زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۲، صفحات ۱۸۵-۱۷۵

مقاله پژوهشی

ارزیابی ژنتیکی و ساختار جمعیتی جایگاه ژنی دخیل در تنش گرمایی (*HSP90β*) در مرغ‌های بومی مازندران، آذربایجان غربی و مرغ‌های تجاری

جعفر پیش جنگ آقاجری

گروه علوم دامی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

مسئول مکاتبات: J.pishjang@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۰

DOI: 10.22034/ascij.2023.1982273.1477

چکیده

در مناطق گرم و خشک، تنش گرمایی زیان‌های اقتصادی زیادی را در تولید طیور به وجود می‌آورد و منجر به کاهش چندین عامل فیزیولوژیکی و متابولیکی می‌شود. این تحقیق به منظور بررسی چندشکلی‌های آللی و ژنوتیپی جایگاه ژنی دخیل در تنش گرمایی (*HSP90β*) در توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری‌های گوشتی و تخم‌گذار با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام شد. به طور تصادفی از ٤٠٠ قطعه مرغ خون‌گیری و DNAی ژنومی به روش شستشوی نمکی استخراج شد. جایگاه ژنی مورد نظر به طول ٤٩٤ جفت باز به کمک آغازگرهای اختصاصی تکثیر و برای شناسایی جهش در جایگاه ژنی از هضم آنزیم *MspI* استفاده شد. برای این جایگاه ژنی، دو نوع ژنوتیپ M^1M^1 و M^1M^2 و دو آلل M^1 (با یک نوار ٤٩٤ جفت بازی) و M^2 (با دو نوار ٢٤٨ جفت بازی و ٢٤٦ جفت بازی) شناسایی شد. توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری گوشتی از نظر شاخص تعادل برای جایگاه ژنی مورد نظر در تعادل هاردی – واینبرگ قرار داشتند. برای توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری گوشتی شاخص اطلاعات شانون به ترتیب ۰/۳۲، ۰/۲۸ و ۰/٤۰، شاخص تثبیت به ترتیب ۰/۱۲، ۰/۱۱- و ۰/۱٦- و شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب ۰/۱۹، ۰/۱۷ و ۰/۲۸ برآورد شدند. با توجه به وجود چندشکلی و جهش در این جایگاه ژنی، می‌توان از این نشانگر در مرغ‌های بومی مازندران، آذربایجان غربی با انتخاب ژنتیکی و در مرغ‌های تجاری گوشتی با انتخاب ژنتیکی در سطح لاین، در حذف مرغ‌های حساس به گرما و نگهداری مرغ‌های مقاوم در برابر گرما استفاده کرد.

کلمات کلیدی: اصلاح نژاد ژنتیکی، تنوع ژنوتیپی، شوک حرارتی، مرغ بومی، نشانگر ژنی.

مقدمه

هزاران سال است که از اهلی شدن مرغ در کره خاکی گذشته است و نگهداری و پرورش مرغ در ایران و گسترش آن به دیگر نقاط دارای تاریخچه‌ای بسیار دیرینه‌ای دارد و لذا حفظ و نگهداری مرغ‌های بومی از لحاظ تغذیه‌ای، فرهنگی و اقتصادی ضروری به نظر می‌رسد (۱۹). مرغ‌های بومی ایران ذخایر مهم ژنتیکی محسوب می‌شوند و با توجه به سازگاری آن‌ها با شرایط کشور و تحمل عوامل نامساعد محیطی، می‌توان با مطالعه و بررسی ژن‌های مؤثر در صفات تولیدی و اقتصادی بازدهی تولید آن‌ها را به عنوان محصولات با کیفیت برتر و ارگانیک افزایش داد و در برنامه‌های اصلاح و انتخاب در جهت رفع نیازمندی جامعه به غذای مناسب و با کیفیت مطلوب از آن‌ها بهره برد (۲۳). امروزه برای پیش بینی ظرفیت ژنتیکی افراد، متخصصان اصلاح دام تلاش می‌کنند تا به کمک روش‌های ژنتیک مولکولی اطلاعات بیشتری از مکانیسم ژنتیکی صفات اقتصادی به دست

آورند و با اطلاعات فنوتیپی تلفیق کنند، تا با انتخاب صحیح‌تر و سریع‌تر به روند اصلاح نژاد دام سرعت ببخشند. بررسی میزان تنوع و چندشکلی حاصل از این ژن‌های موثر در رشد و تولید در حیوانات می‌تواند راهنمای مفیدی برای اصلاحگران دام در زمینه‌های به‌نژادی و انتخاب حیوانات با تولید بهتر و با کیفیت‌تر باشد (٦). تحقیقات نشان داده‌اند پیشرفت برنامه‌های اصلاح نژادی تا حدود زیادی به میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد بررسی بستگی دارد، بنابراین شناسایی تنوع نژادهای بومی کشور و حفاظت آن‌ها از وظایف اصلی متخصصین اصلاح نژاد دام می‌باشد (۱۹). شناسایی و استفاده از ژن‌های موثر بر صفات اقتصادی اهمیت زیادی در برنامه‌های اصلاح نژادی حیوانات دارند (۱۸).

در طول دهه‌های اخیر، گرمایش آب و هوای کره‌ی زمین منجر به ایجاد طیف وسیعی از مناطق اقلیمی مختلف شده است و ایران نیز با ۹۰ درصد وسعت خشکی که دارد از نظر اقلیمی به عنوان یک منطقه گرم و خشک در جهان به شمار می رود (۱). تنش گرمایی پرورش طیور را تحت تاثیر قرار می‌دهد و زیان‌های اقتصادی قابل توجهی را به‌وجود می‌آورد و به نگرانی‌های اصلی در صنعت پرورش مرغ تبدیل شده است و این امر منجر به کاهش چندین عامل فیزیولوژیکی و متابولیکی در مرغ مانند راندمان مصرف خوراک، سرعت رشد، تولید تخم مرغ، کیفیت پوسته تخم مرغ، باروری، بقاء (۹) و عملکرد و ایمنی بدن می‌شود (١٦).

مرغ‌های تجاری سریع رشد می‌کنند و تولید بالایی دارند، ولی به دلیل متابولیسم سریع، پوشش پر و عدم وجود غدد عرق توانایی تنظیم گرمایی آن‌ها پایین است و باعث می‌شود تا نتوانند به خوبی به دمای بالا سازگار شوند اما برعکس مرغ‌های بومی به محیطی که در آن زندگی می‌کنند سازگارند و به افزایش دما مقاوم هستند (٤، ۲۸). مکانیسم سازگاری به تنش گرمایی تحت تاثیر عوامل مختلفی است و توانایی در ایجاد هومئوستازی با تغییر بیان ژن باعث جبران آسیب‌های برون سلولی شده و می‌تواند شرایط فیزیولوژیکی بدن را پس از بازگشت به ناحیه‌ی دمای مناسب، متعادل سازد (۲، ۳٤). در شرایط تنش گرمایی، بیان اغلب ژن‌ها به استثنای مجموعه‌ی خاصی از ژن‌ها که ژن‌های شوک حرارتی (Heat shock genes) نامیده می‌شوند، به‌شدت سرکوب می‌شود (۲۰) و بیان ژنی مربوط به پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) به‌طور قابل توجهی در شرایط تنش گرمایی افزایش می‌یابد (۷). در مرغ‌ها، خانواده‌های ژنی *HSP70* و *HSP90* با بازیابی سریع پروتئین‌های دناتوره شده به شرایط اولیه و تحمل گرما مرتبط هستند (۲۹).

پروتئین شوک حرارتی Hsp90 یک چاپرون مولکولی و یک تنظیم کننده‌ی کلیدی پروتئوستاز در هر دو شرایط فیزیولوژیکی و استرس است. در پستانداران، دو ایزوفرم سیتوزولی Hsp90α و Hsp90β وجود دارد. این دو ایزوفرم ۸۵ درصد یکسان بوده و توسط دو ژن مختلف کدگذاری می‌شوند (۱۵). نقش جایگاه ژنی *HSP90* نقش اصلی در تحمل گرما ایفا می‌کند (۵، ۲٤، ۲۵)، به عنوان عامل ضد ویروسی عمل می‌کند (۱۳)، از بافت‌ها و ماهیچه‌های مرغ در برابر آسیب ناشی از فرآیندهای اکسیداسیون محافظت می‌کند (۸)، مسئول اصلی سازگاری سلول و یا بدن در شرایط مختلف استرس از طریق پروتئوستاز، محافظت از سلول در برابر تخریب و حفظ ساختار بهینه‌ی پروتئین‌ها و فعالیت‌های بیولوژیکی آن‌ها است (١٤، ۲۹).

قبلاً چندشکلی‌های بعضی از ژن‌های شوک حرارتی مورد مطالعه قرار گرفته است و نشانگرهای تحمل تنش گرما در نژادهای مرغ شناسایی شده‌اند. در مرغ‌های نژادهای لاینگشان و راک رسسیو سفید چندشکلی تک نوکلئوتیدی ناحیه‌ی '۵ (G141A) در پروموتر جایگاه ژنی *HSP90β* در مرغ‌های باتوانایی تحمل گرمایی زیاد وجود داشت (۳، ۳۲). همچنین در جایگاه ژنی *HSP90AB1* چندشکلی تک نوکلئوتیدی ژن G6798A در آلل G شناسایی شده بود که در اگزون شماره‌ی ١٤ رخ می‌دهد، به‌طوری که تحمل به گرما را بهبود بخشیده

و بقای طولانی‌تری را در مرغ‌های نژاد چینی هیواینان در طول تنش گرمایی ایجاد می‌کند. این چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در خانواده‌های ژنی *HSP70* و *HSP90* قابلیت استفاده در برنامه‌های اصلاح نژادی جهت بهبود تحمل گرما توسط مرغ‌ها را دارند.

اگر چه مطالعات مولکولی متعددی در ارتباط با جایگاه‌های ژنی شوک گرمایی در طیور انجام شده است (۱، ۲۱، ۳۰، ۳۱)، اما تاکنون چندشکلی جایگاه ژنی *HSP90β* در مرغ‌های بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری‌های گوشتی و تخم‌گذار درایران مطالعه نشده است. در تحقیقات انجام شده روی جهش در توالی ژنی مربوط به پروتئین تنش گرمایی نشان می‌دهند که جهش بر بیان پروتئین شوک حرارتی موثر بوده است (۳۶). هدف از این مطالعه بررسی وجود چندشکلی در جایگاه ژنی *HSP90β* در مرغ‌های بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری‌های گوشتی و تخم‌گذار با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های خونی

برای انجام این پژوهش به‌طور تصادفی ٤٠٠ قطعه مرغ از توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری‌های گوشتی (سویه‌ی راس ۳۰۸) و تخم‌گذار (سویه‌ی شیور) (۱۰۰ قطعه به ازای هر توده) از مرکز پرورش مرغ بومی موسسه‌ی تحقیقات علوم دامی در حیدرآباد کرج، مرکز تحقیقات مرغ بومی جهاد کشاورزی آذربایجان غربی (ارومیه) و مناطق مختلف آذربایجان شرقی انتخاب شدند. از هر قطعه مرغ یک میلی‌لیتر خون از سیاهرگ زیر بال مرغ‌ها جمع‌آوری و به لوله‌های ۲/۵ میلی‌لیتری غیر وکیوم (CBC) حاوی EDTA انتقال داده شدند. نمونه‌های خون بعد از شماره‌گذاری با حفظ شرایط زنجیره‌ی سرد به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNAی ژنومی نگهداری شدند.

استخراج DNAی ژنومی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

پس از یخ‌گشایی نمونه‌های خون و رسیدن به دمای محیط، استخراج DNAی ژنومی با روش شستشوی نمکی (۱۷) انجام شد. کمیت DNAهای ژنومی استخراج شده به روش طیف سنجی و با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ و کیفیت آن‌ها با الکتروفورز روی ژل آگارز دو درصد تعیین شد. جهت تکثیر قطعات ژنی مورد نظر برای هر جایگاه ژنی از یک جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد (جدول ۱). اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده، به کمک سرویس BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در سایت NCBI بررسی شد.

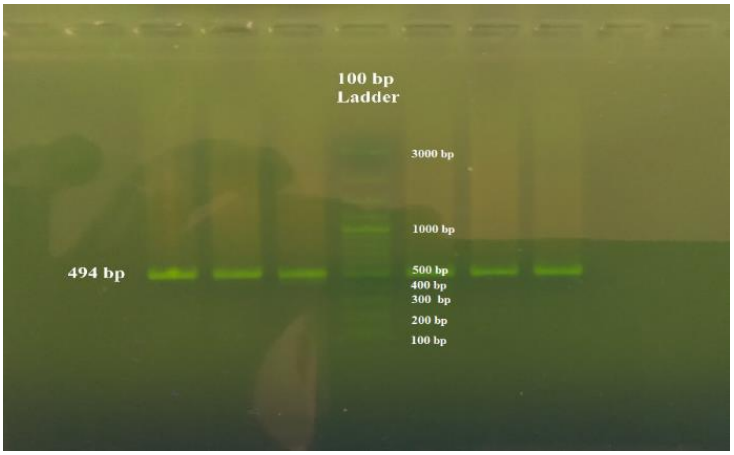
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی۲۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم DNAی ژنومی، پنج میکرولیتر Taq DNA polymerase 2x Master mix red (Taq DNA polymerase، بافر، dNTPs، Red dye و $MgCl_2$) (ساخت شرکت AMPLIQON کشور دانمارک) و یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (ساخت شرکت SINACLON کشور ایران) با غلظت ۱۰ پیکومول برای تکثیر قطعه‌ی مورد نظر از جایگاه ژن *HSP90β* انجام گرفت. در این واکنش، چرخه های حرارتی به صورت آزمون و خطا طراحی و بهینه شدند و واسرشته سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۹/۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه و همچنین تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام گرفت. قطعه‌ی تکثیر شده برای جایگاه ژنی مورد نظر در حضور نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (ساخت شرکت Thermo Scientific کشور آمریکا) روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شد و صحت تکثیر قطعه‌ی مورد نظر بدون حضور باندهای غیراختصاصی و محصولات ناخواسته تأیید شد (شکل ۱).

تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها: در این تحقیق جهت تعیین چندشکلی جایگاه ژنی مورد نظر از تکنیک PCR-RFLP و برای هضم آنزیمی محصولات PCR از آنزیم برشی اختصاصی *MspI* (ساخت شرکت Thermo Scientific کشور آمریکا) استفاده شد (جدول ۱). این واکنش در حجم نهایی ۱۷/۵ میکرولیتر، شامل هفت میکرولیتر محصول PCR، یک میکرولیتر بافر و نیم میکرولیتر آنزیم و در نهایت نه میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام گرفت. واکنش هضم آنزیمی برای جایگاه ژنی مورد نظر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. بعد از هضم آنزیمی محصولات PCR، برای مشاهده‌ی باندها و تعیین الگوهای ژنوتیپی از ژل آگارز چهار درصد و نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت بازی (ساخت شرکت Thermo Scientific کشور آمریکا) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل ژنتیکی داده‌ها: اندازه گیری تنوع درون جمعیتی توسط شاخص‌های مرسوم نظیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی موردانتظار (He)، و شاخص اطلاعات شانون (I) مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، شاخص هتروزیگوسیتی، شاخص تثبیت (F)، آزمون مربع کای و دیگر پارامترهای ژنتیکی در توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری‌های گوشتی و تخم‌گذار مورد مطالعه از نرم افزار از نرم‌افزار POPGENE نسخه‌ی ۱/۳۲ (۳۵) استفاده شد. در این نرم افزار، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار از فرمول شماره‌ی ۱ (۲۲) و شاخص اطلاعات شانون از فرمول شماره‌ی ۲ (۳۳) محاسبه شد. فرمول (۱) $H_0 = 1 - \frac{1}{m}\sum_{i=1}^{m}\sum_{a=1}^{k} P_a^2$ در فرمول ذکر شده P^2a نشان‌دهنده‌ی فراوانی a امین از k آلل و m تعداد جایگاه ژنی است. فرمول (۲) $H' = -\sum_i LnP_i$ برخلاف هتروزیگوسی، که برای هر تعداد آلل، حد نهایی یک دارد، حداکثر مقدار 'H برابر با Ln(n)است. برای محاسبه‌ی تفاوت فراوانی آللی بین جمعیت‌ها از شاخص تثبیت یا میزان تمایز بین جمعیتی (F_{ST}) استفاده شد (فرمول ۳). در حقیقت این شاخص نشان‌دهنده‌ی مقدار تغییرات ژنتیکی ساختار جمعیت (افزایش و یا کاهش هتروزیگوسیتی) است (۲۲). فرمول (۳) $F_{ST} = \frac{\delta_S^2}{\delta_T^2} = \frac{\delta_S^2}{\bar{p}\,(1-\bar{p})}$ در این فرمول $\bar{p}$ متوسط فراوانی یک آلل در کل جمعیت‌ها، δ_s^2 تفاوت فراوانی-های آللی در بین جمعیت‌ها و δ_T^2 تفاوت فراوانی‌های آللی در کل جمعیت‌ها است. برای مقایسه‌ی فراوانی آللی و ژنوتیپی در بین جمعیت‌ها و آزمون تعادل هاردی – واینبرگ از مربع کای (فرمول ٤) استفاده شد (۱۰). فرمول (٤) $\chi^2 = \sum(O_i - E_i)/E_i$ در فرمول فوق O_i فراوانی‌های مشاهده شده و E_i فراوانی‌های مورد انتظار هستند.

جدول ۱ – توالی و دمای اتصال آغازگرها، اندازه‌ی محصولات PCR و آنزیم برشی

جایگاه ژنی	آغازگر (۳' → ۵')	محصول PCR (جفت باز)	دمای اتصال آغازگر	آنزیم برشی
HSP90β	GCGCGTGGAACTCTCTGGAA GTCGGAGGCGTTGGAGATGAG	٤٩٤	۵۹/۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه	*MspI*



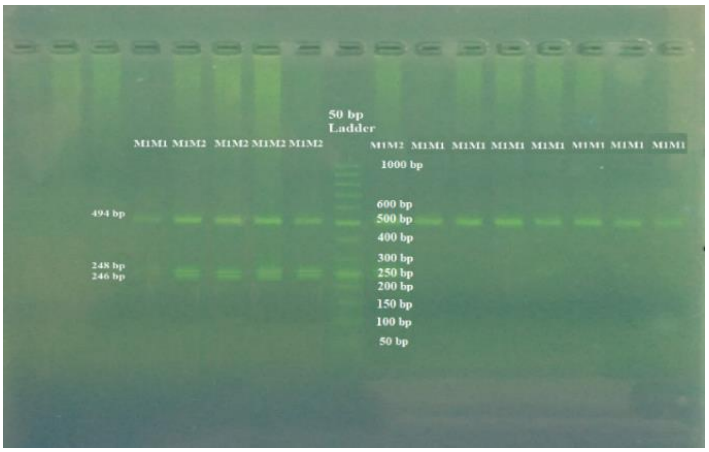
شکل ۱- محصولات PCR برای جایگاه ژنی *HSP90β* روی ژل آگارز دو درصد با نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز

نتایج

در اثر هضم آنزیم برشی *MspI* روی محصولات PCR جایگاه ژنی *HSP90β* (٤٩٤ جفت باز)، در توده‌ی مرغ تجاری تخم‌گذار یک قطعه به طول ٤٩٤ جفت باز (بدون برش) و همه مرغ‌ها تنها دارای ژنوتیپ M^1M^1 (مونومورف) بودند. در توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری گوشتی، الگوهای آنزیم برشی *MspI* متفات بود و در نتیجه در بین مرغ‌ها قطعات ٤٩٤ جفت بازی برش نخورده و همچنین دو قطعه‌ی ٢٤٨ و ٢٤٦ جفت بازی مشاهده شد، به طوری که آلل M^1 دارای یک نوار ٤٩٤ جفت بازی و آلل M^2 دارای دو نوار ٢٤٨ و ٢٤٦ جفت بازی بود و دو نوع ژنوتیپ M^1M^1 و M^1M^2 شناسایی شد (شکل ٢).

تجزیه و تحلیل فراوانی‌های ژنوتیپی حاصل از این تحقیق نشان داد که در توده‌ی مرغ تجاری تخم‌گذار، ژنوتیپ M^1M^1 دارای فراوانی ۱۰۰ درصد و هیچ گونه چندشکلی مشاهده نشد و فراوانی ژنوتیپ‌های M^1M^1 و M^1M^2 در توده‌های مرغ بومی مازندران (به ترتیب ۰/۸۱ و ۰/۱۹)، آذربایجان شرقی (به ترتیب ۰/۸۳ و ۰/۱۷) و تجاری گوشتی (به ترتیب ۰/۷۲ و ۰/۲۸) بود. همچنین در توده-های مرغ بومی مازندران فراوانی آلل‌های M^1 و M^2 (به ترتیب ۰/۸۷ و ۰/۱۳)، آذربایجان شرقی (به ترتیب ۰/۹۱ و ۰/۰۹) و تجاری گوشتی (به ترتیب ۰/۸٦ و ۰/۱٤) برآورد شدند و ژنوتیپ M^1M^1 و آلل M^1 دارای بیشترین فراوانی بودند و توده‌ی مرغ تخم‌گذار نیز تک شکلی نشان داد (جدول ٢).

در تحقیق حاضر توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری گوشتی مورد مطالعه از نظر شاخص تعادل هاردی- واینبرگ در حالت تعادل قرار داشتند ($p > ۰/۰۵$) (جدول ٢). شاخص اطلاعات شانون برای توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری گوشتی در جایگاه ژنی مورد مطالعه (به ترتیب ۰/۳۲، ۰/۲۸ و ۰/٤۰) برآورد شد و یکی دیگر از پارامترهای مورد مطالعه در تحقیق حاضر شاخص تثبیت بود که برای توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری گوشتی (به ترتیب ۰/۱۲-، ۰/۱۱- و ۰/۱٦-) محاسبه گردید (جدول ٢).



شکل ۲- الگوهای ژنوتیپی حاصل از هضمی آنزیمی محصولات PCR برای جایگاه ژنی *HSP90β* روی ژل آگارز چهار درصد با نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت باز

جدول ۲ – فراوانی آللی و ژنوتیپی و فراوانی‌های هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی *HSP90β* در توده‌های مرغ‌های بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری‌های گوشتی و تخم‌گذار

آلل و ژنوتیپ		نژاد				کل توده‌ها
		مازندران	آذربایجان غربی	گوشتی	تخم‌گذار	
فراوانی آللی	M^1	۰/۸۷	۰/۹۱	۰/۸۶	۱	۰/۹۳
	M^2	۰/۱۳	۰/۰۹	۰/۱۴	۰	۰/۰۷
فراوانی ژنوتیپی	M^1M^1	(۰/۸۵) ۰/۸۱	(۰/۸۲) ۰/۸۳	(۰/۷۴) ۰/۷۲	۱	(۰/۸۱) ۰/۸۰
مشاهده شده	M^1M^2	(۰/۱۴) ۰/۱۹	(۰/۱۸) ۰/۱۷	(۰/۲۴) ۰/۲۸	۰	(۰/۱۹) ۰/۰۲
(مورد انتظار)	M^2M^2	(۰/۰۰۳) ۰	(۰/۰۰۱) ۰	(۰/۰۲) ۰	۰	(۰/۰۰۱) ۰
کای اسکور [۱]		۰/۳۵	۰/۲۱	۱/۲۱	–	۰/۷۸
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مشاهده شده		(۰/۸۱) ۰/۱۹	(۰/۸۳) ۰/۱۷	(۰/۷۲) ۰/۲۸	(۱) ۰	(۰/۸۸) ۰/۱۲
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مورد انتظار		(۰/۸۷) ۰/۱۴	(۰/۸۲) ۰/۱۸	(۰/۷۶) ۰/۲۴	(۱) ۰	(۰/۸۹) ۰/۱۱
شاخص اطلاعات شانون		۰/۳۲	۰/۲۸	۰/۴۰	–	۰/۲۱
شاخص تثبیت		-۰/۱۲	-۰/۱۱	-۰/۱۶	–	-۰/۰۵

۱- کای اسکور برای تعادل هاردی – واینبرگ

بحث

نتایج مطالعه حاضر از تعیین ژنوتیپ جایگاه ژنی *HSP90β* با تکنیک PCR-RFLP با استفاده از آنزیم برشی *MspI* نشان داد که توده‌ی مرغ تجاری تخم‌گذار دارای یک قطعه ۴۹۴ جفت بازی برش نخورده بوده و این نشان می‌دهد که جایگاه ژنی *HSP90β* یک شکل است (مونومورف) و در حالی که در توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری گوشتی دو ژنوتیپ M^1M^1 و M^1M^2 شناسایی شد. این نتایج با نتایج تحقیقی که قبلاً انجام شده بود (۲۶) مطابقت داشت. این محققین با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و آنزیم برشی *MspI*، چندشکلی جایگاه ژنی *HSP90β* (به طول ۴۹۸ جفت باز) در توده‌های مرغ فایومی و لگهورن مورد بررسی قرار داده بودند و در نتیجه دو ژنوتیپ M^1M^1 و M^1M^2 شناسایی شده بود و فراوانی ژنوتیپ‌های M^1M^1 و

M^1M^2 را در توده‌ی مرغ‌های لگهورن (به ترتیب ۰/۷۰ و ۰/۳۰) برآورد کرده بودند. با توجه به گزارش آن‌ها ژنوتیپ M^1M^1 و M^1M^2 را به ترتیب مقاوم و حساس به تنش گرمایی شناسایی کرده بودند، لذا از ژنوتیپ M^1M^2 می‌توان به عنوان یک نشانگر برای حذف مرغ-های حساس به گرما استفاده کرد.

اثرات تعیین ژنوتیپ جایگاه ژنی *HSP90β* بر تحمل تنش گرمایی در چندین مطالعه بررسی شده است. برای مثال در تحقیق (۳) جهشی را در ناحیه‌ی '۵ (G141A) جایگاه ژنی *HSP90* شناسایی شده بود که با تحمل تنش گرما در مرغ‌های لاینگشان و راک رسسیو مرتبط بود و در نتایج این تحقیق ژنوتیپ GG به عنوان ژنوتیپ مقاوم به تنش گرما شناسایی کرده بودند. در مطالعه‌ای دیگر (۲۷)، توالی‌های چندگانه‌ی جایگاه ژنی *HSP90* در تمام گونه-های مرغ‌های مورد مطالعه، شباهت زیادی را نشان داده بودند که حاکی از حفظ تکاملی بالا بود. نتایج تحقیق ما نیز با این یافته‌ها مطابقت دارد زیرا نتایج ما نشان داد که توده‌ی مرغ تجاری تخم‌گذار تنها دارای ژنوتیپ وحشی (M^1M^1) جایگاه ژنی *HSP90β* بودند.

در بررسی دیگر (۳۲)، چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) جایگاه ژنی *HSP90β* در مرغ چینی هیواینان را بررسی کرده بودند و نتایج تحقیق حاضر با نتایج مطالعه‌ی یاد شده مطابقت نداشت. این محققین فراوانی‌های سه ژنوتیپ مختلف AA، AG و GG را به ترتیب ۰/۴۹، ۰/۲۷ و ۰/۲۴ برآورد کرده بودند و مشخص شده بود که مرغ‌هایی با ژنوتیپ GG، دارای زمان بقای طولانی‌تر نسبت به مرغ‌هایی با ژنوتیپ دیگر داشتند و این حالت نشانگر ایجاد مقاومت در برابر تنش گرمایی توسط آلل G بوده و به‌طور بالقوه می‌تواند در بهبود مقاومت در برابر تنش گرمایی استفاده شود. دلیل عدم تطابق فراوانی‌های ژنوتیپی با نتایج تحقیق حاضر احتمالاً می‌تواند تفاوت در نوع توده‌های مورد مطالعه و تفاوت در تکنیک مورد آزمایش باشد.

در تحقیقات انجام شده (۳، ۲۶، ۲۷، ۳۲) در مورد شاخص تعادل، شاخص اطلاعات شانون و شاخص تثبیت اشاره‌ای نشده است در تحقیق حاضر، شاخص اطلاعات شانون برای توده‌های مرغ‌های بومی مازندران، آذربایان غربی و گوشتی در جایگاه ژنی مورد مطالعه (به ترتیب ۰/۳۲، ۰/۲۸ و ۰/۴۰) برآورد شد که نشانگر تنوع ژنتیکی کم در توده‌های مرغ بومی مازندران و آذربایجان غربی و نسبتاً کم در مرغ تجاری گوشتی است. شاخص اطلاعات شانون بیانگر میزان تنوع ژنتیکی توده‌ی مورد مطالعه برای جایگاه ژنی مورد نظر است. همچنین توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و گوشتی برای جایگاه ژنی *HSP90β* در تعادل هاردی- واینبرگ بودند. عواملی مثل جهش، انتخاب، مهاجرت و رانش ژنتیکی باعث ایجاد عدم تعادل توده‌ها برای جایگاه ژنی مورد نظر می‌شوند. دیگر این که شاخص تثبیت برای توده‌های مرغ‌های بومی مازندران، آذربایجان و تجاری گوشتی (به ترتیب ۰/۱۲، ۰/۱۱- و ۰/۱۶-) برآورد شد. شاخص تثبیت منفی در مرغ‌های مورد مطالعه احتمالاً می-تواند به دلیل شدت انتخاب بالا و عدم تلاقی تصادفی در توده‌های مورد مطالعه باشد. شاخص تثبیت همیشه در محدوده‌ی ۱- تا ۱ متغیر است و منفی بودن آن نشانه‌ی کاهش هتروزیگوسیتی و افزایش هموزیگوسیتی یا افزایش هم‌خونی در داخل توده‌ها می‌باشد.

نتیجه‌گیری

اصلاح نژاد ژنتیکی مرغ‌های بومی و یا تجاری برای یک جایگاه ژنی خاص، نیاز به انجام بررسی‌های مولکولی مخصوصاً به کمک نشانگرهای ژنتیکی دارد. با توجه نتایج به دست آمده از این تحقیق، جایگاه ژنی *HSP90β* پس از برش توسط آنزیم محدود کننده‌ی *MspI*، مرغ‌های تجاری تخم‌گذار تک شکل (مونومورفیک) بود که یک ژنوتیپ برای این جایگاه ژنی دخیل در تنش گرمایی نشان می‌دهد، اما چندشکلی در توده‌های مرغ بومی مازندران، آذربایجان غربی و تجاری گوشتی وجود داشت، لذا می‌توان با انتخاب ژنتیکی با استفاده از این

نشانگر ژنتیکی برای حذف مرغ‌های حساس به گرما و نگهداری مرغ‌های مقاوم در برابر گرما استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت علمی، مدیر گروه محترم گروه علوم پایه و مدیر محترم آزمایشگاه‌ها و کارگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه در همکاری در اجرای این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Asadollahpour Nanae H., Kharrati-Koopaee H., Esmailizadeh A. 2022. Genetic diversity and signatures of selection for heat tolerance and immune response in Iranian native chickens. *BMC Genomics*, 23(1): 224.

2. Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbiso C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S., Young R.A. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 12(2): 323-337.

3. Chen Z.Y., Gan J.K., Xiao X., Jiang L.Y., Zhang X.Q., Luo Q.B. 2013. The association of SNPs in *Hsp90β* gene 5′ flanking region with thermo tolerance traits and tissue mRNA expression in two chicken breeds. *Molecular Biology Reports*, 40(9): 5295-5306.

4. Duangjinda M., Tunim S., Duangdaen C., Boonkum W. 2017. *Hsp70* genotypes and heat tolerance of commercial and native chickens reared in hot and humid conditions. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19: 7-18.

5. Galal A., Radwan L.M., Rezik H.H., Ayoub H. 2019. Expression levels of *HSP70* and *CPT-1* in three local breeds of chickens reared under normal or heat stress conditions after the introduction of the naked neck gene. *Journal of Thermal Biology*, 80: 113-118.

6. Ghaderzadeh M., Mardani K., Hashemi A. 2013. Study of polymorphism in Intron 4 Ghrelin gene in West Azerbaijan native chicken using PCR-SSCP. *Modern Genetics Journal*, 8(4): 403-410. (In Persian).

7. Guerreiro E.N., Giachetto P.F., Givisiez P.E.N.J., Ferro A., Ferro M.I.T., Gabriel J.E. 2004. Brain and hepatic Hsp70 protein levels in heat-acclimated broiler chickens during heat stress. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 6(4): 201-206.

8. Hao Y., Gu X.H. 2014. Effects of heat shock protein 90 expression on pectoralis major oxidation in broilers exposed to acute heat stress. *Poultry Science*, 93(11): 2709-2717.

9. Kapakin K.A.T., Gümüş R., Imik H., Kapakin S., Sağlam Y.S. 2012. Effects of ascorbic and α-lipoic acid on secretion of HSP-70 and apoptosis in liver and kidneys of broilers exposed to heat stress. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 59(4): 279-287.

10. Levene H. 1949. On a matching problem in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics*, 20: 91-94.

11. Leveque G., Forgetta V., Morroll S., Smith A.L., Bumstead N., Barrow P., Loredo-Osti J., Morgan K., Malo D. 2003. Allelic variation in *TLR4* is linked to susceptibility to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in chickens. *Infection and Immunity*, 71: 1116-1124.

12. Lin H., Decuypere E., Buyse J. 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(1): 11-17.

13. Lin T.W., Lo C.W., Lai S.Y., Fan R.J., Lo C.J., Chou Y.M., Thiruvengadam R., Wang A.H.J., Wang M.Y. 2007. Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 81(16): 8730-8741.

14. Liu C.P., Fu J., Xu F.P., Wang X.S., Li S. 2014. The role of heat shock proteins in oxidative stress damage induced by Se deficiency in chicken livers. *Biometals*, 28: 163-173.

15. Maiti S., Picard D. 2022. Cytosolic Hsp90 isoform-specific functions and clinical significance. *Biomolecules*, 12: 1166.

16. Mashaly M.M., Hendricks G.L., Kalama M.A., Gehad A.E., Abbas A.O., Patterson P.H. 2004. Effect of heat stress on production

under conditions of heat stress through selection and gene expression studies. *Journal of Thermal Biology*, 89: 102545.

26. Sheraiba N.I., Hemeda S.A., Mahboub H.D.H., Heikal H.S. 2019. *HSP70* and *HSP90β* genes polymorphism and its association with thermotolerance in Fayoumi and Leghorn chicken breeds. *Journal of Current Veterinary Research*, 2: 55-62.

27. Sigei C., Kariuki D., Ndiema E., Wainaina E., Maina S., Makanda M., Ommeh S. 2015. In silico detection of signatures for adaptive evolution at select innate immune and heat stress genes in indigenous poultry. *JKUAT Scientific Conference*, 161-173.

28. Soleimani A.F., Zulkifli I., Omar A.R., Raha A.R. 2011. Physiological responses of three chicken breeds to acute heat stress. *Poultry Science*, 90: 1435-40.

29. Surai P.F. 2015. Antioxidant systems in poultry biology: heat shock proteins. Journal of Science, 5(12): 1188-1222.

30. Tamzil M.H., Noor R.R., Hardjosworo P.S. 2013. Polymorphism of the Heat shock protein gene in kampong, Arabic and commercial chickens. *Jurnal Veteriner*, 14(3): 317-326.

31. Tohidi R., Nassiri M., Javadmanesh A. 2021. A study on the expression of *HASPA2* and *HSPB1* genes and gene ontology in the liver of Khorasan native chickens under acute heat stress. *Animal science journal*, 34(130): 53-62. (In Persian).

32. Wan Y., Ma C., Wei P., Fang Q., Guo X., Zhou B., Jiang R. 2017. Dynamic expression of *HSP90B1* mRNA in the hypothalamus of two Chinese chicken breeds under heat stress and association analysis with a SNP in Huainan chickens. *Czech Journal of Animal Science*, 62(2): 82-87.

33. Weir B.S. 1990. Genetic data analysis: Methods for discrete population genetic data. 1rd edn, Sinauer Assoc., Sunderland, MA, USA, 377 pp.

34. Xie J., Tang L., Lu L., Zhang L., Xi L., Liu H.C., Odle J., Luo X. 2014. Differential expression of Heat shock transcription factors and heat shock proteins after acute and chronic

parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry Science*, 83(6): 889-894.

17. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3): 12-15.

18. Moazeni S., Sadeghi M., Mohamadabadi M., Moradi Shahrbabak H., Esmailizadeh Kashkoeiyeh A. 2012. Study of genetic structure of UCP gene in Mazandaran native chickens. *Fifth Congress of Animal Science Iran, University of Technology Isfahan*, 200-203. (In Persian).

19. Mohammadabadi M.R., Nikbakhti M., Mirzaee H.R., Shandi A., Saghi D.A., Romanov M.N., Moiseyeva I.G. 2010. Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 46(4): 505-509.

20. Morimoto R.I., Hunt C., Huang S.Y., Berg K.L., Banerji S.S. 1986. Organization, nucleotide sequence and transcription of the chicken *HSP70* gene. *Journal of Biological Chemistry*, 261(27): 12692-12699.

21. Nazari M., Fatemeh S., Radpoor S. 2020. Investigation of Heat shock protein 70 gene polymorphism in Khuzestan native chicken. *Agricultural Biotechnology Journal*, 12(1): 81-100. (In Persian).

22. Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3321-3323.

23. Piryonesi A., Mardani K., Khakpour K., Ghaderzadeh M., Modaresi R. 2012. Study on the polymorphism of insulin-like growth factor1 gene (*IGF1*) in West Azerbaijan native chicken. *Modern Genetics Journal*, 7(4): 417-419. (In Persian).

24. Radwan L.M., Mahrous M.Y. 2019. Genetic selection for growth performance and thermal tolerance under high ambient temperature after two generations using heat shock protein 90 expression as an index. *Animal Production Science*, 59(4): 628-633.

25. Radwan L.M. 2020. Genetic improvement of egg laying traits in Fayoumi chickens bred

heat stress in laying chickens (Gallus gallus). *PLoS One,* 29; 9(7): e102204.

35. Yeh F., Rongcal Y., Boyle T. 2000. POPGENE 1.32: A free program for the analysis of genetic variation among and within populations using co-dominant and dominant markers. Department of Renewable Resources, University of Alberta, Alberta, Canada.

36. Zhen F.S., Du H.L., Xu H.P., Luo Q.B. 2006. Tissue and allelic-specific expression of *Hsp70* gene in chickens: basal and heat-stress-induced mRNA level quantified with real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *British Poultry Science*, 47: 449-455.

Genetic Evaluation and Population Structure of the Gene Locus Involved in Heat Stress (*HSP90β*) in Native Chickens of Mazandaran, West Azerbaijan and Commercial Chickens

Jafar Pish Jang Aghajeri

Department of Animal Science, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

Abstract

In hot and dry regions, heat stress causes significant economic losses in poultry production and leads to the reduction of several physiological and metabolic factors. This research was conducted in order to investigate the allelic and genotypic polymorphisms of the gene locus involved in heat stress (*HSP90β*) in native chickens of Mazandaran, West Azerbaijan and commercial broiler and egg-laying chicken populations using PCR-RFLP technique. Randomly, blood was taken from 400 chicken and genomic DNA was extracted by salting out method. The desired gene locus of 494 base pairs was amplified with the help of specific primers and *MspI* enzyme digestion was used to identify the mutation in the gene locus. For this gene locus, two types of genotypes M^1M^1 and M^1M^2 and two alleles M^1 (with one band of 494 bp) and M^2 (with two bands of 248 bp and 246 bp) were identified. Mazandaran, West Azerbaijan native and commercial broiler chicken masses were in the Hardy-Weinberg equilibrium. For Mazandaran, West Azerbaijan native and commercial broiler chicken populations, Shannon information index was 0.32, 0.28 and 0.40, respectively, the fixation index was 0.12, -0.11 and -0.16, respectively and the observed heterozygosity was 0.19, 0.17 and 0.28, respectively. Due to the presence of polymorphism and mutation in this gene locus, it is possible to use this marker in the native chickens of Mazandaran and West Azerbaijan with genetic selection and in commercial broiler chickens with genetic selection at the line level, to remove heat-sensitive chickens and keep them heat-resistant chickens are used.

Keywords: Native chicken, Genetics breeding, Genotype diversity, Gene marker, Heat shock.