نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۱۷، زمستان ۱۳۹٤
ص‌ص: ۱۵~۲٤

بررسی ارتباط ژن‌های PRL و NPY با صفات تولید مثلی در مرغ بومی آذربایجان غربی

- **حمید رضا سیدآبادی** (نویسنده مسئول)
استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. کرج. ایران.
- **محمد باقر عبدی**
فارغ التحصیل کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر
- **ابوالفضل قربانی**
استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۹۶۴۳۵۷۸۵
Email: h_seyedabadi@yahoo.com

چکیده:

پرولاکتین(PRL) و نوروپپتیدY(NPY) ، دو ژن کاندید با عملکرد فیزیولوژیکی وسیع در فرآیند رشد و تولید مثلی می‌باشند. هدف این پژوهش، تعیین چند شکلی ژن‌های پرولاکتین(PRL) و نوروپپتیدY (NPY) و بررسی ارتباط آن با صفات تولیدمثلی در مرغ بومی آذربایجان غربی بود. بدین منظور، از تعداد ۱۰۰ قطعه مرغ بومی از مرغان مولد ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی استان آذربایجان‌غربی، نمونه خون تهیه و استخراج DNA از نمونه‌ها صورت گرفت. سپس ژنوتیپ حیوانات با استفاده از روش PCR-RFLP و آنزیم‌های برشی *AluI* و *DraI* تعیین گردید. برای ژن NPY دو آلل A و a با فراوانی ۰/۲۵ و ۰/۷۵ و ژن PRL دو آلل T وC با فراوانی ۰/۲۲ و ۰/۷۸ شناسایی شد. نتایج این تحقیق نشان دادند که چند شکلی‌های مشاهده شده با هیچ‌کدام از صفات تولیدمثلی مورد مطالعه در این تحقیق ارتباط معنی‌داری ندارند. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که جایگاه‌های مورد مطالعه نمی‌توانند به عنوان ژن کاندید برای صفات تولید مثلی در برنامه‌های اصلاح نژادی مرغ بومی آذربایجان غربی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های PRL و NPY ، صفات تولید مثلی، چندشکلی،PCR-RFLP.

Applied Animal Science Research Journal No 17 pp: 15-24

Association of NPY and PRL genes with reproductive traits in West Azerbaijan native chicken

By: 1:Hamid Reza Seyedabadi, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultual Research Education and Extension organization
2:Mohammadbager Abdi, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shabstar Branch, Islamic Azad University, Shabstar, Iran.
3:Abolfazl Gorbani, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shabstar Branch, Islamic Azad University, Shabstar, Iran.

Neuropeptide Y (NPY) and Prolactin (PRL) are two candidate genes with a wide variety of physiological functions in growth and especially in reproduction processes. The current study was designed to investigate the associations of PRL and NPY gene polymorphism with reproductive traits in West Azerbaijan native chicken. Genomic DNAs were extracted from 100 chickens. Genotyping for the PRL and NPY genes were determined by using PCR-RFLP method. The PCR products from PRL and NPY loci were digested with AluI, and DraI restriction endonuclease, respectively. Two alleles were found for both genes, A and a alleles for NPY, with frequencies of 0.25 and 0.75, T and C alleles for PRL, with frequencies of 0.22 and 0.78, respectively. The association analysis between the polymorphism PRL and NPY genes and reproductive traits were carried out. Significant relationship was not found between genotypes with reproductive traits. The results of current study showed that using information of genes related to reproductive traits couldn't be used to improve the performance of native chicken of East Azerbaijan province.

Key words: PRL and NPY genes, reproductive traits, Polymorphism, PCR-RFLP

مقدمه

هرچند انتخاب مرسوم بر اساس ارزش‌های ژنتیکی در جوجه‌های گوشتی موجب بهبود در سرعت رشد و راندمان تولید مثلی در طی چند دهه گذشته شده است ولی به‌دلیل همبستگی منفی بین صفات تولیدی و تولیدمثلی، امروزه اصلاح نژاد در طیور با مشکل مواجه شده است(۸،۴). لذا انتخاب چند صفتی برای بهبود همزمان در این صفات تنها بر اساس انتخاب ژنتیکی مشکل می‌باشد. بنابراین، انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی می‌تواند برای افزایش بازده انتخاب و بهبود عملکرد تولیدی مناسب باشد(۹).پرولاکتین پروتئینی است با وزن ملکولی ۲۳۰۰ کیلو دالتون و توسط لب پیشین هیپوفیز ساخته می‌شود. این هورمون از ۱۹۹ اسیدآمینه تشکیل شده و ساختمان آن مشابه ساختمان هورمون رشد و دارای یک ریشه تریپتوفان و دو اتصال دی‌سولفور می‌باشد (۲۰). در پرندگان، پرولاکتین نقش مهمی در شروع رفتار انکوباسیون و جوجه درآوری مرغ دارد (۱۲، ۲۰). در پرندگان، فعالیت پرولاکتین با فعالیت تولیدمثلی مرتبط بوده و در کنترل متابولیسم و رشد دخالت دارد (۱). ساختار ژنومی پرولاکتین مرغ و بوقلمون برای اولین بار توسط Kurima و همکاران (۱۹۹۵)، مشخص شد(۱۴). ژن پرولاکتین پرندگان بر روی کروموزوم شماره ۲ واقع شده است و شامل پنج اگزون و چهار اینترون بوده و طول آن ۶۱۶۳ جفت‌باز می‌باشد (۱۲). طول اگزون‌ها به ترتیب ۲۸، ۱۸۲، ۱۰۸، ۱۸۰ و ۱۹۲ جفت‌باز و طول اینترون‌ها ۱۵۲۰، ۴۰۸، ۱۳۴۸ و ۱۹۰۹ جفت‌باز می‌باشد(۳). نتایج تحقیقات، بیش‌ترین چندشکلی در ژن پرولاکتین مرغ را در ناحیه پروموتور نشان داده است (۶، ۲۱ و ۲۲). بنابراین، چندشکلی ژنی در ناحیه پروموتور به ویژه جهش‌هایی که منجر به ایجاد تغییر در سایت اتصال پروموتور می‌شوند، به احتمال زیاد در بیان mRNA نقش داشته و بر رفتار انکوباسیون و تولید تخم‌مرغ تاثیر می‌گذارد.

پروتئین نوروپپتیدY شامل ۵ تیروزین است که در قسمت C ترمینال، آمینی می‌باشد (۱۸). نورو پپتیدY در همه مهره‌داران یافت می‌شود و بسیار حفاظت شده می‌باشد (۵). تحقیقات نشان می‌دهند که ۹۲٪ توالی اسیدآمینه نوروپپتیدY بین ماهی‌های غضروفی، اژدرمار موراتا و پستانداران که به فاصله تکاملی بیش از ۴۰۰ میلیون سال از هم جدا شده‌اند، یکسان می‌باشد. این شواهد نشان می‌دهند که NPY احتمالا" دارای یک نقش حیاتی و فیزیولوژیکی است که اختلاف بین افراد در این مورد بسیار کم می‌باشد(۷). مدت کوتاهی پس از شناسایی NPY به عنوان نوروپپتید Orexigenic، مطالعات تکمیلی نشان دادند که NPY در تولیدمثل نیز نقش دارد (۷). نوروپپتیدY عضوی از خانواده پلی‌پپتیدی پانکراس و یک هورمون Orexigenic است که در بیان هورمون آزادکننده گنادوتروپین[۱] و گیرنده‌هایNPY[۲] مؤثر می‌باشد. این امر نشان دهنده وجود یک رابطه مستقیم بین عملکرد متابولیسم و تولیدمثل می‌باشد (۱۳). ژن نوروپپتیدY بر روی کروموزوم ۷ واقع شده است. طول این ژن در حدود ۸Kb می‌باشد که با چهار اگزون کوچک با طول کمتر از ۲۰۰ جفت باز توسط سه اینترون با طول‌های حدود ۹۶۵، ۲۳۰۰ و ۴۳۰۰ جفت باز از هم جدا شده‌اند. طول منطقه رونویسی ژن NPY، ۵۵۳ جفت‌باز می‌باشد که ۹۷ آمینواسید را کد می‌کند(۱۷).

Rashidi و همکاران (۲۰۱۲)، با استفاده از تکنیک‌های (PCR-SSCP) و (PCR-RFLP)، ناحیه پروموتور ژن PRL را در مرغ بومی مازندران مورد بررسی قرار دادند(۱۶). در تحقیقی دیگر Alipanah و همکاران (۲۰۱۱)، چندشکلی ناحیه ′۵جانبی ژن پرولاکتین را در مرغ بومی زابل بررسی کردند. آن‌ها در این مطالعه با استفاده از روش PCR-RFLP ، فراوانی ژنی و ژنوتیپی این ژن را جمعیت مرغ بومی زابل، مورد بررسی قرار دادند(۲). همچنین Fatemi و همکاران (۲۰۱۲)، ارتباط چندشکلی تک-نوکلئوتیدی ژن‌های NPY و GnRHR (گیرنده هورمون آزادکننده گنادوتروپین) را با صفات رشد بدن و تولید تخم‌مرغ در مرغ بومی استان مازندران بررسی کردند(۱۰).

۱-gonadotrophin releasing hormone(GnRH-1)
۲-GnRH-1 neurons express NPY receptors

با توجه به فرض وجود ارتباط معنی‌دار بین ژن‌های نوروپپتیدY و پرولاکتین، با صفات تولید مثلی در طیور و از آن‌جا که تاکنون تحقیقی بر روی بررسی ارتباط چندشکلی این ژن‌ها با صفات تولیدمثلی در مرغ بومی آذربایجان غربی انجام نگرفته است، انجام این تحقیق و استفاده از نتایج آن در برنامه‌های اصلاح نژادی ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جامعه آماری مورد مطالعه

برای مطالعه چندشکلی ژن‌های نوروپپتیدY (NPY) و پرولاکتین (PRL)، از پرندگان نسل ۱۲ گله تحقیقاتی مربوط به مجتمع پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی آذربایجان‌غربی واقع در منطقه طلاتپه ارومیه نمونه‌گیری به عمل آمد. در این تحقیق، تعداد ۱۰۰ پرنده (۴۵ قطعه خروس و ۵۵ قطعه مرغ) با شرایط پرورشی یکسان به طور تصادفی انتخاب و نمونه‌گیری از آن‌ها به عمل آمد. همچنین از ارزش های اصلاحی مربوط به صفات وزن بدن در پایان ۱۲ هفتگی، سن بلوغ‌جنسی، تعداد تخم‌مرغ و میانگین وزن تخم‌مرغ، در این مطالعه استفاده شد.

جمع‌آوری نمونه‌ها

از تمام پرندگان به مقدار ۲ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ ناحیه مثلثی زیر بال، در تیوب‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA خونگیری به عمل آمد و نمونه‌های خون اخذ شده بلافاصله به یخ منتقل و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر انتقال و تا زمان استخراج DNA در فریزر در دمای^{o}C ۲۰ - نگه‌داری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل به روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی انجام گردید (۱۱). کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر- نانودراپ (Nano-Drop2000) بررسی گردید. بر اساس اطلاعات ژنومی از توالی ژن های نوروپپتیدY و پرولاکتین آغازگرهای مورد نظر برای ناحیه پروموتور طراحی شدند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق به صورت زیر می‌باشند:

آغازگر PRL :

Forward:5'-CTAAAggACCTggAAgAAggg-3'
Reverse:5'-AACTTGTCGTAGGTGggTCTg-3'

آغازگر NPY :

F: 5'-TCTCAgAgCTCAACCgTATgA-3'.
R: 5'-ATATTTCTgTgCTgAACAACA-3'

پس از آزمایش غلظت‌های مختلف اجزا PCR، شرایط بهینه PCR با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر به صورت بافر PCR ۱x، $MgCl_2$ ۲ میلی مولار، آغازگرها ۰/۲۵ میکرو مولار، ۲۰۰dNTPs میکرو مولار، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز و DNA الگو به میزان ۱۵۰ ng در هر واکنش PCR به‌دست آمد. برنامه حرارتی مناسب برای آغازگرها به صورت واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سیلسیوس به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل: واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سیلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۲ درجه سیلسیوس به مدت ۱ دقیقه برای آغازگر PRL و ۵۹ درجه سیلسیوس به مدت ۱ دقیقه برای آغازگر NPY و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۱ دقیقه انتخاب و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۸ دقیقه در نظر گرفته شد. پس از تکثیر جایگاه PRL ، یک قطعه ۴۳۹ جفت بازی حاصل شد. عمل هضم آنزیمی با حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از آنزیم برشی *AluI* (۱۰ واحد آنزیمی در هر واکنش) در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس و در طول شب بر روی محصول PCR انجام شد. برای جایگاه NPY ، پس از تکثیر یک قطعه ۲۴۰ جفت بازی حاصل شد. عمل هضم آنزیمی با حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از آنزیم برشی *DraI* (۱۰ واحد آنزیمی در هر واکنش) در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس و در طول شب بر روی محصول PCR انجام شد. برای مشاهده قطعات هضم شده از ژل آگارز ۳ درصد و ولتاژ ۱۵۰ به مدت ۵ ساعت استفاده شد. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت و قطعات تکثیر شده زیر لامپ UV مشاهده گردیدند.

اطلاعات به‌دست آمده با استفاده از مدل آماری زیر و با روش GLM در نرم افزار آماری SAS (۱۹) آنالیز و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

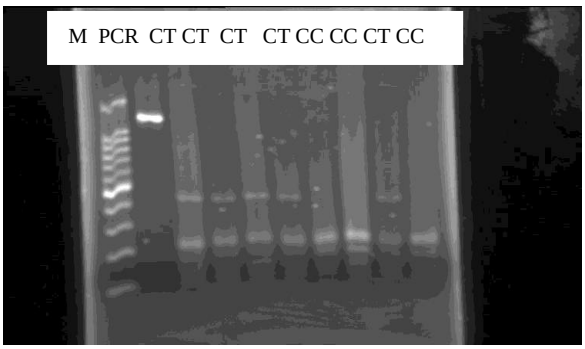
$$y_{ijk} = \mu + Genotype_i + Sex_j + e_{ijk}$$

y_{ijk}: ارزش اصلاحی صفات مورد مطالعه ، μ : میانگین ارزش‌های اصلاحی صفات و e: اثر باقیمانده می‌باشد. عوامل ژنوتیپ (Genotype) و جنس (Sex) به عنوان اثرات ثابت در مدل وارد گردیدند.

ارزش‌های اصلاحی صفات مورد نظر در سطوح مختلف ژنوتیپ‌های جایگاه‌های مورد مطالعه با استفاده از میانگین حداقل مربعات داده‌های (LSM) محاسبه شده مورد بررسی قرارگرفتند. برای برآورد فراوانی آلل‌ها و آزمون کای مربع(χ۲) از نرم افزار Pop Gene 3.1 استفاده گردید(۲۳).

نتایج و بحث

جهش ترانزیشن C→T در موقعیت باز ۲۴۰۲ واقع در ناحیه ۵′ مجاور (پروموتور) از ژن پرولاکتین دو جایگاه برش برای آنزیم *AluI* ایجاد می‌کند. هضم محصول ۴۳۹ جفت‌باز تکثیر شده با آنزیم *AluI* باعث ایجاد چهار قطعه برش خورده ۱۶۰، ۱۴۴، ۸۱ و ۵۴ جفت‌باز برای ژنوتیپ هموزیگوت CC، پنج قطعه ۳۰۴، ۱۶۰، ۱۴۴، ۸۱ و ۵۴ جفت‌باز برای ژنوتیپ هتروزیگوت CT و سه قطعه ۳۰۴، ۸۱ و ۵۴ جفت‌باز برای ژنوتیپ هموزیگوت TT می‌شود که در این مطالعه هیچ فردی با ژنوتیپ هموزیگوت TT مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱- محصولات حاصل از هضم قطعه ۴۳۹ جفت باز ژن پرولاکتین با آنزیم *AluI* بر روی ژل آگارز ۳ درصد.

کویی و همکاران (۲۰۰۶)، با استفاده ازتکنیک PCR-RFLP بر روی منطقه پروموتور از ژن PRL در نژادهای مختلف مرغ شامل Taihe Silkies، Yangshan، Taihe Silkies، White Nongdahe Rock، مرغ‌های بومی و مرغ‌های تجاری لگهورن سفید، جهش ترانزیشن C→T را در موقعیت باز ۲۴۰۲ و یک الحاق ۲۴ جفت‌بازی را در موقعیت ۳۵۸ شناسایی و سه ژنوتیپ برای هر کدام از آن‌ها گزارش نمودند(۶). Rashidi و همکاران (۲۰۱۲)، با استفاده از تکنیک‌های (PCR-SSCP) و (PCR-RFLP)، منطقه′۵کناری (پروموتور) از ژن PRL را در مرغ بومی مازندران تکثیر نمودند و الحاق ۲۴ جفت‌بازی را در موقعیت باز ۳۵۸ و جهش ترانزیشن C→T را در موقعیت باز۲۴۰۲ گزارش نمودند(۱۶).

فراوانی ژنی و ژنوتیپی محاسبه شده برای جمعیت مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. در جمعیت مورد مطالعه، فراوانی آلل C بیشتر از آلل T مشاهده شد. در تحقیقی که Alipanah و همکاران (۲۰۱۱)، بر روی جمعیت مرغ بومی زابل انجام دادند فراوانی آلل C را بیشتر از آلل T گزارش نمودند (به ترتیب۰/۶۷ و۰/۳۳)(۲).

مقایسه تعداد افراد مشاهده شده و مورد انتظار برای هر ژنوتیپ با استفاده از آزمون کای مربع(χ^2) نشان داد که مقدار آماره محاسبه شده در جمعیت حاضر بزرگ‌تر از ارزش بحرانی جدول کای مربع (۳/۸۴۱) بوده و نشان داد که توزیع ژنوتیپ ها در این خطوط از تعادل خارج می باشد(جدول ۲).

این عدم تعادل با توجه به انتخابی که برای صفات مورد مطالعه در این جمعیت‌ها صورت می‌گیرد قابل توجیه می‌باشد. بر اساس تحقیق Rashidi و همکاران (۲۰۱۲)، در مرغ بومی مازندران، آماره محاسبه شده بر روی منطقه پروموتور پرولاکتین انحراف از تعادل هاری - واینبرگ را نشان داد(۱۶) .

جدول ۱- فراوانی مشاهده شده ژنوتیپی و آللی در جایگاه PRL

ژن	فراوانی ژنوتیپی						فراوانی آللی	
PRL	CC		CT		TT		C	T
	تعداد	فراوانی	تعداد	فراوانی	تعداد	فراوانی	فراوانی	فراوانی
	۵۶	۰/۵۶	۴۴	۰/۴۴	۰	۰/۰۰	۰/۷۸	۰/۲۲

جدول۲- آزمون کای مربع برای بررسی توزیع ژنوتیپ‌ها در ژن PRL

جمعیت	آماره X^2	$P_r>X^2$
مرغ بومی استان آذربایجان غربی	۷/۸۷۰	۰/۰۰۵

ارتباط چندشکلی ژن PRL با صفات تولیدمثلی

چندشکلی در ناحیه پروموتور ژن پرولاکتین با هیچ یک از صفات تولیدمثلی ارتباط معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵).

نتایج نشان دادند پرندگان با ژنوتیپ CC نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها، برای اکثر صفات تولیدمثلی دارای میانگین حداقل مربعات بیشتری می‌باشد(جدول۳). مشابه با تحقیق حاضر در تحقیقی که توسط Cui وهمکاران (۲۰۰۶) بر روی نژادهای مختلف مرغ شامل Taihe Silkies، Yangshan، Taihe Silkies، White Rock، Nongdahe، مرغ‌های بومی و مرغ‌های تجاری لگهورن سفید انجام گرفت بین چندشکلی در ناحیه پروموتور ژن پرولاکتین با صفت تولید تخم‌مرغ ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد(P>۰/۰۵)(۶).

در تحقیق دیگری که توسط Rashidi و همکاران(۲۰۱۲)، در مرغ بومی مازندران بر روی همین ناحیه انجام گرفت مشابه با تحقیق حاضر ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی‌های موجود در این ناحیه باصفات تولید تخم‌مرغ مشاهده نشد(P>۰/۰۵)(۱۶).

جدول ۳- میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های PRL برای صفات تولیدمثلی

صفت	P-value	CC	CT
وزن در ۱۲ هفتگی	۰/۳۶۰۵	۱۷۹/۷۷۷±۴/۹۸۷۲۰۳	۱۷۵/۶۰۵ ±۵/۵۷۸۳۹۹
سن بلوغ جنسی	۰/۱۶۷۲	۱۲/۹۰۲±۰/۵۱۳۲۳۸	۱۱/۸۲۶۷±۰/۵۷۴۰۷۸۸
تعداد تخم‌مرغ	۰/۴۶۳۷	۱/۵۲۳۵±۰/۱۱۴۲۶۴۵۲	۱/۶۵۸۱±۰/۱۲۷۸۰۹۷۳
میانگین وزن تخم‌مرغ	۰/۰۷۳۱	۰/۱۷۹۹۳±۰/۰۵۷۷۳۶۸۲	۰/۰۲۴۴۸±۰/۰۶۴۵۸۱۰۹

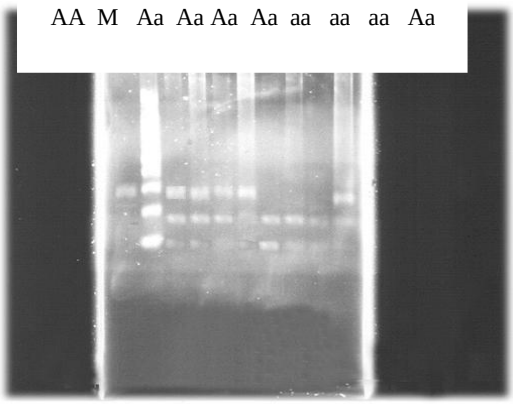
در جایگاه NPY، یک حذف ۴ جفت‌باز در موقعیت باز ۴۹۵، در حدود ۷۰۰ جفت‌باز بالادست محل شروع رونویسی ژن NPY ، باعث ایجاد چندشکلی در جایگاه فوق می‌شود.

با هضم قطعه تکثیر شده ۲۴۰ جفت‌بازی با آنزیم *DraI* ، قطعات ۷۹ و۱۶۱ جفت‌باز به عنوان هموزیگوت aa، قطعات ۷۹، ۱۶۱ و ۲۴۰ جفت‌بازی به عنوان هتروزیگوت Aa و قطعه ۲۴۰ جفت‌بازی به عنوان هموزیگوت AA تعیین ژنوتیپ شدند (شکل ۲).

این نتایج با نتایج تحقیق Dunn وهمکاران (۲۰۰۴) و Li و همکاران (۲۰۰۹)، که در مرغ مادر گوشتی بر روی موقعیت شروع رونویسی(TSS) در ژن NPY انجام گرفته مشابهت دارد(۸ و ۱۵).

فراوانی ژنی و ژنوتیپی محاسبه شده برای جمعیت مورد مطالعه در جدول ۴ نشان داده شده است. در این مطالعه فراوانی آلل a بالاتر از فراوانی آلل A بود. مشابه با تحقیق حاضر، Li و همکاران (۲۰۰۹) ، فراوانی آلل a را بیشتر از آلل A (به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۴۶) گزارش کردند(۱۵).در تحقیقی دیگر Fatemi و همکاران (۲۰۱۲)، چند شکلی موقعیت شروع رونویسی ژن NPY را بر روی مرغ بومی مازندران مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق فراوانی آلل A و a را به ترتیب برابر ۰/۷۸۰ و ۰/۲۲۱ گزارش نمودند که با فراوانی آللی مشاهده شده در تحقیق حاضر مغایرت دارند(۱۰). دلیل این مغایرت می‌تواند ناشی از متفاوت بودن جمعیت‌ها و اندازه نمونه‌ها باشد.

مقایسه تعداد افراد مشاهده شده و مورد انتظار برای هر ژنوتیپ نشان داد که جمعیت حاضر از نظر جایگاه مورد مطالعه از تعادل خارج می‌باشد(جدول ۵). یکی از دلایل برای عدم وجود تعادل در این جمعیت، احتمالاً ناشی از پیوسته بودن ژن NPY با ژن‌های مرتبط با صفات انتخابی در این جمعیت باشد.



شکل۲- محصولات حاصل از هضم قطعه ۲۴۰ جفت باز ژن NPY با آنزیم *DraI* بر روی ژل آگارز ۳ درصد.

فراوانی ژنی و ژنوتیپی محاسبه شده برای جمعیت مورد مطالعه در جدول ۴ نشان داده شده است. در این مطالعه فراوانی آلل a بالاتر از فراوانی آلل A بود. مشابه با تحقیق حاضر، Li و همکاران (۲۰۰۹) ، فراوانی آلل a را بیشتر از آلل A (به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۴۶) گزارش کردند(۱۵).در تحقیقی دیگر Fatemi و همکاران (۲۰۱۲)، چند شکلی موقعیت شروع رونویسی ژن NPY را بر روی مرغ بومی مازندران مورد مطالعه قرار دادند. در این تحقیق فراوانی آلل A و a را به ترتیب برابر ۰/۷۸۰ و ۰/۲۲۱ گزارش نمودند که با فراوانی آللی مشاهده شده در تحقیق حاضر مغایرت دارند(۱۰). دلیل این مغایرت می‌تواند ناشی از متفاوت بودن جمعیت‌ها و اندازه نمونه‌ها باشد.

مقایسه تعداد افراد مشاهده شده و مورد انتظار برای هر ژنوتیپ نشان داد که جمعیت حاضر از نظر جایگاه مورد مطالعه از تعادل خارج می‌باشد(جدول ۵). یکی از دلایل برای عدم وجود تعادل در این جمعیت، احتمالاً ناشی از پیوسته بودن ژن NPY با ژن‌های مرتبط با صفات انتخابی در این جمعیت باشد.

جدول ٤- فراوانی مشاهده شده ژنوتیپی و آللی در جایگاه شروع رونویسی ژنNPY

ژن	فراوانی ژنوتیپی						فراوانی آللی	
NPY	aa		Aa		AA		a	A
	تعداد	فراوانی	تعداد	فراوانی	تعداد	فراوانی	فراوانی	فراوانی
	۵۶	۰/۵۸	۳۴	۰/۳۵	۶	۰/۰۶	۰/۷۵	۰/۲۵

جدول ٥- آزمون کای مربع برای بررسی توزیع ژنوتیپ‌ها برای ژنNPY

جمعیت	آماره X^2	$P_r>X^2$
مرغ بومی استان آذربایجان غربی	۷/۰۱۰	۰/۰۰۸

ارتباط چندشکلی جایگاه شروع رونویسی ژن NPY با صفات تولید مثل

در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی در ژن NPY با صفات تولیدمثلی مورد مطالعه مشاهده نشد(جدول ۶). مشابه با تحقیق حاضر، Dunn و همکاران (۲۰۰۴)، نیز ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی در ژن NPY با صفت سن اولین تخم‌مرغ در جمعیت مرغ مادر گوشتی تجاری گزارش نکردند (P<۰/۰۵)(۸). هم‌چنین بر اساس نتایج این تحقیق، پرندگان با ژنوتیپ هتروزیگوت Aa برای صفت مذکور نسبت به پرندگان با ژنوتیپ AA و aa، دارای میانگین سن اولین تخم‌مرغ پایین‌تری می‌باشند. در تحقیقی دیگرکه توسط لی و همکاران (۲۰۰۹) بر روی مرغ Wenchang انجام گرفت، ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی ژن NPY با تعداد تخم‌مرغ در سن ۳۰۰ روزگی (NE) مشاهده نکردند (P>۰/۰۵). در این تحقیق افراد با ژنوتیپ AA میانگین تعداد تخم‌مرغ بالاتری در سن ۳۰۰ روزگی نسبت به ژنوتیپ‌های Aa و aa داشتند(۱۵).

در مطالعه‌ای مشابه که توسط Fatemi و همکاران (۲۰۱۲)، بر روی چندشکلی ژن NPY در مرغ بومی مازندران انجام گرفت، ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی فوق با تولید تخم‌مرغ یافت نشد (P>۰/۰۵). اما در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین وزن بدن در بلوغ جنسی با جایگاه یاد شده گزارش شد(P<۰/۰۵)(۱۰).

جدول٦- میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های NPY برای صفات تولیدمثلی

صفت	P-value	AA	Aa	aa
وزن در ۱۲ هفتگی	۰/۴۳۷	۱۶۴/۱۱±۱۵/۴۳	۱۷۴/۸۲ ±۶/۴۹	۱۸۳/۹۲±۵/۰۶
سن بلوغ جنسی	۰/۴۸۵	۱۱/۳۲۲±۱/۵۳	۱۳/۱۲۴±۰/۶۴	۱۲/۳۸۲±۰/۵۰
تعداد تخم‌مرغ	۰/۱۵۷	۱/۹۵۷۲±۰/۳۳	۱/۳۷۲۴± ۰/۱۴	۱/۶۶۵۵±۰/۱۱
میانگین وزن تخم‌مرغ	۰/۹۳۴	۰/۲۹۳۹ ±۰/۱۸	۰/۰۷۳۶±۰/۰۷	۰/۱۲۶۱±۰/۵۹

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که فراوانی آللی جایگاه‌های مورد مطالعه در جمعیت‌های مختلف متفاوت هستندکه این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت بین جمعیت‌ها و اندازه نمونه‌های جمعیتی و تفاوت در استراتژی‌های انتخابی در هرجامعه باشد. همچنین، با توجه به این‌که جمعیت‌های مورد بررسی در این تحقیق برای چندین نسل تحت انتخاب بوده‌اند پس انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ امری منطقی خواهد بود. نتایج این تحقیق نشان دادند که از بین ۲ جایگاه مورد مطالعه، هیچ‌کدام ارتباط معنی‌داری با صفات مورد مطالعه در تحقیق ندارند که با نتایج بسیاری از پژوهش‌های مختلف در جمعیت‌های متفاوت هم‌خوانی دارد. مشاهده ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی موجود در ژن‌های کاندید مورد مطالعه با برخی صفات تولیدمثلی در بعضی از تحقیقات پیشین می‌تواند ناشی از عدم تعادل پیوستگی بین SNP و دیگر جهش‌های رخ داده در این جایگاه‌ها و یا دیگر ژن‌هایی باشد که به طور مستقیم در تنظیم فنوتیپی این صفات نقش دارند. این اثر بستگی به نژاد، ساختار جامعه و فشار انتخاب بر جامعه دارد. بنابراین، می‌توان انتظار داشت این اثر در برخی از جمعیت‌ها مشاهده و در برخی دیگر مشاهده نشود. لذا، با توجه به این‌که در این تحقیق در هر ژن، فقط چندشکلی یک جهش مورد مطالعه قرار گرفت و با توجه به شناسایی جهش‌های دیگر در این ژن‌ها ، پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری با تأکید بر تمام چندشکلی‌ها در یک ژن صورت گیرد تا درک درستی از وظایف ژن مورد نظرحاصل شود. همچنین، اگر چه اطلاعات حاصل از چندشکلی-های یک جایگاه ژنی به منظور مطالعه تأثیرآن با صفات مورد نظر حائزاهمیت است ولی نمی‌تواند به تنهایی به عنوان یک معیار انتخاب در شرایط عملی مورد استفاده قرار گیرد و لازم است اطلاعات حاصل از نتایج تحقیق در جایگاه‌های فوق در کنار اطلاعات حاصل از سایر جایگاه‌ها، تجزیه و تحلیل شود و انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه در آینده ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

۱- پناهی دهقان، م. ر.، رسول نژاد فریدونی. س ، زنده روح کرمانی. ر، مدیر صانعی. م ، میر سلیمی. س. م و نیک نفس ف.(۱۳۷۴). فیزیولوژی پرندگان (ترجمه)، ناشر واحد آموزش و پژوهش معاونت کشاورزی سازمان اقتصادی کوثر.

2-Alipanah, M. Shojaian K. and Khani Bandani H. (2011). The Polymorphism of Prolactin Gene in Native Chicken Zabol Region. Journal of Animal and Veterinary Advances. 10 , 619-621.

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

4-Burt, D.W. Dey, B.R. Paton, I.R. Morrice, D.R. and Law, A.S.(1995). The chicken transforming growth factor-beta 3 gene: genomic structure, transcriptional analysis, and chromosomal location. DNA Cell Biology. 14,111-23.

5-Cerda-Reverter, J.M. and Larhammar, D.(2000). Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution. Cell Biol. 78(3), 371-92.

6-Cui, J. X. Du, H.L. Liang, Y. Deng, X.M. Li, N. and Zhang, X.Q. (2006). Association of polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production. Poult. Sci. 85,26-31.

7-Dhillon, S.S. (2010). The hormonal control of neuropeptide Y and gonadotropin releasing hormone hypothalamic neurons. S. Ms. thesis. for the degree of Doctor. University. Toronto.Dhillon_Sandeep .PhD_thesis.

8-Dunn, I. C., Y. W. Miao, A. Morris, M. N. Romanov, P. W. Wilson, and D.Waddington. (2004). A study of association between genetic markers in candidate genes and reproductive traits in one generation of a commercial broiler breeder hen population. Heredity. 92: 128-34.

9-Emara, M.G. and Kim, H.(2003). Genetic markers and their application in poultry breeding. Poultry Science. 82, 952–957.

10-Fatemi, S.A. Mehrabani-Yeganeh, H. Nejati-Javaremi, A. and Niknafs, S.h.(2012). Association of neuropeptide Y and gonadotrophin-releasing hormone receptor gene SNPs with breeding value for growth and egg production traits in Mazandaran native chickens. Genetics and Molecular Research. 11 (3): 2539-2547.

11- Javanrouh, A. Banabazi, M.H. Esmaeilkhanian, S. Amirinia, C. Seyedabadi, H.R. and Emrani, H. (2006). Optimization onsalting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. The 57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Antalya, Turkey.

12-Jiang, R.S. Xu, G.Y. Zhang, X.Q. and Yang, N. (2005). Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor geneswith broody traits in chickens. Poult. Sci. 84,839-845.

13-Klenke, U. Constantin, S. and Wray, S.(2010). Neuropeptide Y Directly Inhibits Neuronal Activity in a Subpopulation of Gonadotropin-Releasing Hormone-1 Neurons via Y1 Receptors. Endocrinology. 151, 2736–2746.

14-Kurima, K. Proudman, J.A. El Halawani, M.E. and E. Wong, A.(1995). The turkey prolactin-encoding gene and its regulatory region. Gene. 156, 309–310.

15-Li, H.F. Zhu, W.Q. Chen, K.W. Wu, X. Tang, Q.P. Gao, Y.S. Song, W.T. and Xu, H.L. (2009). Polymorphism in NPY and IGF-I genes associate with reproductive traits in Wenchang chicken. Afric. J. Biotech. 8(19), 4744-4748.

16-Rashidi, H., Rahimi-Mianji, G. Farhadi, A. and Gholizadeh, M.(2012). Association of prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms with economic traits in breeder hens of indigenous chickens of Mazandaran province. IRAN. J. of Biotechnolojy. 10(2), 129-135.

17-Ravi, K.(2008). PCR-RFLP and nucleotide sequencing of neuropeptide Y (NPY) gene in egg type chicken. Indian. J. Poult. Sci. 43(3), 263-266.

18-Ruscica, M. Dozio E. and Magni, P. (2009). NPY. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.

19-SAS, institute. (2003). SAS/STAT Users Guide (ver 9). SAS Institute, Inc., Cary, NC.

20-Sharp, P.J. Sterling, R.J. Talbot, R.T. and Huskisson, N.S.(1989). The role of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide in the maintenance of prolactin secretion in incubating bantam hens, observations using passive immunization, radioimmunoassay and immunohistochemistry. J. Endocrinol. 122, 5–13.

21-Wong, E.A. Ferrin, N.H. Silsby, J. L. and El Halawani, M.E. (1991). Cloning of a turkey prolactin cDNA, expression of prolactin mRNA throughout the reproductive cycle of the domestic turkey (Meleagris gallopavo). Gen. Comp. Endocrinol. 83, 18–26.

22-Zhou, M. Zhang, X.Q. Shi, Z.D. and Cao, Y.C.(2001). Cloning and sequencing of prolactin gene cDNA in three chicken breeds. Yi Chuan Xue Bao. 28, 614–620.

23- Yeh, F.C. Yang,R. and Boyle, T.(1999). POPGENE. Version 1.31. Microsoft Window–based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.