جفت بازی برای ژن GHR و قطعات ۱۴۵، ۱۲۵، ۷۵ و ۲۰ جفت بازی برای ژن TGFβ3 ایجاد شده بود (اشکال ۱، ۲، ۳).



شکل۱- الگوی قطعات هضم شده ژن GH در مرغان بومی مازندران (اعداد روی شکل نشان دهنده اندازه باند ها بر اساس جفت باز می باشند) ژنوتیپ ها به صورت +/+، -/+ و -/- نشان داده شدند.



شکل۲- الگوی قطعات هضم شده ژن GHR در مرغان بومی مازندران (اعداد روی شکل نشان دهنده اندازه باند ها بر اساس جفت باز می باشند) ژنوتیپ ها به صورت +/+ و -/- در شکل نشان داده شدند.



شکل۳- الگوی قطعات هضم شده ژن TGFβ3 در مرغان بومی مازندران (اعداد روی شکل نشان دهنده اندازه باند ها بر اساس جفت باز می باشند) ژنوتیپ ها به صورت +/+، -/+ و -/- در شکل نشان داده شدند.

قطعات حاصل از ژن GH در این تحقیق با گزارشات سایر محققین دقیقا همخوانی نداشت. محققین بعد از تعیین توالی ژن GH

در سویه زرد وای چو اندازه قطعه مورد نظر را ۱۱۶۵ جفت باز اعلام نمودند (۲۷). در همان تحقیق بیان شد دو برابر شدن[1] یا درج شدن[2] باعث ایجاد یک قطعه ۱۲۰۰ جفت بازی در مرغان بانتام و لگهورن سفید شده است. به نظر این محققین حذف یا درج شدن به صورت یک پدیده معمولی در ژن GH رخ می دهد (۲۷). در جمعیت مرغ بومی مازندران قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصولات PCR ، دو قطعه ۶۰۰ و ۴۵۰ جفت بازی را برای ژن GH ایجاد نمود که با قطعات ۱۴۰ و ۱۰۲۵ جفت بازی حاصل از تحقیق سایر محققین متفاوت می باشد (۲۰). اما قطعات حاصل از محصول PCR و هضم آنزیمی برای ژن های GHR و TGFβ3 مشابه با نتایج سایر تحقیق ها بود (۱۲ و ۱۳).

برآورد فراوانی ژنی و ژنوتیپی ژن های GH، GHR و TGFβ3 در مطالعه حاضر در جدول ۳ ارایه شده است. فراوانی ژنوتیپ های ژن GH در مرغان لگهورن سفید برای ژنوتیپ های +/+، +/+ و –/– به ترتیب برابر ۰/۳۶، ۰/۴۴ و ۰/۲ گزارش شده بود. در همین تحقیق فراوانی ژنوتیپ های +/+ و –/– مربوط به ژن GHR به ترتیب ۰/۵۲ و ۰/۴۸ گزارش شده است (۵). در تحقیقی دیگر که در جوجه های نژاد خالص ونچانگ چین انجام گرفته است، فراوانی ژنوتیپ های ژن GHR به ترتیب ۰/۹۴ و ۰/۶۰ گزارش شده بود (۱۳). پایین بودن وفور ژنوتیپ های –/– و +/– در جایگاه مربوط به ژن GHR در این مطالعات را می توان احتمالا به فراوانی کم آلل "–" نسبت داد.

در مطالعه حاضر آزمون مربع کای برقراری تعادل هاردی واینبرگ در جایگاه GH و TGFβ3 را در سطح احتمال ۰/۱ تایید نمود اما نشان داد که جایگاه ژن GHR در تعادل نبوده است. این نتیجه می تواند بیانگر این مطلب باشد که جایگاه GHR احتمالا تحت تاثیر استراتژی انتخاب در این گله قرار گرفته باشد (جدول ۳).

عدم رویت ژنوتیپ هتروزیگوت در جایگاه GHR در مطالعه ما شاید به دلیل پایین بودن تعداد نمونه های خروس باشد. چرا که ژن GHR روی کروموزم جنسی Z واقع شده است. در نتیجه از آنجاییکه تنها خروس ها دارای دو کروموزم Z می باشند لذا پایین بودن تعداد خروس های نمونه گیری شده در مطالعه حاضر (نسبت ۱ به ۷ مطابق ترکیب گله)، احتمالا منجر به عدم مشاهده افراد با ژنوتیپ +/– شده است (جدول ۴).

در مجموع میزان هتروزیگوسیتی که یکی از شاخص های میزان تنوع می باشد در جایگاه های مورد بررسی در مطالعه حاضر پایین بوده است (جدول ۴) که علت آن را می توان احتمالا در بسته بودن گله دانست.

در این تحقیق جایگاه ژن GH به ترتیب روی ارزش فنوتیپی صفت EWM و ارزش اصلاحی صفت AFE اثر معنی دار داشته است (جدول ۵). مقایسات میانگین نشان داد افراد دارای ژنوتیپ –/– دارای میانگین بالاتری در صفت EWM و میانگین پایین تری در صفت AFE بوده اند (شکل ۴). افزایش و یا کاهش اثر آلل های ژن های کاندید بر نرخ ارزش اصلاحی صفات در گزارشات مختلفی آمده است (۱۸). در تحقیق حاضر آلل "–" باعث کاهش در ارزش اصلاحی صفت AFE شده که مطلوب نظر اصلاح کنندگان نیز می باشد. لذا می توان این فرضیه را مطرح نمود که کاهش وفور آلل – در مقابل آلل +، سبب افزایش ارزش اصلاحی سن بلوغ و به تبع آن به تعویق افتادن زمان تخمگذاری خواهد شد. در نتیجه استفاده از ژن های کاندید جهت کنترل ارزش اصلاحی و سرعت بخشیدن به انتخاب می تواند مفید واقع شود. در تعدادی از تحقیقات گزارش شده است که اثر ژنوتیپ های حاصل از آنزیم برشی *MSP*1 در جایگاه ژنی GH روی صفات AFE و EN معنی دار نبوده است (۵، ۲۴ و ۲۵). در تحقیقی دیگر ژنوتیپ های GH حاصل از آنزیم برشی *Sac*I در جایگاه مشابه تحقیق حاضر در سه سویه غیر همخون با اساس ژنتیکی متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط ژنوتیپ های حاصل از این جایگاه با صفت AFE معنی دار گزارش نشد، اما در یکی از این سویه ها به نام Gelin اثر ژنوتیپ های یاد شده روی صفت تولید تخم معنی دار بوده است. به طوریکه در مقایسات بین میانگین مشخص شده بود که افراد با ژنوتیپ "+/–" میانگین بالاتری نسبت به سایر ژنوتیپ ها داشتند (۷). در تحقیقی آنالیز هورمون رشد در ۱۲ سویه از مرغ لگهورن سفید در سایت SacI (انترون ۴ ژن GH) به منظور یافتن رابطه با صفات تولید تخم، انجام گرفت، نتایج این تحقیق یک رابطه معنی دار با صفت AFE نشان داد. در این مطالعه ژن هورمون رشد هیچ ارتباطی با وزن تخم مرغ، چگالی تخم مرغ و وزن نوجوانی نداشت (۹).

گروه های مختلف تحقیقاتی اثر چند شکلی های موجود در انترون ۲ ژن GHR را به کمک آنزیم HindIII روی جوجه های ونچانگ بررسی نموده و معنی دار بودن ژنوتیپ های حاصل از آن را روی صفت تعداد تخم های دو زرده گزارش نمودند (۶، ۱۳و ۱۶). اما بررسی اثر جایگاه ژن GHR روی صفات AFE و وزن تخم معنی دار گزارش نشده است (۵). در تحقیق حاضر به دلیل این که همه نمونه‌ها دارای ژنوتیپ هموزایگوس +/+ بوده اند (به جز یک مورد که با ژنوتیپ –/– در شکل ۲ نشان داده شده است) آنالیز آماری و در نتیجه شناسایی چگونگی اثر بین ژنوتیپ های حاصل از جایگاه ژنی GHR با صفات مورد بررسی امکان پذیر نبوده است.

1 - Duplication
2 - Insertion

جدول ۳- فراوانی ژنی و ژنوتیپی در جایگاه های ژنی GH، GHR و TGFβ3

جایگاه ژنی	فراوانی آللی		فراوانی ژنوتیپی			χ^2
GH	+	−	+/+	−/+	−/−	۲/۶۷
	۰/۷۹۸۱	۰/۲۰۱۹	۰/۶۱۵۴	۰/۳۶۵۱	۰/۰۱۹۵	
GHR	+	−	+/+	−/+	−/−	۳۱۱
	۰/۹۹۳۶	۰/۰۰۶۴	۰/۹۹۳۵	۰	۰/۰۰۶۵	
TGFβ3	+	−	+/+	−/+	−/−	۲/۵۴
	۰/۸۰۳۷	۰/۱۹۶۱	۰/۶۶۴۵	۰/۲۷۸۴	۰/۰۵۶۹	

جدول ٤- هموزایگوسیتی(Ho)، هتروزیگوسیتی(He)، فراوانی مشاهده شده(O) و فراوانی مورد انتظار(e) در جایگاه ژنی GH، GHR و TGFβ3

نام جایگاه	Ho (O)	Ho (e)	He (O)	He (e)
GH	۰/۶۳۴۶	۰/۶۷۶۷	۰/۳۶۵۴	۰/۳۲۲۳
GHR	۱	۰/۹۸۷	۰	۰/۰۱۲۷
TGFβ3	۰/۷۱۷۹	۰/۶۸۰۵	۰/۲۸۲۱	۰/۳۱۹۵

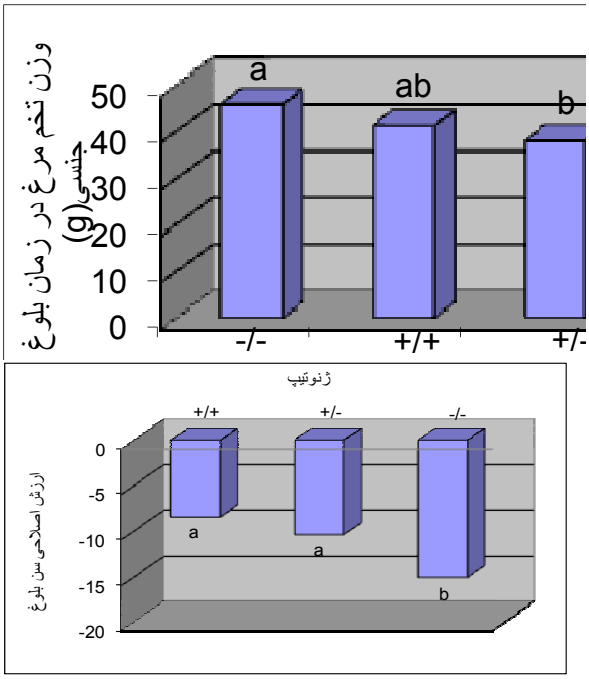
جدول ٥- نتایج آنالیز واریانس صفات مورد بررسی مربوط به جایگاه ژنی GH و TGFβ3

صفات	ارزش ها	P_{VALUE}	
		GH	TGFβ3
EVM	فنوتیپی	۰/۰۲*	۰/۳۸
	اصلاحی	۰/۱۳	۰/۶۴
EN	فنوتیپی	۰/۷۵	۰/۹۵
	اصلاحی	۰/۰۷	۰/۲۴
AFE	فنوتیپی	۰/۱۴	۰/۵۴
	اصلاحی	۰/۰۰۳*	۰/۵۸

★: معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵

در تحقیق حاضر جایگاه TGFβ3 اثر معنی داری روی ارزش فنوتیپی و اصلاحی صفات مورد بررسی نداشت. اما در سایر تحقیقات رابطه بین ژنوتیپ های حاصل از جایگاه ژن TGFβ3 با صفات وزن بدن معنی دار گزارش شده است و بیان شده است که این ژن عموما دارای نقش غالبی در ارتباط با صفات مرتبط به رشد می باشد (۱۲). در تحقیق حاضر اثرات متقابل بین دو جایگاه TGFβ3×GH نیز روی صفات مورد بررسی معنی دار نبوده است.

تغییرات ژن های مورد بررسی و اثرات آن ها روی صفات در تحقیق حاضر نمونه ای از عملکرد این ژنها در سویه های مختلف مرغ می باشد، که می تواند در گله های دیگر با زمینه ژنتیکی متفاوت، متغیر باشد. لذا جهت استفاده از نتایج این تحقیق در برنامه های اصلاحی از جمله افزایش دقت در برآورد ارزش اصلاحی و تعیین شاخص های اقتصادی بهینه، نیاز به انجام مطالعات مشابه در گله ها و نسلهای متفاوت با اندازه نمونه بزرگتر می باشد.



شکل ٤- مقایسه اثر ژنوتیپ های مختلف جایگاه GH روی صفات سن بلوغ جنسی و وزن تخم مرغ در زمان بلوغ جنسی. حروف متفاوت اختلاف میانگین ها در سطح احتمال ۰/۰۵ را نشان می دهد.

منابع

1- Apa, R., A. Lanzon, and F. Micheli. 1994. Growth hormone induces invitro maturation of follicle and cumulus-enclosed rat oocytes. J. Mol Cell Endocr. 106:207-212.

2- Barnard, J. A., M. R. Lyons, and H. L. Moses. 1990. The cell biology of transforming growth factor. J. Biochim.

Biophys. Acta. 1032:79-87
3- Byatt, J. C., N. R. Staten, W. J. Salsgiver, J. C. Kostelec, and J. R. Collier. 1993. Stimulation of food intake and weight gain in mature female rates by bovine prolactin and bovine growth hormone gene. J. Ame J Physiol. 264:986-992
4- David, W. B., R. D. Bhakta, R. P. Ian, R. M. David, and S. L. Andrew. 2009. The chicken transforming growth factor-β3 gene: Genomic structure, transcriptional analysis, and chromosomal location. J. DNA and Cell Biology. 14:111-123.
5- Feng, X. P., U. Kuhenlein, S. E. Aggrey, S. J. Gavora, and D. Zadworny. 1997. Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a white leghorn strain. J. Poult Sci. 76:1770-1775.
6- Feng, X. P., U. Kuhenlein, R. W. Fairfull, S. E. Aggrey, S. E. Yao, and D. Zadworny. 1998. A genetic marker in growth hormone receptor gene associated with body weight in chickens. J. Hered. 89:355-359.
7- Kansaku, N., A. Nakada, H. Okabayashi, D. Guemene, and U. Kuhnlein. 2003. DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene: Association with egg production. J. Animal science Journal. 74:243-244,
8- Kelley, S. M., and D. L. Felton. 1995. Experimental basis for neural immune interactions. J. Physiol Rev. 75:77-106.
9- Kuhnlein, U., L. Nie, S. Weigend, J. S. Gavora, and W. Fairfall. 1997. DNA polymorphism in chicken growth gene, response to selection for disease resistance and association with egg production. J. Anim Genet. 20:145-155.
10- Lawrence, D. A. 1996. Transforming growth factor-beta: A general review. J. Eur. Cytokine Netw. 7:363-374.
11- Lechleider, R. J., and A. B. Robert. 1999. Transforming growth factor-β. Pages 104-110 in the cytokine network and immune functions. J. Theze. Ed. Oxford university press. Oxford.
12- Li, H., N. Deep, H. Zhou, A. D. Mitchell, C. M. Ashwell, and S. J. Lamont. 2003. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with transforming growth factor-β genes. J. Poultry. Sci. 82:347-356.
13- Li, H., W. Zhu, K. Chen, X. Wu, Q. Tang, and Y. Gao. 2008. Association between GHR and IGF-1 gene polymorphisms, and reproductive traits in wenchang chickens. J. Turk J Vet Anim Sci. 32: 281-285.
14- Meyer, K. 2000. DF REML version 3.0 program to estimate variance components by restricted maximum likelihood using derivative-free algorithm. Users note Animal genetics and breeding unit. University New England, Armidable, NSW, Australia, pp: 84.
15- Mou, L., N. Liu, D. Zadworny, L. Chalifour, and U. Kuhnlein. 1995. Presence of an additional Pst1 fragment in intron 1 of the chicken growth hormone-encoding gene. J. Gene. 160:313-314.
16- Nagaraja, S. C., S. E. Aggrey, J. Yao, D. Zadworny, R. W. Fairfull, and U. Kuhnlein. 2000. Trait association of a genetic marker near the IGF-I gene in egg-laying chickens. J. Hered. 91:150-156.
17- Nie, Q., S. C. Y. Ip, X. Zhang, F. C. Leung, and G. Yang. 2002. New variation in intron 4 of growth hormone gene in Chinese native chickens. J. Hered. 93:277-279.
18- Olenski, K., S. Kaminski, J. Szyda, and A. Cieslinska. 2010. Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holestein-Frisian bulls. J. Livestock Science. 131:137-140.
19- Parmentier, I., D. Portetelle, C. Bertozzi, V. Haezebroeck, M. Pirard, and R. Renavilie. 2002. Marker genes in farm animals. J. Focus on Biotechnology. 5:47-64.
20- Piek, E., H. C. Heldin, and P. T. Dijke. 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-β superfamily signaling. J. FASEB. 13:2105-2124.
21- Quere, P., and G. J. Thorbecke. 1990. Multiple suppressive effects of transforming growth factor beta 1 on the immune response in chickens. J. Cell Immunol. 129:468-477.
22- Robert, R. D., P. J. Sharp, D. W. Burt, and C. Goddard. 1994. Insulin-Like growth factor-I in the ovary of the laying hen: gene expression and biological action on granolosa and thecal cell. J. Gene Comp Endocrinol. 93:201-205.
23- Sanders, E. J., and M. A. Wirde. 1997. Roles for growth and differential factors in avian embryonic development. J. Poult. Sci. 76:111-117.
24- SAS Institute Inc. 2006. SAS/STAT. Users guide. Version 9.1.
25- Shahnaz, S., F. Shadma, D. N. Rank, K. Khanna, and C. G. Joshi. 2008. Growth hormone gene polymorphism and its correlation with different traits in bantam and leghorn ckicken. J. India Journal of Poultry Science. 43:123-127.
26- Stephen, C. Y., I. P. Xiquan Zhang, and C. Frederick, Leung. 2001. Genomic Growth Hormone Gene Polymorphisms in Native Chinese Chickens. J. Experimental Biology and Medicine. 226:458-462.
27- Tanaka, M., Y. Hosokava, M. Watahiki, and K. Nakashima. 1992. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. J. Gene. 112:235-239.
28- Thakur, S. M., S. N. S. Parmar, M. V. Chaudhari, and J. K. Bhardwaj. 2009. Growth hormone gene polymorphism and association with egg production in Kadaknath chicken. J. Livestock Research. 21:1-9.
29- Wiliams, J., P. J. Sharp, and C. Goddard. 1992. The effects of growth hormone on ovarian follicular growth in the domestic hen. J. Repord Fertil. Abstract Series No.9:59.
30- Yeh, F. C., and R. Yang. 1999. POPGEN Version 1.31program to Population genetic analysis. Quick user guide. University Alberta, Center for International Forestry Research. pp: 28.