مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۹ شماره ۳/ سال۱۳۹۸/ صفحات ۶۱ تا ۷۰

ارتباط چندشکلی ژن *NPY* با صفات تولید مثلی در بوقلمون های ایران

نیلوفر راستی‌دوست [۱]، سعید نیک‌بین[۲*]، بهمن نوید شاد[۲] و قربان الیاسی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/٤/۲۹

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی
[۲] به‌ترتیب استادیار و دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه محقق اردبیلی
[۳] مربی گروه علوم دامی مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی تبریز
[*] مسئول مکاتبه: Email: snikbin@uma.ac.ir

چکیده

زمینه‌ی مطالعاتی: نوروپپتیدY یک نوروترنسمیتر در هیپوتالاموس است که نخستین بار از هیپوتالاموس مغز خوک استخراج شد و محرک اشتها و موثر بر هورمون های تولیدمثلی است. **هدف:** هدف این مطالعه، توالی یابی و بررسی ارتباط ژن *NPY* با صفات تولیدمثلی در بوقلمون‌های بومی ایران است. این صفات شامل وزن توده‌ی تخم تولیدی، طول دوره‌ی تخم‌گذاری، سن بلوغ جنسی و وزن اولین تخم می‌باشد. **روش کار:** ۱۲۰ بوقلمون ماده به طور تصادفی از ایستگاه تحقیقات بوقلمون استان آذربایجان شرقی انتخاب شد و رکوردهای تولید مثلی آنها ثبت شد. از نمونه ی خون بوقلمون ها برای استخراج DNA استفاده شد. قطعه ی ۷۲۵ جفت بازی ژن *NPY* با استفاده از پرایمرهای طراحی شده‌ی اختصاصی تکثیر شد. چندشکلی ژن *NPY* با توالی یابی محصولات PCR بررسی شد. **نتایج:** ٤ جایگاه چندشکلی C552T، T544A، T360G و C367A در توالی ژن *NPY* یافت شد. نتایج ارتباط معنی‌داری بین جایگاه T360G با صفت وزن کل تخم نشان داد و چندشکلی A544T ارتباط معنی داری با وزن تخم و طول دوره‌ی تخم‌گذاری داشت. **نتیجه گیری نهایی:** در نتیجه چندشکلی‌های جدیدی در ناحیه اینترونی ژن *NPY* مشخص شد که بر صفات وزن کل تخم، تعداد تخم و طول دوره تخم‌گذاری تاثیر داشت. نتایج این پژوهش می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی بوقلمون‌های بومی شمال غرب ایران مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: چندشکلی، بوقلمون، نوروپپتید y، طول دوره ی تخمگذاری، وزن تخم

مقدمه

نوروپپتیدY (NPY) یک نورومودلاتور[۱] است که در غلظت بالا در هیپوتالاموس وجود دارد (پدرازیمی و همکاران ۲۰۰۳)، و متشکل از ۳٦ اسیدآمینه است (تاتموتو و همکاران ۲۰۰٤). NPY اولین بار در سال ۱۹۸۲ از هیپوتالاموس مغز خوک ایزوله شد (تاتموتو و همکاران ۱۹۸۲). این نوروترانسمیتر ٥ گیرنده دارد که هرکدام از آن‌ها توسط ژن‌های مختلف رمزگذاری می‌شوند و هر کدام عملکردی خاصی دارند (ماکتلی و همکاران ۲۰۰۷). ژن *NPY* در بوقلمون روی کروموزوم ٦ قرار داشته و ۳ اگزون دارد (NCBI). این نوروپپتید یکی از فراوان‌ترین پپتیدهای مغز در منطقه

[1] Neuromodulator

پاراونتریکولارPVN و دیگر مناطق است که تاثیر آن در تنظیم رفتار غذا خوردن، تعادل انرژی و ترشح غدد شناخته شده است (گاگنون و همکاران ۲۰۰۷). میزان ترشح نوروپپتیدهای مرکزی تحت تاثیر پیام‌های دریافت شده از محیط و سیگنال‌های عصبی ناحیه هیپوتالاموس کنترل می‌شود تا میزان مصرف انرژی و غذا تنظیم گردد (دنبو و همکاران ۲۰۱٤). نوروپپتیدY انسان و جوجه تنها در یک آمینواسید تفاوت دارند (لاندل و همکاران ۲۰۰۲). پپتید مرتبط با آگوتی[2] (AGRP) که داخل هسته‌ی قوسی هیپوتالاموس بیان می‌شود به‌عنوان یک آنتاگونیست، گیرنده‌های MC4R را مهار و مصرف غذا را افزایش می‌دهد (کون و همکاران ۲۰۰۱) نورون‌های حاوی این پپتید که فقط در داخل هسته‌ی قوسی بیان می‌شوند نوروپپتیدY و گابا ترشح می‌کنند (تاچیبانا و همکاران ۲۰۰۱) *NPY* یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر اشتها است و در زمان گرسنگی به میزان بیشتری ترشح می‌شود که می‌تواند اثرات گوناگونی از جمله کنترل ترشح غدد و عملکردهای فیزیولوژیکی داشته باشد، اما مهمترین و بارزترین تاثیر آن تحریک اشتها است (اینوی ۲۰۰۰ و کالرا ۲۰۰٤). از سوی دیگر این نوروپپتید با کنترل ترشح هورمونGnRH[3] از سطح هیپوتالاموس اثرات زیادی بر عملکردهای تولیدمثلی دارد (دیلون و همکاران ۲۰۰۹، کلنک و همکاران ۲۰۱۰). پژوهش‌هایی نیز بر روی جهش‌های ژن *NPY* و ارتباط آن با صفات تولیدی و تولیدمثلی طیور انجام شد که ارتباط معنی داری بین چندشکلی‌های ناحیه پروموتور این ژن و صفات تولیدمثلی مرغ نشان دادند (دان و همکاران ۲۰۰٤، فاطمی و همکاران ۲۰۱۲). بطور کلی اهمیت صفات تولید مثلی در این پژوهش‌ها می‌تواند بر کیفیت تخم که یکی ازعوامل تاثیرگذار درمیزان جوجه کشی، رشد جوجه ها و بازارپسندی است تاثیر بگذارد (رنجبر و همکاران ۱۳۹٤) در این پژوهش هدف بررسی چندشکلی‌های ژن *NPY* و ارتباط آن با صفات تولیدمثلی در بوقلمون‌های بومی ایران بود .

مواد و روش

از ۱۲۰ بوقلمون جمعیت اصلاح نژادی ایستگاه تحقیقات بوقلمون تاتار استان آذربایجان شرقی که با توجه به شرایط استاندارد و نیازهای بین‌المللی پرورش یافته و دارای رکوردهای تولید تخم بودند، رکوردگیری به عمل آمد. رکوردگیری تولید تخم برای مدت ۷ ماه از اسفند تا شهریور انجام شد. خون از ورید زیر بالی بوقلمون‌ها گرفته شد. نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی EDTA ذخیره شد و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- نگهداری شد. برای استخراج DNA از روش بیلز و همکاران (۲۰۰۷) با اعمال تغییراتی استفاده شد. DNA استخراج شده از نمونه‌ها از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۸,۰ درصد تعیین کیفیت شد (شکل ۱).

آغازگرها

با استفاده ازنرم‌افزارPrimer3، پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر بخشی از اگزون و اینترون۱ ژنNPY به طول ۷۲۵ باز طراحی شد. توالی پرایمرهای اختصاصی عبارت بود از:

F:GAAGCGTACCCCTCCAAAC
R:CCCCTTTAAGCAGCACAGTC

سپس با استفاده از واکنش PCR با ٥ دقیقه واسرشت اولیه (oC ٩٤) و۳۲ دوره دمایی شامل ۱ دقیقه واسرشت (oC ٩٤)، ٤٠ ثانیه اتصال (oC ٦٥) و ٤٥ ثانیه بسط (oC ٧٢) تکثیر شد. برای بررسی باندهای ایجاد شده محصول واکنش PCR روی ژل ٥,١ درصد آگارز الکتروفورز شد.محصولات PCR ژن *NPY* مستقیما برای تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شد تا پس از تخلیص توالی‌یابی شود.

[1] Periventricular
[2] Agouti-related peptide
[3] Gonadotropin-releasing hormone

آنالیزهای آماری

پس از تعیین توالی ۱۲۰ نمونه، هم‌ترازی توالی‌ها توسط نرم‌افزار BioEdit و بررسی فراوانی آللی توسط نرم افزار DnaSP 5.10 انجام شد. ارتباط ژنوتیپ های شناسایی شده با صفات تولیدمثلی با نرم‌افزار SAS9.2 و رویه‌ی GLM بررسی شد و میانگین‌های گروه‌ها با روش آزمون توکی در سطح ۰۵,۰ مقایسه شدند. مدل آماری مورد استفاده به شرح زیر است:

$y_{ij}=\mu+G_i+e_{ij}$

y= صفات تولیدمثلی (وزن توده‌ی تخم، طول دوره ی تخمگذاری، سن بلوغ جنسی، وزن اولین تخم)

μ= میانگین

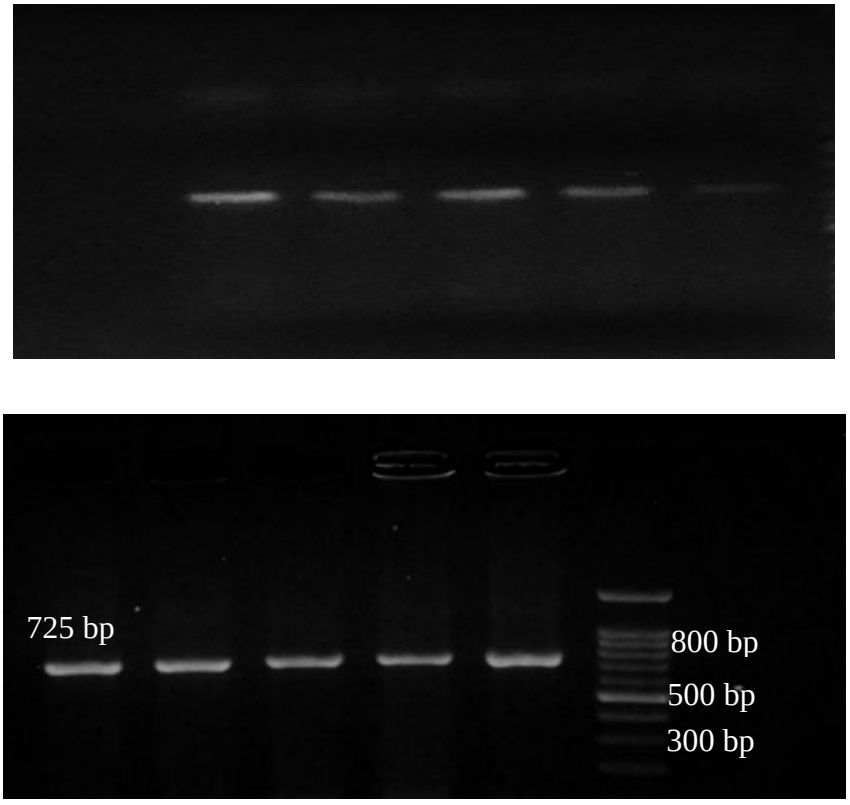
G_i= اثرات ثابت ژنوتیپ

e_{ij}= اثرات باقیمانده

نتایج

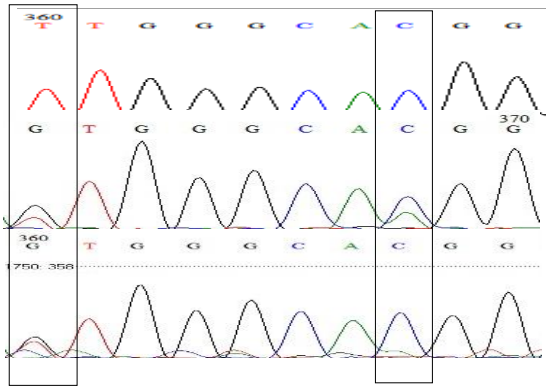
تکثیر قطعات مربوط به بخشی از اگزون ۱ و اینترون ۱ژن *NPY* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی منجر به تولید توالی bp ۷۲۵ شد (شکل‌های ۲-۱).

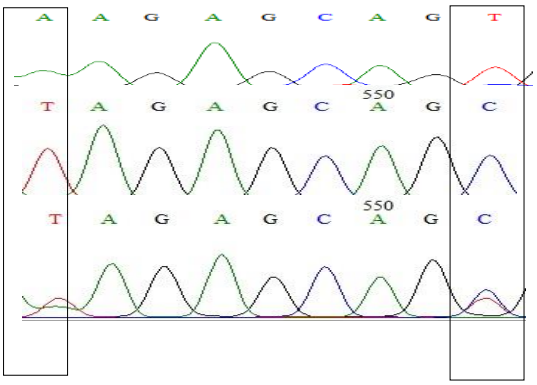
همترازی توالی‌های مورد بررسی منجر به شناسایی چهار چندشکلی جدید شد (شکل ۲) که قبلا در بوقلمون گزارش نشده است.



شکل ۱-**A**- الکتروفورز **DNA** استخراج شده بر روی ژل آگارز ۸,۰ درصد. **B** -الکتروفورز نتایج تکثیر جایگاه ***NPY***

Figure 1-A- Electrophoresis of extracted DNA on 0.8% Agarose gel. Electrophoresis of the proliferation of location





شکل ۲- جهش‌های نقطه‌ای در ژن *NPY* : (T544 A)، (C552T)، (T360 G) و (C367A)

Figure 2- Single nucleotide mutations in the *NPY* gene (T544 A), (C552T), (T360 G), (C367A)

بررسی چندشکلی ژن *NPY* نیز که در ناحیه بخشی از اگزون ۱ و اینترون ۱ با ۷۲۵ جفت باز وجود چهار جایگاه چندشکلی را نشان داد. چندشکلی ها در جایگاه‌های مشخص شده در بخش اینترون این ژن قرار داشت. گزارشی برای چندشکلی در این موقعیت‌ها از ژن *NPY* بوقلمون در منابع و پژوهش‌های گذشته وجود ندارد و SNPهای گزارش شده در پژوهش حاضر جدید هستند. جدول ۱ و ۲ ارتباط ژنوتیپ‌های *NPY* با صفات تولیدمثلی بوقلمون را نشان می‌دهد.

جدول ۱- میانگین حداقل مربعات (±*se*) صفات تولیدمثلی بوقلمون مربوط به ژنوتیپ‌های *T۳۶۰G*

Table 1: LS Means (±se) of turkey's reproductive traits related to the genotypes of G360T

Traits				Genotype
Weight of the first egg (g)	Age of the first egg (day)	Laying period length (day)	Total egg weight (g)	
72.86 (±1.75)	245.11 (±1.70)	118.65 (±10.98)	3033.87 [b] (±392.38)	GG
73.76 (±1.95)	244.38 (±1.89)	125.18 (±12.24)	[b]3419.68 (±02.437)	GT
74.05 (±2.33)	246.67 (±2.27)	148.70 (±15.26)	4493.76 [a] (±523.83)	TT
0.7551	0.5663	0.1704	0.0127	P value

*** In each column, means with different letters are significantly different (P≤0/05).**

جدول ۲- میانگین حداقل مربعات (±*se*) صفات تولیدمثلی بوقلمون مربوط به ژنوتیپ‌های *T۵۴۴A*

Table 2: LS Means (±se) of turkey's reproductive traits related to the genotypes A544T.

Traits				
Weight of the first egg (g)	**Age of the first egg (day)**	**Laying period length (day)**	**Total egg weight (g)**	**Genotype**
75.78 (±2.23)	245.64 (±2.17)	148.32 [a] (±12.50)	4556.73 [a] (±501.81)	AA
71.73 (±1.92)	245.75 (±1.86)	118.70 [b] (±12.10)	2974.77 [b] (±430.27)	AT
73.16 (±1.80)	244.76 (±1.75)	125.42 [b] (±11.36)	3415.84 [b] (±403.98)	TT
0.1780	0.7505	0.0112	0.0048	P value

*** In each column, means with different letters are significantly different (P≤0/05)**

نتایج نشان داد از بین ٤ جایگاه چندشکلی تنها جایگاه‌های G360T وA544T ژن *NPY* با صفات تخم‌گذاری در بوقلمون ارتباط معنی‌داری دارند. دارند که در جایگاه درG360T فراوانی آللT ۰,۲۲ وG ۰,۷۷ و همچنین در جایگاه A544T فراوانی آلل T ۰,۸۵ و آلل A ۰,۱٤ بود. به این ترتیب که جایگاه G360T بر صفات وزن کل تخم موثر بود ($p<0.05$). ژنوتیپ TT از این جایگاه موجب افزایش معنی‌دار در صفات وزن کل تخم و تعداد تخم شد. همچنین صفات وزن کل تخم و طول دوره تخم‌گذاری به‌طور معنی‌داری همراه با ژنوتیپ AA از جایگاهA544T افزایش نشان داد ($p<0.05$). بنابراین آلل‌های T وA به ترتیب برای جایگاه‌های G360TوA544T به‌عنوان آلل‌های مطلوب برای صفات تخم‌گذاری در بوقلمون بومی شناسایی شدند.

بحث

SNP های پیداشده برای ژن *NPY* در این پژوهش در ناحیه‌ی اینترونی قرار داشتند. اگرچه SNPهای ناحیه‌ی اینترون قادر به ایجاد تغییر در اسید های آمینه و در نتیجه تغییر در ساختار پروتئین سنتز شده نیستند ولی می‌توانند بر میزان رونویسی ژن و سطح بیان ژن موثر باشند (بیرلوا و هورستیمکی۲۰۱۰). تغییر در ناحیه اینترونی بر فرآیند پیرایش RNAها (splicing) نیز موثر است (کوما ۲۰۰۷). همچنین پژوهش‌های بسیاری وجود دارد که تأثیر بالقوه پیرایش RNA را بر فنوتیپ صفات گزارش کرده‌اند (فاستینو و کوپر ۲۰۰۳) تا پیش از این چندین مطالعه روی ژن *NPY* بخصوص روی بخش‌های پروموتور و 5'-UTR انجام شده که اثر این ژن را بر صفات تولیدی و تولیدمثلی مرغ نشان می‌داد. دان و همکاران (۲۰۰٤) یک جهش ناشی از حذف-اضافه چهار نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتور ژن *NPY* مرغ‌های مادر گوشتی مشاهده کردند که ارتباط معنی‌داری با سن اولین تخم‌گذاری مرغ داشت . فاطمی و همکاران (۲۰۱۲) فراوانی آللی را ۰,۷۸ (B) و۰,۲۳ (b) برای جایگاه مشابه در ژن *NPY* گزارش کردند. اگرچه آن‌ها ارتباط معنی‌داری بین این جایگاه باصفت تخم‌گذاری پیدا نکردند ولی ارتباط معنی‌داری بین وزن بدن و بلوغ جنسی با این جایگاه ثابت شد. تحقیقات دیگری به ارتباط معنی‌دار بین SNP های بررسی شده در اینترون ۳ ژن *NPY* با صفات رشد و وزن بدن در گاو اشاره دارد (شرمن و همکاران ۲۰۰۸).

گرلین[1] یک پپتید ۲۸ اسید آمینه‌ای است (مورفی و همکاران ۲۰۰۶) که در زمان گرسنگی موجب تحریک تغذیه‌ای از طریق تاثیر بر NPY و AGRP (پپتید وابسته به آگوتی) می‌شود و سنتز نوروپپتید *Y* در هسته‌ی کمانی هیپوتالاموس را افزایش می‌دهد. افزایش NPY در نهایت سبب افزایش سیگنال‌های گرسنگی و افزایش اشتها می‌شود (ورن و همکاران ۲۰۰۱). بخش قابل توجهی از *NPY* از گردش خون سیستم عصبی سمپاتیکی فوق کلیه نخاعی منشا می‌گیرد (اتون و همکاران ۲۰۰۷). مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که اکسون‌های نورون‌های *NPY* در ارتباط با نورون‌های کیس پپتین است و میزان کیس پپتین در موش‌های حاوی جهش در ژن *NPY* بسیار پایین است و mRNA ی گیرنده کیس پپتین برروی نورون‌های *NPY* در موش‌ها بیان می‌شود (کیم و همکاران ۲۰۱۰). به‌علاوه نشان داده شده است که گیرنده‌ی کیس پپتین بر نورون‌های *NPY* اثر داشته و تزریق کیس پپتین سبب افزایش بیان *NPY* می‌شود (بی و همکاران ۲۰۰۰ و کیم و همکاران ۲۰۱۰) از طرفی کیس پپتین، پپتید تنظیم‌کننده‌ی کلیدی تولید و آزادسازی هورمون آزاد کننده‌ی گونادوتروپین (گوتسچ ۲۰۰۴ و اسمیت ۲۰۰۸) و هورمون لوتئینه کننده (دیلو ۲۰۰۷) در بیشتر گونه‌ها است. محققان نشان داده اند که پایانه‌ی نورون‌های *NPY* به‌طور مستقیم بر نورون‌های GnRH ختم می‌شود و سنتز *NPY* قبل از آزادسازی GnRH افزایش نشان می‌دهد و آن‌هم به‌نوبه خود که باعث آزاد شدن هورمون محرکه‌ی فولیکولی FSH و هورمون لوتئینه کننده LH از هیپوفیز می‌شود. پس *NPY* به‌طور مستقیم در آزادسازی این هورمون‌ها نقش دارد و بر عملکرد گنادها از جمله تخمدان موثر است (دیلون و همکاران ۲۰۰۹). به‌علاوه نشان داده شده است که نالوکسین میزان بیان NPY mRNA در ناحیه‌ی هیپوتالاموس قاعده‌ای میانی را تحریک می‌کند و منجر به آزادسازی تونیک GnRH/LH در هر دو جنس نر و ماده می‌شود. تزریق داخل بطنی مغزی آنتی بادی علیه *NPY* سبب کاهش قابل‌ملاحظه‌ای LH می‌شود (کیم و همکاران ۲۰۱۰) همچنین تحریک ترشح هورمون GnRH از طریق گیرنده‌های نوروپپتیدی می‌تواند باعث بلوغ زودرس در جوجه شود (پائو و همکاران ۱۹۹۸). نوروپپتید وای با تحریک کیس پپتید محرک و رابط مهم اثرات بازگشتی مثبت استرادیول بر نورون‌های هورمون‌های آزادکننده گونادوتروپین است. وجود نورون‌های هورمون‌های آزادکننده گونادوتروپین در ناحیه‌ی کیس پپتین بینایی این اثر را ثابت می‌کند و همچنین گیرنده‌های آلفا استرادیول با کیس پپتین بیان می‌شوند (فرانسس شینی و همکاران ۲۰۰۶). نتایج حاصل از یک تحقیق دیگر نشان داد برهم‌کنش بین مسیرهای پیام‌رسان کیس پپتین/ GPR54 و اپیئودها در تنظیم محور اندوکرینی تولیدمثل از طریق تنظیم فعالیت نورون‌های *NPY* می‌باشد (کلارک و همکاران ۲۰۱۵). به این ترتیب به نظر می‌رسد که *NPY* تاثیر خود بر صفات تعداد و وزن تخم را به واسطه اثر بر نورون‌های مترشحه GnRH و متاثرکردن فعالیت گنادوتروپین ها (FSH و LH) از یک‌سو و تاثیر براشتها و میزان مصرف غذا از سوی دیگر اعمال می‌کند. این تاثیر می‌تواند اثر چندشکلی *NPY* را بر روی تعداد تخم تولیدی و مجموع وزن تخم تولیدی که به‌نوعی تابعی از وزن تخم‌مرغ و تعداد آن است در بوقلمون‌ها توضیح دهد.

نتیجه‌گیری کلی

چهار جایگاه‌های چندشکلی جدید (T٥٤٤A، T٥٥٢C، T٣٦٠G و A٣٦٧C) در ناحیه اینترون۱ ژن *NPY* در بوقلمون‌های بومی ایران یافت شد. چندشکلی‌های T٣٦٠G و T٥٤٤A بطور معنی‌داری با وزن کل تخم و طول دوره‌ی تخم‌گذاری بوقلمون‌ها ارتباط نشان دادند. در صورت تائید این نتایج در گله‌های بزرگتر و نیز سایر گله های مشابه، جهش‌های مذکور می‌تواند در

[1] Ghrelin

برنامه‌های اصلاح نژادی برای اصلاح صفات تولیدمثلی بوقلمون بومی ایران مورد استفاده قرار گیرند.

منابع مورد استفاده

Bethea CL and Widmann AA, 1996. Immunohistochemical detection of progestin receptors in hypothalamic β- endorphin and substance P neurons of steroid-t monkeys. Neuroendocrinology 63:132-134.

Bailes, SM, Devers JJ, Kirby JD, Rhoads DD, 2007. An inexpensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. Poultry Science 86: 102-106.

Cone RD, Cowley, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ, 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders 5: 7-63.

Clarke H, Dhillo WS and Jayasena CN, 2015. Comprehensive Review on kisspeptin and its role in reproductive disorders. Endocrinology and Metabolism 30: 124-141.

Denbow DM and Cline MA, 2014. Food Intake Regulation in Scanes CG editor. Sturkie's Avian Physiology. Ireland 85-469.

Dhillo W, Murphy K, Bloom S, 2007. The neuroendocrine physiology of kisspeptin in the human. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders 8: 41-46.

Dhillon SS, Gingerich S and Belsham DD, 2009. Neuropeptide Y induces Gonadotropin-releasing hormone gene expression directly and through conditioned medium from mHypoE-38 neurons. Regulatory Peptides 156: 96-103.

Dunn IC, Miao YW, Morris A, Romanov MN, Wilson PW, Waddington D, 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: 34-128.

Eaton K, Sallee FR and Sah R, 2007. Relevance of neuropeptide Y (NPY) in psychiatry. Current Topics in Medicinal Chemistry 7: 45-59.

Fatemi SA, Mehrabani-Yeganeh A, Nejati-Javaremi A, niknafs SH, 2012. Association of neuropeptide Y and Gonadotropin-releasing hormone receptor gene SNPs with breeding value for growth and egg production trait in Mazandaran native chicken. Genetic and Molecular Research 11: 239-247.

Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A, 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. Neuroscience Letters 401: 22-23.

Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA, 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology 145: 473-477.

Horsthemke B, Berulava H, 2010. The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels. European Journal of Human Genetics 10:54-61.

Inui A, 2000. Transgenic approach to the study of body weight regulation. Pharmacological Reviews 52: 35-62.

Kalra SP and Kalra PS, 2004. NPY and Cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy. Neuropeptides 38: 201–211.

Karsch FJ, Bowen JM, Caraty A, Evans NP, Moenter SM., 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. Biology Reproduction .303-309.

Kim GL, Dhillon SS, Belsham DD, 2010. Kisspeptin directly regulates neuropeptide Y synthesis and secretion via the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in NPY-secreting hypothalamicneurons. Endocrinology 151: 5038- 5047.

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. Endocrinal 151: 236-246.

Komar AA, 2007. Silent SNPs impact on gene function and phenotype. Pharmacogenomics 8: 1075-1080.

Li MD, Kane JK, Parker SL, McAllen K, Matta SG, Sharp BM, 2000. Nicotine administration enhances NPY expression in the rat hypothalamus. Brain Research 867: 157-164.

Lundell I, Boswell T and Larhammar D, 2002. Chicken neuropeptide Y-family receptor Y4: a receptor with equal affinity for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y and peptide YY. Journal of Molecular Endocrinology 28: 25-35.

Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, 2001. A novel human G proteincoupled receptor, activated by the peptide KiSS1. Journal of Biological Chemistry 276: 296-297.

Pedrazzini T, Pralong F and Grouzmann E, 2003. Neuropeptide Y, the universal soldier. Cellular and Molecular Life Sciences 60: 35-77.

Pillon D, Caraty A, Fabre C, Bruneau G, 2003. Short-term effect of estradiol on neurokinin B mRNA expression in the infundibula nucleus of ewes. Journal of Neuroendocrinology 15:749-753.

Rance NE, Mcullen NT, Smialek JE, Price DL, Young WS, 1990. Postmenopausal hypertrophy of neurons expressing the Estrogen receptor gene in the human hypothalamus. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 71: 79-85.

Ranjbar S, Alijani M and Daghigh KH, 2017. Estimation of some genetic and phenotypic parameters of egg qualitative traits in Azari native birds. Journal of Animal Research 4:17-28.

Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Li C, Wang Z, Moore S, 2008. Polymorphisms and haplotypes in the bovine Neuropeptide Y, Growth hormone receptor, Ghrelin, Insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. Journal of Animal Science 86: 1–16.

Tachibana T, Tazawa M, Sugahara K, 2001. Feeding increases 5-hydroxytryptamine and norepinephrine within the hypothalamus of chicks. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 130: 71-122.

Tatemoto K, 2004. Neuropeptide Y: History and overview in Michel MC. handbook of Experimental Pharmacology. Springer 2–15.

Wu H, Meijiao YN, Tang H, Yu-shigao Y, Wen-qizh U, 2007. Associations of Gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) and Neuropeptide Y (NPY) genes polymorphisms with egg-laying traits in Wenchang Chicken. Agricultural Sciences in China 600: 3-75.

NPY gene polymorphisms associate with reproductive traits of turkeys in Iran

N Rastidoust[1], S Nikbin[2], B Navidshad[2] and G Elyasi[3]

Received: December 18, 2018 Accepted: July 20, 2019
[1]MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2]Associate Professor and [3]Assistant Professor, respectively, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[3]Trainer, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Jahad Research Center, Tabriz, Iran.
[*]Corresponding author: Email: snikbin@uma.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Researches
Journal of Animal Science/vol.29 No.3/ 2019/pp 61-70
https://animalscience.tabrizu.ac.ir
OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
This is an open access article under the CC BY license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

Introduction: Neuropeptide Y (NPY) is a neurotransmitter that presents at high concentrations in the hypothalamus. Neuropeptide Y is one of the most abundant peptides in chicken's brain, which works as a neurotransmitter in many functions and behaviors. The first time, it was extracted from the pituitary hypothalamus of pigs. This neuropeptide stimulates appetite and affects reproductive hormones. It was showed that there is a significant association between NPY gene and growth and reproductive traits of animals. The aim of this study was to investigate NPY gene polymorphisms and their association with reproductive traits in indigenous turkeys of Iran. These traits were including total egg weight production, length of laying period, age at the first egg, and the weight of the first egg.

Materials and methods: A hundred and twenty turkey hens were randomly chosen from turkey's breeding center of East Azerbaijan of Iran. They were recorded for the reproductive traits. The blood samples of the birds were taken from their wing veins and used for DNA extraction. DNA was isolated from each animal's blood samples using salting-out method (Miller et al 1999). A fragment of 725bp of NPY gene was amplified using designed specific primers. The forward and reversed primers were GAAGCGTACCCCTCCAAAC and CCCCTTTAAGCAGCACAGTC, respectively. PCR was performed in a final volume of 25 ml containing 2ml of DNA template, 1.2 ml of each primer, 8.1 ml water and 12.5 ml master mix containing: dNTP, proofreading Taq polymerase, MgCl2, and 1x PCR buffer. Thereafter, the PCR was programmed as follows: an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 32 cycles of 94°C for 60 s, 56° C for 40 s, and 72°C for 45 s. A final extension step was performed at 72°C for 8 min. Electrophoresis of the amplicons was carried out on 1.5% agarose gels, and the gels were visualized under ultraviolet light after 45 minutes in 85 Volt. It should be noted that PCR products were purified and sequenced by Bioneer Company. The polymorphisms of the NPY gene was identified by commercially sequencing the PCR products and aligning the sequences using BioEdit software. PopGen32 software was used to identify genotype and allele frequencies. The associations of polymorphisms or haplotypes with the traits were analyzed using the SAS GLM procedure. Multiple comparisons of Tukey's test were performed to find differences among means.

Results and discussion: The results revealed four novel SNPs in the NPY gene, which has not been already reported in turkey. The detected polymorphisms were including T360G, C367A, T544A, and C552T. Results of statistical analysis showed that there was a significant association between T360G and total egg weight. The T allele was the favorable allele for total egg weight trait as the TT genotype significantly increased the weight of produced eggs. The polymorphism of A544T was significantly

associated with egg weight and laying length. The AA genotype of A544T positively influenced both egg weight and laying length traits. Both SNPs were located in the intron region of the gene. Although intronic mutations are not capable of altering the synthesized protein structure and/or changing the function of the protein, they may affect the level of gene transcription. Additionally, it was proved that the intronic polymorphisms may affect the gene expression levels via influencing the splicing process. Several studies have already been revealed that the NPY gene polymorphism, especially on the promoter and 5'-UTR regions, affect the reproductive traits of chicken. There is another study that reported a significant association between the SNPs of intron 3 of the NPY gene with growth and body traits in cows. It has been proven that NPY neuron terminals directly end on GnRH neurons and NPY is synthesized prior to the release of GnRH. It then releases the follicular stimulating hormone (FSH) and the luteinizing hormone (LH) from the pituitary gland. It has been shown that NPY influences GnRH secretion via affecting Kisspeptin neurons, which consequently alter reproductive traits. Also, stimulating the secretion of the GnRH through the neuropeptide receptors can lead to early maturity in the chicken. On the other hand, it was revealed that stimulation of NPY neurons mediates an increase in energy intake and storage. Altering the NPY gene expression in the hypothalamus of birds resulted in changing energy status. Moreover, NPY has been shown to be a potent appetite stimulating agent in chickens. Specific NPY receptors (Y1 and Y5) have been reported to mediate NPY effects on feeding behavior in chickens. In order to continue laying eggs, turkey hens need a higher amount of available energy and nutrients. Investigations in humans also represented that polymorphisms in NPY influenced fatness in men and was linked to body weight, BMI, body fat prototype, and leptin levels (Ding 2005, Van 2006). Concentrations of NPY are prominent when body fat reservoirs are fully consumed, resulting in hunger enlargement (Kalra et al. 1991). Consequently, upon negative energy balance, NPY levels are anticipated to be elevated. In addition, NPY has been recognized as a major controller of leptin action in the hypothalamus, affecting the discharge of LH and somatotropin (Kalra et al. 1991). This study has pointed out considerable relationships among leptin and NPY SNP with vital intensification, fertility, and milk production characteristics (Clempson et al. 2010). Also, it is assumed to be the cause of augmenting body mass index (BMI) in two different Swedish statistical groups of normal and fat peoples (Ding et al. 2005). The -880I/D advocate region variant of NPY might impact body fat prototyping in non-obese Mexican Americans from Starr County (Bray et al 2000). Therefore, effect of NPY on appetite may influence the supply of nutrients and energy to be consumed for reproductive performance specially egg production traits.
Conclusion: In conclusion, four novel polymorphisms were detected in intron 1 of Meleagrine NPY gene. The polymorphisms of the NPY gene may affect some of egg production traits. If these effects validate by investigating them in a larger or another turkey population, they can be considered in breeding programs of native turkey population in North-West of Iran.

Keywords: Egg weight, Laying, Period, NPY, SNP, Turkey