نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۹، تابستان ۱۳۹۷
ص‌ص: ۹۳~۱۰۲

بررسی چند شکلی ژن هورمون رشد و ارتباط آن با صفات رشد در بلدرچین ژاپنی

- **نوشین قهرمانی**
دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
- **علی هاشمی**(نویسنده مسئول)
دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.
- **مختار غفاری**
استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
- **قربان الیاسی زرین قبایی**
گروه پژوهش علوم دامی،مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی استان آذربایجان شرقی

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش : آبان ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۳۴۱۱۷۰۲
Email: a.hashemi50@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22092/ asj.2017.110442.1446

چکیده

بلدرچین دارای خصوصیات مناسب مانند رشد سریع و کیفیت بالای گوشت می‌باشد. در تحقیق حاضر، چندشکلی ناحیه اگزون دو از ژن هورمون رشد [1](GH) و ارتباط آن با صفات رشد در بلدرچین ژاپنی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، از ۱۵۰ قطعه بلدرچین ژاپنی نمونه‌های خون جمع آوری شد و به دنبال آن DNA ژنومی مطابق پروتکل پروناز استخراج گردید. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز [1](PCR) جهت تکثیر قطعه ۱۶۲جفت بازی ژن GH انجام گرفت. روش تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد [3](SSCP) جهت تعیین الگوهای ژنوتیپی نمونه‌ها بکار برده شد. نتایج SSCP چهار الگوی متفاوت ژنوتیپی در ناحیه اگزون دو از ژن GH را نشان داد. فراوانی چهار الگوی ژنوتیپی ۱، ۲ ،۳ و ۴ در این پژوهش به ترتیب برابر با ۱۱/۶۴، ۱۵/۷۵، ۳۷/۶۷ و ۳۴/۹۴ درصد برآورد گردید. تجزیه و تحلیل ارتباط صفت وزن بدن و الگوهای ژنوتیپی با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. نتایج نشان داد که بین الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده با وزن بدن در هیچ دوره پرورشی ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. در ارتباط با تأثیر جنس بر صفت وزن بدن نیز در ۶۰ روزگی (سن بلوغ) اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P\leq ۰/۰۵$). با توجه به تعداد الگوهای ژنوتیپی، ناحیه مورد مطالعه در بلدرچین ژاپنی از تنوع بالای برخوردار می باشد.

واژه‌های کلیدی: بلدرچین ژاپنی، ژن GH، PCR-SSCP، صفات رشد

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 119 pp: 93-102

Investigation of growth hormone gene polymorphism and its association with growth traits in Japanese Quail

By: Noshin Ghahramani, Ali Hashemi[2]*, Mokhtar Ghafari[3], Ghorban Elyasi[4]
1-MSc Graduated of Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
2-Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
3-Assistant Professor Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
4. Department of Animal Science, East Azerbaijan Agriculture and Natural Resources Research Centre, Tabriz, Iran.

Received: April 2017 **Accepted: October 2017**

Quails have suitable properties such as rapid growth and high quality of meat. In this study, polymorphism of exon two of the gene encoding Growth Hormone (GH) and its association with growth traits in the Japanese quail were investigated. For this purpose, blood samples were taken from 150 Japanese quails and genomic DNA was extracted using Pronase method. Then, polymerase chain reaction (PCR) was executed to amplify a 162 bp fragment of GH gene. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) method was used to determine the patterns of genetic samples. The results of SSCP showed four different genotype patterns in the exon two region of GH gene. The frequencies of genotype patterns were 11.64, 15.75, 37.67 and 34.94%. Association of body weight with genotype patterns was analyzed using the SAS software. Our results indicated that there is no significant difference between the genotype patterns and body weight in any period of rearing. However, for association of gender effect on body weight, there was a significant difference in the age of 60 days (maturity) ($P \leq 0.05$). Based on the multitude of genotypic patterns, the region in question in Japanese quail has a high diversity.

Key words: Japanese quail, GH Gene, PCR-SSCP, Growth traits

مقدمه

امروزه با رشد جمعیت، الگوی مصرف و در نتیجه تقاضا برای مواد غذایی سیر صعودی داشته است. افزایش تقاضا از یک‌سو و محدود بودن منابع تولید مواد غذایی از سوی دیگر، ضرورت افزایش بازده تولیدات کشاورزی به ویژه تولیدات دامی را آشکارتر می‌نماید (اکبری، ۱۳۹۲). پایین بودن بازده تولید در ایران نسبت به کشورهای پیشرفته، باعث افزایش اهمیت بازده تولید می‌شود. به همین دلیل استفاده از روش‌های بهینه تولید و به‌کارگیری حیواناتی با ظرفیت ژنتیکی بالا، نقش به سزایی در افزایش تولیدات دامی دارند (راشدی و همکاران، ۱۳۹۲). از جمله مواد غذایی مورد نیاز جوامع، پروتئین حیوانی می‌باشد و برای تأمین این نیاز، گوشت و تخم طیور مورد توجه مردم بوده است (اکبری، ۱۳۹۲). بلدرچین، کوچکترین گونه از پرندگان بومی آسیاست که به منظور تولید تخم و گوشت پرورش داده می‌شود (El-Tarabany و همکاران، ۲۰۱۴). ویژگی‌های ممتاز این پرنده از جمله میزان رشد بالا، بلوغ جنسی سریع، ضریب تبدیل غذایی پایین، فاصله نسلی کوتاه، تولیدگوشت بالا، تراکم بالای پرورش در واحد سطح، دوره جوجه‌کشی کوتاه و در نهایت ارزش غذایی بالای گوشت و تخم آن موجب شده است که پرورش بلدرچین به یک صنعت پُربازده و سودآور در بسیاری از کشورها تبدیل شود و همچنین به عنوان مدل آزمایشگاهی و اقتصادی مناسبی برای تحقیقات در نظر گرفته شود (رجایی اربابی، ۱۳۸۴).

بلدرچین متعلّق به جنس *کوتورنیکس* (Coturnix)، و همسان مرغ از خانوادهٔ قرقاول سانان (Phasianidae) و راستهٔ ماکیان سانان (Galliformes) است (Kan و همکاران، ۲۰۱۰). اگرچه بلدرچین ژاپنی به‌عنوان یک پرنده آزمایشگاهی دارای مزایای فراوانی است اما هنوز توالی ژنوم آن به طور کامل شناسایی نشده است. کمبود اطلاعات در رابطه با توالی ژنوم بلدرچین، منجر به‌سرعت بخشیدن به مطالعات انجام‌شده بر روی بلدرچین خواهد شد (Kahawara-Miki و همکاران، ۲۰۱۳).

تنوع ژنتیکی لازمه‌ی برنامه‌های اصلاح‌نژادی می‌باشد. عوامل متعددی در جمعیت‌های حیوانی در ایجاد تنوع ژنتیکی نقش دارند که از آن جمله می‌توان به نوترکیبی، رانش ژنتیکی، جهش و انتخاب اشاره کرد (اکبری، ۱۳۹۲). هدف اصلی اصلاح نژاد، تلاش برای بهبود صفات دارای ارزش اقتصادی است (Mmereole و همکاران، ۲۰۱۰). بررسی میزان تنوع و چندشکلی ژن‌های مؤثر در صفات رشد و تولیدی می‌تواند راهنمای مفیدی برای اصلاحگران دام در زمینه‌های به‌گزینی و انتخاب حیوانات با تولید بهتر و با کیفیت‌تر باشد. تحقیقات نشان داده‌اند پیشرفت برنامه‌های اصلاح نژادی تا حدود زیادی به میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد بررسی بستگی دارد (قادرزاده و همکاران، ۱۳۹۲). برای بررسی تنوع در سطح ژنوم، روش‌ها و تکنیک‌های متعددی وجود دارد که هرکدام دارای مزایا و معایبی هستند که بسته به هدف تحقیق انتخاب می‌شوند. ظهور روش‌های نوین ژنتیک مولکولی رویکردهای مناسب و مفیدی جهت انتخاب حیوانات در سال های اولیه‌ی پرورش با توجه به فنوتیپ موردنظر فراهم نموده‌است (Hayes و همکاران، ۲۰۰۹). در جمعیت‌های حیوانی صفات مورفولوژیک و روابط شجره‌ای به‌عنوان معیارهای مطالعه تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. جهت انجام برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر، نشانگرهای مولکولی ابزار مناسبی هستند که تفاوت و تنوع افراد را در سطح ماده ژنتیکی نشان می‌دهند.

در این خصوص، نشانگر SSCP به دلیل آشکارسازی تفاوت-های کوچک در قطعه قابل تکثیر و همچنین تفاوت در ردیف بازی (نه در طول قطعه) مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (پیرانی، ۱۳۸۵).

هورمون رشد طیور (cGH)[1] یک هورمون پلی‌پپتیدی است که از هیپوفیز پیشین ترشح می‌شود و قادر است تغییرات وسیعی در عملکرد فیزیولوژیکی مانند رشد، وضعیت بدن، تولید تخم، پیری و پاسخ‌های ایمنی ایجاد نماید. ژن GH در ماکیان روی کروموزوم شماره ۲۷ قرار دارد و دارای پنج اگزون و چهار اینترون و طول ۴۱۰۱ جفت باز می‌باشد. GH، یک پلی‌پپتید متشکل از ۱۹۲ اسیدآمینه است که در ساختمان آن دو پیوند دی‌سولفور وجود دارد. وزن مولکولی این هورمون ۲۲ هزار دالتون است. وظایف اصلی GH در رشد استخوان و عضلات به واسطه بیان ژن فاکتورهای رشد شبه انسولین یک (IGF-I)[2] می‌باشد. ژن GH اثرات مهمی در رشد و کنترل متابولیسم طیور دارد. هورمون‌هایIGF و GH تنظیم‌کننده‌های مهمی در تحریک رشد، سنتز پروتئین و تکثیر و تمایز انواع سلول‌ها محسوب می‌شوند (Scanes و همکاران، ۱۹۹۹).

Johari و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی چندشکلی ناحیه هضم آنزیمیMPS1 از ژن GH نشان دادند که ارتباط معنی داری بین چند شکلی ها با صفت وزن بدن و تولید تخم مرغ در پنج نسل از بلدرچین ژاپنی وجود ندارد.

با توجه به مطالعات اندکی که در رابطه با ژن GH در روی بلدرچین ژاپنی صورت گرفته، هدف از پژوهش حاضر، بررسی چندشکلی موجود در ژن GH با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و برآورد فراوانی الگوهای ژنوتیپی ژن GH و در نهایت ارتباط الگوهای ژنوتیپی با صفت افزایش وزن بدن (صفت رشد) بود.

---

[1] Chicken Growth Hormone

[2] Insulin-Like Growth Factor 1

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این پژوهش از تعداد ۱۵۰ قطعه بلدرچین ژاپنی (نر- ماده) گله تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی (ایستگاه تحقیقاتی بناب) که دارای رکورد وزن بدن برای سنین ۱۵، ۳۰ ، ۴۵ و ۶۰ روزگی بود، استفاده شد. نمونه‌های خون از ناحیه ورید زیربالی با استفاده از سرنگ‌های یک میلی‌لیتری جمع آوری شدند و به آن‌ها ماده ضد انعقاد (EDTA) اضافه گردید. نمونه ها به همراه یخ به آزمایشگاه ژنتیک و اصلاح نژاد گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه منتقل گردیدند و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج و تعیین کیفیت DNA

استخراج DNA از ۱۰۰ میکرولیتر خون کامل با استفاده از پروتکل پروناز صورت گرفت (Bailes و همکاران، ۲۰۰۷). کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد، ارزیابی شد.

طراحی آغازگرها

ابتدا توالی نوکلئوتیدی ژن GH با طول ۱۶۲ جفت بازی از بانک اطلاعات ژنی، پایگاه NCBI دریافت شد. سپس با استفاده از نرم افزار Primer3 plus اقدام به طراحی آغازگر مناسب شد. با استفاده از نرم افزار Primer BLAST اختصاصی بودن آغازگرها مورد آزمون قرار گرفت. اطلاعات مربوط به آغازگر طراحی شده اختصاصی به شرح زیر می باشد:

Forward Primer GH 5'-GTCGTGGTTTTCTCCTCTC-3'
Reverse Primer GH 5'-AACTCTTTGTACGTCTCTGC-3'

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر رفت (با غلظت ۵۰ mM)، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت (با غلظت ۵۰ mM)، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس و ۷/۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد. واکنش PCR با استفاده از محدوده حرارتی و با تکثیر قطعه مورد نظر با کمک یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه واکنش اصلی (واسرشته-سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۸ درجه به‌مدت ۴۰ ثانیه، دمای توسعه ۷۲ درجه به-مدت ۴۰ ثانیه) و بسط نهایی با ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر بکار گرفته شد. بعد از انجام واکنش PCR ، محصولات واکنش روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شده و با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی گردیدند، برای تشخیص اندازه قطعات تکثیر شده از نشانگر PUC19 (اندازه ۱۰۰ جفت‌بازی) شرکت Fermentas استفاده شد و با استفاده از دستگاه ترانس الومیناتور اشعه UV عکس‌برداری شد.

روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)

به منظور تعیین ژنوتیپ محصولات واکنش PCR از روش SSCP استفاده گردید. برای این منظور ۴ میکرولیتر از محصول PCR با ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس نمونه‌ها به سرعت به روی یخ منتقل شدند. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از دستگاه الکتروفورز عمودی و از ژل پلی آکریلامید غیرواسرشته‌ساز ۸ درصد استفاده شد. نمونه‌ها در ژل پلی آکریلامید با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق الکتروفورز شدند و در نهایت با استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره تعیین ژنوتیپ شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی اثر الگوهای مختلف ژنوتیپی بر روی صفت افزایش وزن بدن بلدرچین از مدل آماری زیر استفاده شد.

$$Y_{ijk}= \mu+ S_i + G_j+ e_{ijk}$$

که در آن، Y_{ijk} میزان افزایش وزن برای هر بلدرچین در دوره‌های پرورشی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روزگی، μ میانگین ارزش های فنوتیپی صفت، S_i اثر ثابت مربوط به i امین جنس، G_j اثر ثابت مربوط به j امین ژنوتیپ و e_{ijk} اثرات باقیمانده (خطای آزمایش) می‌باشد. صفات مورد بررسی، توسط رویه مدل‌های خطی عمومی نرم‌افزار SAS 9.1 مورد آنالیز قرار گرفتند. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

قطعه ۱۶۲ جفت بازی از ژن GH به‌خوبی تکثیر شدکه نشان می-دهد آغازگرها برای این ناحیه به‌خوبی طراحی شدند و کاملاً اختصاصی عمل کردند، زیرا هیچ‌گونه باند غیراختصاصی در محصولات واکنش PCR دیده نشد (شکل ۱). نتایج حاصل از الکتروفورز عمودی محصولات SSCP چهار الگوی مختلف ژنوتیپی را روی ژل پلی آکریلامید نشان داد که این بیانگر چندشکلی و وجود تنوع ژنتیکی در جایگاه اگزون دو از ژن GH در بلدرچین ژاپنی بود (شکل ۲).

فراوانی الگوهای ژنوتیپی به‌دست آمده در جمعیت بلدرچین به ترتیب ۱۱/۶۴، ۱۵/۷۵، ۳۷/۶۷ و ۳۴/۹۴ درصد بود که الگوی ژنوتیپی ۳ بیشترین فراوانی و الگوی ژنوتیپی ۱ کمترین فراوانی را دارا بودند. ارتباط بین الگوهای ژنوتیپی و صفت وزن بدن در سنین ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روزگی مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میانگین اثر الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده ژن GH بر روی صفت افزایش وزن بدن بلدرچین در جدول ۱ ذکر گردید. بین الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده با صفت وزن بدن در هیچ دوره پرورشی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در ارتباط با تاثیر جنس نیز در دوره پرورشی ۶۰ روزگی تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P\leq$۰/۰۱) و وزن بلوغ در بلدرچین ماده بیشتر از بلدرچین نر بود (جدول ۲).

Johari و همکاران (۲۰۱۳) چندشکلی ژن GH و ارتباط آن با صفت وزن بدن و تولید تخم را در پنج نسل از بلدرچین ژاپنی با استفاده از تکنیک RFLP[2] بررسی کردند. سه گروه از بلدرچین‌های ماده دارای وزن بالا(Q-H)، وزن پایین (Q-L) و وزن تصادفی (Q-R) انتخاب شدند. تاثیر ژن GH بر روی صفت وزن بدن، در بلدرچین با وزن بالا (Q-H) به میزان ۱/۵۳ برابر بیشتر از بلدرچین با وزن پایین (Q-L) و ۱۲/۳۷ برابر بیشتر از بلدرچین با وزن تصادفی (Q-R) بود. ژنوتیپ BB برای Q-L و ژنوتیپ AA برای Q-H شناسایی شد. بررسی‌ها نشان داد که ژن GH در این جمعیت دارای چند شکلی است. نتایج نشان داد این ژن اثر معنی‌داری بر روی صفت وزن بدن و تولید تخم‌مرغ در هیچ یک از دوره‌های تولیدی ندارد. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر در چندشکلی بودن ژن GH و وجود الگوهای ژنوتیپی مختلف و عدم برقراری ارتباط با صفت وزن بدن مطابقت داشت.

طی مطالعه‌ای که برای شناسایی چندشکلی ژن GH در جمعیت مرغ بومی آذربایجان غربی انجام گرفت، قطعه‌ای به اندازه ۷۷۶ جفت باز از ناحیه اینترون یک ژن GH با استفاده از PCR تکثیر و به وسیله RFLP مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده وجود سه نوع آلل A_1 ، A_2 و A_3 به ترتیب با فراوانی ۳۱/۱۲ ، ۱۷/۸۶ و ۵۱/۰۲ درصد بود. نتایج نشان داد که جایگاه اینترون یک ژن GH در این جمعیت دارای تنوع ژنتیکی بالایی بوده و می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی بکار گرفته شود (خاکپور و همکاران، ۱۳۹۰).

بررسی چندشکلی ژن GH در ۲۰ جمعیت از نژادهای مختلف مرغ انجام گرفت، نتایج حاکی از وجود هشت الگوی هضم آنزیمی در جایگاه اینترون چهار بود. محققان در نژادهای لاین ۱ دو آلل A و B، در نژادهای گوشتی چهار آلل A، B، C و D، در هیبریدهای 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 (Nie و همکاران، ۲۰۰۲).

[2] Restriction Fragment Length Polymorphism

در پژوهشی چندشکلی ناحیه اینترون یک ژن GH در ارتباط با صفات رشد در مرغ نژاد Kadaknath مورد بررسی قرار گرفت. ناحیه '5-C↓C G G-3' مورد هضم آنزیمی و توالی یابی قرار گرفت و دو آلل A_1 و A_3 و سه الگوی ژنوتیپی A_1A_1، A_1A_3 و A_3A_3 شناسایی شد. فراوانی الگوهای ژنوتیپی به‌دست‌آمده با استفاده از آزمون مجذور کای اسکوار مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت معنی‌داری بین الگوهای ژنوتیپی بر روی صفت رشد گزارش نشد اما جمعیت در تعادل هاردی-واینبرگ بود (Thakur و همکاران، ۲۰۰۶).

چندشکلی ناحیه اینترون یک ژن GH در لگهورن سفید بانتام مورد بررسی قرار گرفت. پنج الگوی ژنوتیپی توسط تکنیک RFLP شناسایی شد. تجزیه تحلیل‌های آماری بین ژنوتیپ‌های این ناحیه با صفت وزن بدن در۳۶ -۲۰ هفتگی و تولید تخم‌مرغ در ۶۰-۴۰ روزگی ارتباط معنی‌داری را نشان داد (Pipalia، ۲۰۰۳).

چندشکلی تک نوکلئوتیدی[1] (SNP) ژن GH و ارتباط آن با صفات رشد و صفات لاشه در مرغ مورد بررسی قرار گرفت. تکثیر توالی ژن GH با استفاده از دو آنزیم برشی EcoRI و MspI انجام شد. جهش‌های تک نوکلئوتیدی در ناحیه اینترون ۳ (G→ A) و اینترون چهار (C→ T) گزارش شد. سه الگوی ژنوتیپی AA, Aa, aa توسط آنزیم برشی MspI و سه الگوی ژنوتیپیbb, Bb وBB بوسیله EcoRI شناسایی شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان داد ارتباط معنی‌داری بین نواحی تکثیر شده با برخی از صفات لاشه مانند وزن ماهیچه و میزان چربی شکمی وجود دارد، درحالی‌که بین سایر صفات از قبیل صفت رشد و برخی دیگر از صفات لاشه از قبیل وزن لاشه، وزن کبد، وزن ساق پا و غیره در دوره‌های ۱، ۶ و ۱۲ هفتگی ارتباط معنی‌داری گزارش نشد (Bingxue و همکاران، ۲۰۰۳).

چندشکلی جایگاه ژنی GH و گیرنده هورمون رشد[2](GHR) و ارتباط آنها با صفت وزن بدن در جمعیت مرغ بومی مازندران مورد بررسی قرار گرفت. توالی ناحیه مدنظر از ژن GH با طول قطعه ۱۰۵۰ جفت باز و GHR با طول ۷۱۸ جفت باز تکثیر شد. با استفاده از آنزیم برشی SacI در ژن GH دو آلل + و - و با استفاده از آنزیم برشی HindIII دو آلل A و B شناسایی شد. برای ژن GH سه الگوی ژنوتیپی و برای ژن GHR دو الگوی ژنوتیپی گزارش شد. آنالیز آماری مربوط به ژن GH ارتباط معنی‌داری را با صفت وزن بدن در سن ۱۲ هفتگی نشان داد ($P<0.03$) ولی روابط بین الگوهای ژنوتیپ‌های GHR و GH برای وزن بدن در سایر دوره ها معنی‌دار نبود (عنایتی و همکاران ۱۳۹۰).

تنوع ژن GH و ارتباط آن بر روی صفات رشد و صفات لاشه در چهار نژاد مرغ (لگهورن، WRR، Taihe Silkies و X)توسط تکنیک RFLP مورد بررسی قرار گرفت و ژن GH توالی یابی شد. ارتباط بین SNPs و هاپلوتایپ‌ها در بررسی با صفات در نسل دوم (F_2) از مرغ‌ها انجام شد. از کل 46SNP، چهار SNP در ناحیه 5UTR، یک SNP در ناحیه 3UTR، پنج SNP در اگزون و ۳۶ SNP در ناحیه اینترون گزارش شد. چندشکلی در پنج ناحیه از ژن GH گزارش شد. ژن GH در جمعیت مورد مطالعه تنوع بالایی داشت. آنالیزهای آماری نشان‌دهنده وجود ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی ها با صفت وزن بدن و صفت لاشه بود (Nie و همکاران، ۲۰۰۵).

در تحقیقی با استفاده از تکنیک RFLP، چند شکلی ژن GH در جمعیت مرغ بومی اصفهان و مازندران بررسی شد. سه الگوی ژنوتیپی A_1، A_2 و A_3 با فراوانی ۰/۶، ۰/۲۱ و ۰/۱۹ درصد درمرغ بومی اصفهان و ۰/۲۸، ۰/۰۵ و ۰/۶۷ درصد در مرغ بومی مازندران گزارش شد. بررسی انجام گرفته چندشکلی را در ناحیه اینترون چهار گزارش کرد (Jafari و همکاران، ۲۰۱۵).

بررسی چندشکلی ژن GH و ارتباط آن با صفات رشد در چهار گروه مختلف (A، B، C، D) از جوجه‌های گوشتی آرین در سن شش هفتگی انجام شد. توسط آنزیم برشی MspI ناحیه اینترون یک با طول قطعه ۷۷۶ جفت بازی برش داده شد. سه نوع آلل A_1، A_2 و A_3 شناسایی شد. نتایج نشان داد که ژن GH دارای چندشکلی بوده و ارتباط معنی‌داری با صفات رشد دارد و میتواند به‌عنوان یک ژن کاندید در بررسی صفات رشد معرفی گردد (Asghari و همکاران، ۲۰۱۳).

[1] Single Nucleotide Polymorphism
[2] Growth Hormone Receptor

چندشکلی ژن GH در جمعیت مرغ بومی و ارتباط آن با صفت تولید تخم‌مرغ مورد بررسی قرار گرفت. دو آنزیم برشی SacI و MspI به ترتیب برای تیپ وحشی و تیپ نرمال جمعیت مرغی استفاده شد. با استفاده از آنزیم MspI سه آلل A، B و C به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۵۹۹، ۰/۱۰۲ و ۰/۲۹۹ و شش الگوی ژنوتیپی AA، BB، CC، AB، AC و BC شناسایی گردید. آنالیزهای آماری انجام‌گرفته گویای تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت بود. ارتباط معنی‌داری بین الگوهای ژنوتیپی با صفت تولید تخم‌مرغ گزارش شد (Makhsos و همکاران، ۲۰۱۳).

بررسی چندشکلی ژن GH و ارتباط آن با صفات رشد و لاشه در جوجه‌های نسل دوم (F_2) با استفاده از تکنیک RFLP انجام گرفت و چندشکلی‌هایی در ناحیه اینترون سه و چهار شناسایی گردید. آنالیز حداقل مربعات نشان داد که این ژن اثرات معنی‌داری با برخی از صفات رشد و صفات لاشه دارد (Yan و همکاران، ۲۰۰۳).

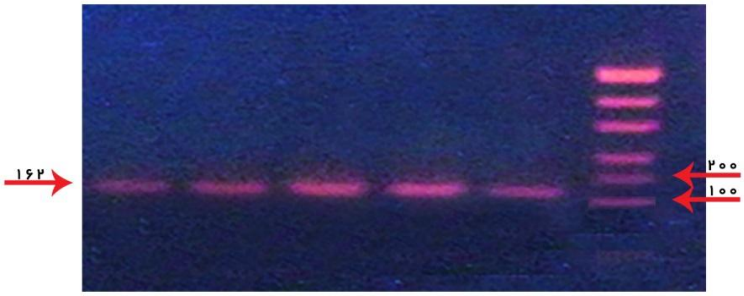
بررسی چندشکلی ژن GH در نژاد لگهورن سفید با استفاده از تکنیک RFLP انجام شد. مطالعات حاکی از وجود چندشکلی در ناحیه اینترون یک با طول قطعه ۷۷۰ جفت باز و اینترون چهار با طول قطعه ۱۲۱۶ جفت باز بود. پژوهشگران نشان دادند ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ناحیه اینترون یک و چهار با صفات رشد مرغ وجود دارد (Brahmkshtri و Solanki، ۲۰۰۳).

چندشکلی ژن GH و ارتباط آن با صفات رشد در غاز مورد مطالعه قرارگرفت. نتایج این پژوهش نشان داد دو جهش تک نوکلئوتیدی در جایگاه P_2 وP_4 به ترتیب منجر به ایجاد ده و سه ژنوتیپ شده است. آزمون حداقل مربعات ارتباط معنی‌داری را با صفات رشد نشان داد (Ming Zhao و همکاران، ۲۰۱۱).

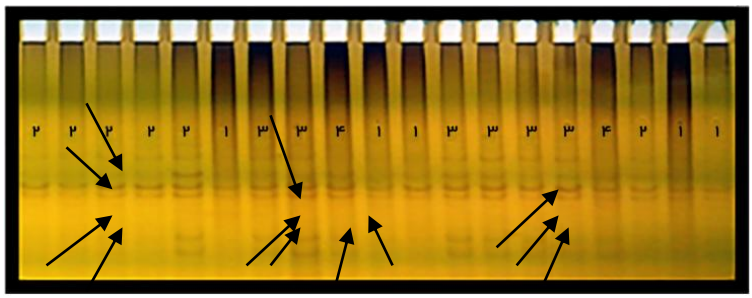
بررسی چندشکلی ژن IGF-I و GH با استفاده از تکنیک RFLP بر روی صفات تولیدی تخم‌مرغ در گونه‌ای از مرغ Wenchang انجام گرفت. نتایج نشان داد که ژن GH در ناحیه اینترون پنج و ژن IGF-I در ناحیه 5UTR دارای چندشکلی می‌باشند. ژن GH دارای آلل C و D به ترتیب با فراوانی ۰/۱۹ و ۰/۸۱ درصد و دو الگوی ژنوتیپی CC و DD شناسایی و برای ژن IGF-I فراوانی آللی A و B به ترتیب با فراوانی ۰/۵۳ و ۰/۴۷ درصد و با سه الگوی ژنوتیپی AA، AB و BB شناسایی شد. طول قطعه تکثیری ژن GH، ۷۴۰ جفت باز و یک جابجایی (C→T) و طول قطعه تکثیری IGF-I، ۶۲۱ جفت باز بود. آنالیزهای آماری انجام گرفته با استفاده از نرم افزارهای آماری ارتباط معنی‌داری را بین ژن GH با صفتEST (ضخامت پوسته تخم مرغ) و ژن IGF-I با صفات ESW (وزن پوسته تخم مرغ) و ESS (اندازه تخم مرغ) نشان داد (Huifang و همکاران، ۲۰۱۰).

نتیجه گیری

در این پژوهش برای جایگاه ژنی اگزون ۲ ژن GH چهار الگوی مختلف ژنوتیپی شناسایی شد که فراوانی‌های بدست آمده حاکی از وجود تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا در این جایگاه می‌باشد. صفات رشد مورد مطالعه با الگوهای ژنوتیپی بدست آمده ارتباط معنی-داری نداشت. تکنیک SSCP می تواند به‌عنوان یکی از ابزارهای مناسب و کم‌هزینه در شناسایی SNP مورد استفاده قرار گیرد. صرفاً استفاده از روش PCR-SSCP برای بررسی تنوع کافی نیست و باید سایر روش‌های دیگر نیز مورد استفاده قرار گیرند. همچنین از آنجایی‌که ژن GH به‌عنوان یکی از عوامل محرک رشد می‌باشد و با توجه به نقش مهم GH و اثراتی که این هورمون بر صفات مهم تولیدی و اقتصادی دارد، بررسی ژنوتیپ‌های متنوع در این جایگاه از ژن GH در بلدرچین ژاپنی و تحقیقات بیشتر در رابطه با سایر جایگاه‌های ژنی و دیگر صفات می‌تواند زمینه‌ساز اطلاعات مفیدی جهت برنامه‌ریزی برای اصلاح نژاد هر چه بیشتر این پرندگان شود.



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR برای ژن GH بر روی ژل آگارز ۱/۵٪



شکل ۲: الگوهای SSCP ژن GH بر روی ژل پلی اکریلامید ۸٪

جدول ۱: مقایسه میانگین الگوهای مختلف ژنوتیپی، ژن GH بر روی صفت رشد در بلدرچین(گرم)

الگو	۱۵ روزگی	۳۰ روزگی	۴۵ روزگی	۶۰ روزگی
(۱)	۳۵/۱۷۶±۱/۲۷	۱۰۳/۲±۳/۶۷	۱۶۶/۸۱۸±۵/۷۴	۲۱۶/۵۲۹±۶/۸۶
(۲)	۳۲/۶۹۶±۱/۱	۹۴/۵۷±۳/۱۸	۱۵۵/۹۴۱±۴/۹۷	۲۰۰/۷۳۹±۵/۹۴
(۳)	۳۲/۵۶۴±۰/۷۲	۱۰۰/۶۹±۲/۰۸	۱۶۶/۸۱۸±۳/۲۵	۲۱۳/۲۳۶±۳/۸۹
(۴)	۳۳/۹۸±۰/۷۳	۱۰۱/۱۱۸±۲/۱۲	۱۶۳/۷۴۵±۳/۳۱	۲۱۱/۴۷۱±۳/۹۵
P value	۰/۲۶۲۳^{ns}	۰/۲۶۱۳^{ns}	۰/۲۴۰۸^{ns}	۰/۱۹۵۳^{ns}

جدول ۲: مقایسه میانگین تأثیر جنس بر روی صفت رشد در بلدرچین(گرم)

جنس	۱۵روزگی	۳۰ روزگی	۴۵روزگی	۶۰ روزگی
ماده	۳۳/۲۲	۹۹/۹۵	۱۶۵/۳۱	۲۲۲/۵۸^{a}
نر	۳۲/۸۶	۹۹/۳۹	۱۵۹/۶۷	۱۹۶/۲۶^{b}
P value	۰/۷۲۶ ^{ns}	۰/۱۶۰ ^{ns}	۰/۴۱۷ ^{ns}	۰/۰۲۹*

حروف لاتین در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد

منابع

اکبری، م. (۱۳۹۲). ارزیابی تنوع ژنتیکی و فراوانی آللی ژن پرولاکتین در مرغان بومی استان آذربایجان غربی. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه.

قادرزاده، م. هاشمی، ع و مردانی، ک. (۱۳۹۲). مطالعه چندشکلی اینترون ۴ ژن Ghrelin در مرغ بومی آذربایجان غربی با استفاده از روش PCR-SSCP. مجله ژنتیک نوین، شماره ۴، ص ص. ۴۱۰-۴۰۳.

پیرانی، ن. (۱۳۸۵). درس‌نامه کارگاه آموزشی کاربرد بیوتکنولوژی در علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

خاکپور، ک. مردانی، ک و هاشمی، ع. (۱۳۹۰). شناسایی چندشکلی‌های ناحیه اینترون ۱ ژن هورمون رشد در جمعیت مرغ بومی استان آذربایجان غربی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP. نشریه پژوهش‌های علوم دامی، شماره سوم، ص ص. ۳۰-۲۱.

راشدی، آ. فیاضی، ج و وطنخواه، م. (۱۳۹۲). بررسی روند هم‌خونی و اثر آن بر عملکرد صفات رشد در گوسفند نژاد لری بختیاری. مجله‌ی پژوهش در نشخوارکنندگان، شماره سوم، ص ص. ۷۸-۶۵.

رجایی اربابی، م. ع. (۱۳۸۴). اهمیت پرورش بلدرچین ژاپنی Coturnix Japonica از نظر اصلاح نژاد. جهان دامپروری، شماره نهم، ص ۴۲.

عنایتی، ب. رحیمی میانجی، ق. شادپرور، ع. (۱۳۹۰). چندشکلی در جایگاه‌های ژنی GH و GHR و ارتباط آن‌ها با ارزش‌های فنوتیپی و اصلاحی صفات وزن بدن در مرغان بومی مازندران. نشریه علوم دامی، شماره ۲، ص ص ۲۶-۲۰.

Asghari, G., Seyedabadi, HR. and Lak. A. (2013). Association of growth hormone gene polymorphism with growth and fatness traits in Arian broilers. *International Journal of Biosciences*. 216- 220.

Bailes, S., Devers, M., Kirby, J. D. and Rhoads, D.D. (2007) . An inexpensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high- throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. *Poultry Science*. 86: 102- 106.

Bingxue, Y., Xuemel , D., Jing, F., Xiaoxing, H., Changxin, W. and Ning, L. (2003). Single nucleotide polymoephism analysis in chicken growth hoemone gene and its associations with growth and carcass traits. *China Science Bulletin* 15: 1561- 1564.

Brahmkshtri, B.P. and Solanki, J.V. (2003). Growth hormone gene polymorphism in Bantam, White Leghorn and Bantamised White Leghorn. *Indian Journal of Poultry Science* .38(3): 206- 211.

El-Tarabany, M. S., Awad, A. and El-Bayomi, K. M. (2014). Genetic polymorphism of prolactin, bone morphogenetic protein receptor 1B and Insulin- like growth factor 1 genes in two selected lines of Japanese quail. *Life Science Journal*. 11(6): 408-416.

Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A.J. and Goddard, M. E. (2009). Genomic selection indairy cattle: Progress and challenges. *Journal Dairy Sciences*. 92: 433–443

Huifang, Li., Wenqi, Zhu., Kuanwei, Chen., Weitao, Song., Jingting, S. and Wei, Han. (2010). Effects of the Polymorphisms of GHR Gene and IGF-I Gene on Egg Quality in Wenchang Chicken. *Journal of Poultry Sciences* 3(2):19-22.

Jafari, A., Pakdel, A. and Esmailkhanian, S. (2015). Growth Hormone Gene Polymorphism in Two Iranian NativeFowls (Short Communication). *Poultry Science Journal*. 3 (1): 99- 104.

Johari, S., Setiati, N., Sidadolog, J. H. P., Hartatik. T. and Yuwanta,T. (2013). The Gene Effect of Growth Hormone on Body Weight and Egg Production in Divergent Selection for Five Generation of Japanese Quail (Coturnix japonica). *International Journal of Poultry Scinces*. 12:489- 494.

Kan, X. Z., Li, X. F., Lei, Z. P., Chen, L., Gao,H. and Yang, Z. Y. (2010). Estimation of divergence times for major lineages of galliform birds: evidence from completemitochondrial genome sequences. *Africa Journal Biotechnology*. 9, 3073–3078.

Kawahara-Miki, R., Sano, S., Nunome, M., Shimmura, T., Kuwayama, T., Takahashi, S., Kawashima, T., Matsuda, Y., Yoshimura. and T. Kono, T. (2013). Next-generation sequencing reveals genomic features in the Japanese quail. *Genomics*. 101: 345-353.

Makhsos, G. S., Mirhoseini, Z. S., Zamiri, M. J. and Niazi, A. (2013).Polymorphism of growth hormone gene in a native chicken population: association with egg production. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* .73-77.

Ming Zhao, W., Rong- Xue Zhao, R., Qiao, N., Xu, Q., Yang Huang, Zh., Li, X., Hong Che, Y. and ZH, Gu. (2011). Association of GH Polymorphisms with Growth Traits in Goose. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 692-697.

Mmereole, F. U. and Obinne, J. I. (2010) Relationship of the body weight and linear measurements of the west African Dwarf (WAD) sheep under the humid environment of Nigeria. *Agricultura Tropica et Subtropica*. 43(1): 64-67.

Nie, Q., Liu, N., Zhang, X., Leung, F. C. and Yang, G. (2002). New variation in intron 4 of growth hormone Gene in Chinese Native Chickens. *journal of Heredity*. 277-279.

Nie, Q., Sun, B., Zhang, D., Luo, C., Ishag, N.A., Lei, M.; Yang, G. and Zhang, X. (2005). High Diversity of the Chicken Growth Hormone Gene and Effects on Growth and Carcass Traits. *Journal of Heredity*. 96(6): 698–703.

Pipalia, D. L. (2003). Growth hormone gene polymorphism in Bantam, White Leghorn and BantamisedWhite Leghorn. *Indian Journal Poultry Sciences* .38: 206-211.

Scanes, C., Proudman, J.A. and Radecki, S.V. (1999). Influence of continuous growth hormone insulin-like growth factor I administration in adult female chickens. *General and Comparative Endocrinology*. 315-323.

Thakur, M. S., Parmar, S. N., ToJenkhomba, T. C., Srivastava, P. N., Joshi, C. G., Rank, D. N., SoJanki, J. V. and Pillai, P. C. (2006). Growth hormone gene polymorphism in Kadaknath breed of poultry. *Indian Journal Biology*. 5: 189- 194