

بررسی چند شکلی ژن $TGF\beta_3$ و ارتباط آن با صفات رشد در جوجه های گوشتی سویه راس

حامد شریفی نژاد*^۱ و محمد باقر منتظر تربتی^۲

۱ و ۲- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار علوم دام دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۰

چکیده

در این تحقیق به منظور شناسایی چند شکلی های قسمتی از ژن فاکتور موثر بر رشد بتا- $TGF\beta_3$ (۳) در جوجه های گوشتی سویه راس با استفاده از تکنیک واکنش های زنجیره ای پلیمرز و روش آرایش فرم فضایی رشته های منفرد (PCR-SSCP) انجام شد. به این منظور به طور تصادفی از تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه خونگیری به عمل آمد، و سپس DNA ژنومی آنها استخراج گردید. برای تعیین کیفیت DNA های استخراجی از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. سپس با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی طی واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) قطعه ای از ژن به اندازه ۲۹۴ جفت باز از ناحیه قسمتی از اینترون چهارم و کل اگزون پنجم این ژن تکثیر گردید، و در نهایت برای مشخص شدن باندها از ژل آکرلامید و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره استفاده شد. تجزیه و تحلیل الگوهای باندها منجر به شناسایی سه الگو باندها AA، AB و BB شد، که فراوانی آنها به ترتیب برابر با ۰/۵۲، ۰/۴۲ و ۰/۰۶ بدست آمد. و دو آلل A و B با فراوانی ۰/۷۳ و ۰/۲۷ در جمعیت مورد مطالعه شناسایی شد. شاخص شانون و تعداد آلل موثر برای این جایگاه از ژن $TGF\beta_3$ به ترتیب ۰/۵۸۳۳ و ۱/۶۵۰۷ بدست آمد. برای تایید نتایج حاصل از PCR-SSCP برخی نمونه ها از هر ژنوتیپ تعیین توالی مستقیم شدند. مقایسه میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ های مختلف نشان داد که چندشکلی ژن $TGF\beta_3$ با صفات درصد وزن ران و درصد وزن لاشه ارتباط معنی داری دارد.

کلمات کلیدی: جوجه گوشتی- چند شکلی- ژن $TGF\beta_3$ - رشد - SSCP.

مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن ۵ قبل از میلاد تا تقریباً 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 راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان‌شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (محمدآبادی و همکاران ۲۰۱۰). بر اساس پژوهش‌های West and Zhou استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: 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 (محمدآبادی و همکاران ۲۰۱۰). از طرفی نیاز روز افزون جامعه به فرآورده‌های پروتئینی با منشاء حیوانی، استفاده از روش‌های نوین تولید و افزایش محصول را ضروری کرده است. در میان این فرآورده‌ها، گوشت مرغ در تغذیه بشر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین دلیل در چند دهه گذشته تولید گوشت مرغ در بسیاری از کشورهای جوان از جمله ایران رشد زیادی

داشته است و پیش بینی می‌شود که در آینده نیز ادامه یابد. برای افزایش تولید عمودی علاوه بر روش‌های نوین مدیریت، بهداشت و تغذیه، استفاده از روش‌های علمی اصلاح نژاد به همراه تکنیک‌های مولکولی ضروری می‌باشد. میزان رشد به دلیل ارزش اقتصادی اش یکی از مهمترین زمینه‌ها در صنعت اصلاح نژاد طیور می‌باشد، و به شکل چشمگیری در گذشته از طریق انتخاب براساس توده بدنی که وراثت متوسط به بالا را نوید می‌دهد، بهبود یافته است. با این وجود رشد یک فرآیند پیچیده می‌باشد که دربرگیرنده افزایش در وزن و تمایز و نیز بلوغ بسیاری از بافت‌ها به ویژه عضلات اسکلتی می‌باشد. بنابراین تعدادی محدودیت (مانند کارایی تولید مثلی، افزایش چربی لاشه، ناهنجاری‌های اسکلتی و آسیت) به دلیل انتخاب براساس توده بدنی به شکل فشرده برای میزان رشد بالا به وجود آمده است. این اختلال در هموستاز فیزیولوژیک به یک سد در انتخاب جهت ادامه بهبود در رشد طیور منجر شده است (محمدآبادی و همکاران ۲۰۱۰). همچنان که نشان داده شده است، چندشکلی‌های ژنتیکی با صفات کمی (برای مثال، میزان رشد) ارتباط دارد، بنابراین ممکن است که با به کارگیری نشانگرهای ژنتیکی جهت ارزیابی مستقیم ژنوم برای حذف آلل‌های ناخواسته و افزایش درجه هموزیگوتی یا هتروزیگوتی برای آلل‌های مطلوب قدم‌های اساسی در جهت بهبود ژنتیکی در طیور برداشت (دیونینگتون و پلوتسکی ۱۹۹۰ و همکاران ۲۰۰۴). اثرات بیولوژیکی فاکتور مؤثر بر رشد بتا شامل اثرات روی

های موجود در جایگاه $TGF\beta$ ممکن است در انتخاب براساس نشانگر برای تولید آنتی بادی مفید باشند (محمدی فر و همکاران ۱۳۹۲) (ژائو و لامونت ۲۰۰۳). بررسی چند شکلی تک نوکلئوتیدی روی ژن میواستاتین در لاین های مختلف مرغ نشان می دهد که میواستاتین عضو جدیدی از خانواده بزرگ فاکتور مؤثر بر رشد بتا است که به صورت اختصاصی در ماهیچه اسکلتی بیان شده و به عنوان تنظیم کننده رشد در این بافت عمل می کند (گیو و همکاران ۲۰۰۲). در پژوهشی (لی و همکاران ۲۰۰۳) رابطه چند شکلی ژن فاکتور مؤثر بر رشد بتا-۳ را با صفات وزن در ۲، ۴، ۶ و ۸ هفتگی بررسی و رابطه معنی داری بین چند شکلی های این ژن و صفت وزن را گزارش کردند. در پژوهش دیگری، همبستگی های معنی داری بین ژن های گوناگون $TGF\beta$ با میزان SE^3 سکوم، کبد و طحال گزارش شده است (کرامر و همکاران ۲۰۰۳). محمدی فر و همکاران (۱۳۹۲) تأثیر ژن $TGF\beta 3$ بر ارزش های فنوتیپی و اثری صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس را مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش آنها فراوانی ژنوتیپ های TT، Tt و tt را به ترتیب ۰/۱۵، ۰/۲۷۵ و ۰/۵۷۵ و مقادیر شاخص شانون (I)، تعداد آلل مؤثر (Ne)، شاخص هتروزیگوزیسیته مشاهده شده (Ho) و شاخص هتروزیگوزیسیته مورد انتظار (He)، برای جایگاه ژنی $TGF\beta 3$ را به ترتیب برابر ۰/۶۰،

تمایز سلولی، تکثیر سلولی، رشد سلولی، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و عملکرد ایمنی است (مادجی و همکاران ۲۰۰۴). زیر خانواده فاکتور بتا یکی از مهمترین ژن های مؤثر در صفات رشد و سازگاری می باشد (بارت و لائو ۱۹۹۴). ژن های خانواده بزرگ $TGF\beta^1$ در تولید پروتئین هایی نقش دارند که انتقال دهنده پیام از یک سلول به سلول دیگر می باشند و نقش آنها در رشد و سازگاری سلول ها مهم است (پیک و همکاران ۱۹۹۹). خانواده $TGF\beta$ دارای چهار ژن به نام های $TGF\beta 1$ ، $TGF\beta 2$ ، $TGF\beta 3$ و $TGF\beta 4$ می باشد (محمدی فر و همکاران ۱۳۹۲). ژن $TGF\beta 3$ در طیور روی کروموزوم شماره ۵ قرار دارد (محمدی فر و همکاران ۱۳۹۲)، که شامل ۷ اگزون و ۶ اینترون می باشد و فعالیت های بیولوژیکی اشکال مختلف $TGF\beta$ در طیور تقریباً مشابه پستانداران گزارش شده است (محمدی فر و همکاران ۱۳۹۲). ژن های $TGF\beta$ بر رشد و تمایز انواع مختلفی از سلول ها و نیز در ساخت ماهیچه، غضروف، استخوان، خون، چربی و سلول های پوششی نقش دارند (محمدی فر و همکاران ۱۳۹۲). تعدادی از محققین رابطه ژن های $TGF\beta$ با جایگاه صفات کمی سازوکارهای پاسخ ایمنی در مرغ ها را بررسی کرده و مشخص نموده اند که این ژن یا ژن های پیوسته به آن در ارتباط با پاسخ ایمنی می باشند. نتایج این پژوهش ها نشان داد که SNP^2

³ Salmonella Enteritis

⁴ polymerase chain reaction technique and single-strand conformation polymorphism

¹ Transforming Growth Factor- β

² Single Nucleotide Polymorphism

۱/۶۹، ۰/۲۸ و ۰/۴۱ گزارش کردند و نشان دادند که آلل T بر افزایش وزن بدن در یک روزگی و ۸ هفتگی تأثیر معنی داری دارد ($P \leq 0/05$). در ایران مطالعات ملکولی متعددی روی طیور در ایران انجام شده است (محمدی فر و همکاران ۱۳۹۲) (مودنی و همکاران ۲۰۱۶) (زندى و همکاران ۲۰۱۴)، اما تا کنون ژن $TGF\beta_3$ و ارتباط آن با صفات رشد و ترکیبات لاشه مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا، هدف از انجام این پژوهش، شناسایی چند شکلی قسمتی از ناحیه اینترون چهارم و کل اگزون پنجم ژن $TGF\beta_3$ در جمعیت جوجه های گوشتی سویه راس با استفاده از روش تفاوت آرایش فرم فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (-PCR SSCP)^۴ و ارتباط آن با صفات رشد و ترکیبات لاشه می‌باشد.

مواد و روش ها

به منظور انجام این تحقیق، تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی راس به طور تصادفی از محل پرورش برای تکثیر قطعه مورد نظر ژن $TGF\beta_3$ ، یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی زیر مورد استفاده قرار گرفت (لی و همکاران ۲۰۰۳).

5'- F: $TGF\beta_3$
TCAGGGCAGGTAGAGGGTGT -3'
5'- R: $TGF\beta_3$
GCCACTGGCAGGATTCTCAC -3'
واکنش PCR با استفاده از کیت Master PCR (Cinnagen, Iran) و مطابق دستورالعمل کیت

و در سن ۶ هفتگی انتخاب گردید. وزن بدن در پایان ۶ هفتگی (زمان کشتار) اندازه گیری شد و در ۶ هفتگی همه جوجه‌ها کشتار و پس از تجزیه لاشه، صفات وزن کل لاشه بدون محتویات شکمی، وزن پشت بدن (گردن، سینه و محوطه لگنی)، وزن عضله سینه، وزن عضله ران، وزن و درصد چربی حفره بطنی اندازه گیری و ثبت گردید. همچنین، در زمان کشتار از تمام جوجه‌ها به مقدار ۶ میلی لیتر خون گرفته شد. برای جلوگیری از انعقاد نمونه‌های خون از EDTA استفاده شد و نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA ژنومی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی انجام گردید (ایرانپور و اسماعیل زاده ۲۰۱۰). سپس کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر-نانودراپ (Nano-Drop2000) بررسی گردید.

انجام گرفت. برنامه حرارتی در جدول ۱ داده شده است (لی و همکاران ۲۰۰۳).

جدول ۱- برنامه حرارتی و زمانی PCR جهت تکثیر قطعه ۲۹۴ جفت بازی ژن TGFβ₃
Table 1. Temperature and time program PCR for replication of 294 bp of TGFβ₃ gene

ژن Gene	مراحل Steps	دما Temperature	زمان Time
TGFβ ₃	واسرشته سازی اولیه primary Denaturation	94°C	3 minutes
	واسرشته سازی Denaturation	94°C	60 seconds
	اتصال آغازگر Primer annealing	58°C	60 seconds
	تکثیر Extension	72°C	60 seconds
	تکثیر نهایی Final extension	72°C	10 minutes

چسبیدن دوباره رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید. نمونه‌ها در ژل پلی آکریل آمید با ولتاژ ۲۰۰ و به مدت ۸ ساعت جهت مشاهده تفاوت موجود در نمونه‌ها الکتروفورز شدند. بعد از پایان الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید با استفاده از نیترات نقره جهت دیدن چندشکلی‌های ایجاد شده رنگ آمیزی شد (بنبیوزا و همکاران ۲۰۰۶). برای برآورد فراوانی الگوها از نرم افزار POPGEN نسخه ۳۱ استفاده گردید (یه و همکاران ۱۹۹۹). اطلاعات بدست آمده با استفاده از مدل آماری زیر و با روش GLM در نرم افزار آماری SAS (SAS 2006) آنالیز و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + G_j + b(W_i - W) + e_{ijk}$$

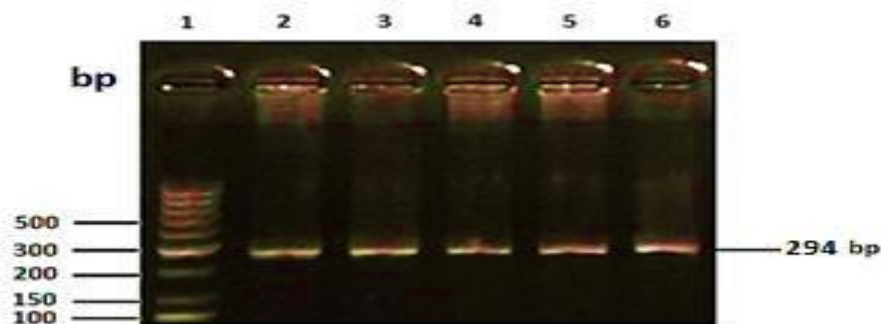
در این مدل؛ Y_{ijk} : ارزش فنوتیپی صفات مورد مطالعه، μ : میانگین ارزش‌های فنوتیپی صفات و

سپس واکنش PCR با استفاده از کیت استاندارد انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. قطعه تکثیرشده با اشعه ماورابنفش (UV) عکسبرداری و مشاهده شد. برای تجزیه محصولات PCR به کمک روش SSCP از ژل آکریل آمید استفاده شد. برای این منظور ۴ میکرولیتر از محصول PCR با ۴ میکرولیتر SSCP-dye (شامل ۹/۵ میلی لیتر فرمامید+۴۰۰ میکرولیتر EDTA نیم مولار+۰/۰۳ گرم بروموفنل بلو ۱۰ درصد) و نیز با ۳ میکرولیتر گلیسرول مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ترموسایکلر با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس نمونه‌ها به سرعت به داخل یخ منتقل شدند تا از بهم

با استفاده از یک جفت آغازگرهای اختصاصی طی واکنش زنجیره ای پلیمرز، قطعه ۲۹۴bp از ناحیه قسمتی از اینترون چهار و کل اگزون پنجم ژن $TGF\beta_3$ تکثیر گردید که به منظور تشخیص تکثیر قطعه مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۱).

اثر باقی‌مانده می‌باشد. عوامل جنس (S_i) و ژنوتیپ (G_j) به عنوان اثرات ثابت و $b(W_i-W)$ به عنوان ضرایب رگرسیون وزن اندام‌ها به کوواریت وزن زنده یا وزن لاشه (آنالیز اندام‌ها) در مدل وارد گردید.

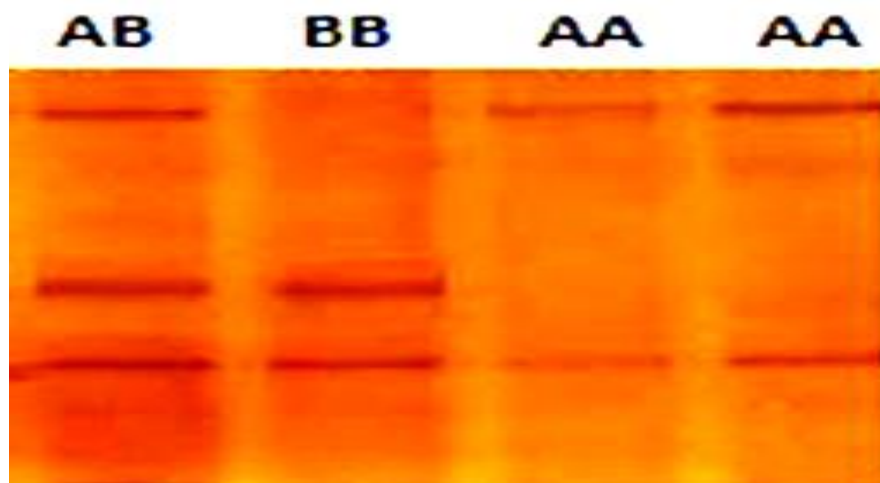
نتایج و بحث



شکل ۱- کیفیت محصول PCR
Figure 1. PCR product quality

منجر به شناسایی سه الگوی باندی متفاوت در جمعیت مورد مطالعه گردید (شکل ۲).

تجزیه و تحلیل باندهای حاصل از الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره با استفاده از روش چند شکلی فضایی تک رشته ای،



شکل ۲- الگوی بانندی ژن $TGF\beta_3$
 Figure 2. Bands pattern of $TGF\beta_3$ gene

الگوهای بانندی به صورت AA، AB و BB بودند، که فراوانی‌ها به ترتیب برابر با ۰/۵۲، ۰/۴۲ و ۰/۰۶ به دست آمد. و دو آلل A و B به ترتیب با فراوانی ۰/۷۳ و ۰/۲۷ در جمعیت مورد مطالعه شناسایی شد. از شاخص‌های مهم یک نشانگر مولکولی تعداد آلل، فراوانی آللی، تعداد آلل موثر و میزان هتروزیگوسیتی می‌باشد، که مقدار هر کدام از این پارامترهای موثر در تنوع درون جمعیت در (جدول ۳) ذکر شده است.

جدول ۳- پارامترهای آماری و ژنتیکی برآورد شده ژن $TGF\beta_3$ توسط نرم افزار پاپ ژن

Table 3. Statistical and genetic parameters estimated by the Application pop-gene gene $TGF\beta_3$

ژن	هموزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هموزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی Nie	مقدار Value	تعداد آل	شاخص شانون
Gene	Observed Hemozygosity	Observed Hetrozygosity	Expected Hemozygosity	Expected Hetrozygosity	Hetrozygosity(Nie)	χ^2	موثر N_e	Shannon index(I)
$TGF\beta_3$	0.58	0.42	0.6040	0.3960	0.3942	0.36	1.6507	0.5833

ارتباط چندشکلی این ژن با صفات رشد بوسیله رویه ی GLM نرم افزار SAS آنالیز شد و نتایج نشان داد که ژنوتیپ های مشاهده شده در ناحیه مورد مطالعه با درصد وزن لاشه و درصد وزن ران ارتباط معنی داری دارد ($P < 0.05$). نتایج همچنین نشان داد که جوجه های با ژنوتیپ BB برای صفات درصد وزن لاشه و درصد وزن ران نسبت به دیگر ژنوتیپ ها دارای میانگین حداقل مربعات بالاتری می باشند (جدول ۴).

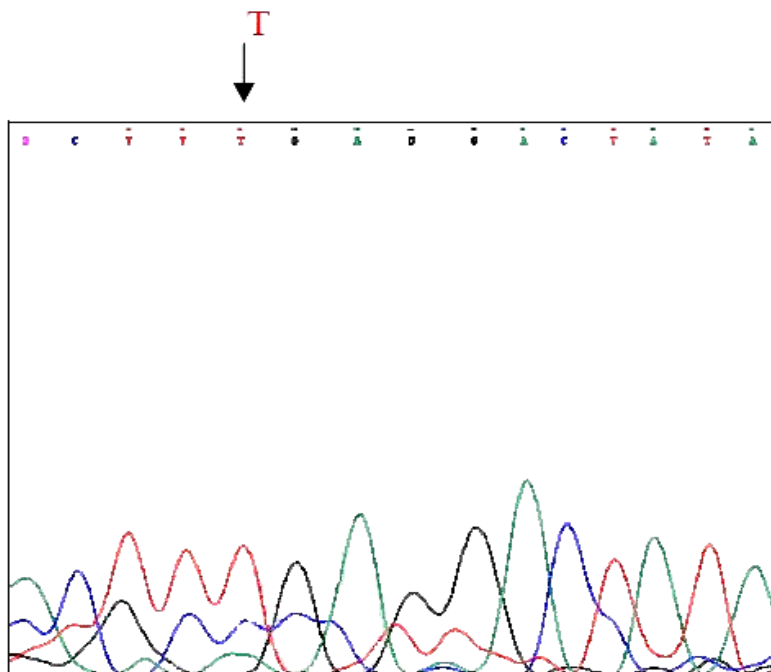
جدول ۴- میانگین حداقل مربعات و خطای استاندارد صفات رشد براساس ژنوتیپ های ژن $TGF\beta_3$ در جوجه های

گوشتی سویه راس

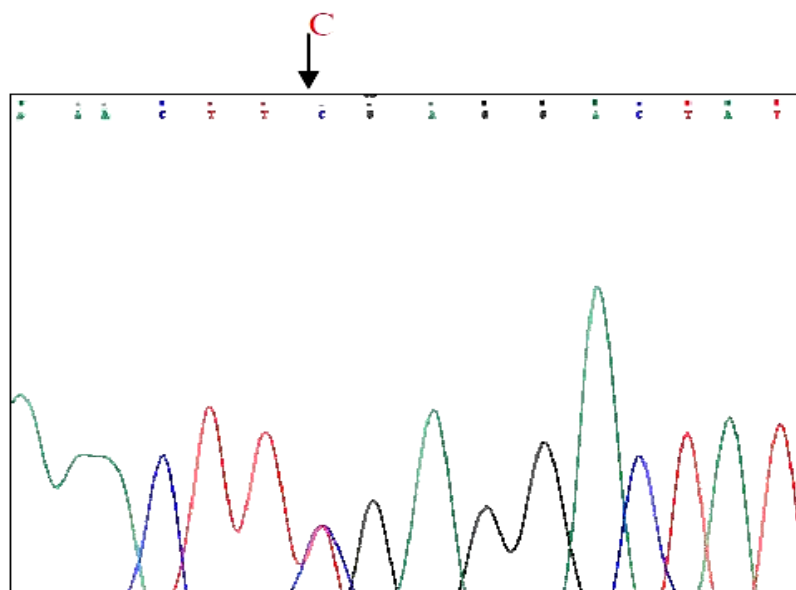
Table 4. Mean of the least squares and standard error of growth traits based on $TGF\beta_3$ genotypes in broiler chickens Ross strain

صفات Traits	ژنوتیپ genotype			P-Value
	AA	AB	BB	
وزن بدن در ۶ هفته	2500.4±25.47	2543.7±20.65	2502.02±51.46	0.33
Body weight at 6 week				
وزن لاشه	1727.2±18.2	۱۷۵۵/۷±۱۴/۶۶	1764.4±36.5	0.35
Carcass weight				
وزن عضله سینه	579.5±7.49	۵۷۸/۶±۷/۲	569.11±12.92	0.51
Chest weight				
وزن ران	485.85±6.20	۵۰۶/۴۳±۴/۷	528±4.41	0.08
Femur weight				
وزن بال	200.78±19.45	203.53±1.28	195.22±4.15	0.09
Wing weight				
وزن پشت	380.55±5.14	390.80±3.51	380.72±9.53	0.19
Back weight				
وزن چربی شکمی	26.34±1.09	26.24±0.91	25.92±2.46	0.65
Abdominal fat				
درصد وزن لاشه	68.82±0.46	68.97±0.38	71.25±2.2	0.039*
Percentage of carcass weight				
درصد وزن عضله سینه	23.02±0.34	22.78±0.23	22.47±0.30	0.19
Percentage of chest weight				
درصد وزن ران	19.42±0.21	19.90±0.14	20.7±0.10	0.003*
Percentage of femur weight				
درصد وزن بال	8.05±0.06	8.02±0.05	7.8±0.12	0.57
Percentage of wing weight				
درصد وزن پشت	15.40±0.04	15.33±0.18	15.88±0.34	0.35
Percentage of back weight				
درصد وزن چربی شکمی	1.05±0.07	0.94±0.08	·0.91±0.06	0.25
Percentage of abdominal fat				

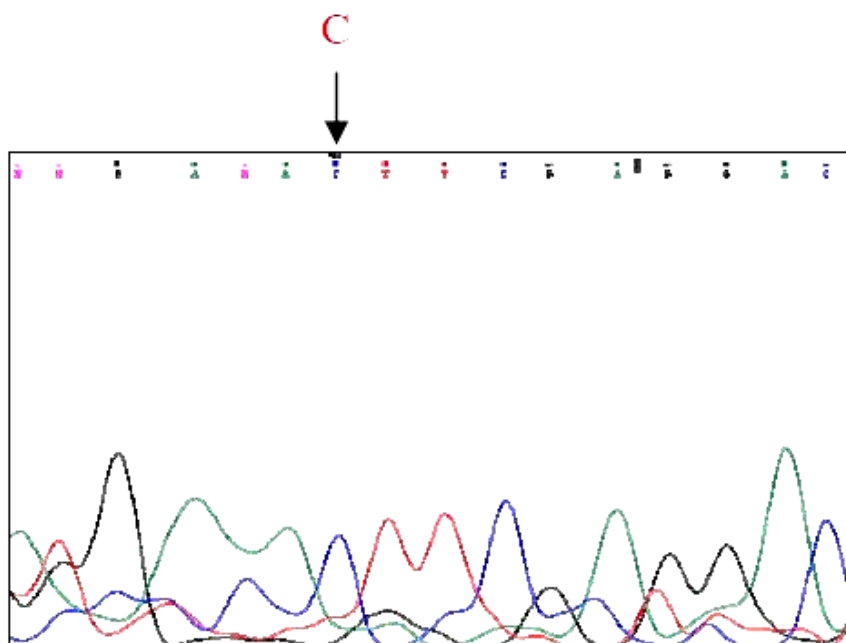
برای تایید نتایج حاصل از PCR-SSCP، برخی از نمونه‌ها با ژنوتیپ متفاوت تعیین توالی گردیدند. با بررسی نتایج تعیین توالی، نتایج حاصل از PCR-SSCP مورد تایید قرار گرفت (شکل ۳، ۴ و ۵).



شکل ۳- نتایج تعیین توالی ژنوتیپ AA
Figure 3. Results of sequencing of AA genotype



شکل ۴- نتایج تعیین توالی ژنوتیپ AB
 Figure 4. Results of sequencing of AB genotype



شکل ۵- نتایج تعیین توالی ژنوتیپ BB
 Figure 5. Results of sequencing of BB genotype

براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان گفت که تنوع آللی و ژنتیکی برای این ناحیه از ژن $TGF\beta_3$ در جمعیت جوجه های گوشتی سویه راس تقریباً بالا می باشد، و می تواند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی در بررسی ها و مطالعات آینده از آن بهره گرفت همچنین می توان برای مطالعه چند شکلی ها و تنوع بیشتر اگزون های دیگر این ژن را در برنامه های اصلاح نژادی مورد بررسی قرار داد. تکنیک PCR-SSCP یک ابزار قوی، آسان، قابل اعتماد و با هزینه پایین در جمعیتی از حیوانات جهت بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی واریانت های مختلف آللی ژن ها می باشد.

بحث

صفات رشد و کیفیت لاشه جزء مهمترین صفات اقتصادی در جوجه های گوشتی می باشند. امروزه کیفیت لاشه و بازاری پسند بودن آن مورد توجه تولیدکنندگان و مصرف کنندگان می باشد و روز به روز بر اهمیت آن در بازارهای جهانی افزوده می شود. مشابه با دیگر صفات اقتصادی مهم، صفات رشد و چربی نیز بوسیله تعداد زیادی ژن که اثر برخی از آنها زیاد (ژن عمده) و اثر بسیاری دیگر کم می باشد، کنترل می شوند. اگر چه تعداد ژن های موثر بر یک صفت مانند صفات رشد و چربی نامشخص است، اما تعدادی ژن کاندید موثر بر روی این صفات شناسایی شده است. مدل ژن عمده پیشنهاد می کند تعداد کمی ژن می تواند سهم عمده ای از تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص دهد.

پیشرفت های اخیر در ژنتیک مولکولی امکان شناسایی و تعیین توالی این ژن ها را فراهم نموده است (فالكونر و مک کی ۱۹۹۶). ژن $TGF\beta_3$ به عنوان ژن کاندیدا جهت بررسی ارتباط چندشکلی این ژن با صفات رشد و ترکیبات بدن در سویه تجاری طیور گوشتی راس مورد مطالعه قرار گرفت. مشابه با تحقیق حاضر در مطالعه خود بر روی ژن $TGF\beta_3$ در جوجه های بومی استان فارس در نتایج خود سه ژنوتیپ گزارش کردند با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. فراوانی ژنی و ژنوتیپی محاسبه شده برای جمعیت مورد مطالعه با فراوانی ژنی و ژنوتیپی تحقیق محمدی فر و همکارانش مغایرت دارد، دلیل این مغایرت می تواند ناشی از جمعیت های مورد مطالعه متفاوت باشد (محمدی فر و همکاران ۱۳۹۲). رشد و ترکیبات بدن منعکس کننده رشد و نمو همه اندامهای بدن در طیور می باشد و تظاهر فنوتیپی این صفات نتیجه اثر متقابل ژنتیک، تغذیه و فاکتورهای محیطی می باشد (ونگ و همکاران ۲۰۰۶). در تحقیقی که بر روی جوجه های گوشتی و تخمگذار انجام داده بودند، سه ژنوتیپ را گزارش کردند که با تحقیق حاضر همخوانی داشت و همچنین رابطه معنی داری بین چندشکلی ژن $TGF\beta_3$ را با صفات وزن در ۲، ۴ و ۶ هفتگی را گزارش نمودند (لی و همکاران ۲۰۰۳). در پژوهشی که بر روی مرغان بومی مازندران صورت گرفته نتایج این تحقیق نشان داد که قطعه تکثیر شده دارای دو آلل و سه ژنوتیپ (+/+)، (+/-) و (-/-) می باشد که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت

عنوان یک معیار انتخاب در شرایط عملی مورد استفاده قرار گیرد و لازم است اطلاعات حاصل از نتایج تحقیق در جایگاه فوق در کنار اطلاعات حاصل از سایر جایگاه ها تجزیه و تحلیل شود و انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه در آینده ضروری به نظر می رسد.

دارند همچنین مقایسه اثر بین ژنوتیپ های حاصل از ژن فاکتور موثر بر رشد بتا-۳ بر صفات وزن بدن در یک روزگی و هشت هفتگی، عدم وجود اختلاف معنی دار بین ژنوتیپ های $+/+$ و $-/+$ را نشان داد (عنایتی و رحیمی ۱۳۹۱). تعداد الگوهای باندی مشاهده در تحقیق حاضر نیز با تعداد الگوهای تحقیق (آمرینیا و همکاران ۲۰۱۱) مطابقت داشت که حکایت از اختصاصی عمل کردن آغازگرهای مورد استفاده برای این ژن و عملکرد صحیح PCR دارد. به طور کلی در جوجه های گوشتی که تحت برنامه های شدید اصلاح نژادی هستند، باید به طور همزمان کاهش هزینه ها، بهبود کیفیت تولیدی و سلامت پرند مد نظر قرار گیرد. لذا باید در شاخص های انتخاب صفات شایستگی و رشد منظور گردند. علاوه بر مشکل اندازه گیری این قبیل صفات، همبستگی بین این صفات، پیچیده می باشد. انتخاب به کمک نشانگر می تواند یک گزینه مطلوبی برای بهبود برنامه های اصلاح نژادی مورد توجه قرار گیرد. نتایج حاصل از مطالعه اخیر نشان داد که چندشکلی ناشی از جهش در ژن $TGF\beta_3$ با برخی از صفات ترکیبات لاشه ارتباط معنی داری دارد. لذا می توان با استفاده از اطلاعات بدست آمده از جایگاه فوق در شاخص های بهینه انتخاب، ضمن افزایش صحت انتخاب، پیشرفت ژنتیکی و پاسخ به انتخاب را برای صفات مذکور افزایش داد. با این حال اگر چه اطلاعات حاصل از چندشکلی های یک جایگاه ژنی به منظور مطالعه تاثیر آن با صفات مورد نظر حائز اهمیت است ولی نمی تواند به تنهایی به

منابع

- ۱- عنایتی، ب. و رحیمی، ق.، ۱۳۹۱. اثر جایگاه ژنی $TGF\beta_3$ بر ارزش های اصلاحی و فنوتیپی صفات وزن بدن در مرغان بومی مازندران، مجله تولیدات دامی، شماره، صفحات ۴۹-۵۷.
- ۲- محمدی فر، آ.، فقیه ایمانی، ع.، محمدآبادی، م. و سفلائی، م.، ۱۳۹۲. تاثیر ژن $TGF\beta_3$ بر ارزش های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس، مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، شماره ۵، صفحات ۱۳۶-۱۲۵.
3. Amirinia, C., Seyedabadi, H.R., Amirmozafari, N., Vaez Torshizi, R., Chamani, M., Javanrouh Aliabad, A. and Abbasi, M.A., 2011. Association of transforming growth factor- β_3 gene polymorphism with growth and body composition traits in Iranian commercial broiler lines. *African Journal of Biotechnology*. 10:1784-1788.
4. Benbouza, H., Jacquemin, M., Baudoin, J. and Mergeai, G., 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*. 10: 77-81.
5. Burt, D.W., Paton, I.R. and Dey, B.R., 1991. Comparative analysis of human and chicken transforming growth factor-beta 2 and -beta 3 promoters. *Endocrinal*. 7: 175-183.
6. Burt, D.W. and Paton, I.R., 1992. Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta gene family. *DNA Cell Biological*. 11: 497-510.
7. Burt, D.W. and Law, A.S., 1994. Evolution of the transforming growth factor-beta super family. *Program Growth Factor Research*. 5: 99-118.
8. Cogburn, L.A., Burnside, J.C. and Scanes, G., 2000. Physiology of growth and development. *Sturkie Avian Physiology*. 5: 635-656.
9. Dunnington, E.A., Gal, O. and Plotsky, Y., 1990. DNA fingerprints of chickens selected for high and low body weight for 31 generations. *Journal Animal Genetics*. 21: 247-257.
10. Falconer, D.S. and Mckay, T.F., 1996. Introduction to quantitative genetics (4th Ed.). Longman Sel: Harlow, UK. Pp. 289-310.
11. Groenen, M.A., Cheng, H.H., Bumstead, H., Benkel, B.F., Briles, W.E., Burke, T., Burt, D.W., Crittenden, L.B., Deodgson, J., Hillel, J., Lamont, S., Soller, M., Takahashi, H. and Vignal, A., 2000. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Research*. 10: 137-147.
12. Gu, Z., Zhu, D., Li, N., Li, H., Deng, X. and Wu, C., 2004. The single nucleotide polymorphisms of the chicken myostatin gene are associated with skeletal muscle and adipose growth. *Science in China Life Science*. 47: 26-31.
13. Gu, Z.L., Zhang, H.F., Zhu, D.H. and Li, H., 2002. Single nucleotide polymorphism analysis of chicken myostatin gene in different chicken lines. *Yi Chuan Xue bao*. 29: 599-606.
14. Iranpur, V. and Esmailizadeh, M.A.K., 2010. Rapid Extraction of High Quality DNA from Whole Blood Stored at 4°C for Long Period. *Protocol online*http://www.natureleads.com/protocols/cache/2012_03_31_06_37_38_PM.htm. [30May].
15. Kramer, J., Malek, M. and Lamont, S.J., 2003. Association of twelve candidate gene polymorphisms and response to challenge with *Salmonella enteritidis* in poultry. *Animal Genetics*. 34: 339-348.
16. Li, H., Deep, N., Zhou, H., Michell, A.D., Ashwell, C.M. and Lamont, S.J., 2003. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition association with transforming growth for- β_3 genes. *Poultry Science*. 82: 347-356.

-
17. Madeja, Z., Adamowicz, T., Chmurzynska, A., Jankowski, T., Melonek, J., Switonski, M. and Strabel, T., 2004. Effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. *Journal of Dairy Science*. 87: 3925-3927.
 18. Piek, E., Heldin, C.H. and Dijke, P.T., 1999. Specificity diversity, and regulation in $TGF\beta$ superfamily signaling. *Federation American Societies Experimental Biology*. 13: 2105-2124.
 19. Wall, N.A. and Hogan, B.L., 1994. TGF -beta genes in development. *Current Opinion in Genetics & Development*. 4: 517-522.
 20. Wang, Q., Li, H., Li, N., Leng, L., Wang, Y. and Tang, Z., 2006. Identification of single nucleotide polymorphism of adipocyte fatty acid-binding protein gene and its association with fatness traits in the chicken. *Poultry Science*. 85:429-434.
 21. Zhou, H. and Lamont, S.J., 2003. Association of transforming growth factor beta genes with quantitative trait loci for antibody response kinetics in hens. *Animal Genetic*. 34: 275-82.

Study of TGF β_3 gene polymorphism and its association with growth traits in Ross broiler chicken

H. Sharifinejad¹, M.B. Montazer Torbati²

¹MSc. graduated, Department of Animal Science, University of Birjand, Iran

²Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Birjand, Iran

Received: 08/15/2016

Accepted: 03/10/2017

Abstract

In this research in order to identify the part of the gene polymorphism transforming growth factor beta-3 (TGF β_3) in broiler chickens Ross, polymerase chain reaction technique and single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) were performed. For this purpose randomly selection was done between 200 chicks and selected chicks were bled, and genomic DNA was extracted. To determine the quality of the DNA extracted 1% agarose gel was used. Then, by using a pair of specific primers through polymerase chain reaction (PCR) gene fragment with the size of 294 bp from parts of fourth introns and entire fifth exons of the gene was amplified, and finally to determine the bands acrylamide gel and stained with silver nitrate were used. The analysis of band patterns lead to identify three band patterns AA, AB and BB, with 0.52, 0.42 and 0.06 frequency, respectively. Two alleles A and B, with a frequency of 0.73 and 0.27 in the study population was also identified. Shannon index and effective number of alleles for the TGF β_3 gene were 0.5833 and 1.6507, respectively. To confirm the results of PCR-SSCP some samples of each genotype were sequenced directly. Compare of least squares mean different genotypes showed that the gene polymorphism TGF β_3 has significant relation with leg weight and carcass traits.

Keywords: Broiler -PCR - Polymorphism - SSCP - TGF β_3 gene