Archive of

Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Investigation of heat shock protein 70 gene polymorphism in Khuzestan native chickens

Mahmood Nazari

*Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran. Tel: 09166036404, Email: M. Nazari@asnrukh.ac.ir

Fatemeh Salabi

Assistant Professor, Department of Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. Email: F.salabi@rvsri.ac.ir

Sosan Radpoor

PhD Student of Animal Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran, Email: S.radpoor90@yahoo.com

Abstract

Objective

Heat shock protein 70 (Hsp70) are a family of molecular chaperones, which promote protein folding and participate in many cellular functions. The purpose of the study was to identify the polymorphisms of heat shock protein 70 gene of Khuzestan native chickens using SSCP technique.

Materials and methods

For this purpose, blood samples were collected from 130 native chicken from Shosh, Ramhormoz, Andimeshk cities and Jihad native chicken breeding station (Bavi city). After DNA extraction, the target area (892 base pair) was amplified using polymerase chain reaction (PCR) method and sequenced.

www.SID.ir

Archive of SID

Results

PCR-SSCP analysis of these regions indicated the presence of polymorphisms in the beginning of the coding region and the sequencing of the PCR products confirmed and identified two polymorphic sites in this region: a transition A → G in position +259 (A259G) and a transversion C→G in position +277 (C277G). The results showed that Hsp70 gene is polymorphic in the studied area. Moreover, using the chi-square (X2) showed that the locus allele frequencies is not in Hardy-Weinberg equilibrium. Furthermore, the observed heterozygosity and the effective number of alleles demonstrated high diversity in the population. Moreover, Haplotype H3 has the highest frequency in the population. It occurs A259G mutants in this haplotype.

Conclusions

Thus, these valuable gene pools should be conserved to be used in the future if needed. The selection at Jihad native chicken breeding station (Bavi city) has led to increased inbreeding and, as a result, the abundance of haplotype H3 in the population.

Key words: Polymorphism, Heat shock protein 70 gene, Native chickens

Citation: 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.

Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 81-100.
DOI: 10.22103/jab.2020.12806.1081
Received: January 11, 2020; Accepted: February 26, 2020.
© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی چندشکلی ژن Hsp70 در مرغ‌های بومی استان خوزستان

محمود نظری

*نویسنده مسئول، استادیار گروه علوم دامی –دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی –دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان–ملاثانی–ایران. تلفن ۰۹۱۶۶۰۳۶۴۰۴ ایمیل: M.Nazari@asnrukh.ac.ir

فاطمه ثعلبی

استادیار سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اهواز، گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، اهواز، ایران. ایمیل: F.salabi@rvsri.ac.ir

سوسن رادپور

دانشجوی دکتری علوم دامی –دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی –دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان–ملاثانی–ایران. ایمیل: S.radpoor90@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۷

چکیده

هدف: پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ (Hsp70) خانواده‌ای از چاپرون‌های مولکولی هستند که برای تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها و بسیاری از فعالیت های سلولی مورد نیاز هستند. هدف از این تحقیق تعیین چندشکلی ژن شوک حرارتی ۷۰ مرغ بومی استان خوزستان با استفاده از تکنیک SSCP بود.

مواد و روش‌ها: بدین منظور از ۱۳۰ مرغ بومی شهرستان‌های اندیمشک، شوش، رامهرمز و ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی جهاد (شهرستان باوی) خونگیری به‌عمل آمد. پس از استخراج DNA، ناحیه موردنظر (۳۵۹ جفت بازی ابتدای ژن) توسط آغازگرهای اختصاصی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر و توالی‌یابی شد.

نتایج: نتایج نشاندهنده وجود چندشکلی در قسمت ابتدایی ژن شوک حرارتی ۷۰ بود که توسط توالی‌یابی محصولات PCR تایید گردید و دو جایگاه چندشکل در این منطقه شناسایی شد: یک جهش از نوع انتقال در موقعیت ۲۵۹+ (A259G) سبب جایگزینی گوانین با آدنین و یک جهش از نوع جابجایی در موقعیت ۲۷۷+ (C277G) سبب جایگزینی گوانین با سیتوزین. آزمون مربع کای نشان داد که جایگاه‌های مورد بررسی در حالت تعادل هاردی–وینبرگ نیستند. به‌علاوه، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و تعداد آلل

www.SID.ir

Archive of SID

موثر نشان داد که میزان تنوع این جایگاه‌ها در جمعیت بالاست. بعلاوه، هاپلوتیپ H3 بیشترین فراوانی را در جمعیت داشت. در این هاپلوتیپ جهش از نوع A259G رخ داده است.

نتیجه گیری: باید در حفظ این جمعیت کوشید تا در آینده بتوان از این مخازن با ارزش در صورت نیاز اسفاده نمود. انتخاب در مرکز اصلاح نژاد دام جاهد سبب افزایش همخونی و در نتیجه فراوانی هاپلوتیپ H3 در جمعیت شده است.

کلمات کلیدی: چندشکلی، ژن شوک حرارتی ۷۰ ، مرغ‌های بومی

مقدمه

پروتئین شوک حرارتی (HSP) بر اساس وزن مولکولی زیر واحدهای آن در خانواده¬های متفاوتی شاملHSP90 ، HSP70، HSP60، HSP40 وHSP های کوچک تقسیم می¬شود. ژن شوک حرارتی ۷۰ مرغ بر روی کروموزوم ۵ قرار گرفته است و دارای ۱۹۰۴ جفت باز می‌باشد. این ژن از یک اگزون تشکیل شده است و اینترون ندارد .(Masodi et al. 2012) در سلول¬های پستانداران چندین نوع HSP وجود دارد که عملکردی مانند چاپرون¬های مولکولی دارند و برای تاخوردگی صحیح و حفظ یکپارچگی ساختار در شرایط رشد طبیعی ضروری هستند .(Santoro 2000) در حالی که وجود شرایط استرس به مدت طولانی به دلیل تاثیر بر عملکرد پروتئینها تبعات منفی بر عملکرد سلول دارد بطوریکه به مرگ سلول و یا بافت منجر شود، القاء سنتز HSP می¬تواند باعث افزایش مقاومت نسبت به تنش و ایجاد فرآیند محافظت سلول در برابر آسیب¬های ایجاد شده از تنش گردد .(Morimoto et al. 1997) یک عملکرد حفاظتی متداول HSP در طول شرایط تنش حفاظت از پروتئین¬هایی است که به عنوان ترکیبات حد واسط هستند که در تا خوردگی مجدد به شکل صحیح نقش دارند .(Mezquita 2001)

از طرف دیگر، پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه¬ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن ۵ قبل از میلاد تا تقریبا قرن ۷ میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود. در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه¬ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره¬ها نیز توسعه و گسترش جمعیت¬های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری¬های باستان شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان¬های باستان تأیید کرده است (Mohammadabadi et al. 2010). بر اساس تحقیقات West and Zhou استخوان¬های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته¬اند. دو کشف در تپه یحیی (Tepe Yahya) (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ قبل از میلاد و ۱۰۰۰ قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ قبل از میلاد

www.SID.ir

Archive of SID

(Mohammadabadi et al. 2010). همچنین، پرورش مرغ بومی با توجه به خصوصیات منحصر به فرد آن از جمله مقاومت در برابر شرایط سخت محیطی مخصوصا آب و هوای گرم و خشک، هزینه پایین نگهداری و پرورش، بازار پسندی و کیفیت مطلوب تولیدات از دیر باز مورد توجه بوده است. حفظ این ذخائر بعلت مزایایی که مرغ های بومی کشور در سازگاری با شرایط محیطی، مدیریتی، بهداشتی و تغذیه ای دارند امر مهمی است (Gheisari, 2005). از طرفی، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم¬های مولکولی در زمره مهم¬ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی¬شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می¬نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می¬کند کنترل می¬شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری E.coli کشف شد. بیان ژن های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می-باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت ها بیان می شود و نیز بیان ژن¬ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت¬ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت¬هایی که آن محصول را می¬سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می¬شود (Mohammadabadi et al. 2017). یکی از اقدامات اساسی در حیوانات اهلی مطالعه ژن¬ها و پروتئین¬های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari et al. 2016). یکی از این ژن¬های مهم شوک حرارتی ۷۰ است. اگر چه مطالعات ملکولی متعددی روی طیور در ایران انجام شده است (Zandi et al. 2014; Mohammadifar et al. 2011; Mohammadifar et al. 2014; Mohammadifar and Mohammadabadi 2017; Shahdadnejad et al. 2016; Moazeni et al. 2016a; Moazeni et al. 2016b). اما تا کنون چندشکلی ژن شوک حرارتی ۷۰ (Hsp70) در مرغ‌های بومی استان خوزستان مطالعه نشده است. تحقیقات نشان دهنده جهش در توالی پروتئین شوک حرارتی است (Tamzil et al. 2013; Mazzi et al. 2003) که در بعضی موارد گزارشات ارائه شده نشان دهنده تاثیر این جهش بر بیان این پروتئین بوده است (Zhen et al. 2006). با توجه به اینکه مرغان بومی استان خوزستان نسبت به شرایط آب و هوایی گرم سازگاری یافته‌اند نیاز است که اطلاعاتی در مورد ساختار این ژن و چگونگی پراکندگی آن در جمعیت بدست آورد. لذا هدف از این تحقیق بررسی چندشکلی ژن شوک حرارتی ۷۰ (Hsp70) در مرغ‌های بومی استان خوزستان بود.

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از ۱۳۰ قطعه مرغ بومی از شهرهای مختلف شامل باوی (ایستگاه تکثیر و اصلاح نژاد مرغ بومی)، اندیمشک، شوش و رامهرمز خونگیری صورت گرفت. خون¬گیری از ورید گردنی به میزان ۰/۵ سی‌سی لوله¬های خلا دار حاوی ماده ضد انعقاد EDTAانجام گرفت. پس از اتمام خون گیری نمونه¬ها در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان انجام آزمایشات در فریز با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از خون کامل با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناکلون (ایران) انجام گرفت. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. غلظت DNAبا استفاده از طیف سنجی جذبی اشعه ماوراءبنفش و با دستگاه نانودراپ ساخت کشور آمریکا مدل ۲۰۰۰، اندازه‌گیری شد . در پژوهش حاضر یک قطعه ۳۵۹ جفت نوکلئوتیدی که از نوکلئوتید ۱۰۵ تا ۴۴۳ ژن شوک حرارتی ۷۰ را پوشش می¬داد به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر شد. جهت تکثیر از آغازگرهای ارائه شده در جدول ۱ استفاده گردید .(Mazzi et al. 2003)

جدول ۱. توالی و خصوصیات پرایمر مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. The sequence and characteristics of the primer used in this study

توالی پرایمر (Primer sequence)	دمای اتصال (سانتیگراد) Annealing Temperature (^{0}C)	اندازه محصول (جفت باز) Product size (base pair)
F3: 5'-AACCGCACCACACCCAGCTATG -3'	64	359
R3: 5'-CTGGGAGTCGTTGAAGTAAGCG -3'		

برای تشخیص چندشکلی از تکنیک SSCP استفاده گردید. جهت انجام تکنیکSSCP ، مقدار ۵ میکرولیتر از محصولات تکثیرشده با ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP شامل ۰/۹۸ درصد فرمامید،۰/۰۲۵ درصد زایلن سیانول،۰/۰۲۵ درصد بروموفنل بلو و 10 Mm از (EDTA) مخلوط شد. بعد از اضافه کردنDNA، میکروتیوب‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس، بلافاصله پس از خارج کردن، میکروتیوب ها روی یخ قرار گرفتند. بعد از گذشت ۵ دقیقه ۱۰ میکرولیتر از مخلوط محصولات PCR همراه با بافر بارگذاری SSCP با استفاده از سیستم الکتروفورز عمودی با ولتاژ ۱۶۰ به

www.SID.ir

Archive of SID

مدت ۱۲ ساعت روی ژل آکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز شد. برای تهیه ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد ۱۸ سی‌سی آب دو بار تقطیر را در داخل بشر ریخته سپس ۶ سی‌سی از محلول اکریل آمید به آن اضافه کرده و بلافاصله ۶ سی‌سی TBE(5X)به آن اضافه کردیم، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول آمونیوم پرسولفات نیز به آن اضافه شد و در مرحله آخر مقدار ۵۰ میکرولیتر TEMED را به محلول اضافه کردیم. برای مشاهده ژنوتیپ¬ها از رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد .(Bassam et al. 1991) جهت تعیین توالی نمونه ها به شرکت تکاپوزیست و از آنجا به خارج از کشور فرستاده شد و تعیین توالی نمونه‌ها توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گرفت. توالی های بدست آمده بوسیله نرم افزار وکتور NTI همردیف و جهش‌ها شناسایی شدند. جهت تهیه عکس از توالی موردنظر از نرم افزار Bio Edit استفاده گردید. پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی و تعیین ژنوتیپ تمام نمونه‌ها، کلیه داده‌ها توسط برنامه اکسل مرتب شد سپس وارد نرم‌افزار GENALEX 6.3 گردید و سپس فراوانی آللی، ژنوتیپی و وجود تعادل هاردی وینبرگ مورد بررسی قرارگرفت.

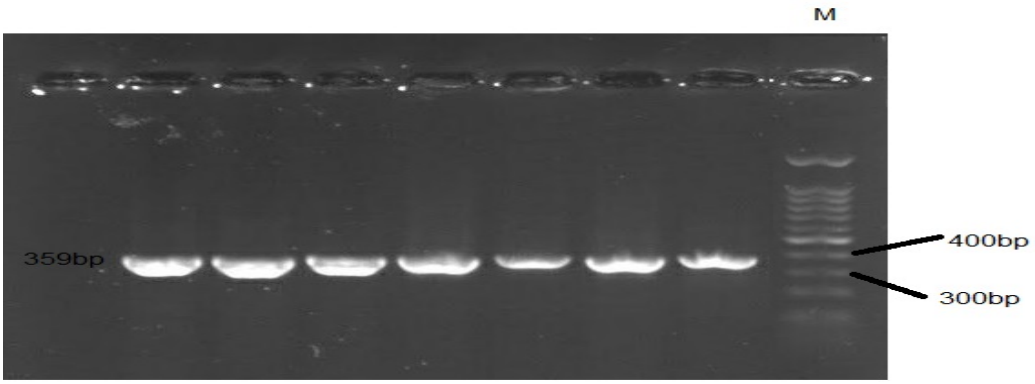
نتایج و بحث

شناسایی چند شکلی و تعیین ژنوتیپ در جایگاه ژنی Hsp70**:** پس از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز (۲٪) مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده تک باند در محدوده‌ی ۳۵۹ جفت نوکلئوتید در مورد همه نمونه‌ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه‌ی موردنظر می‌باشد (شکل ۱). نتایج SSCP نشان-دهنده چندشکلی در این ژن بود. جهش‌های مشاهده شده سبب تغییر نوکلئوتید آدنین A به باز گوانین G در موقعیت نوکلئوتید ۲۵۹ + (A259G) و همچنین تغییر سیتوزین C به باز گوانین G در موقعیت نوکلئوتید ۲۷۷ + (C277G) شده است (شکل ۲). براساس دو جهش مشاهده شده در این قطعه چهار هاپلوتیپ مورد انتظار است که در جدول ۲ این هاپلوتیپ‌ها ارائه گردیده اند. در جمعیت مرغ بومی خوزستان هاپلوتیپ AC (H1) مشاهده نگردید. انواع هاپلوتیپهای شناسایی شده در شکل ۳ نشان داده شده است. این هاپلوتیپ ها با شماره دسرسی MH938652 و MH938653 و MH938654 در ژن بانک NCBI ثبت گردیده است. چندشکلی در مرغ در تحقیقات زیادی گزارش شده است (Tamzil et al. 2013; Mazzi et al. 2003). در تحقیقی چندشکلی ژن شوک حرارتی ۷۰ در سه نژاد مرغ بررسی گردید و نشان داده شد که جهش در موقعیت نوکلئوتید ۲۵۹ + و ۲۷۷+ در هر سه نژاد مختلف وجود دارد و این تغییر در عملکرد و ساختار پروتئین تاثیری ندارد (Mazzi et al. 2003).

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز ژن شوک حرارتی ۷۰ بر روی ژل آگارز ۲ درصد. M: **مارکر** bp100.

Figure 1. Electrophoresis of PCR products for HSP70 gene on the 2% Agarose gel.

جدول ۲. هاپلوتیپ های مشاهده شده برای دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) **موقعیت نوکلئوتید ۲۵۹** + (A259G) **و نوکلئوتید ۲۷۷** + (C277G)

Table 2. Observed haplotypes for two single nucleotide polymorphisms (SNP) of positions A259G and C277G

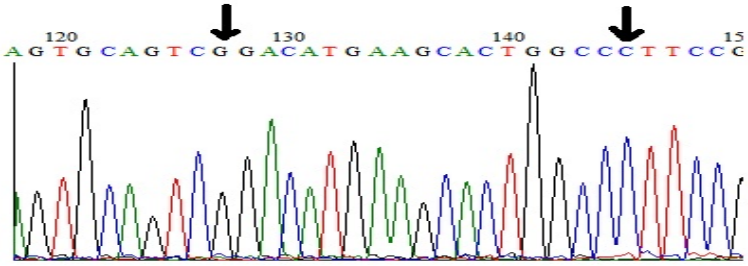
Haplotype	259	277
H1	A	C
H2	A	G
H3	G	C
H4	G	G

تعداد مشاهده شده و مورد انتظار هر ژنوتیپ و فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی در جایگاه نوکلئوتید ۲۵۹+ (A259G) ژن شوک حرارتی ۷۰ مرغ‌های بومی استان خوزستان در جدول ۳ ارائه شده است. ژنوتیپ GG بیشترین تعداد و فراوانی را در جمعیت مورد بررسی نشان داد. ژنوتیپ هتروزیگوت ها (AG) فراوانی پایینی را نسبت به ژنوتیپ GG از خود نشان داد. ژنوتیپ هتروزیگوت ها (AG) کمترین میزان فراوانی را در جمعیت داشت. فراوانی آللی G (۰/۶۰۸) در جمعیت بیشتر از فراوانی آللی A (۰/۳۹۲) بود.

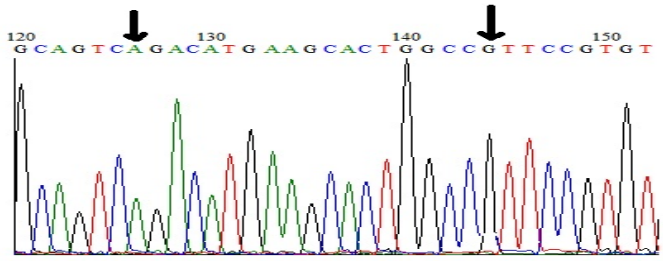
Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

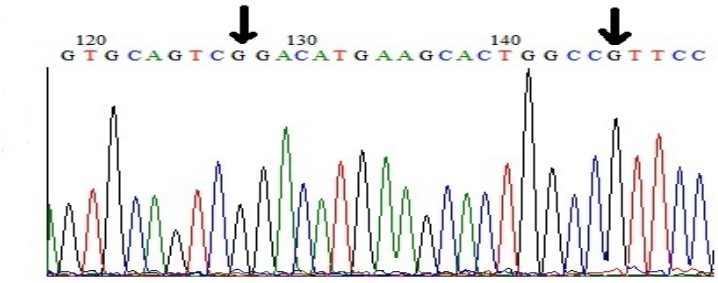
Archive of SID



هاپلوتیپ GC (Haplotype GC)



هاپلوتیپ AG (Haplotype AG)



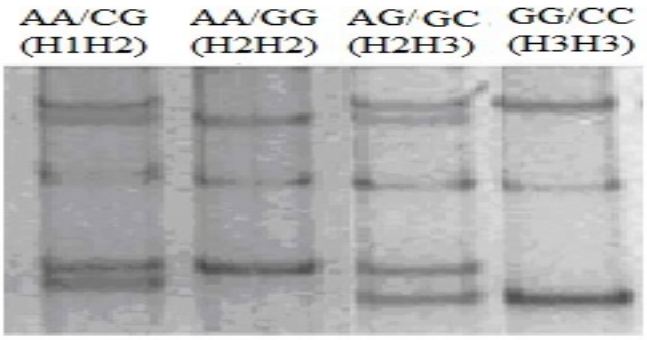
هاپلوتیپ GG (Haplotype GG)

شکل ۲. جهش سبب تغییر نوکلئوتید آدنین A به باز گوانین G در موقعیت نوکلئوتید ۲۵۹ + و همچنین تغییر سیتوزین C به باز گوانین G در موقعیت نوکلئوتید ۲۷۷ + شده است. محل جهشها بر روی نمودار کروماتوگرام نشان داده شده است.

Figure 2. The mutation cause to change in the nucleotide of adenine A to guanine G at the 259 + nucleotide position, as well as the alteration of cytosine C to guanine G at the nucleotide position of 277 +. The location of mutations is shown on the chromatogram chart.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. آنالیز SSCP **محصولات** PCR **اجرا شده بر روی ژل پلی اکریل‌آمید ۸ درصد**

Figure 3. SSCP analysis of PCR fragment electrophoresis was performed on 8% PAGE

جدول ۳. تعداد مشاهده شده و مورد انتظار، فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی در جایگاه باز ۲۵۹ (A259G) **پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ‌های بومی استان خوزستان**

Table 3. Genotypic and allelic frequencies, Number of observed and expected genotypes at the nucleotide position of 259 (A259G) for Heat shock protein 70 (Hsp70) gene of Khuzestan native chickens.

فراوانی آللی		تعداد مورد انتظار	تعداد مشاهدات	ژنوتیپها
G	A	Number of expectation	Number of observation	Genotypes
0.608	0.392	20	36	AA
		62	30	AG
		48	64	GG
		130	130	**جمع** Total

تعداد مشاهده شده، تعداد مورد انتظار و درصد فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی در جایگاه باز ۲۷۷ (C277G) پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ‌های بومی استان خوزستان در جدول ۴ ارائه شده است. ژنوتیپ CC بیشترین تعداد و فراوانی را در جمعیت مورد

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی نشان داد. ژنوتیپ هتروزیگوت ها (CG) فراوانی پایینی را نسبت به ژنوتیپ CC از خود نشان داد. فراوانی آللی C (۰/۶۴۲) در جمعیت بیشتر از فراوانی آللی G (۰/۳۵۸) بود. برای بررسی تطبیق فراوانی های ژنوتیپی مشاهده شده با فراوانی های مورد انتظار براساس فراوانی آللی در هر جایگاه از آزمون کای مربع استفاده گردید که نتایج در جدول ۵ ارائه گردیده است.

جدول٤. تعداد مشاهده شده و مورد انتظار، فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی در جایگاه باز ۲۷۷ (C277G) پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ‌های بومی استان خوزستان

Table 4. Genotypic and allelic frequencies, Number of observed and expected genotypes at the nucleotide position of 277 (C277G) for Heat shock protein 70 (Hsp70) gene of Khuzestan native chickens

فراوانی آللی		فراوانی مورد انتظار	فراوانی مشاهده شده	ژنوتیپها
G	A	expected frequency	observed frequency	Genotypes
0.608	0.392	20	36	AA
		62	30	AG
		48	64	GG
		130	130	**جمع** Total

نتایج آزمون مربع کای (جدول ۵) نشان داد که جایگاه‌های مورد بررسی از تعادل هاردی–وینبرگ خارج شده‌اند و کای مربع بسیار معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$). علت این امر می‌تواند انتخاب طبیعی یا مصنوعی شدید در این مرغ ها، تعداد کم نمونه و عمل سایر نیروهای برهم زننده تعادل باشد. با توجه به این‌که فراوانی آللی G (۰/۶۰۸) در جمعیت بیشتر از فراوانی آللی A (۰/۳۹۲) در جایگاه (A259G) و فراوانی آللی C (۰/۶۴۲) در جمعیت بیشتر از فراوانی آللی G (۰/۳۵۸) در جایگاه (C277G) می‌باشد همین امر سبب شده هاپلوتیپ GC (H3) بیشترین فراوانی را در جمعیت داشته باشد و بنظر می‌رسد ژنوتیپ غالب در جمعیت هاپلوتیپ H3 باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵. آزمون کای مربع داده های ژنوتیپی ژن شوک حرارتی ۷۰ در جمعیت مرغ بومی خوزستان

Table 5. Chi square test of genotype data of Heat shock protein 70 in Khuzestan native chicken population

HWE p value	مربع کای Chi square	درجه آزادی Degree of freedom	جایگاه Location
P < 0.001	34.61	1	نوکلئوتید ۲۵۹ (A259G) Nucleotide +259
P < 0.001	15.66	1	نوکلئوتید ۲۷۷ (C277G) Nucleotide +277

تحقیقات نشان داده که مرغ‌هایی که هاپلوتیپ H3 را دارا هستند در شرایط استرس گرمایی میزان mRNAی پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در بافت های مختلف آنها بیشتر از بقیه هاپلوتیپ‌هاست و شاید بتوان گفت که این هاپلوتیپ احتمالا مقاومت بیشتری نسبت به گرما از خود نشان خواهند داد (Zhen et al. 2006).

تنوع ژنتیکی در مرغ بومی استان خوزستان: میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، تعداد نمونه، تعداد آلل واقعی و اندازه آلل موثر در جایگاه باز ۲۵۹ (A259G) و جایگاه باز ۲۷۷ (C277G) پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ‌های بومی استان خوزستان در جدول ۶ ارائه گردیده است. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جایگاه باز ۲۵۹ (A259G) برابر با ۰/۲۳۱ و در جایگاه باز ۲۷۷ (C277G) برابر با ۰/۳ بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده هر دو جایگاه در جمعیت ۰/۲۶۵ است. پس می توان نتیجه گرفت که میزان تنوع این جایگاهها در جمعیت پایین است.

یکی از معیارهایی که برای تعیین میزان چندشکلی جایگاهها استفاده می‌شود اندازه آلل موثر (Ne) و تعداد آلل مشاهده شده (Na) است. اندازه آلل موثر عکس هموزایگوسیتی مورد انتظار می¬باشد. این معیار در شرایطی که همه آلل¬ها دارای فراوانی یکسانی بوده و تحت تأثیر آلل¬های نادر قرار نگیرند بیانگر تعداد آلل¬هایی است که هتروزایگوسیتی یکسان، ایجاد می¬نماید. تعداد آلل مؤثر تنها زمانی با تعداد آلل مشاهده شده (Na) برابر خواهد بود که همه آلل¬ها فراوانی مشابهی داشته باشند ولی در اکثر موارد تعداد آلل مؤثر (Ne) کمتر از تعداد آلل مشاهده شده (Na) است (فرانکهام و همکاران، ۲۰۰۲).

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٦. هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، تعداد نمونه، تعداد آلل واقعی و اندازه آلل موثر در جایگاه باز ۲۵۹ (A259G) **و جایگاه باز ۲۷۷** (C277G)**پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ¬های بومی استان خوزستان**

Table 6. Observed and expected heterozygosity, number of samples, Observed and effective number of alleles for Heat shock protein 70 (Hsp70) gene of Khuzestan native chickens

جایگاه Location	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity	تعداد آلل مشاهده شده Observed number of alleles	اندازه آلل موثر Effective number of alleles
نوکلئوتید ۲۵۹ (A259G) Nucleotide +259	0.231	0.477	2	1.911
نوکلئوتید ۲۷۷ (C277G) Nucleotide +277	0.300	0.459	2	1.850
میانگین و خطای استاندارد Mean and standard error	0.265 ± 0.03	0.468 ± 0.01	2	1.881 ± 0.03

همانطور که در جدول ۶ ارائه شده است اندازه آلل موثر در جایگاه باز ۲۵۹ (A259G) برابر با ۱/۹۱۱ و در جایگاه باز ۲۷۷ (C277G) برابر با ۱/۸۵۰ بود. میانگین اندازه آلل موثر ۱/۸۸۱ بدست آمد. اندازه آلل موثر از تعداد آلل مشاهده شده کمتر است. در جایگاهی که تفاوت بین دو عامل زیاد باشد دلیل بر وجود فراوانی بالا در آن جایگاه است. این عدد نشان می دهد که میزان تنوع کم است. بیشترین تعداد آلل موثر (۴ آلل) هنگامی ایجاد میشود که فراوانی هیچ آللی بیشتر از ۰/۵ نباشد.

تنوع ژنتیکی مرغ بومی در شهرستانهای مورد مطالعه: فراوانی¬های ژنوتیپی و آللی در جایگاه باز ۲۵۹ (A259G) و تست کای مربع برای پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در شهرستان باوی (ایستگاه تکثیر و اصلاح نژاد مرغ بومی)، اندیمشک، رامهرمز و شوش در جدول ۷ ارائه گردیده است. تجزیه کای مربع برای این جایگاه نشان داد که جمعیت مرغ های بومی شهرستان باوی و اندیمشک دارای تعادل هاردی–وینبرگ نیستند و جمعیت مرغ بومی شهرهای شوش و رامهرمز در حالت تعادل هستند. بیشترین فراوانی ژنوتیپی در دو شهر باوی و اندیمشک متعلق به ژنوتیپ GG بود. فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی در

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

جایگاه نوکلئوتیدی ۲۷۷ (C277G) و تست کای مربع برای ژن شوک حرارتی ۷۰ در شهرستان باوی، اندیمشک، رامهرمز و شوش در جدول ۸ ارائه گردیده است. تجزیه کای مربع برای این جایگاه نشان داد که جمعیت مرغ بومی شهرستان باوی (مرکز اصلاح نژاد مرغ جاهد) دارای تعادل هاردی–وینبرگ نیست و جمعیت مرغ بومی شهرهای اندیمشک و شوش و رامهرمز در حالت تعادل هستند. بیشترین فراوانی ژنوتیپی در شهرستان باوی متعلق به ژنوتیپ CC برابر با ۰/۶ بود. نتایج این دو جدول نشان دهنده این است که در شهرستان باوی (مرکز مرغ بومی جاهد) انتخاب به گونه ای انجام گرفته است که مرغهای بومی با هاپلوتیپ H3 انتخاب شده است. با توجه به اینکه این مرغ ها در روستاهای اطراف و در شوشتر و دزفول و اندیمشک بفروش میرسند این هاپلوتیپ در منطقه غالب شده است.

مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده و مورد انتظار، تعداد نمونه، تعداد آلل واقعی و اندازه آلل موثر پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ¬های بومی شهرستان باوی (مرکز مرغ بومی جاهد استان خوزستان)، اندیمشک، رامهرمز و شوش در جدول ۹ ارائه گردیده است. کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده متعلق به مرکز مرغ بومی جاهد (شهر باوی) و بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده متعلق به شهر رامهرمز بود. علت کاهش هتروزیگوسیتی در مرکز مرغ بومی جاهد می‌تواند بدین دلیل باشد که سالهاست در این مرکز اصلاح نژاد این مرغ در حال انجام است و بدلیل بسته بودن جمعیت، سبب افزایش هموزیگوسیتی و در نتیجه همخونی در این گله مرغ بومی شده است. نتایج نشان دهنده این است که کل جمعیت از تنوع خوبی برخوردار است و باید در حفظ آن کوشید تا در آینده بتوان از این مخازن با ارزش در صورت نیاز استفاده نمود. نتایج این تحقیق با نتایج محققین دیگر که چندشکلی ژن TGF مرغ بومی استان فارس را مورد بررسی قرار می‌دادند همخوانی دارد (Mohammadifar, 2013).

نتیجه گیری :براساس نتایج بدست آمده از ژل پلی‌اکریل‌آمید سه هاپلوتیپ قابل انتظار بود. هاپلوتیپ H3 بیشترین فراوانی را در جمعیت داشت. در این هاپلوتیپ جهش سبب تغییر نوکلئوتید آدنین A به باز گوانین G در موقعیت نوکلئوتید ۲۵۹ + (A259G) است. نتایج آزمون کای مربع نشان داد که جایگاه‌های مورد بررسی از تعادل هاردی–وینبرگ خارج شده اند. علت این امر میتواند انتخاب طبیعی یا مصنوعی شدید در این مرغ‌ها باشد.

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۷. تعداد مشاهده شده، فراوانی¬های نسبی ژنوتیپی و آللی در جایگاه باز ۲۵۹+ (A259G) و تست کای مربع برای ژن شوک حرارتی ۷۰ در شهرستان باوی، اندیمشک، رامهرمز و شوش

Table 7. Number of observed genotypes, relative genotypic and allelic frequencies and Chi square test at the nucleotide position of +259 (A259G) for Heat shock protein 70 (Hsp70) gene of Khuzestan native chickens

شهر City	ژنوتیپ Genotype	تعداد Number	فراوانی نسبی ژنوتیپی Relative genotypic frequency	مربع کای Chi square (p value)	فراوانی آللی Allelic frequency	
					A	G
باوی Bavi	AA	15	0.30	30.43 *** (P<0.001)	0.35	0.65
	AG	5	0.10			
	GG	30	0.60			
اندیمشک Andimeshk	AA	12	0.30	13.61 *** (P<0.001)	0.40	0.60
	AG	8	0.20			
	GG	20	0.50			
رامهرمز Ramhormoz	AA	4	0.20	0.126 ns (0.723)	0.43	0.57
	AG	9	0.45			
	GG	7	0.35			
شوش Shoosh	AA	5	0.25	0.737 ns (0.391)	0.45	0.55
	AG	8	0.40			
	GG	7	0.35			

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۸. تعداد مشاهده شده، فراوانی¬های ژنوتیپی و آللی در جایگاه باز ۲۷۷+ (C277G) و تست کای مربع برای ژن شوک حرارتی ۷۰ در شهرستانهای باوی، اندیمشک، رامهرمز و شوش

Table 8. Number of observed genotypes, relative genotypic and allelic frequencies and Chi square test at the nucleotide position of 277 (C277G) for Heat shock protein 70 (Hsp70) gene of Khuzestan native chickens

شهر City	ژنوتیپ Genotype	تعداد Number	فراوانی نسبی ژنوتیپی Relative genotypic frequency	مربع کای Chi square (p value)	فراوانی آللی Allelic frequency	
					C	G
باوی Bavi	CC	30	0.60	19.99*** (P< 0.001)	0.68	0.32
	CG	8	0.16			
	GG	12	0.24			
اندیمشک Andimeshk	CC	20	0.50	1.637 ns (0.201)	0.67	0.33
	CG	14	0.35			
	GG	6	0.15			
رامهرمز Ramhormoz	CC	7	0.35	0.126 ns (0.723)	0.57	0.43
	CG	9	0.45			
	GG	4	0.20			
شوش Shoosh	CC	7	0.35	0.737 ns (0.391)	0.55	0.45
	CG	8	0.40			
	GG	5	0.25			

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۹. هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، تعداد نمونه، تعداد آلل مشاهده شده و اندازه آلل موثر پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ¬های بومی شهرستان باوی، اندیمشک، رامهرمز و شوش

Table 9. Observed and expected heterozygosity, number of samples, Observed and effective number of alleles for Heat shock protein 70 (Hsp70) gene of native chickens of Shosh, Ramhormoz, Andimeshk and Bavi city

اندازه آلل موثر Effective number of alleles	تعداد آلل مشاهده شده Observed number of alleles	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity	تعداد نمونه Number of samples	شهرستان City
1.8 ± 0.03	2	0.44 ± 0.03	0.13 ± 0.03	50	باوی Bavi
1.85 ± 0.07	2	0.45 ± 0.02	0.27 ± 0.07	40	اندیمشک Andimeshk
1.95 ± 0.001	2	0.48 ± 0.001	0.45 ± 0.001	20	رامهرمز Ramhormoz
1.98 ± 0.001	2	0.49 ± 0.001	0.40 ± 0.001	20	شوش Shoosh

با توجه به اینکه فراوانی هاپلوتیپ GC (H3) بیشترین فراوانی را در جمعیت داشت بنظر میرسد ژنوتیپ غالب در جمعیت هاپلوتیپ H3 باشد و با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایشات Zhen و همکاران ۲۰۰۶ که نشان دادند هاپلوتیپ H3 در شرایط استرس گرمایی در بافت های مختلف مقدار HSP70 بیشتری تولید می‌کند شاید بتوان گفت که این هاپلوتیپ احتمالا مقاومت بیشتری نسبت به گرما از خود نشان خواهد داد. لذا پیشنهاد می‌گردد جهت اطمینان از این موضوع آزمایش دیگری طرح گردد و ارتباط این هاپلوتیپ و میزان تولید مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج بررسی فراوانی ژنوتیپی و آللی شهرهای مختلف استان خوزستان نشان داد که شهر ملاثانی (مرکز مرغ بومی جاهد) انتخاب به گونه ای انجام گرفته است که مرغهای بومی با هاپلوتیپ H3 انتخاب شده است. با توجه به اینکه این مرغ ها در

www.SID.ir

Archive of SID

روستاهای اطراف و در شوشتر و دزفول و اندیمشک بفروش می‌رسند این هاپلوتیپ در منطقه غالب شده است. می‌توان انتظار داشت که مرغهای بومی اصلاح نژاد شده مرکز مرغ بومی جاهد با پراکنده شدن در استان سبب پراکنده شدن هاپلوتیپ H3 در جمعیت مرغ بومی خوزستان شوند.

نتایج بررسی تنوع در شهرهای مختلف استان خوزستان نشان داد که کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده متعلق به مرکز مرغ بومی جاهد (ملاثانی) و بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده متعلق به شهر رامهرمز بود. علت کاهش هتروزیگوسیتی در مرکز مرغ بومی جاهد می‌تواند بدین دلیل باشد که سالهاست در این مرکز اصلاح نژاد این مرغ در حال انجام است و بدلیل بسته بودن جمعیت، سبب افزایش هموزیگوسیتی و در نتیجه همخونی و کاهش تنوع در این گله مرغ بومی شده است.

سپاسگزاری: بودجه این پروژه از طرح شماره ۴۷-۹۴۱ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تامین گردیده است، لذا از کلیه مسئولین پژوهشی دانشگاه بدلیل همکارای صمیمانه شان تشکر بعمل می آید.

منابع

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

References

Bassam BJ, Anolles GC Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem 196, 80-83.

Frankham R, Ballou JD, Brisco DA (2002) Introduction to conservation Genetics. First published Cambrige Unipress.

Gheisari A (2005). Collection of research projects and research results of native chicken in Isfahan province. Ministry of Agriculture Jihad of Isfahan.

www.SID.ir

Archive of SID

Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. J Rumin Res 4, 119-132 (In Persian).

Mazzi CM, Ferro JA, Ferro MIT, et al. (2003) Polymorphism analysis of the hsp70 stress gene in Broiler chickens (Gallus Gallus) of different breeds. Gene Mol Bio 26, 275-281.

Masodi A, Maridi M, Ahmad panah J, Vaeze Tarshizi R (2012) Molecular study; evolution and classification of thermal shock protein of 70 in cows. Iran. J. Appl. Anim. Sci.. 42, p187-189.

Mezquita B, Mezquita J, Durfort M, Mezquita C (2001) Constitutive and heat-shock induced expression of Hsp70mRNA during chicken testicular development and regression. J. Cell. Biochem 82, 480–490.

Moazeni S, Mohammadabadi MR et al. (2016a) Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. Open J Anim Sci 6, 1-8.

Moazeni SM, Mohammadabadi MR et al. (2016b) Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. J Live Sci Tech 4, 51-56.

Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. Brazil J Med Biol Res 50, e6177.

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iranian J Appl Anim Sci 7, 289-295.

Mohammadabadi, M.R., Nikbakhti, M et al. (2010) Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. Russ. J. Genet 46, 505-509.

Mohammadifar A, Faghih Imani SA, Mohammadabadi MR, Soflaei M (2014) The effect of TGFb3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. J. Agric. Biotech 5, 125-136 (In Persian).

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2017) The Effect of Uncoupling Protein Polymorphisms on Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in the Fars Indigenous Chicken. Iranian J Appl Anim Sci 7, 679-685.

Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ (1997) The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. Essays Biochem 32, 17-29.

www.SID.ir

Archive of SID

Santoro MG (2000). Heat Shock Factors and the Control of the Stress Response. Biochem. Pharmacol 59, 55–63.

Shahdadnejad N, Mohammadabadi MR, Shamsadini M (2016) Typing of Clostridium Perfringens Isolated from Broiler Chickens Using Multiplex PCR. Genetics in the 3rd millennium 14 e.

Tamzil MH, Noor RR, Hardjosworo PS et al. (2013) Polymorphism of the heat shock protein gene in kampong, arabic and commercial chickens. J Vet 14e.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. J. Agric. Biotech 6, 35-50 (in Persian).

Zandi E, Mohammadabadi MR, Ezzatkhah M, Esmailizadeh AK (2014) Typing of Toxigenic Isolates of Clostridium Perfringens by Multiplex PCR in Ostrich. Iranian J Appl Anim Sci 4, 509-514.

Zhen FS, Du HL, Xu HP, Luo QB (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. Br. Poult. Sci 47, 449-455.

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir