تعیین چند شکلی ژن مقاوم به میکسو ویروس (MX) در مرغان بومی خوزستان با استفاده از تکنیک PCR-RFLP

شماره صفحات
۵۹-۶۷

سعید چعب[۱]، محمدتقی بیگی نصیری[۲]، محمودنظری*[۳] و جمال فیاضی[۴]

۱) دانشجوی ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۲) استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی ، ایران.
۳) دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۴) استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
*نویسنده مسئول: **m.nazar@asnrukh.ac.ir**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۵**

چکیده

ژن Mx نقش مهمی در پاسخ های ضد ویروسی مرغ دارد. ژن Mx یک کاندید بالقوه به عنوان یک نشانگر ژنتیکی مقاوم به ویروس آنفولانزا در مرغ می‌باشد. پژوهش حاضر به منظور بررسی چندشکلی ژن مقاومت به میکسوویروس(Mx) با استفاده از روش PCR-RFLP در مرغ بومی خوزستان انجام گرفت. به‌طور تصادفی از ۱۰۰ قطعه مرغ بومی خوزستان از شهرهای (ملاثانی، اندیمشک، شوش) خون‌گیری شد و استخراج DNA از نمونه‌ها انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر قطعه ۲۹۹ جفت بازی ژن مقاومت به میگزو ویروس (Mx) به کمک آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. قطعه تکثیر شده به وسیله آنزیم برشی HPY8I هضم گردید. فراوانی آلل‌های A و G در مرغان بومی شوش به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۴۶ ، در ملاثانی ۰/۸۵ و ۰/۱۵و در اندیمشک ۰/۵۷ و ۰/۴۷ و فراوانی ژنوتیپ‌های AA، GG و AG به‌ترتیب در شوش ۰/۴۰، ۰/۳۳ و ۰/۲۷، در ملاثانی ۰/۸، ۰/۱ و ۰/۱ و در اندیمشک ۰/۴۵، ۰/۴۰ و ۰/۱۵ بود. نتایج نشان داد که فراوانی آلل A بیشتر از G است بعلاوه، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و تعداد آلل موثر نشان داد که میزان تنوع این جایگاه‌ها در جمعیت پایین است. با استفاده از آزمون کای مربع (X2) مشخص شد که فراوانی آلل‌ها در این جایگاه ژنی در حالت تعادل هاردی - وینبرگ نمی‌باشد. نتایج این تحقیق پیشنهاد می داد که ژن MX دارای چندشکلی است و پتانسیل بالایی برای استفاده به عنوان نشانگر ژنتیکی برای مقاومت در برابر آنفولانزای مرغی و بیماری نیوکاسل دارد.

کلیدواژه‌ها: ژن مقاومت به میکسوویروس (MX)، آنفولانزا، مرغ بومی و چندشکلی.

مقدمه

اجرای ایمنی زیستی و واکسیناسیون در مزرعه پرورش تجاری مرغ هیچ مشکلی ایجاد نمی‌کند با این حال، در مزارع کوچک مرغ به خصوص مزارع محلی، این حیوانات بیشتر پرندگان وحشی و جوانی هستند که استفاده از روش‌های بیولوژیک و واکسیناسیون در آن‌ها دشوار است. بنابراین، لازم است یک سیستم جایگزین برای انتخاب حیوانات مقاوم در برابر آنفولانزای مرغی فراهم آوریم (Susanti *et al*., 2017). رویکرد ژنتیکی می‌تواند به موفقیت در جهت جوجه‌های مقاوم به آنفولانزا دست یابد. توسعه‌ی علم و تکنولوژی، انتخاب ژنتیکی بسیار کارآمد را جایگزین استفاده از روش‌های انتخاب معمولی (با استفاده از روش‌های مورفولوژیک، ایمنی و روش واکسیناسیون) کرده است (Livant *et al*., 2007).

شیوع پاتوژنیک ویروس آنفولانزای مرغی، حامل ویروس آنفولانزای پرندگان (HPAI) که به واسطه آنتی‌بادی‌های H5 و H7 ویروس آنفلوانزا رخ می‌دهد بالا است. توزیع جهانی این ویروس از طریق تجارت مرغ و محصولات آن ، رفت و آمد مردم (گردشگران و پناهندگان) و همچنین مهاجرت صورت می‌گیرد (Capua & Marangon, 2006). ویروس آنفلوانزا، دارای RNA تک رشته‌ای می‌باشد که جزء خانواده ارتومیکس ویروس‌ها بوده و بر اساس تفاوت‌های آنتی‌ژنی به سه نوع (A، B و C) تقسیم می‌شود (Lamb *et al*., 1996).

سیستم ایمنی، نوعی سیستم دفاعی تخصصی است که به روش طبیعی سبب ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌هایی که به وسیله عوامل عفونی متفاوت (نظیر باکتری‌ها، ویروس، قارچ ها و غیره) ایجاد می‌شوند، عمل می‌کند. به طور کلی در مهره‌داران دو سیستم دفاعی شامل ایمنی ذاتی وایمنی اکتسابی علیه پاتوژن ها وجود دارد. سیستم ایمنی ذاتی اولین خط دفاعی است که طی ساعات اولیه پس از عفونت پاسخ سریع خود را اعمال می‌کند (Lee & vidal, 2002).

ویروس‌های RNA دار در مقایسه با ویروس‌های حاوی DNA عامل تحریک کننده قوی‌تری برای تولید اینترفرون‌ها می‌باشند. اینترفرون نوع ۱ اولین خط دفاعی قوی علیه عفونت‌های ویروسی در مهره داران است. IFN-α و IFN- β تحریک‌کننده های قوی برای بیان پروتئین‌های آنتی‌ویروسی می‌باشند و نقش مهمی در پاسخ ذاتی به عفونت‌های ویروسی دارند (Xiangan *et al*., 2010). اینترفرون های نوع ۱ اثرات حفاظتی خود را با بیان ژن های دیگر به نام ژن‌های ISGs[۱] اعمال می‌کنند. شناخته شده ترین پروتئین‌های آنتی‌ویروسی که توسط ISGs کد می‌شوند، ژن مقاوم به میکسوویروس ها (MX) می‌باشد.

ژن Mx یکی از مهمترین ژن‌های ضد ویروسی تنظیم کننده اینترفرون می‌باشد و ارتباط مشخصی بین عفونت آنفلوانزا و تحریک بیان Mx وجود دارد (Arnheir & Mir, 1990). ژن Mx پروتئین Mx دارای ویژگی ضد ویروسی کد می‌کند. پروتئین Mx جز خانواده بزرگ GTPase می‌باشد که در هسته و سیتوپلاسم مکان‌یابی شده است (Haller & Kohkh, 2002).

---

[۱]- Interferon-stimulated genes

ژن Mx در جوجه ها در طی یک شیوع AIV در مرغ‌های خانگی یافت شد. در جوجه‌ها، ژن Mx بر روی کروموزوم ۱ در قطعه ۲۰،۷۶۷ جفت بازی قرار دارد. این ژن شامل ۱۳ اگزون که حاوی ۲۱۱۵ جفت باز است و ۷۰۵ اسیدآمینه را کد می‌کند. مقاومت در برابر AIV در اگزون ۱۳که دارای ۱۸۹۲ نوکلئوتید می‌باشد در یک نقطه‌ی جهش یافته است (Li *et al*., 2006).

جایگاه ۶۳۱ پروتئین Mx طیور، تعیین‌کننده فعالیت آنتی ویروسی نسبت به ویروس های آنفلوانزا و آبسه های مخاط دهانی می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد اگر در جایگاه ۶۳۱ ژن Mx کدون مربوط به اسید آمینه آسپاراژین جایگزین اسیدآمینه سرین شود، فعالیت آنتی ویروسی افزایش و این جوجه ها نسبت به بیماری آنفلوانزا مقاومت بیشتری نشان می‌دهند (Ko *et al*., 2002). در یک پژوهش توالی نوکلئوتیدی ژن Mx مرغ در بسیاری از نژادها تعیین گردید. در مجموع ۲۵ جایگزینی نوکلئوتیدی که ۱۴ مورد آن باعث ایجاد مبادلات اسیدآمینه شدند مشاهده گردید که بیان کننده‌ی این است که ژن مرغ بسیار چندشکل می‌باشد و در نهایت گزارش شد که در بعضی از نژادها پاسخ مثبت به فعالیت ضد ویروس آنفولانزا نشان می‌دهد و همینطور جایگزینی تنها در اسید آمینه Mx بر فعالیت ضد ویروسی در جوجه‌های اهلی تاثیر می‌گذارد (Ko *et al*., 2002). بنابراین، این پژوهش به منظور بررسی چندشکلی ژن Mx و برآورد فراوانی هریک از آلل‌های مقاوم و حساس به بیماری آنفلوانزا در این جایگاه ژنی در جمعیت مرغ بومی خوزستان انجام گرفت.

مواد و روش ها

در تحقیق حاضر، از ۱۰۰ قطعه مرغ بومی از شهرهای مختلف استان خوزستان (۵۰ قطعه از ملاثانی، ۲۰ قطعه از اندیمشک، ۳۰ قطعه از شوش) خون‌گیری به عمل آمد. خون‌گیری از سیاهرگ بال به میزان ۴-۳ سی‌سی و با استفاده از لوله‌های خلاءدار حاوی ماده ضدانعقاد EDTA انجام شد. نمونه‌های خون روی یخ به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ا ستخراج DNA از خون کامل با ا ستفاده از کیت نام صحیح وارد شود انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ و ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد.

تکثیر قطعه دارای ۲۹۹ جفت بازی ژن Mx با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی (Pagala *et al*., 2017) طی واکنش PCR و دستگاه ترموسیکلر انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱: آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای تکثیر ژن Mx

Table 1: **The specific primers used to amplification the Mx gene**

ژن Gene	توالی آغازگر Primer sequence	طول قطعه کثیر شده The length of the amplified fragment
Mx	F 5'GCACTGTCACCTCTTAATAGA-3' R 5'GTATTGGTAGGCTTTGTTGA-3'	299

طول آغازگر پیشرو و پیرو به ترتیب ۲۱ و ۲۰ نوکلئوتید بود. آغازگرها طبق دستورالعمل شرکت سازنده با آب دو بار تقطیر رقیق شدند. واکنش PCR شامل ۲ میکرولیتر (حدود ۵۰-۱۰۰ نانوگرم) DNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۷۵

میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی مولار، ۱/۲۵ میکرولیتر پرایمر رفت (۱۰ پیکومول)، ۱/۲۵ میکرولیتر پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، یک واحد آنزیم تک‌پلیمراز که در نهایت با اضافه کردن آب استریل یا دو بار تقطیر به ازای هر نمونه به حجم ۲۵ میکرولیتر می‌رسد، انجام گرفت. به منظور واکنش PCR از دستگاه ترموسایکلر استفاده شد و چرخه حرارتی مطابق جدول ۲ اجرا شد.

برای آشکار کردن الگوهای باندی حاصل از تکثیر PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. برای هضم آنزیمی محصولات PCR از آنزیم برشی اختصاصی، HPY8l استفاده گردید. واکنش هضم آنزیمی DNA با آنزیم HPY8l، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل بن‌ماری انجام شد و سپس محصولات هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۲ درصد در ولتاژ ۹۰ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز افقی شدند (جدول ۳).

انواع ژنوتیپ بر اساس مشاهده تعداد و اندازه باندها با استفاده از دستگاه عکسبرداری ژل داک تعیین شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار آنالیز اطلاعات ژنتیک جمعیت (Gen Alex) فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی محاسبه شدند.

جدول ۲: برنامه دمایی مورد استفاده برای تکثیر ژن Mx

Table 2: Temperature program used to amplification the Mx gene

زمان Time	دما Temperature	مراحل Steps
3´	95	واسرشته سازی اولیه Initial denaturation
30´´	95	واسرشته سازی denaturation
30´´	65	اتصال آغازگر Annealing
30´´	72	بسط Extension
10´´	72	بسط نهایی Final Extension

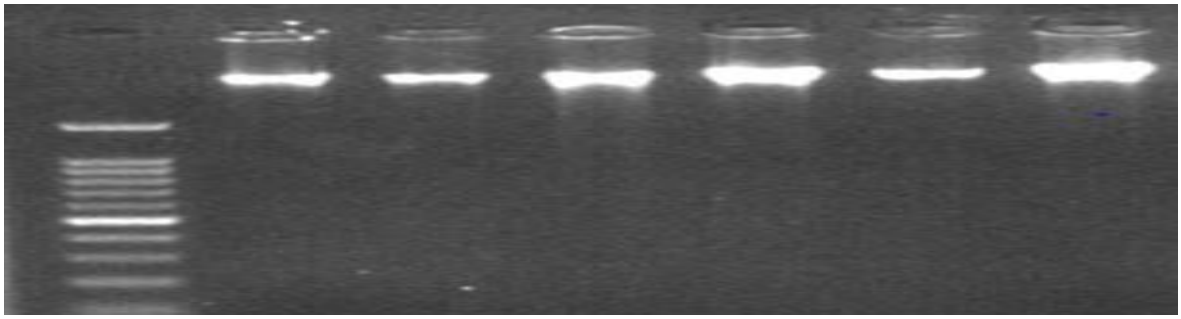
جدول ۳: مواد لازم برای هضم آنزیمی HPY8l ژن Mx

Table 3: Ingredients for the HPy8l enzyme digestion of the Mx gene

حجم (میکرولیتر) Volume (Micro Liter)	مواد Materials
10	محصول PCR Product
1	بافر Buffer
0.5	آنزیم Enzyme
18.5	آب H_2O
30	حجم کل Total

نتایج و بحث

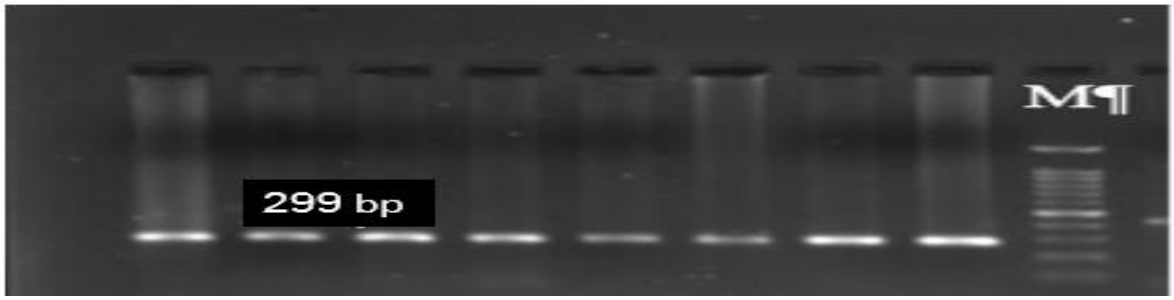
DNA از ۱۰۰نمونه خون کامل به کمک کیت استخراج شد. نتایج حاصل از روش اسپکتروفتومتر و ژل آگارز یک درصد نشان داد، کمّیت و کیفیت DNA استخراج شده برای ادامه پژوهش مناسب می‌باشد (شکل ۱). قطعه ۲۹۹ جفت بازی ژن Mx با دستگاه ترموسایکر تکثیر گردید و برای تأیید محصول PCR الکتروفورز گردید.



شکل ۱: الکتروفورز DNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز(۱٪)

Fig 1: Electrophoresis of the DNA on agarose gel (1%)

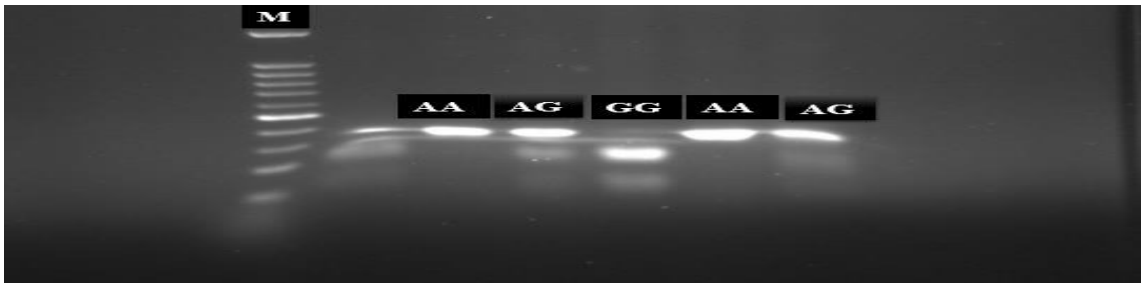
با توجه به تصویر نمونه‌های پی سی آر شده بر روی ژل آگارز مشخص شد که نمونه‌های مورد بررسی فاقد آلودگی و باند اضافه بوده و برنامه دمایی مورد استفاده، برای تکثیر ناحیه موردنظر مناسب است (شکل ۲).



شکل ۲ : محصولات PCR (قطعه ۲۹۹ جفت بازی)، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. M: مارکر ملکولی ۱۰۰ جفت بازی

Figure 2 : PCR products (299 bp), on the 1.5% agarose gel. M: Molecular Marker 100bp.

الگوی الکتروفورزی حاصل از هضم قطعه ۲۹۹ جفت بازی گیرنده‌ی ژن Mx مرغ‌های بومی توسط آنزیم برشی Hpy8I، سه الگوی باندی را مشخص گردانید: ژنوتیپGG (باند ۹۹ و ۲۰۰ جفت بازی)، AA (باند ۲۹۹ جفت بازی) و AG (سه باند ۲۹۹ و ۲۰۰ و ۹۹ جفت بازی) (شکل ۳).



شکل ۳: الکتروفورز محصولات حاصل از هضم ژن Mx با آنزیم اختصاصی *Hpy*8I و انواع الگوهای ژنوتیپی مرغ‌های بومی خوزستان. M : مارکر ملکولی ۱۰۰ جفت بازی

Figure 3: Electrophoresis of digestible products with Hpy8I Restriction enzyme and genotype patterns of Khuzestan native chickens. Molecular Marker 100bp.

در این تحقیق با استفاده از آنزیم برشی Hpy8I دو آلل A و G و سه ژنوتیپ AA، GG، وAG به دست آمد که در جدول ۴ فراوانی آنها آورده شده است. ژنوتیپ AA بیشترین و ژنوتیپ AG کمترین فراوانی را نشان دادند. آلل A بیشترین و آلل G کمترین فراوانی را نشان داد که تقریبا در همه جمعیت‌های مورد مطالعه نتایج مشابه‌ای بدست آمد، به گونه‌ای که

فراوانی الل A و G به ترتیب در مرغان بومی شوش ۰/۵۴ و ۰/۴۶ ، ملاثانی ۰/۸۵ و ۰/۱۵ و در اندیمشک ۰/۵۷ و ۰/۴۷ گزارش شد.

در تحقیقی که Pagala *et al* (2017) به منظور بررسی چندشکلی ژن Mx در جوجه‌های بومی اندونزی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام دادند گزارش کردند که این ژن دارای سه نوع ژنوتیپ AA، AG و GG و دو آلل A و G می‌باشد و همینطور فراوانی آلل A بیشتر از فراوانی آلل G است که با نتایج حاصل از تحقیق ما مطابقت دارد. در نهایت گزارش شد که ژن Mx در تمام سویه‌های مرغ چندشکل می‌باشد و پتانسیل بالایی برای استفاده به عنوان نشانگر ژنتیکی برای مقاومت در برابر آنفولانزای مرغی و بیماری نیوکاسل در جوجه‌های بومی اندونزی دارد.

همچنین در مطالعه‌ای که به بررسی چندشکلی ژن Mx با آنزیم Hpy8I در مرغ‌های بومی مرکز اصلاح نژاد مازندران، فارس و خراسان انجام گرفت در نهایت فراوانی آللی، آلل های A و G به ترتیب در جمعیت مرغ های بومی ساری ۰/۶۹ و ۰/۳۱، مرغ بومی شیراز ۰/۵۸ و ۰/۴۲، مشهد با ۰/۶۱ و ۰/۳۹، جمعیت مرغ گوشتی نژاد راس ۰/۴۶ و ۰/۵۴ و در جمعیت مرغ تخم گذار ۰/۸۶ و ۰/۱۴ گزارش شد که در اکثر موارد فراوانی آلل A بیشتر از آلل G می‌باشد که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد (Malek *et al*., 2014).

جدول ۴: فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی ژن Mx با آنزیم Hpy8I در مرغ‌های بومی استان خوزستان

Table 4: Genotypic and allelic frequency of Mx gene digested with Hpy8I enzyme in native chickens of Khuzestan province

فراوانی آللی Allelic frequency		فراوانی ژنوتیپی Genotypic frequency	تعداد Number	ژنوتیپ Genotype	شهر City
G	A				
0.15	0.85	0.8	40	AA	ملاثانی Mollasani
		0.1	5	AG	
		0.1	5	GG	
0.47	0.53	0.45	9	AA	اندیمشک Andimeshk
		0.15	3	AG	
		0.40	8	GG	
0.46	0.54	0.40	12	AA	شوش shush
		0.27	8	AG	
		0.33	10	GG	

در پژوهشی که به منظور شناسایی چندشکلی ژن Mx به عنوان نشانگر ژنتیکی جهت فعالیت ضدویروسی در جوجه‌های مصر صورت گرفت، نتایج حاصل از PCR-RFLP نشان داد که سه ژنوتیپ AA، AG، GG در موقعیت نوکلئوتید هدف در ژن Mx در تمام نژادها و سویه های مورد مطالعه مرغ وجود دارد. فراوانی آلل مقاوم در پرندگان مورد آزمایشA (۰/۶۷) بیشتر از فراوانی متوسط آلل حساس G (۰/۳۳) در همان پرندگان بود که نتایج گزارش شده با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Hassanane *et al*., 2017).

در مطالعه‌ای توالی نوکلئوتیدی ژن Mx مرغ در بسیاری از نژادها تعیین گردید. که در مجموع ۲۵ جایگزینی نوکلئوتیدی که ۱۴ مورد آن باعث ایجاد مبادلات اسید آمینه شدند مشاهده شد که نتایج نشان داد ژن Mx مرغ بسیار چندشکل می‌باشد و

در نهایت گزارش شد که در بعضی از نژادها پاسخ مثبت به فعالیت ضد ویروس آنفولانزا نشان می‌دهد و همینطور جایگزینی تنها در اسیدآمینه Mx بر فعالیت ضد ویروسی در جوجه‌های اهلی تاثیر می‌گذارد (Ko *et al*., 2002).

در پژوهشی دیگر که بر روی مرغ بومی اندونزی صورت گرفت گزارش شد که فراوانی آلل مقاوم (A) مرغ بومی ۶۵ درصد و در خروس ۶۰ درصد و فراوانی آلل حساس(G)، ۳۵ درصد در مرغ و در خروس ۴۰ درصد است (Sartika *et al*., 2011). نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج تحقیق ما که نشان از وجود فراوانی بالای آلل A می‌باشد یکسان است.

تنوع درون جمعیتی با تعیین شاخص هایی همچون هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار(He)، شاخص شانون و شاخص تثبیت (F) مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق مقدار هتروزیگوسیتی جمعیت مرغ بومی در ملاثانی ۰/۱ ، اندیمشک ۰/۱۵ و شوش ۰/۲۶درصد است. میانگین هتروزیگوسیتی ۰/۱۷ بدست آمد که نشانه تنوع نسبتاً پایین در جایگاه ژنی Mx در مرغ بومی خوزستان است (جدول ۵). میانگین شاخص شانون (I) برای این جایگاه در جمعیت ۰/۶ و شاخص تثبیت (F) ۰/۵۸ می‌باشد (جدول ۵) که تنوع کم این جایگاه در جمعیت مرغ بومی خوزستان را تایید می‌کند.

جدول ۵: هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ژن Mx برای مرغ بومی خوزستان

Table 5: Observed heterozygosity and expected heterozygosity of Mx gene for native chickens of Khuzestan province

جایگاه ژنی به تفکیک شهر Number of sample	تعداد نمونه Observed Heterozygosity	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Expected heterozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار
ملاثانی Mollasani	50	0.10±0.03	0.25±0.01
اندیمشک Andimeshk	20	0.15±0.04	0.49±0.02
شوش Shush	30	0.26±0.03	0.49±0.01
میانگین و خطای استاندارد Mean ± SE	33.3±8.8	0.17±0.04	0.41±0.08

جدول۶: فراسنجه‌های تنوع ژنتیکی برای جایگاه ژنی Mx

Table 6: Genetic variety of Parameters for the Mx Gene

شهر city	شاخص تثبیت (F) Fixation Indrx	شاخص اطلاعاتی شانون (I) Shannon' s Information Index	تعداد آلل واقعی (Na) Observed number of alleles	اندازه آلل موثر (Ne) Effective number of alleles
ملاثانی Mollasani	0.60	0.42	2	1.34
اندیمشک Andimeshk	0.69	0.69	2	1.99
شوش Shush	0.46	0.69	2	1.99
میانگین	0.58	0.60	2	1.77

برای بررسی تعادل هاردی – واینبرگ ژن موردنظر در جمعیت و بررسی تطابق فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده با فراوانی‌های مورد انتظار براساس فراوانی آلل‌های G و A از نرم‌افزار Gen ALEx و روش آزمون کای مربع استفاده شد و مشخص شد که

جمعیت در تعادل هاردی - واینبرگ نیست ($P<0/01$). علت عدم تعادل در جایگاه می‌تواند نشانه وجود بعضی عوامل عدم تعادل هاردی واینبرگ نظیر (جهش، مهاجرت و انتخاب) باشد.

مقدار کای مربع برای مرغان بومی ملاثانی ۱۸/۰۷۴۷۴ ، اندیشمک ۹/۷۷۹ و در شوش ۶/۴۶۷ بدست آمد که در سطح یک درصد معنی‌دار بود و جمعیت هیچ شهری در تعادل هاردی‌واینبرگ نمی‌باشند که این نشان دهنده وجود عوامل بر هم زننده تعادل مانند انتخاب، مهاجرت، رانش ژنتیکی، جهش و غیره در جمعیت‌ها، به ویژه انتخاب می‌باشد. این موضوع قابل پیش بینی بود چراکه مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی خوزستان (مرکز اصلاح نژاد جاهد) در ملاثانی قرار گرفته است و در این مرکز مرغ بومی خوزستان طی مراحل اصلاح نژادی تحت انتخاب شدید قرار می‌گیرد و مرغهای اصلاح نژاد شده در روستاهای اطراف به فروش می‌رسند و در جمعیت پخش می‌شوند. پس نتایج بدست آمده مانند پایین بودن تنوع و کاهش هتروزیگوسیتی در جمعیت مخصوصا در ملاثانی دور از ذهن نبود.

یکی دیگر از معیارهای تنوع و چندشکلی تعداد آلل مؤثر می‌باشد که در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار Gen ALEX محاسبه شد. در جایگاه ژنی MX در مرغ بومی خوزستان ۲ نوع آلل واقعی (G و A) شناسایی شد. نتایج نشان داد که متوسط اندازه آلل موثر (۱/۷۷) از تعداد الل واقعی (۲) کمتر است. در جایگاهی که تفاوت بین این دو مقدار (آلل واقعی و آلل مؤثر) زیاد باشد، دلیل بر وجود فراوانی آللی با پراکندگی بالا در آن جایگاه‌ها است. جایگاه‌هایی که فراوانی آللی در آن‌ها تقریبا برای تمام آلل‌ها مشابه باشد، تعداد آلل موثر بیشتری را نشان خواهد داد. تعداد آلل مؤثر تنها زمانی با تعداد آلل واقعی برابر خواهد بود که همه آلل‌ها فراوانی مشابهی داشته باشند، ولی در بیشتر مواقع تعداد آلل مؤثر کمتر از تعداد آلل واقعی است. نتایج نشان می‌دهد که آلل G و A در مرغان بومی اندیشمک و شوش خیلی نزدیک به هم است اما در مرغان بومی ملاثانی از هم فاصله دارند.

نتیجه گیری

نتایج تمامی تحقیق های گزارش شده نشان داد آلل A و همینطور ژنوتیپ AG سبب مقاومت به بیماری آنفولانزا می‌گردند. از آنجایی که مرغ بومی خوزستان دارای آلل A با فراوانی بالا می‌باشد و همینطور ژنوتیپ AG در بین جمعیت مشاهده گردید پس می‌توان از تکنیک PCR-RFLP در برنامه پرورش برای انتخاب جوجه هایی که مقاومت به بیماری دارند را انتخاب کرد. ژن MX پتانسیل بالایی برای استفاده به عنوان نشانگر ژنتیکی برای مقاومت در برابر آنفولانزای مرغی و بیماری نیوکاسل دارد و این امر در بهبود پرورش طیور بومی با تولید جوجه های مقاوم در برابر بیماری های عفونی کمک خواهد کرد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که هزینه‌های این تحقیق را تأمین نمودند، تشکر به عمل می‌آید.

منابع

Arnheiter, H. and Meier, E. (1990). Mx proteins: antiviral proteins by chance or by necessity. New Biologist 2 (10): 851-857.

Capua, I. and Marangon, S. (2006). Control of avian influenza in poultry. Emerging Infectious Diseases 12: 1-2.

Haller, O. and Kochs, G. (2002). Interferon-indused mx proteins: dynamic-like GTPase with antiviral activity. J. Traffic. 10:710-717.

Ko, J.H., Jin, HK. Asano, A. Takada, A. Ninomiya, A. Kida, H. Hokiyama, H. Mutsuo, O. Tsuzuki, M. Nishibori, M. Mizutani, M. and Watanabe, T. (2002). Polymorphisms and the Differential Antiviral Activity of the Chicken *Mx* Gene. Genome Research. 12: 595–601.

Lamb, R. and Krug, R. (1996). "Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. Fields Virology. 1: 1353-1395

Lee, SH. and Vidal, SM. (2002). Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. Genome Research. 12(4):527-530.

Li, X.Y., Qu, L.J. Yao, J.F. and Yang, N. (2006). Skewed allele frequencies of an Mx gene mutation with potential resistance to avian influenza virus in different chicken populations. Poultry Science. 85(7): 1327-1329.

Livant, E.J., Avendano, S. Mc Leod, S. Ye, X. Lamont, S.J. Dekkers, J.C. and Ewald, S.J. (2007). Mx1nExon 13 Polymorphisms in Broiler Breeder Chickens and Associations with Commercial Traits. Poultry Science. 86 (1): 206.

Malek Shahdehi, S., Hafezian, S.H. Rahimi, G.H. and Ansari, Z. (2014). Comparison of single nucleotide polymorphisms of Mx gene in different strains of broiler chickens and laying hens. Iranian Journal of Animal Science Research. 6 (1): 92-97. (In Persian)

Hassanane, A.M., Hassan Fatma, M. Esteftah, M. El-Komy Khaled, M. Roushdy, C. and Nagwa, A. 2018. Identification of Mx gene nucleotide dimorphism (G/A) as genetic marker for antiviral activity in Egyptian chickens. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 16 (1): 83–88.

Pagala, M., Saili, T. Nafiu, L. Sandiah, N. Baa, L. Selamet, A. Zulkarnaen, D. Kurniawan, W. (2017). Polymorphism of Mx|*Hpy*81 Genes in Native Chickens Observed using the PCR-RFLP Technique. International Journal of Poultry Science. 16 (9): 364-368.

Sartika, T., Sulandari, S. Syamsul, M. and Zein, A. (2011). Selection of Mx gene genotype as genetic marker for Avian Influenza resistance in Indonesian native chicken. BMC Proceedings. 5 (4): 37.

Susanti, R., Nur Rahayu, U. Rahayuningsih, M. and Fibriana, F. (2017). Identification of Avian Influenza Genetic Resistance Gene Marker in Chickens. Makara Journal of Science. 21(4):167-174.

Xiangun, Y., Ten, Z. Zhang, Y. and Li, K. (2010). Single nucleotide polymorphisms in the chicken Mx gene at position 2032 by Real-time Allele PCR Melting-curve Analysis. Journal of Poultry Science. 47: 133-138.