

آنالیز ژنتیکی ژن *DRD1* در جمعیت مرغ بومی آذربایجان غربی

Genetic analysis of *DRD1* gene in the population of West Azerbaijan native chicken

مژگان غلامی^۱، مختار غفاری^{۲*}، علی هاشمی^۲

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- به‌ترتیب استادیار، دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Gholami M¹, Gaffari M^{2*}, Hashemi A²

1- Msc Graduated of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2- Assistance Professor, Associated Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.gaffari@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۷/۰۷/۹۸ - تاریخ پذیرش: ۰۲/۰۶/۹۹)

چکیده

تحقیق حاضر با هدف مطالعه آنالیز ژنتیکی ژن *DRD1* در جمعیت مرغ بومی آذربایجان غربی با روش PCR-SSCP انجام گرفت. در این پژوهش نمونه‌های خون از ۱۸۰ قطعه مرغ بومی واقع در ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی آذربایجان غربی گرفته شد. استخراج DNA به روش بهینه یافته نمکی صورت گرفت فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) جهت شناسایی چندشکلی در نمونه‌ها بکار برده شد. الکتروفورز عمودی نمونه‌ها روی ژل آکرلامید ۱۲ درصد به مدت ۲۴ ساعت و با اختلاف پتانسیل ۳۰۰ در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره انجام و ۴ نمونه از هر الگوی متفاوت برای توالی‌یابی ارسال شد. نتایج این تحقیق نشان داد که ناحیه مورد بررسی ژن *DRD1* چندشکل است که در نتیجه آن سه نوع ژنوتیپ AA، AG و GG به ترتیب با فراوانی ۰/۴۲، ۰/۴۹ و ۰/۰۹ مشاهده شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ناحیه مورد مطالعه چند شکل بوده و می‌تواند به‌عنوان نشانگر ژنتیکی برای صفات تولیدی و تولیدمثلی در انتخاب به کمک مارکر استفاده شود.

واژه‌های کلیدی

تعادل هاری‌واینبرگ

دوپامین

مرغ بومی
PCR-SSCP

رفتار تولید مثل پرندگان دخالت دارد، در پرندگان نشان داده شد که دوپامین در مغز باعث کاهش پرولاکتین می‌شود. مرغ تحت درمان با آنتاگونیست گیرنده دوپامین دچار خاتمه کرچی از طریق مهار پرولاکتین می‌شود (Xu et al. 2010).

در تحقیقی که برای چندشکلی، بیان ژن و تأثیر ژنتیکی گیرنده‌ی یک دوپامین بر روی صفات تولید مثلی در اردک صورت گرفت، یک قطعه ۴۵۸bp با آنزیم محدودکننده HinfI و DdeI برش داده شد که برای آنزیم HinfI، سه ژنوتیپ (TT, CC, TC) و برای آنزیم DdeI سه ژنوتیپ (AA, TT, AT) به صورت چند شکلی در گیرنده‌ی یک ژن دوپامین مشاهده شد (Wang et al. 2012).

Wang et al. (2014) به بررسی چند شکلی و بیان گیرنده‌ی یک ژن دوپامین در غاز پرداختند. در این تحقیق یک قطعه ۳۸۸ bp مورد مطالعه قرار دادند و از آنزیم TspRI برای هضم استفاده کردند و در نهایت دو ژنوتیپ GG و GA رویت شدند. نژادهای بومی به دلیل شدت انتخاب پایین، تعداد زیاد پرورش دهندگان و محدودیت استفاده از تلقیح مصنوعی و سایر فناوری‌های تولید مثلی، از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند. از طرفی با گذشت زمان و کسب آگاهی بیشتر نسبت به اهمیت صفات مختلف، نیازهای جدیدی مطرح می‌شود که متخصصین اصلاح نژاد را بر آن می‌دارد که از ژن‌های نژادهای بومی استفاده نمایند. این مسئله به‌خصوص با افزایش تولید محصولات دامی و تولید محصولات پیش‌بینی نشده در آینده، لزوم حفظ تنوع ژنتیکی در دام‌های بومی را الزامی ساخته است. هدف از تحقیق حاضر آنالیز ژنتیکی ژن DRD1 در جمعیت مرغان بومی آذربایجان غربی بود.

در این آزمایش از ۱۸۰ قطعه مرغ بومی به صورت کاملاً تصادفی از مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی آذربایجان غربی خون‌گیری صورت گرفت. مرکز پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی آذربایجان غربی در ۲۷ کیلومتری شهرستان ارومیه واقع در جاده طلاتپه با مساحت ۱۱ هکتار در سال ۱۳۶۳ احداث شد این مرکز فعالیت خود را در سال ۱۳۶۷ با جمع‌آوری مرغ و خروس از دورترین نقاط این استان که انتظار کمترین احتمال اختلاط با مرغ‌های صنعتی و نژادهای رنگی خارجی می‌رفت، آغاز کرد. تا سال ۷۲ این مرکز به‌گزینی را فقط به صورت گله‌ای انجام می‌داد و جوجه‌های یک روزه را به ایستگاه‌های خود در شهرستان‌های اطراف می‌فرستاد و آن واحدها

عموماً نژادهای بومی حیوانات هر کشور به‌عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشوری محسوب می‌شوند. حفظ و تکثیر آن‌ها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. این موجودات پس از هزاران سال انتخاب طبیعی و مصنوعی و نیز گذر از موانع بسیار و با غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته و نسبت به بسیاری از محدودیت‌های محیطی سازگاری پیدا کرده‌اند. مرغ‌های بومی ایران مواد ژنتیکی پایه برای برنامه‌های اصلاح نژاد در زیستگاه‌های خویش محسوب می‌شوند، بنابراین شناخت دقیق این ذخایر ژنتیکی می‌تواند مبنای دقیق‌تری برای برنامه‌های اصلاح نژادی در آینده و نتیجه‌دهی آن‌ها در زمان کوتاه‌تر و استفاده بهینه از منابع موجود در جهت افزایش تولید شود (Shojaei et al. 2010; Zamani et al. 2013). تکنیک‌های انتخاب ژنتیکی سنتی منجر به بهبود قابل توجهی در بسیاری از صفات مهم اقتصادی در جوجه‌ها شده است. از طرف دیگر، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه‌ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهم‌تر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد (Mohammadabadi et al. 2017). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Khodabakhshzadeh et al. 2015; Zamani et al. 2016). روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید، زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به دست می‌دهد می‌تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش‌های آماری به دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و یا ممکن است که آن‌ها را رد کند (Alinaghizadeh et al. 2010). دوپامین، انتقال دهنده عصبی در سیستم عصبی مرکزی به مقدار فراوانی ترشح و نقش مهمی در شناخت، احساسات و غدد درون ریز در پستانداران دارد، مسئول فعالیت GnRH است و در آزاد کردن گنادوتروپین‌ها نقش مهارکننده و تحریک کننده دارد (Xu et al. 2011). تاکنون، حداقل پنج گیرنده مجزا از دوپامین شناسایی شده که شامل DRD1 تا DRD5 می‌باشند. گیرنده‌ها دارای تفاوت‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی هستند. دوپامین در تنظیم

ژنوتیپ، براساس اختلاف حرکت محصول PCR تکثیر شده در میدان الکتروفورز که ناشی از تغییر شکل فضایی DNA تکرشته‌ای است، صورت می‌پذیرد. برای تکرشته سازی پنج میکرولیتر از محصول PCR را با ۱۰ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخصوص ژل اکریل آمید (فرماید ۹۸ درصد، برموفنل بلو ۰/۰۲۵ درصد، گزین سیانول ۰/۰۲۵ درصد، EDTA ۱۰ میلی مول بر لیتر، گلیسرول ۱۰ درصد) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۹۵ درجه در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد، سپس نمونه‌ها به سرعت در داخل یخ قرار داده شدند تا از به هم چسبیدن دوباره رشته‌ها ممانعت به عمل آید. بعد از انجام الکتروفورز محصولات PCR روی ژل اکریل آمید، از رنگ آمیزی نترات نقره برای رویت باندهای مورد نظر استفاده شد. به منظور مشاهده ژنوتیپ‌ها از الکتروفورز عمودی استفاده شد که محصولات PCR تک رشته‌ای به مدت ۲۴ ساعت با ولتاژ ۳۰۰ بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. در این پژوهش تعیین الگوهای بانندی متفاوت مستقیماً از روی ژل آکریل آمید انجام شد و سپس از هر الگوی بانندی متفاوت چهار نمونه برای توالی‌یابی ارسال شد.

نتایج طیف سنجی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری بر روی ژل آگارز یک درصد نشان داد که DNAهای استخراج شده دارای کیفیت مناسبی برای انجام PCR می‌باشند. DNAهای استخراج شده با غلظت ۲۰۰-۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر برای انجام PCR انتخاب شدند. نتایج بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز دو درصد نشان داد که الگوی بانندی مربوط به تکثیر ژن *DRD1* به قطعه ۲۸۳ جفت‌بازی به خوبی و بدون تکثیر قطعات اضافی و فاقد اسمیر و دایمر بود که مؤید اختصاصی بودن جفت آغازگرها و انتخاب مناسب برنامه دمایی و زمانی برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌باشد. صحت این مطلب با حضور سایز مارکر در کنار نمونه‌های الکتروفورز شده تأیید شدند (شکل ۱). چندشکلی فضایی تک رشته‌ای (SSCP) جایگاه ژنی *DRD1* مرغ، با موفقیت انجام شد و برای آن سه فرم مختلف از الگوی بانندی مشاهده شد (شکل ۲). که بیانگر چند شکل بودن ژن *DRD1* در این جایگاه می‌باشد و نتایج توالی‌یابی مؤید وجود جهش در ناحیه مورد مطالعه با دو آلل بود به طوری که آلل A با فراوانی ۰/۶۶۵ و آلل G با فراوانی ۰/۳۳۵ مشاهده شد و در نتیجه آن سه نوع ژنوتیپ AA،

نیز نیمچه‌ها را ما بین متقاضیان توزیع می‌کردند. این مرکز از سال ۱۳۷۳ کار اصلاحی را به صورت رکوردبرداری و ثبت شجره و براساس عملکرد خود مرغ یا خروس و شجره آن‌ها ادامه داده است (Bostanchi 2010). خون‌گیری از ورید بال به میزان ۴-۳ سی‌سی در لوله‌های خلاء‌دار حاوی ماده ضد انعقاد EDTA انجام گرفت. پس از اتمام خون‌گیری نمونه‌ها در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و استخراج DNA به روش بهینه‌یافته نمکی انجام گرفت. بافرهای مورد نیاز در استخراج DNA به شرح زیر بودند؛ بافر جداکننده (ساکارز ۰/۳۲ مولار، MGCL2 ۰/۰۰۵ مولار و تریس ۰/۰۱ مولار PH=7.5)، بافر لیز کننده هسته (Tris-Hcl ۱۰ میلی‌مولار، EDTA دو میلی‌مولار، NaCl ۴۰۰ میلی‌مولار PH=8.2)، بافر TE (Tris ۰/۰۶ گرم و EDTA ۰/۰۱۸ گرم) و بافر پروتئیناز k (مقدار ۱۰ میلی‌گرم پروتئیناز k را در یک میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل)، و محلول‌های سدیم دو دسیل سولفات ۱۰ درصد و محلول کلرید سدیم پنج مولار. در پژوهش حاضر از آغازگرهای پیشنهادی Xu et al. (2011) که قطعه ۲۸۳ جفت‌بازی ژن *DRD1* را در مرغ بومی تکثیر می‌نمایند استفاده شد. F: 5'- CACTATGGATGGGGAAGGGTTG -3' R: 5'- GGCCACCCAGATGTTGCAAAAATG-3' آغازگرهای یاد شده به صورت لیوفیلیزه از شرکت تکاپوزیست تهیه شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میلی مولار Mgcl2، ۱۰ پیکومولار از هر یک از پرایمرها، ۲/۵ میکرولیتر از بافر 1x یک واحد آنزیم Taq پلیمرز و حدود ۳۰۰ نانوگرم DNA ژنومی انجام گرفت. شرایط دمایی در نظر گرفته شده برای PCR به شرح زیر بود؛ در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه، در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه واسرشته‌سازی ثانویه، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه اتصال، و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه بسط اولیه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بسط نهایی انجام شد.

برای تعیین ژنوتیپ هر حیوان از روش PCR-SSCP و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید استفاده شد. در این روش تعیین

می‌شوند. در بدن انسان فراوان‌ترین کاته‌کولامین‌ها شامل اپی‌نفرین (آدرنالین)، نوراپی‌نفرین (نورآدرنالین) و دوپامین می‌باشند که از اسیدآمین تیروزین و فنیل‌آلانین ساخته می‌شوند. تیروزین از افزوده شدن گروه هیدروکسیل به فنیل‌آلانین توسط آنزیم فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز ساخته می‌شود و پس از رشته‌ای از واکنش‌ها به هورمون‌های یاد شده برگردانده می‌شود. کاته‌کولامین‌ها دارای ساختاری کامل از یک حلقه بنزن و دو گروه هیدروکسیل می‌باشند درحالی‌که واسطه زنجیره اتیل و یک گروه آمین در انتها را در خود جای می‌دهند.

جدول ۱- فراوانی الگوهای ژنوتیپی ژن *DRD1* در مرغان بومی آذربایجان غربی

فراوانی			آلل	
ژنوتیپ	فراوانی		A	G
AA	AG	GG	۰/۶۶۵	۰/۳۳۵
۰/۴۲	۰/۴۹	۰/۰۹		

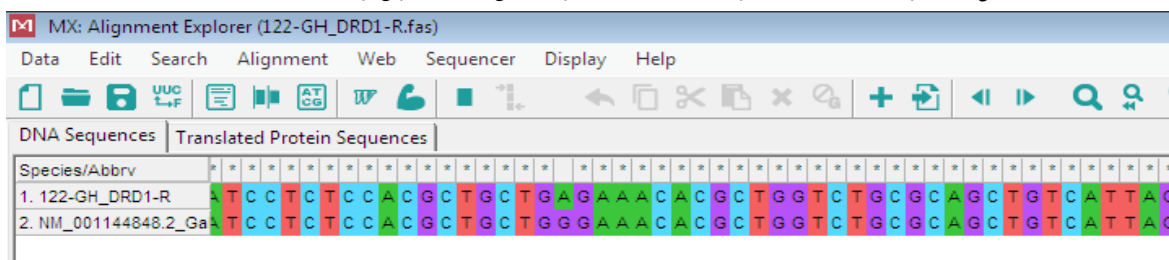
جدول ۲- پارامترهای تنوع ژنتیکی ژن *DRD1* در مرغان بومی آذربایجان غربی

مقدار	پارامترهای تنوع ژنتیکی
۲	آلل واقعی (Na)
۱/۸۱	آلل موثر (Ne)
۰/۴۸۸	هتروزیگوتی مشاهده شده
۰/۵۱۱	هموزیگوتی مشاهده شده
۰/۴۴۹	هتروزیگوتی مورد انتظار
۰/۵۵۰	هموزیگوتی مورد انتظار
۰/۶۴	شاخص شانون (I)

AG و GG به ترتیب با فراوانی ۰/۴۲، ۰/۴۹ و ۰/۰۹ در جمعیت حضور داشتند که الگوی AG با فراوانی ۰/۴۹ بیشترین مقدار فراوانی را در مقایسه با دیگر الگوها نشان داد (جدول ۱). پارامترهای مربوط به ژنتیک جمعیت و معیارهای مربوط به چندشکلی ژن *DRD1* محاسبه و در جدول ۲ ارائه شده است. آزمون کای اسکوار نشان داد که جمعیت مورد مطالعه برای این جایگاه ژنی در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارد که این امر می‌تواند به دلیل تعداد نسبتاً زیاد نمونه‌های مورد بررسی باشد. یکی از خصوصیات نشانگر مولکولی، تعداد آلل موثر است. در مرغان بومی آذربایجان غربی در جایگاه مورد مطالعه از ژن *DRD1* تعداد آلل واقعی (Na) برابر دو و تعداد آلل موثر (Ne) ۱/۸۱ محاسبه شد که نزدیکی مقادیر این دو عدد به همدیگر می‌تواند نشان‌دهنده کارایی خوب آلل‌ها در ایجاد چندشکلی و تنوع ژنتیکی بالا باشد. برای مشخص کردن بهتر تنوع ژنتیکی از شاخص اطلاعاتی شانون استفاده شد که دامنه تغییرپذیری این شاخص بین صفر و یک قرار دارد و هر چه به صفر نزدیک‌تر شود، تنوع کمتر خواهد شد. در این پژوهش میزان شاخص شانون محاسبه شده برابر ۰/۶۴ بود که بیانگر تنوع ژنتیکی بالا در جایگاه‌های مورد بررسی در جمعیت است. کاته‌کولامین‌ها جزو هورمون‌های جنگ و گریز محسوب شده و از گره آدرنال آزاد می‌شوند. این مواد بخشی از سامانه عصبی سمپاتیک هستند و در پاسخ به استرس ترشح می‌شوند. این آمین‌ها به دلیل داشتن یک گروه کاتکولی (3,4-dihydroxybenzene) کاته‌کولامین نامیده



شکل ۱- الکتروفورز محصولات تکثیر شده ژن *DRD1* در مرغان بومی آذربایجان غربی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد



شکل ۲- توالی‌یابی محصولات حاصل از SSCP قطعه تکثیری ژن *DRD1* در مرغان بومی آذربایجان غربی

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Research* 132: 123-127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, Saki AA, Ershadi A, Banabazi MH, Abdolmohammadi AR (2013)

Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology* 10: 1812-1817.