Summer (2023) 12(45): 1-8
DOI: 10.30473/eab.2023.65118.1884
Received: 18 Aug 2022 Accepted: 4 Nov 2023

Experimental Animal Biology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Identification of gene locus polymorphism involved in heat stress (*HSP90β*) in Marandi indigenous and commercial chickens

Jafar Pish Jang Aghajeri[1*], Ghader Najafi[2], Parsa Pish Jang Aghajari[3], Fatemeh Mohammad Gholi Famiyan[3], Elnaz Mehri[4]

[1]Department of Animal Science, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.
[2]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
[3]Department of Basic Sciences, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran.
[4]Department of Basic Sciences, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.

Correspondence
Jafar Pish Jang Aghajeri
Email: Ja.pja@iau.ac.ir

How to cite
Pish Jang Aghajeri, J., Najafi, Gh., Pish Jang Aghajari, P. Mohammad Gholi Famiyan, F., & Mehri, E. (2023). Identification of gene locus polymorphism involved in heat stress (HSP90*β*) in Marandi indigenous and commercial chickens. *Experimental Animal Biology, 12*(45), 1-8.

ABSTRACT

Heat stress causes significant economic losses in poultry production and leads to the reduction of several physiological and metabolic factors. This research was conducted in order to investigate the allelic and genotypic polymorphisms of the gene involved in heat stress (*HSP90β*) in Marandi indigenous, broiler and laying chickens using PCR-RFLP technique. Randomly, blood was taken from 300 chicken and genomic DNA was extracted by salting out method. Amplification of the desired gene locus with a length of 494 bp was performed using specific primers and *MspI* enzyme was used to identify the mutation in the desired gene locus. After enzymatic digestion, two genotypes M^1M^1 and M^1M^2 and two alleles M^1 (with a band of 494 bp) and M^2 (with two bands of 248 bp and 246 bp) were identified for the *HSP90β* marker locus. Marandi indigenous and broiler chicken masses were in the Hardy-Weinberg equilibrium. For Marandi indigenous and broiler chicken populations, the Shannon information index at the *HSP90β* marker locus was 0.25 and 0.40, the fixation index is -0.07 and -0.16, and the observed heterozygosity index was 0.14 and 0.28, respectively. Due to the presence of polymorphism and mutation in the studied gene locus, it can be used in the Marandi indigenous and broiler chickens by genetic selection with the help of this marker to eliminate heat-sensitive chickens and keep heat-resistant chickens.

KEYWORDS

Chicken, Genetics breeding, Genotype diversity, Gene marker, Heat shock.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

سال دوازدهم، شماره اول، پیاپی چهل و پنجم، تابستان ۱۴۰۲ (۸-۱)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳
DOI: 10.30473/eab.2023.65118.1884

نشریه علمی
زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

شناسایی چندشکلی جایگاه ژن دخیل در تنش گرمایی (*HSP90β*) در مرغ‌های بومی مرندی و تجاری

جعفر پیش‌جنگ آقاجری[1*]، قادر نجفی[2]، پارسا پیش‌جنگ آقاجری[3]، فاطمه محمدقلی فامیان[3]، الناز مهری[4]

[1]گروه علوم دامی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.
[2]گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.
[3]گروه علوم پایه، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران.
[4]گروه علوم پایه، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.

نویسنده مسئول:
جعفر پیش‌جنگ آقاجری
رایانامه: Ja.pja@iau.ac.ir

چکیده

تنش گرمایی زیان‌های اقتصادی قابل توجهی را در تولید طیور به‌وجود می‌آورد و منجر به کاهش چندین عامل فیزیولوژیکی و متابولیکی می‌شود. این تحقیق به منظور بررسی چندشکلی‌های آللی و ژنوتیپی ژن دخیل در تنش گرمایی (*HSP90β*) در مرغ‌های بومی مرندی، گوشتی و تخم‌گذار با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام شد. به‌طور تصادفی از ۳۰۰ قطعه مرغ خون‌گیری و DNAی ژنومی به روش شستشوی نمکی استخراج شد. تکثیر جایگاه ژنی مورد نظر به طول ۴۹۴ جفت باز به کمک آغازگرهای اختصاصی انجام و برای شناسایی جهش در جایگاه ژنی مورد نظر از آنزیم برشی *MspI* استفاده شد. بعد از هضم آنزیمی، برای جایگاه نشانگری *HSP90β*، دو نوع ژنوتیپ M^1M^1 و M^1M^2 و دو آلل M^1 (با یک نوار ۴۹۴ جفت بازی) و M^2 (با دو نوار ۲۴۸ جفت بازی و ۲۴۶ جفت بازی) شناسایی شد. توده‌های مرغ‌های بومی مرندی و گوشتی از نظر شاخص تعادل برای جایگاه ژنی مورد نظر در تعادل هاردی – واینبرگ قرار داشتند. برای توده‌های مرغ‌های بومی مرندی و گوشتی شاخص اطلاعات شانون به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۴۰، شاخص تثبیت به ترتیب ۰/۰۷- و ۰/۱۶- و شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب ۰/۱۴ و ۰/۲۸ برآورد شدند. با توجه به وجود چندشکلی و جهش در جایگاه ژنی مورد مطالعه می‌توان در مرغ‌های بومی مرندی و گوشتی با انتخاب ژنتیکی با کمک این نشانگر ژنی، در حذف مرغ‌های حساس به گرما و نگهداری مرغ‌های مقاوم در برابر گرما استفاده شود.

واژه‌های کلیدی

اصلاح نژاد ژنتیکی، تنوع ژنوتیپی، شوک حرارتی، مرغ، نشانگر ژنی.

استناد به این مقاله:
پیش‌جنگ آقاجری، جعفر، نجفی، قادر، پیش‌جنگ آقاجری، پارسا، محمدقلی فامیان، فاطمه و مهری، الناز (۱۴۰۲). شناسایی چندشکلی جایگاه ژن دخیل در تنش گرمایی (HSP90β) در مرغ‌های بومی مرندی و تجاری. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی, ۱۲(۴۵)، ۸-۱.

مقدمه

پرورش طیور در ایران و گسترش آن به دیگر نقاط دارای تاریخچه‌ای بسیار دیرینه‌ای دارد و لذا حفظ و نگهداری مرغ‌های بومی از لحاظ تغذیه‌ای، فرهنگی و اقتصادی ضروری به نظر می‌رسد (Mohammadabadi *et al.*, 2010). پرورش مرغ بومی با توجه به خصوصیات منحصر به فرد آن از جمله مقاومت در برابر شرایط سخت محیطی مخصوصاً آب و هوای گرم و خشک، هزینه پایین نگهداری و پرورش، بازارپسندی و کیفیت مطلوب تولیدات از دیرباز مورد توجه بوده است. حفظ این ذخائر به علت مزایایی که مرغ‌های بومی کشور در سازگاری با شرایط محیطی، مدیریتی، بهداشتی و تغذیه‌ای دارند، امر مهمی است (Gheisari, 2005). از طرفی، مرغ‌های بومی از ذخایر مهم ژنتیکی و یکی از سرمایه‌های ژنتیکی ملی به‌حساب می‌آیند و برنامه‌های اصلاح نژاد ژنتیکی مرغ‌های بومی نیاز به شناخت دقیق و کسب اطلاعات بیشتر در مورد آن‌ها دارد (Nikoubin Borujeni *et al.*, 2016). هرکدام از نژادها، حاصل فرآیندهای جهش، رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری مجزایی است که طی قرون متمادی حاصل گردیده است.

فشار انتخاب در طی این زمان تحت تأثیر آب و هوا، انگل‌ها و بیماری‌های بومی، تغذیه و دخالت انسان تغییر کرده است. بنابراین می‌توان گفت هر نژاد مجموعهی منحصر به فردی از ژن‌ها است که مخزن ژنی آن نژاد را می‌سازند. لذا تنوع درون نژادی حاکی از پتانسیل آن جمعیت برای بازسازی و نجات آن از خطر انقراض خواهد بود و مطالعه آن در اولویت مطالعات ژنتیکی حفاظت است (Hemati *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 (Shojaei *et al.*, 2010; Zamani *et al.*, 2013). با رشد روز افزون جمعیت تأمین نیازهای غذایی از جمله پروتئین حیوانی، جزو ضروری‌ترین برنامه‌ها محسوب می‌شود. به‌منظور بهره‌مندی درست از صنعت پرورش مرغ بومی به دلیل سازگاری با شرایط مختلف آب و هوایی، کاربرد تکنیک‌های نوین در زمینه‌ی پرورش و اصلاح نژاد ژنتیکی بسیار حائز اهمیت بوده و حفظ و برنامه‌ریزی برای افزایش تولید آن‌ها امری ضروری است (Mayahi *et al.*, 2018).

تنش گرمایی نشان دهنده‌ی چالش‌های زیست محیطی بزرگی است که تولید طیور را تحت تاثیر قرار می‌دهد و زیان‌های اقتصادی قابل توجهی را در تولید طیور به وجود می‌آورد. در طول فصل تابستان، موج گرمای شدید برای مرغ‌ها و افزایش حساسیت به تنش گرمایی به نگرانی‌های اصلی در صنعت پرورش طیور تبدیل شده است و این امر منجر به کاهش چندین عامل فیزیولوژیکی و متابولیکی در طیور مانند راندمان تغذیه، سرعت رشد، تولید تخم مرغ، کیفیت پوسته تخم مرغ، باروری و بقاء می‌شود (Kapakin *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2006). بخش زیاد تولیدات طیور در دنیا به مناطق خشک و گرمسیری اختصاص دارد که این مناطق عمدتاً طول روز بلند با دمای بیش از ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد دارند. بدیهی است که در چنین شرایطی، یکی از مهم‌ترین مشکلات صنعت طیور تنش گرمایی بوده که از یک طرف کاهش تولید و از طرف دیگر افزایش مرگ و میر گله را در پی خواهد داشت. در طول دهه‌های اخیر، گرمایش آب و هوای کره‌ی زمین منجر به ایجاد طیف وسیعی از مناطق اقلیمی مختلف شده است و ایران نیز با ۹۰ درصد وسعت خشکی که دارد از نظر اقلیمی به عنوان یک منطقه گرم و خشک در جهان به شمار می‌رود (Asadollahpour *et al.*, 2022). انتخاب سویه‌های مرغ‌های مقاوم به گرما می‌تواند برای رفع این مشکل استفاده شود.

مرغ‌های تجاری سریع رشد می‌کنند و تولید بالایی دارند، ولی به دلیل متابولیسم سریع، پوشش پر و عدم وجود غدد عرق توانایی تنظیم گرمایی آن‌ها پایین است و این باعث می‌شود که نتوانند به خوبی به دمای بالا سازگار شوند اما برعکس مرغ‌های بومی به محیطی که در آن زندگی می‌کنند سازگارند و به افزایش دما مقاوم هستند (Duangjinda *et al.*, 2017). در اثر تنش گرمایی علاوه بر کاهش عملکرد، اعمال ایمنی بدن هم مختل می‌شود، به‌طوری که می‌توان به کاهش محتوای گلبول‌های سفید خون، آنتی‌بادی‌ها، کاهش فعالیت لنفوسیت‌های T و B و افزایش مرگ و میر در مرغ‌های تحت تنش گرمایی اشاره کرد (Mashaly *et al.*, 2004). در غالب گزارشات بیان شده است که در شرایط تنش گرمایی، بیان اغلب ژن‌ها به استثنای مجموعه‌ی خاصی از ژن‌ها که ژن‌های شوک حرارتی (Genes shock heat) نامیده می‌شوند، به‌شدت سرکوب می‌شود (Morimoto *et al.*, 1986) و بیان ژنی مربوط به پروتئین‌های شوک حرارتی به‌طور قابل توجهی در شرایط تنش گرمایی افزایش می‌یابد (Guerreiro *et al.*, 2004). در مرغ‌ها، خانواده‌های ژنی *HSP70* و *HSP90* با بازیابی سریع پروتئین‌های دناتوره شده به شرایط اولیه و تحمل گرما مرتبط هستند (Surai, 2015).

پروتئین شوک حرارتی Hsp90 یک چاپرون مولکولی و یک تنظیم کننده‌ی کلیدی پروتئوستاز در هر دو شرایط فیزیولوژیکی و استرس است. در پستانداران، دو ایزوفرم سیتوزولی Hsp90α و

Hsp90β وجود دارد. این دو ایزوفرم ۸۵ درصد یکسان بوده و توسط دو ژن مختلف کدگذاری می‌شوند (Maiti & Picard, 2022) و جایگاه ژنی *HSP90* نقش اصلی در تحمل گرما ایفا می‌کند (Galal *et al.*, 2019; Radwan & Mahrous, 2019; Radwan, 2020)، به‌عنوان عامل ضد ویروسی عمل می‌کند (Lin *et al.*, 2007)، از بافت‌ها و ماهیچه‌های مرغ در برابر آسیب ناشی از فرآیندهای اکسیداسیون محافظت می‌کند (Hao & Gu, 2014)، مسئول اصلی سازگاری سلول و یا بدن در شرایط مختلف استرس از طریق پروتئوستاز، محافظت از سلول در برابر تخریب و حفظ ساختار بهینه‌ی پروتئین‌ها و فعالیت‌های بیولوژیکی آن‌ها است (Liu *et al.*, 2014; Surai, 2015).

پیشینه‌ی پژوهش

قبلاً چندشکلی‌های بعضی از ژن‌های شوک حرارتی مورد مطالعه قرار گرفته است و نشانگرهای تحمل تنش گرما در نژادهای مرغ شناسایی شده‌اند. در مرغ‌های نژادهای لاینگشان و راک رسسیو سفید چندشکلی تک نوکلئوتیدی G141A در ناحیه‌ی ′۵ پروموتر جایگاه ژنی *HSP90β* در مرغ‌های باتوانایی تحمل گرمایی زیاد وجود داشت (Chen *et al.*, 2013). همچنین در جایگاه ژنی *HSP90AB1* چندشکلی تک نوکلئوتیدی G6798A در آلل G شناسایی شده بود که در اگزون شماره‌ی ۱۴ رخ می‌دهد، به‌طوری که تحمل به گرما را بهبود بخشیده و بقای طولانی‌تری را در مرغ‌های نژاد چینی هیوایانان در طول تنش گرمایی ایجاد می‌کند. این چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در خانواده‌های ژنی *HSP70* و *HSP90* قابلیت استفاده در برنامه‌های اصلاح نژادی جهت بهبود تحمل گرما توسط مرغ‌ها را دارند (Wan *et al.*, 2017). در مرغ‌های فایومی و لگهورن با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و آنزیم برشی *MspI*، چندشکلی جایگاه ژنی *HSP90β* (به طول ۴۹۸ جفت باز) مورد بررسی قرار گرفته بود و در نتایج این تحقیق دو ژنوتیپ M^1M^1 و M^1M^2 شناسایی شده بود و فراوانی ژنوتیپ‌های M^1M^1 و M^1M^2 را در مرغ‌های لگهورن به ترتیب ۰/۷۰ و ۰/۳۰ برآورد کرده بودند. با توجه به گزارش آن‌ها ژنوتیپ M^1M^1 را مقاوم به گرما و ژنوتیپ هتروزیگوس M^1M^2 را حساس به تنش گرمایی شناسایی کرده بودند و بیان کرده بودند که ژنوتیپ M^1M^2 را می‌توان به عنوان یک نشانگر برای حذف مرغ‌های حساس به گرما استفاده کرد (Sheraiba *et al.*, 2019).

اگر چه مطالعات مولکولی متعددی در ارتباط با جایگاه‌های ژنی شوک گرمایی در طیور انجام شده است (Tamzil *et al.*, 2013; Nazari *et al.*, 2020; Tohidi *et al.*, 2021; Asadollahpour *et al.*, 2022)، اما تاکنون چندشکلی جایگاه ژنی *HSP90β* در مرغ‌های بومی مرندی و تجاری‌های گوشتی و تخم‌گذار درایران مطالعه نشده است. در تحقیقات انجام شده روی جهش در توالی ژنی مربوط به پروتئین تنش گرمایی نشان می دهندکه جهش بر بیان پروتئین یاد شده موثر بوده است (Zhen *et al.*, 2006). هدف از این مطالعه بررسی وجود چندشکلی در جایگاه ژنی *HSP90β* در مرغ‌های بومی مرندی، گوشتی و تخم‌گذار با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بود. وجود چندشکلی در این جایگاه ژنی این احتمال را می‌دهد که با تحمل تنش گرمایی همراه باشد و به شناسایی نشانگرهای ژنتیکی بالقوه برای تحمل تنش گرمایی در این نژادهای مرغ کمک کند.

روش شناسی پژوهش

جمع‌آوری نمونه‌های خونی

برای انجام این پژوهش به‌طور تصادفی ۳۰۰ قطعه مرغ از توده‌های مرغ بومی مرندی، گوشتی و تخم‌گذار (۱۰۰ قطعه به ازای هر توده) از مرکز پرورش مرغ بومی موسسه‌ی تحقیقات علوم دامی کشور و مناطق مختلف آذربایجان شرقی انتخاب شدند. از هر قطعه مرغ یک میلی‌لیتر خون از سیاهرگ زیر بال مرغ‌ها جمع‌آوری و به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون انتقال داده شدند. نمونه‌های خون بعد از شماره‌گذاری با حفظ شرایط زنجیره‌ی سرد به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNAی ژنومی نگهداری شدند.

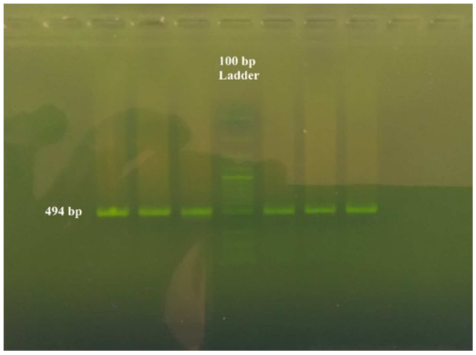
استخراج DNAی ژنومی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

پس از یخ‌گشایی نمونه‌های خون و رسیدن به دمای محیط، استخراج DNAی ژنومی با روش شستشوی نمکی (Miller *et al.*, 1988) انجام شد. کمیت DNAهای ژنومی استخراج شده به روش طیف سنجی و با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ و کیفیت آن‌ها با الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ تعیین شد. جهت تکثیر قطعات ژنی مورد نظر برای هر جایگاه ژنی از یک جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد (جدول ۱). اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده، به کمک سرویس BLAST (Basice Local Alignment Search Tool) در سایت NCBI بررسی شد.

جدول ۱. توالی و دمای اتصال آغازگرها، اندازه‌ی محصول PCR برای جایگاه ژنی و آنزیم برشی

جایگاه ژنی	آغازگر (۳' → ۵')	محصول PCR (جفت باز)	دمای اتصال آغازگر	آنزیم برشی
HSP90β	GCGCGTGGAACTCTCTGGAA GTCGGAGGCGTTGGAGATGAG	۴۹۴	۵۹/۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه	*MspI*

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم DNAی ژنومی، پنج میکرولیتر Taq DNA polymerase 2x Master mix red (Taq DNA polymerase، بافر، dNTPs، Red dye و $MgCl_2$) (ساخت شرکت AMPLIQON کشور دانمارک) و یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (ساخت شرکت SINACLON کشور ایران) با غلظت ۱۰ پیکومول برای تکثیر قطعه‌ی مورد نظر از ژن *HSP90β* ، انجام گرفت. در این واکنش، واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۹/۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و همچنین تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام گرفت. قطعه‌ی تکثیر شده برای جایگاه ژنی مورد نظر در حضور نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (ساخت شرکت Thermo Scientific کشور آمریکا) روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد و صحت تکثیر قطعه‌ی مورد نظر بدون حضور باندهای غیراختصاصی و محصولات ناخواسته تأیید شد (شکل ۱).



شکل ۱. محصولات PCR برای جایگاه ژنی *HSP90β* روی ژل آگارز ۲٪ با نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز

تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها

در این تحقیق جهت تعیین چندشکلی جایگاه ژنی مورد نظر از تکنیک PCR-RFLP و برای هضم آنزیمی محصولات PCR از آنزیم برشی اختصاصی *MspI* (ساخت شرکت Thermo Scientific کشور آمریکا) استفاده شد (جدول ۱). این واکنش در حجم نهایی ۱۷/۵ میکرولیتر، شامل هفت میکرولیتر محصول PCR، یک میکرولیتر بافر و نیم میکرولیتر آنزیم و در نهایت نه میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام گرفت. واکنش هضم آنزیمی برای جایگاه ژنی مورد نظر در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. بعد از هضم آنزیمی محصولات PCR، برای مشاهده‌ی باندها و تعیین الگوهای ژنوتیپی از ژل آگارز ۴٪ و نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت بازی (ساخت شرکت Thermo Scientific کشور آمریکا) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل ژنتیکی داده‌ها

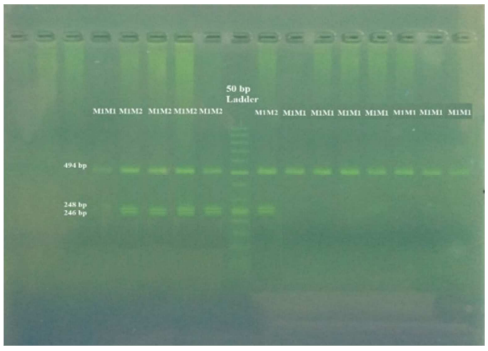
برای برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص تعادل هاردی- واینبرگ، شاخص تثبیت (Fixation index) و شاخص اطلاعات شانون (Shannon's information index) و دیگر پارامترهای ژنتیکی در توده‌های مرغ بومی مرندی، گوشتی و تخم‌گذار مورد مطالعه، از نرم‌افزار POPGENE نسخه‌ی ۱/۳۲ (Yeh *et al.*, 2000) استفاده شد.

یافته‌های پژوهش

در اثر هضم آنزیم برشی *MspI* روی محصولات PCR جایگاه ژنی *HSP90β* (۴۹۴ جفت باز)، در توده‌ی مرغ تجاری تخم‌گذار یک قطعه به طول ۴۹۴ جفت باز (بدون برش) و همه مرغ‌ها تنها دارای ژنوتیپ M^1M^1 (مونومورف) بودند. در توده‌های مرغ بومی مرندی و تجاری گوشتی، الگوهای آنزیم برشی *MspI* متفاوت بود و در نتیجه در بین مرغ‌ها قطعات ۴۹۴ جفت بازی برش نخورده و همچنین دو قطعه‌ی ۲۴۸ و ۲۴۶ جفت بازی مشاهده شد به طوری که آلل M^1 دارای یک نوار ۴۹۴ جفت بازی و آلل M^2 دارای دو نوار ۲۴۸ و ۲۴۶ جفت بازی بود و دو نوع ژنوتیپ M^1M^1 و M^1M^2 شناسایی شد (شکل ۲). تجزیه و تحلیل فراوانی‌های ژنوتیپی حاصل از این تحقیق نشان داد که در توده‌ی مرغ تجاری تخم‌گذار، ژنوتیپ M^1M^1 دارای فراوانی ۱۰۰ درصد و فراوانی ژنوتیپ‌های M^1M^1 و M^1M^2 در مرغ‌های بومی مرندی (به ترتیب ۰/۸۶ و۰/۱۴) و در مرغ‌های تجاری گوشتی (به ترتیب ۰/۷۲ و ۰/۲۸) بود. همچنین در توده‌ی مرغ بومی مرندی، فراوانی آلل‌های M^1 و M^2 به ترتیب ۰/۹۳ و ۰/۰۷ برآورد شدند و ژنوتیپ M^1M^1 و آلل M^1 دارای بیشترین فراوانی بودند. در

توده‌ی مرغ گوشتی، فراوانی آلل‌های M^1 و M^2 به ترتیب ۰/۸۶ و ۰/۱۴ برآورد شدند و ژنوتیپ M^1M^1 و آلل M^1 دارای بیشترین فراوانی بودند و توده‌ی مرغ تخم‌گذار نیز تک شکلی نشان داد (جدول۲).

در تحقیق حاضر توده‌های مرغ بومی مرندی و گوشتی مورد مطالعه از نظر شاخص تعادل هاردی- واینبرگ در حالت تعادل قرار داشتند ($p<0/05$) و شاخص اطلاعات شانون برای توده‌های مرغ بومی مرندی و گوشتی در جایگاه ژنی مورد مطالعه به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۴۰ برآورد شد و یکی دیگر از پارامترهای مورد مطالعه در تحقیق حاضر شاخص تثبیت بود که برای توده‌های مرغ بومی مرندی و گوشتی به ترتیب ۰/۰۷- و ۰/۱۶- محاسبه گردید (جدول ۲).



شکل ۲. الگوهای ژنوتیپی حاصل از هضمی آنزیمی محصولات PCRبرای جایگاه ژنی مورد مطالعه روی ژل آگارز ۴٪ با نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت باز

جدول ۲. فراوانی‌های آللی، ژنوتیپی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی *HSP90β*در مرغ‌های بومی مرندی، گوشتی و تخم‌گذار

	آلل و ژنوتیپ	نژاد			کل توده‌ها
		مرندی	گوشتی	تخم-گذار	
فراوانی آللی	M^1	۰/۹۳	۰/۸۶	۱	۰/۹۳
	M^2	۰/۰۷	۰/۱۴	۰	۰/۰۷
فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده (مورد انتظار)	M^1M^1	۰/۸۶ (۰/۸۶)	۰/۷۲ (۰/۷۴)	۱	۰/۸۴ (۰/۸۵)
	M^1M^2	۰/۱۴ (۰/۱۳)	۰/۲۸ (۰/۲۴)	۰	۰/۱۴ (۰/۱۳)
	M^2M^2	۰ (۰/۰۰۴)	۰ (۰/۰۲)	۰	۰ (۰/۰۰۴)
کای اسکور [۱]		۰/۲۴	۱/۲۱	–	۰/۸۲
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مشاهده شده		۰/۱۴ (۰/۸۶)	۰/۲۸ (۰/۷۲)	۰ (۱)	۰/۱۴ (۰/۸۶)
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مورد انتظار		۰/۱۳ (۰/۸۷)	۰/۲۴ (۰/۷۶)	۰ (۱)	۰/۱۳ (۰/۸۷)
شاخص اطلاعات شانون		۰/۲۵	۰/۴۰	–	۰/۲۵
شاخص تثبیت		۰/۰۷-	۰/۱۶-	–	۰/۰۷-

۱- کای اسکور برای تعادل هاردی - واینبرگ

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج مطالعه حاضر از تعیین ژنوتیپ جایگاه ژنی *HSP90β* با تکنیک PCR-RFLP با استفاده از آنزیم برشی *MspI* نشان داد که توده‌ی مرغ تجاری تخم‌گذار دارای یک قطعه ۴۹۴ جفت بازی برش نخورده بوده و این نشان می‌دهد که جایگاه ژنی *HSP90β* یک شکل است و در حالی که در توده‌های مرغ بومی مرندی تجاری گوشتی دو ژنوتیپ M^1M^1 و M^1M^2 شناسایی شد. این نتایج با نتایج تحقیقات (Sheraiba *et al.*, 2019) مطابقت داشت. این محققین با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و آنزیم برشی *MspI*، چندشکلی جایگاه ژنی *HSP90β* (به طول ۴۹۸ جفت باز) در مرغ‌های فایومی و لگهورن مورد بررسی قرار داده بودند و در نتیجه دو ژنوتیپ M^1M^1 و M^1M^2 شناسایی شده بود و فراوانی ژنوتیپ‌های M^1M^1 و M^1M^2 را در مرغ‌های لگهورن به ترتیب ۰/۷۰ و ۰/۳۰ برآورد کرده بودند. با توجه به گزارش آن‌ها ژنوتیپ M^1M^1 را مقاوم به گرما و ژنوتیپ هتروزیگوس M^1M^2 را حساس به تنش گرمایی شناسایی کرده بودند و بیان کرده بودند که ژنوتیپ M^1M^2 را می‌توان به عنوان یک نشانگر برای حذف مرغ‌های حساس به گرما استفاده کرد.

اثرات تعیین ژنوتیپ جایگاه ژنی *HSP90β* بر تحمل تنش گرمایی در چندین مطالعه بررسی شده است. در یک تحقیق (Chen *et al.*, 2013) جهشی را در ناحیه ۵' (G141A) جایگاه ژنی *HSP90* شناسایی کرده بودند که با تحمل تنش گرما در مرغ‌های لاینگشان و راک رسسیو سفید مرتبط بود. محققین ژنوتیپ GG را به عنوان ژنوتیپ مقاوم به تنش گرمایی شناسایی کرده بودند. در مطالعه‌ی دیگر (Sigei *et al.*, 2016) توالی‌های چندگانه‌ی جایگاه ژنی *HSP90* در تمام گونه‌های مرغ‌های مورد مطالعه، شباهت زیادی را نشان داده بودند که حاکی از حفظ تکاملی بالا است. نتایج تحقیق ما نیز با این یافته‌ها مطابقت دارد زیرا نتایج ما نشان داد که توده‌ی مرغ تجاری تخم‌گذار تنها دارای ژنوتیپ وحشی (M^1M^1) جایگاه ژنی *HSP90β* بودند. نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه‌ی Wan *et al.* (2017) که چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) جایگاه ژنی *HSP90B1* در مرغ هیواینان چینی را بررسی کرده بودند، مطابقت نداشت. وان و همکاران فراوانی‌های سه ژنوتیپ مختلف AA، AG و GG را به ترتیب ۰/۴۹، ۰/۲۷ و ۰/۲۴ برآورد کرده بودند و نشان داده بودند که مرغ‌هایی با ژنوتیپ GG نسبت به مرغ‌های دارای دو ژنوتیپ دیگر زمان بقای طولانی‌تری دارند که نشانگر این است

که آلل G برای مقاومت در برابر تنش گرمایی مطلوب بوده و به طور بالقوه می‌تواند در بهبود مقاومت در برابر تنش گرمایی استفاده شود. دلیل عدم تطابق فراوانی‌های ژنوتیپی با نتایج تحقیق حاضر احتمالاً می‌تواند تفاوت در نوع توده‌های مورد مطالعه و تفاوت در تکنیک مورد آزمایش باشد.

در دیگر تحقیقات انجام شده در مورد شاخص تعادل، شاخص اطلاعات شانون و شاخص تثبیت اشاره‌ای نشده اشت لذا شاخص اطلاعات شانون بیانگر میزان تنوع ژنتیکی توده‌ی مورد مطالعه برای جایگاه ژنی مورد نظر است. در تحقیق حاضر، شاخص اطلاعات شانون برای توده‌های مرغ‌های بومی مرندی و گوشتی در جایگاه ژنی مورد مطالعه به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۴۰ برآورد شد که نشانگر تنوع ژنتیکی کم در مرغ بومی مرندی و نسبتاً کم در مرغ گوشتی است. همچنین توده‌های مرغ بومی مرندی و گوشتی برای جایگاه ژنی *HSP90β* در تعادل هاردی- واینبرگ بودند. عواملی مثل جهش، انتخاب، مهاجرت و رانش ژنتیکی باعث ایجاد عدم تعادل توده‌ها برای جایگاه ژنی مورد نظر می‌شوند. دیگر این که شاخص تثبیت برای توده‌های مرغ‌های بومی مرندی و گوشتی به ترتیب ۰/۰۷- و ۰/۱۶- برآورد شد. شاخص تثبیت منفی در مرغ‌های مورد مطالعه احتمالاً می‌تواند به دلیل شدت انتخاب بالا و عدم تلاقی تصادفی در توده‌های مورد مطالعه باشد. شاخص تثبیت همیشه در محدوده‌ی ۱- تا ۱ متغیر است و منفی بودن آن نشانه‌ی کاهش هتروزیگوسیتی و افزایش هموزیگوسیتی یا افزایش هم‌خونی در داخل توده‌ها می‌باشد.

در اصلاح ژنتیکی مرغ‌ها برای یک جایگاه ژنی خاص، نیاز به اطلاعات کافی در مورد آن جایگاه ژنی می‌باشد. با توجه نتایج به دست آمده از این تحقیق، جایگاه ژنی *HSP90β* پس از هضم توسط آنزیم محدود کننده‌ی *MspI*، مرغ‌های تخم‌گذار تک شکل (مونومورفیک) بود که یک ژنوتیپ برای این جایگاه ژنی دخیل در تنش گرمایی نشان می دهد، اما چندشکلی در مرغ‌های بومی مرندی و گوشتی وجود داشت که می‌توان با انتخاب ژنتیکی از این نشانگر برای حذف مرغ‌های حساس به گرما و نگهداری مرغ‌های مقاوم در برابر گرما استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیر گروه محترم گروه علوم پایه و مدیر محترم آزمایشگاه‌ها و کارگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

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

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

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

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

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

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

Hemati, B., Banabazi, M. H., Shahkarami, S., Mohandesan, E., & Burger, P. (2017). Genetic diversity within Bactrian camel population of Ardebil province. *Research on Animal Production*, 8 (16), 192-197. (In Persian).

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

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

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

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

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

Mashaly, M. M., Hendricks, G. L., Kalama, M. A., Gehad, A. E., Abbas, A. O., & Patterson, P. H. (2004). Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry Science*, 83(6), 889-894.

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

Mayahi, M., Talazadeh, F., & Abdoshah, M. (2018). Comparison of the performance between three strains of broiler chicks in Iran. *Iranian Veterinary Journal*, 13(4), 100-108. (In Persian).

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

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

Morimoto, R. I., Hunt, C., Huang, S. Y., Berg, K. L., & Banerji, S. S. (1986). Organization, nucleotide sequence and transcription of the chicken HSP70 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 26 1(27), 12692-12699.

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

Nikoubin Borujeni, M., Pirany, N., & Rafiei Boroujeni, F. (2016). Analysis of genetic diversity in Fars native chicken based on partial mitochondrial DNA D-loop region sequences. *Research on Animal Production*, 7, (14), 180-185. (In Persian).

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

Radwan, L. M. (2020). Genetic improvement of egg laying traits in Fayoumi chickens bred under conditions of heat stress through selection and gene expression studies. *Journal of Thermal Biology*, 89, 102545.

Shojaei, M., Mohammadabadi, M. R., Asadi Fozi, M., Dayani, O., Khezri, A., & Akhondi, M. (2010). Association of growth trait and leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2, 67-73.

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

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

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

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

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

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

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

Zamani, P., Akhondi, M., Mohammadabadi, M. R., Saki, A. A., Ershadi, A., Banabazi, M. H., & Abdolmohammadi, A. R. (2013). Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(10), 1812-1817.

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