پژوهش‌های علوم دامی
Animal Science Research

مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۱ شماره ۳/ سال ۱۴۰۰/ صفحات ۸۹ تا ۹۸

DOI: 10.22034/AS.2022.42063.1585

شناسایی چندشکلی ژن IGF-I و ارتباط آن با صفت وزن بدن در بلدرچین‌ژاپنی

نوشین قهرمانی[۱]، علی هاشمی*[۲]، مختار غفّاری[۳] و قربان الیاسی زرین قبایی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۹/۷/۹ تاریخ پذیرش: ۴۰۰/۳/۹

[۱] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
[۲] دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
[۳] استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
[۴] گروه پژوهش علوم دامی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی
*مسئول مکاتبه: Email: A.hashemi50@gmail.com

چکیده

زمینه مطالعاتی و هدف: بلدرچین به دلیل خصوصیاتی از قبیل کوچک بودن اندازه بدن، فاصله نسلی کوتاه، میزان رشد بالا و تولید تخم و گوشت بیشتر به‌طور گسترده در مطالعات آزمایشگاهی استفاده می‌شود. IGF-I به عنوان یک ژن کاندید مرتبط با صفات وزن بدن و رشد در گونه‌های مختلف حائز اهمیت است. این آزمایش به منظور بررسی چندشکلی ژن IGF-I و ارتباط آن با صفت وزن بدن در بلدرچین‌ژاپنی انجام گرفت. **روش کار:** در مطالعه حاضر رکوردهای مربوط به وزن بدن ۱۱۰ قطعه بلدرچین‌ژاپنی در دوره‌های پرورشی مختلف ثبت و DNA ژنومی با کیفیت مطلوب از نمونه‌های خون با استفاده از پروتکل پروناز استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر قطعه ٤٦٥ جفت بازی از ژن IGF-I استفاده شد. روش تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) جهت تعیین الگوهای ژنوتیپی نمونه‌ها بکار گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری ارتباط بین صفت وزن بدن و الگوهای ژنوتیپی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS انجام گرفت. **نتایج:** نتایج SSCP نشان داد جایگاه ژنی اگزون ٤ چندشکل بوده و سه الگوی ژنوتیپی با فراوانی‌های ۷/۲۷، ۵۰/۹۱ و ٤١/٨٢٪ بدست آمد. نتایج ارائه شده در این تحقیق نشان داد که بین الگوهای ژنوتیپی و وزن بدن در سن ۳۰ روزگی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P<0/05$). در ارتباط با تأثیر جنس با وزن بدن در سن ٦٠ روزگی اختلاف معنی‌داری برقرار بود($P<0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به این پژوهش جایگاه منتخب برای بررسی ژن IGF-I در بلدرچین می‌تواند به عنوان یک جایگاه پیشنهادی مؤثر بر صفت وزن بدن بشمار آید. همچنین می‌تواند به عنوان یکی از عواملی باشد که باعث تفاوت وزن بدن در دوره‌های مختلف می‌شود.

واژ گان کلیدی: وزن بدن، ژن IGF-I، بلدرچین‌ژاپنی، چندشکلی

مقدمه

تأمین موادغذایی یکی از ضروری‌ترین مسائلی است که جوامع بشری را تحت تأثیر قرار داده و از آن تأثیر می‌پذیرد. از جمله موادغذایی مورد نیاز، پروتئین حیوانی است و برای تأمین این نیاز، گوشت و تخم طیور مورد توجه مردم بوده است (اکبری۱۳۹۲). چند سالی است که علاقه‌مندان به سرمایه‌گذاری در بخش تولید به ویژه در صنعت طیور به سمت پرنده‌های دیگری به‌جز مرغ، گرایش پیدا کرده‌اند که از آن جمله می‌توان به بلدرچین، بوقلمون،

شترمرغ، کبک و قرقاول اشاره کرد (رجایی اربابی ۱۳۸٤). بلدرچین‌ژاپنی که از خانواده ماکیان می‌باشد دارای ویژگی‌های منحصر بفردی از جمله رشد بالا، بلوغ جنسی سریع، فاصله نسلی کوتاه، مقاومت به بیماری‌ها و شرایط نامساعد محیطی، امکان پرورش تعداد زیادی پرنده در فضایی محدود، دوره جوجه‌کشی کوتاه، ضریب تبدیل-غذایی پایین است و از طرفی هزینه پایین نگهداری و موادغذایی و درمان باعث شده است که پرورش بلدرچین به یک صنعت پُربازده و سودآور در بسیاری از کشورها تبدیل شود (نستور و همکاران۱۹۹٦، شریفی و همکاران۲۰۱۱ و رستم‌زاده و همکاران۱۳۹۵). برخلاف مرغ که بیشتر مطالعات ژنومی بر روی آن متمرکز شده است، تحقیقات اندکی روی بلدرچین صورت گرفته است (طهمورث پور و همکاران۱۳۹٤). بلدرچین به عنوان یک پرنده آزمایشگاهی دارای مزایای فراوانی است اما توالی ژنوم آن هنوز به طور کامل شناسایی نشده است (کاوهارا و همکاران۲۰۱۳). رشد یک فرایند پیچیده بیولوژیکی است که سنجش کامل آن به آسانی ممکن نیست؛ بنابراین یک اقدام ساده و عملی برای ارزیابی میزان رشد جوجه‌ها، اندازه‌گیری وزن بدن می‌باشد (آگری و همکاران۲۰۰۳). تنوع ژنتیکی در بین موجودات زنده ناشی از اثر ژنتیک، محیط و اثر متقابل ژنتیک و محیط است. جهش[1] و نوترکیبی[2]منجر به افزایش تنوع ژنتیکی و رانش ژنتیکی[3] و انتخاب منجر به کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های حیوانی می‌شوند. وجود تنوع ژنتیکی لازمه‌ی برنامه‌های اصلاح‌نژادی است (هیز و همکاران۲۰۰۹). برای بررسی تنوع در سطح ژنوم، تکنیک‌های متعددی وجود دارد. با پیشرفت تکنیک‌های مولکولی، این امکان برای اصلاح‌گران فراهم شده است تا در زمان کمتری حیوانات دارای ژنوتیپ برتر را شناسایی و انتخاب کنند. نشانگرهای مولکولی تفاوت و تنوع ژنتیکی افراد را در سطح ماده ژنتیکی نشان می‌دهند (نقوی و همکاران۱۳۹۲). در این خصوص، نشانگر[4]SSCPبه دلیل آشکارسازی تفاوت‌های کوچک در قطعه قابل تکثیر و ردیف‌های بازی، مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. ژن IGF-I به عنوان یک ژن کاندید رشد، ترکیب بدن و سوخت وساز چربی در ماکیان شناسایی شده است. ژن IGF-I از کبد در اثر تحریک هورمون رشدْ ساخته می‌شود و در متابولیسم و رشد سلولی مؤثر است. IGF-I پلی‌پپتید تک‌زنجیره‌ای با وزن مولکولی ٦٧٤٩ دالتون با پایه ۷۰ اسیدآمینه است. IGF-I یک هورمون کاملاً آنابولیکی بوده و عامل توسعه عضلانی و سوخت‌وساز در پرندگان و سایر گونه‌های مهره‌داران است (بارکا و همکاران۱۹۸۹). اغلب انجام فعالیت هورمون رشد در بدن جوجه‌ها وابسته به IGF است (لئی و همکاران۲۰۰۵). طی مطالعه‌ای که بر روی جوجه‌های گوشتی انجام گرفت ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ژن IGF-I با صفات چربی درون ماهیچه‌ای، ترکیب بدن و ماهیچه‌ی اسکلتی گزارش شد (ژو و همکاران۲۰۰۵). در بررسی دیگری بر روی ژن IGF-I در بلدرچین‌ژاپنی، چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه اگزون ۵ شناسایی و ارتباط معنی‌داری با صفات چربی لاشه گزارش شد (طهمورث پور و همکاران۱۳۹٤).

توالی ژن IGF-I و نقش آن در پرندگانی مانند ماکیان تا حدودی بررسی شده است ولی اطلاعات اندکی بر روی این ژن و ارتباط آن با صفت وزن بدن در بلدرچین گزارش شده است. با توجه به اینکه ژن IGF-I در بیشتر پژوهش‌ها بر روی صفات تولیدی مؤثر بوده است، لذا هدف از این تحقیق شناسایی چندشکلی‌های موجود در قسمتی از ناحیه اینترون ٤ با کل اگزون ٤ و قسمتی از اینترون ۵ از ژن IGF-Iبا استفاده از تکنیک PCR-SSCP[5] و برآورد فراوانی الگوهای ژنوتیپی و در نهایت ارتباط آن با صفت وزن بدن در بلدرچین‌ژاپنی است.

[1] Mutation
[2] Recombination
[3] Random Drift
[4] Insulin-Like Growth Factor 1
[5] Growth Hormone
[6] Polymerase Chain Reaction- Single Strand Conformation Polymorphism

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در این پژوهش به طور تصادفی از ۱۱۰ قطعه بلدرچین‌ژاپنی (٤٦ قطعه بلدرچین نر و ٦٤ قطعه بلدرچین ماده) گله تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی (ایستگاه تحقیقاتی بناب) که دارای رکورد وزن بدن برای سنین ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠ روزگی بود استفاده شد. نمونه‌های خون از ناحیه ورید زیربالی با استفاده از سرنگ‌های یک میلی‌لیتری اخذ شد و ماده ضد انعقاد EDTA اضافه گردید و همراه یخ به آزمایشگاه ژنتیک و اصلاح‌نژاد گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه منتقل شدند و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج و تعیین کیفیت DNA: استخراج DNA از ۱۰ میکرولیتر خون کامل با استفاده از پروتکل پروناز انجام شد (بایلس و همکاران۲۰۰۷). کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸٪ مورد ارزیابی قرار گرفت.

طراحی آغازگرها[1]: ابتدا توالی نوکلئوتیدی ژن IGF-I با طول ٤٦٥ جفت‌بازی از بانک اطلاعات ژنی www.ncbi.com دریافت شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Primer3 plus اقدام به طراحی آغازگر مناسب شد. با استفاده از نرم‌افزار Primer BLAST اختصاصی بودن آغازگرها مورد آزمون قرار گرفت. آغازگرها از شرکت سیناژن به صورت لیوفیوزه تهیه گردید. اطلاعات مربوط به آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در جدول۱ قید شده است.

Table 1- Primer sequences

Primer name	Primer sequence
Forward	5'-TGGCCCAGAAACACTATGCG -3'
Reverse	5'-GGGAGAATGCCCATTGGTTG -3'

واکنشPCR: پس از سنتز پرایمرها، جهت تعیین دمای اتصال آغازگرها از گرادیانت حرارتی استفاده شد. برای تکثیر ژن مورد نظر و تعیین دمای اتصال آغازگر به رشته های DNA هدف واکنش زنجیره ای پلی‌مراز انجام گرفت. آنالیز PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل 30 نانوگرم از DNA ژنومیک، ۱۰ میکرومول از هر پرایمر (Sina Gene, Tehran, Iran)، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۰/۲ میکرومول dNTP، ۱/۵ میکرومول $Mgcl_2$، و بافر 1x (Sina Gene, Tehran, Iran) بود. تکثیر قطعه مورد نظر با کمک یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه واکنش اصلی (واسرشته‌سازی[2] در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٠ ثانیه، دمای اتصال[3]پرایمرها ۵۸ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای توسعه[4]۷۲ درجه به‌مدت ٤٠ ثانیه) و توسعه نهایی با ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر بیومترا آلمان بکار گرفته شد (بایلس و همکاران ۲۰۰۷). بعد از انجام واکنش PCR، محصولات واکنش روی ژل آگارز ۱/۵٪ با ولتاژ ۸۰ به مدت ۱ ساعت با استفاده از بافر TAE(1X) الکتروفورز شده و با اتیدیوم‌برماید رنگ‌آمیزی گردیدند، برای تشخیص اندازه قطعات تکثیر شده از نشانگر PUC19 شرکت Fermentas استفاده شد و با استفاده از دستگاه GelDoc عکس‌برداری نمونه‌ها انجام گرفت.

واکنشSSCP: به‌منظور تعیین ژنوتیپ محصولات PCR از روش چندشکلی فرم فضایی رشته‌های منفرد استفاده گردید. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲۰ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (فرمامید95٪، برموفنل بلو ۰/۲۵٪، زایلن سیانول ۰/۳۵٪، EDTA ۱۰میلی مول بر لیتر) مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس سریعا بر روی نمونه‌ها یخ قرار داده شد تا از به هم چسبیدن دوباره رشته‌های مکمل DNA ممانعت به

[1] Primers
[2] Denaturation
[3] Annealing
[4] Extension/Elongation

عمل آید. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از دستگاه الکتروفورز عمودی و ژل پلی‌آکریلامید غیر واسرشته‌ساز ۸٪ استفاده شد. نمونه‌ها در ژل آکریلامید با ولتاژ ۱۱۰ به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق (۱۸°C) با استفاده از بافر (۰/۵X) TBE (۱۰۰ میکرومول تریس، ۹ میکرومول بوریک اسید و ۱ میکرومول EDTA) الکتروفورز شدند؛ و در نهایت با استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات‌نقره تعیین ژنوتیپ شدند (پیپالیا و همکاران ۲۰۰۴، بنبوزا و همکاران۲۰۰۶).

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور بررسی اثر الگوهای مختلف ژنوتیپی بر روی صفت وزن بدن بلدرچین از مدل آماری زیر استفاده شد.

$$y_{ijk}= \mu+ s_i + g_j+ e_{ijk}$$

که در آن y_{ijk} میزان وزن بدن برای هر بلدرچین در دوره‌های پرورشی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روزگی، μ میانگین ارزش فنوتیپی صفات، s_iاثر ثابت[1]مربوط به i امین جنس، g_jاثر تصادفی[2]مربوط به j امین ژنوتیپ و e_{ijk} اثرات باقیمانده (خطای آزمایش) می‌باشد. صفت وزن بدن، توسط نرم‌افزار SAS 9.1با استفاده از رویه GLM مورد بررسی قرار گرفت، همچنین مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج الکتروفورز افقی جهت تعیین کیفیت DNA استخراجی نشان داد، DNA ژنومی استخراج شده از نمونه‌های خون در روی ژل آگارز دارای کیفیت مطلوبی بود (شکل۱).

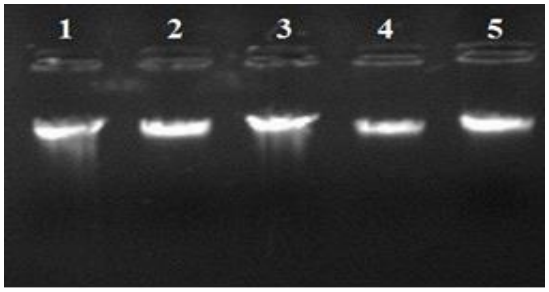

Figure 1- DNA samples extracted from quail blood and DNA quality determination on 0.8% agarose gel

برای تعیین دمای اتصال مناسب آغازگرهای اختصاصی ژن IGF-I واکنش PCR شیب دمایی انجام شد و بر همین اساس مناسب ترین دما برای اتصال آغازگرها به طور اختصاصی به تارگت اصلی، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد مشخص شد. قطعه ٤٦٥ جفت بازی از ژن IGF-I به خوبی توسط PCR تکثیر شد که نشان می‌دهد پرایمرها به خوبی طراحی شده اند و کاملاً اختصاصی عمل کردند، زیرا هیچ‌گونه باند غیراختصاصی در محصولات PCR دیده نشد (شکل۲).

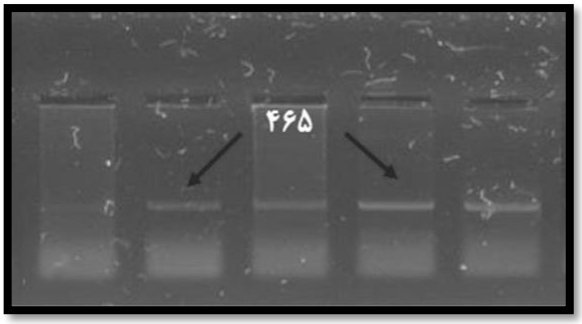

Figure 2- Electrophoresis results of PCR products of IGF-I gene on 1.5% agarose gel

نتایج حاصل از الکتروفورز عمودی محصولات SSCP سه الگوی ژنوتیپی متفاوت ۱، ۲ و ۳ را روی ژل پلی آکریلآمید نشان داد و این بیانگر چندشکلی در ناحیه اگزون ٤ از ژن IGF-I و وجود تنوع در ژن IGF-I در بلدرچین است (شکل۳).

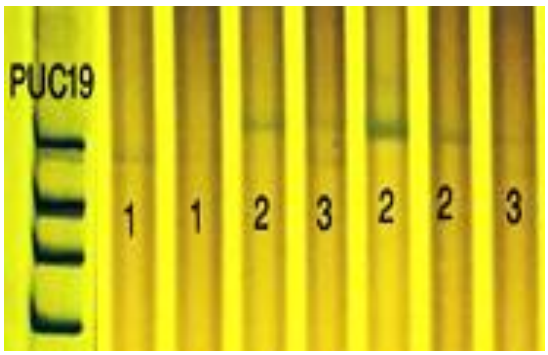

Figure 3- SSCP patterns of IGF-I gene on 8% polyacrylamide gel

[1] Fixed effect

[2] Random effect

فراوانی سه الگوهای ژنوتیپی ۱، ۲ و ۳ به‌دست آمده در این تحقیق در جمعیت بلدرچین به ترتیب ۷/۲۷، ۵۰/۹۱، ٤۱/۸۲٪ بود که الگوی ژنوتیپی ۲ بیشترین فراوانی و الگوی ژنوتیپی ۱ کمترین فراوانی را داشتند. ارتباط بین الگوهای ژنوتیپی و صفت وزن بدن در سنین مختلف مورد بررسی قرار گرفت (جدول۲).

Table 2- LSM comparison the mean of different IGF-I gene patterns on quail (gram) body weight

Genotype Patterns	15-Days	30-Days	45-Days	60-Days
1	36	109.11[a]	172.55	218.33
2	36.09	98.04[b]	161.37	210.16
3	32.41	99.93[b]	163.04	212.22
P-Value	0.143	0.016	0.072	0.544

چندشکلی ژن IGF-I در طیور در مطالعات بسیاری گزارش شده است. جدول مقایسه میانگین اثر الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده بر صفت وزن بدن نشان داد که بین صفت وزن بدن با الگوهای ژنوتیپی ۱، ۲ و ۳ ارتباط معنی داری از نظر آماری در دوره‌های پرورشی ۱۵، ٤۵ و ٦۰ روزگی مشاهده نشد و ارتباط بین الگوهای ژنوتیپی با صفت وزن بدن فقط در ۳۰ روزگی تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) و با توجه به نتایج حاصل از آنالیز داده‌های آماری در نرم‌افزار SAS بهترین الگوی ژنوتیپی در ارتباط با تأثیر بر وزن بدن مربوط به الگوی ۱ می‌باشد. در ارتباط با تأثیر جنس بر صفت افزایش بدن وزن نیز در ناحیه مد نظر از ژن IGF-I تفاوت معنی‌داری در دوره پرورشی ٦۰ روزگی وجود داشت (P<۰/۰۵). وزن بلوغ بلدرچین‌های ماده بیشتر از بلدرچین های نر گزارش گردید که با نتایج (اعرابی و همکاران۱۳۹۵) و (الطرابانی و همکاران۲۰۱٤) در افزایش وزن روزانه ماده‌ها در مقایسه با نرها مطابقت وجود داشت (جدول۳).

Table 3- LSM mean comparison of quail sex on body weight (g)

Sex	15-Days	30-Days	45-Days	60-Days
Female	33.22	99.95	165.31	222.58[a]
Male	32.86	99.39	159.67	196.26[b]
P-Value	0.726	0.160	0.417	0.029

بررسی چندشکلی ژن IGF-I و شناسایی SNP[۷] در بلدرچین‌ژاپنی و ارتباط آن با صفت وزن بدن در دو لاین SS (دارای وزن پایین) و LL (دارای وزن بالا) انجام گرفت. از ۲۱ SNPs شناسایی شده، یک SNP در موقعیت AB292766:c.2293G>A وجود داشت که منجر به جایگزینی اسیدآمینه والین به ایزولوسین شد. با توجه به آنالیزهای آماری انجام گرفته اثر الگوهای ژنوتیپی بر روی صفت وزن بدن در سنین ۱۰، ۱۰-٤ و ۱۰-٦ هفتگی ارتباط معنی‌داری وجود داشت (موئه و همکاران ۲۰۰۷)، تفاوت در تعداد نمونه‌های اخذ شده و ناحیه تکثیر می‌تواند بر روی تعداد الگوهای مشاهده شده تأثیرگذار باشد. چندشکلی ژن IGF-I و ارتباط آن با صفات لاشه در بلدرچین‌ژاپنی مورد بررسی قرار گرفت. قطعه ۱۲۰ جفت بازی از ژن IGF-I توسط آنزیم محدودگر PSTI تکثیر و برش داده شد. سه الگوی ژنوتیپی AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی‌های ٤۱، ۳۵ و ۲٤٪ شناسایی شد. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که ژن IGF-I در ناحیه اگزون ۵ با صفت چربی داخل عضله‌ای ارتباط معنی‌داری دارد. در ارتباط با تأثیر جنس بر صفت لاشه نیز تفاوت معنی‌داری گزارش شد (طهمورث پور و همکاران۱۳۹٤). شناسایی یک چندشکلی جدید در ناحیه پروموتور ژن IGF-I و ارتباط آن با صفت رشد در هشت جفت از بلدرچین سفید و وحشی توسط تکنیک SSCP انجام گردید. یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی A→G با طول قطعه ۱۷۲ جفت بازی در ناحیه راه اندازه ژن شناسایی شد. سه الگوی ژنوتیپی AA، AG و GG به ترتیب با فراوانی‌های ۵، ٦۲ و ۳۳٪ و دو آلل A و G به ترتیب با فراوانی‌های ژنی ۳٦ و ٦٤٪ بدست آمد (اعرابی و همکاران۱۳۹۵). بررسی چندشکلی ژن IGF-I در جمعیت جوجه‌های گوشتی (Ross و Cobb) توسط تکنیک SSCP انجام شد. نتایج نشان‌دهنده تأثیر الگوی ژنوتیپی AC در افزایش وزن جوجه‌های گوشتی بود. آنالیزهای آماری انجام گرفته نشان داد که تفاوت معنی‌داری در ارتباط با تأثیر الگوهای ژنوتیپی بر روی صفت وزن بدن وجود داشت

(کدلک و همکاران ۲۰۱۱). همچنین با بررسی سایر صفات مرتبط با وزن مانند ضریب تبدیل و مصرف خوراک می توان بهترین افراد را برای پرورش در جهت تولید گوشت انتخاب کرد. بررسی چندشکلی ژن IGF-I در مرغ بومی آذربایجان غربی با استفاده از تکنیک[1]RFLP انجام شد. چندشکلی در ناحیه پروموتور ژن IGF-I شناسایی گردید. فراوانی دو آلل A و C در کل جمعیت به ترتیب ۲۵/۵ و ۷۵/۵٪ و فراوانی سه الگوی ژنوتیپی AA، AC و CC به ترتیب ۵، ۳۹ و ٥٦٪ برآورد شد (پیریونسی و همکاران۱۳۹۱). در ارتباط با صفت تولیدی (تخم‌مرغ) در مرغ نژاد ونچنگ با استفاده از تکنیک RFLP بر روی ژن IGF-I پژوهشی انجام گرفت. دو آلل A و B و سه الگوی ژنوتیپی AA، ABو BB شناسایی شد. نشان داده شد که ژن IGF-I در ناحیه 5`UTR دارای چندشکلی بوده و آنالیزهای آماری انجام گرفته ارتباط معنی‌داری را با صفات وزن پوسته و اندازه تخم‌مرغ بیان داشت (هویفانگ و همکاران۲۰۱۰). از طرف دیگر تحقیقات گذشته نشان داده است که ژن IGF-I با صفت وزن بدن در گونه‌های مختلف حیوانی در رابطه می‌باشد. مطالعات متعددی در خصوص چندشکلی و فراوانی آللی موجود در گونه‌های مختلف پستانداران انجام گرفته و تأثیر جایگاه ژنی IGF-I بر روی عملکرد مورد بررسی قرار گرفته و همگی حاکی از این است که این ژن می‌تواند نقش مهمی در افزایش وزن گاوهای گوشتی (دلا روسا رینا و همکاران۲۰۱۰)، صفت رشد در بز (ژانگ و همکاران ۲۰۰۸)، صفات بیومتریک در گوسفند مغانی (پوربایرامیان و همکاران۱۳۹۱) ایفا کند. لذا بررسی نحوه تعامل این ژن با صفت وزن بدن در بلدرچین‌ژاپنی موجب درک بهتر پروسه رشد و عوامل موثر بر آن خواهد شد. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای بررسی وجود ارتباط بین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی با صفت وزن بدن در بلدرچین از یک جمعیت تصادفی بزرگتر نیز استفاده شود.

نتیجه‌گیری کلی

بطور خلاصه در این پژوهش یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی در بخشی از جایگاه ژن IGF-I مشاهده شد. برای ژن IGF-I سه الگوی ژنوتیپی مختلف شناسایی شد که فراوانی‌های بدست آمده حاکی از وجود تنوع ژنتیکی در این جایگاه ژنی می‌باشد. بین الگوهای ژنوتیپی و ارتباط با وزن بدن فقط در سن ۳۰ روزگی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود داشت. تکنیک چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد به‌عنوان یکی از ابزارهای مناسب و کم‌هزینه در شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی می تواند مورد استفاده قرار گیرد. صرفاً استفاده از روش PCR-SSCP برای بررسی تنوع کافی نیست و باید سایر روش‌های دیگر نیز مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به اینکه در بیشتر منابع و بررسی ها، چندشکلی ژن IGF1در مرغ ارتباط معنی‌داری با صفات رشد و وزن بدن داشته است بنابراین جایگاه منتخب برای این بررسی در بلدرچین نیز ممکن است به عنوان یک جایگاه پیشنهادی مؤثر بر صفات مرتبط با وزن بدن به شمار آید. همچنین از آنجایی که ژن IGF-I به‌عنوان یکی از عوامل محرک رشد می‌باشد و با توجه به نقش مهم هورمون IGF-I و اثراتی که این هورمون بر صفات مهم تولیدی و اقتصادی دارد، بررسی ژنوتیپ‌های متنوع در این جایگاه از ژن IGF-I در بلدرچین‌ژاپنی و تحقیقات بیشتر در رابطه با سایر جایگاه‌های ژنی و دیگر صفات می‌تواند زمینه‌ساز اطلاعات مفیدی جهت برنامه‌ریزی برای اصلاح‌نژاد هر چه بیشتر این پرندگان شود.

[1] Restriction Fragment Length Polymorphism

منابع مورد استفاده

Arabi H, Moradi Shahrbabk M, Pakdel A, Moradi Shahrbabak H and Esmailzadeh Koshoiyeh A, 2016. Identification of novel SNP in promoter of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF1) gene in Japanese quail by PCR-SSCP assay. Iranian Journal of Animal Science 47(2): 303-313.

Aggrey S, Ankra-Badu G and Marks H, 2003. Effect of long-term divergent selection on growth characteristics in Japanese quail. Poultry Science 82(4): 538-542.

Akbari M, 2013. Evaluation of genetic diversity and allele frequency of prolactin gene in native birds of West Azerbaijan province. Doctoral dissertation at the Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University.

Bailes S, Devers J, Kirby J and Rhoads D, 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(1): 102-106.

Benbouza H, Jacquemin M, Bauduin J abd 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 (BASE) 2:77-81.

Barreca A, Ciccarelli E, Minuto F, Bruzzi P, Giordano G and Camanni F, 1989. Insulin-like growth factor I and daily growth hormone profile in the assessment of active acromegaly. European Journal of Endocrinology 120(5): 629-635.

De la Rosa Reyna X, Montoya HM, Castrellón VV, Rincón AMS, Bracamonte MP and Vera WA, 2010. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. Genetics and Molecular Research 9(2): 875-883.

Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain A and Goddard M, 2009. Invited review Genomic selection in dairy cattle. Progress and challenges. Journal of dairy science 92(2): 433-443.

Kadlec J, Hosnedlová B, Řehout V, Čítek J, Večerek L and Hanusová L, 2011. Insulin-like growth Factor-I gene polymorphism and its association with growth and slaughter characteristics in broiler chickens. Journal of Agrobiology 28(2): 157-163.

Kawahara-Miki R, Sano S, Nunome M, Shimmura T, Kuwayama T, Takahashi S and Kono T, 2013. Next-generation sequencing reveals genomic features in the Japanese quail. Genomics 101(6): 345-353.

Lei MM, Nie QH, Peng X, Zhang DX, and Zhang XQ, 2005. Single nucleotide polymorphisms of the chicken insulin-like factor binding protein 2 gene associated with chicken growth and carcass traits. Poultry Science 84(8): 1191-1198.

Huifang L, Wenqi Z, Kuanwei C, and Weitao S, 2010. Effects of the polymorphisms of GHR gene and IGF-1 gene on egg quality in Wenchang chicken. Research Journal of Poultry Sciences 3(2): 19-22.

El-Tarabany MS, Awad A and Khairy M, 2014. Genetic polymorphism of prolactin, bone morphogenetic protein receptor 1B and Insulin-like growth factor 1 genes in two selected lines of Japanese quail. Life Science Journal 11(6): 408-416.

Moe H, Shimogiri T, Kamihiraguma W, Isobe H, Kawabe K, Okamoto S and Maeda Y, 2007. Analysis of polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) gene from Japanese quail selected for body weight. Animal genetics 38(6): 659-661.

Naghavi MR and Qara Yazi B and Hosseini Salekdeh GH, 2013. Molecular markers. University of Tehran Press.

Nestor K, Bacon W, Anthony N and Noble D, 1996. Divergent selection for body weight and yolk precursor in Coturnix coturnix japonica. 10. Response to selection over thirty generations. Poultry Science 75(3): 303-310.

Piryonesi A, Mardani K, Khakpour K, Ghaderzadeh M and Modaresi R, 2012. Study on the polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene (IGF1) in West Azerbaijan native chickens. Modern Genetics Journal 7(4): 417-419.

Pipalla D, Joshi C, Rank D, Brahmkshtri B, and Solanki J, 2004. PCR-SSCP typing of MHC in cattle and buffaloes. Indian Journal of Animal Sciences 74: 637-639.

Pourbayramian F, Ghaderzadeh M, Deljoo Isaloo HA, Biabani P, Shams Borhan MB and Barenj Foroush P, 2012. Association study between some of biometric traits and IGF-I gene exon 1 polymorphism in Moghani sheep. Journal of Livestock Production 14(2): 21-30.

Rostamzade E, Asadi Fozi M, Esmailizadeh AK and Asadi MH, 2016. Effect of Methionine Restriction on IGF-1 Gene Expression in Breast Muscle of Japanese quail. Agricultural Biotechnology Journal 8(1): 48-59.

Rajaei Arbabi MA, 2005. Importance of breeding Japanese quail (Coturnix Japonica) of genetics and breeding prespective. World Animal Husbandary.

Sharifi M, Shams M, Dastar B and Hassani S, 2011. Evaluation of dietary protein levels on the performance of some economic factors of production in Japanese quail. In: 4th Congress of Animal Sciences: 88-90.

Tahmoorespur M, Attarchi H, Ahani Azari M and Nassiry MR, 2015. Evaluation of IGF-1 gene polymorphism and its association with carcass quality traits in Japanese quail. Journal of Animal Environment 4(4): 89-94.

Zhang C, Zhang W, Luo H, Yue W, Gao M, and Jia Z, 2008. A new single nucleotide polymorphism in the IGF-I gene and its association with growth traits in the Nanjiang Huang goat. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 21(8): 1073-1079.

Zhou H, Mitchell A, McMurtry J, Ashwell C and Lamont SJ, 2005. Insulin-like growth Factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. Poultry Science 84: 212-219.

Identification of polymorphism Insulin-Like Growth Factor I gene and its association with body weight in Japanese quail

N Ghahramani[1], A Hashemi[2*], M Ghaffari and Gh Elyasi Zaringhobaie

Received: September 30, 2020 Accepted: May 30, 2021

[1]Former MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[2]Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[4]Scientific Member of Agriculture and Natural Resources Research Center of East Azerbaijan Province, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: Email: A.hashemi50@gmail.com

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research

Journal of Animal Science/vol.31 No.3/ 2021/pp 89-98
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 NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI: 10.22034/AS.2022.42063.1585

Introduction: In order to take advantage of breeding programs and productivity of poultry and other domesticated animals, it is essential to assess genetic variability and study the strategies to preserve genetic diversity. The Japanese quail is widely used as a model for animal research purposes in laboratory studies because of its small body size, short intergeneration interval, high growth rate, production of more eggs and meat. Although, Japanese quail has various benefits as a laboratory bird, but its genome sequence is not accessible now. The genome sequence of Japanese quail will deliver important genomic resources to accelerate different studies and to authenticate divergent lines of Japanese quail. Growth is a complex physiological pathway that occurs from fertilization until maturity in birds. Insulin-like growth factor I (IGF-I) gene is one of the most important candidate genes in different species which can affect the performance traits because of its function in metabolism and growth. IGF-I is a 70 amino acid polypeptide hormone with endocrine, paracrine, and autocrine effects. It has been reported that there is association of genetic polymorphisms of the IGF-I gene with growth traits in the poultry. There are relatively few reported studies about the relation between genetic markers of the IGF-I gene and body weights in quails. The objective of this study was undertaken to identify polymorphisms of the IGF-I gene using PCR single-strand conformational polymorphism (PCR–SSCP) analysis and to evaluate association of these polymorphisms with body weight in the Japanese quail.

Material and methods: For doing this research, body weight of the 110 quails under study (46 males and 64 females) in different ages were collected. All data were collected from the Natural Resources Research Center of East Azerbaijan. The data included the identification of the animal, year of birth, sex, body weights at 15, 30, 45 and 60 days. Genomic DNA was extracted from 10 µl of blood in presence of Pronase (Bailes et al. 2007) and stored in EDTA-coated tubes and placed immediately inside an ice box and transferred to the laboratory. The samples were stored at -20 until DNA has been extracted. The quality and quantity of extracted DNA were measured by %0/8 agarose gel electrophoresis. PCR was done for amplifying a fragment in size of 465 bp of IGF-I gene. The PCR primers for the IGF1 gene were designed based on GenBank. PCR primers of IGF-I gene was

mentioned in Table 1. The PCRs were carried out in 25 µl volumes containing 1 unit Taq DNA Polymerase, reaction buffer 1X (Sina Gene, Tehran, Iran), 1/5 mM MgCl2, 0/2 µM each of dNTPs, 10 µM of each primer (Sina Gene, Tehran, Iran) and 30 ng of genomic extracted DNA as template. PCR was performed using the T-professional thermal cycler. The thermal profile consisted of 3 min at 95°C, followed by 35 cycles of 40 s at 95°C, 30 s at 58°C and 40 s at 72°C, with a final extension of 5 min at 72°C. Amplification was carried out in Mastercycler (Bailes et al. 2007). PCR products were detected by electrophoresis on %1/5 agarose gel containing ethidium bromide and were visualized in a gel documentation system with a UV transilluminator. PCR products were mixed with 20 µl of denaturing loading dye [95% deionized formamide, %0/35 xylene cyanol, %0/25 bromophenol blue and 10 mM EDTA] in a total volume of 10 µl. The mixture was denatured at 95°C for 15 min and was snap chilled on ice. The electrophoresis was performed in 0.5X TBE buffer (Tris 100 mM, boric acid 9 mM, EDTA 1 mM) at room temperature (18°C) and constant 110 V for 16 h. Polyacrylamide gels were stained with silver according to the protocol described (Benbouza et al. 2006). A statistical model included the mean of population, fixed effect of the sex, random effect of the genotype patterns and residual random term was done by using GLM of SAS software to find the association between the SSCP genotype patterns of PCR products with the body weights. Significant differences among means of different genotypes were calculated using Duncan method in the GLM program and P-values of 0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion: The investigation of candidate genes is one of the foremost techniques to reveal whether definite genes are associated with the economic traits in animals. We successfully amplified the exon 4 of the IGF-I gene. All extracted DNAs from quail blood samples yielded a specific single band PCR product without any nonspecific band. Therefore, the PCR products were directly used for SSCP analysis. The results of SSCP showed that this population was polymorphic at the studied loci and three different genotypes with frequencies of 7.27%, 50.91% and 41.82%, respectively were observed in the examined quails (Figure 3). The results indicated that the exon-4 of IGF-1 gene is polymorph and there was a significant difference ($P<0.05$) between the genotype patterns and body weight on 30 days. However, for association of gender effect on body weight, there was a significant difference ($P<0.05$) in the age of 60 days. Also the average daily gain in females is more than males in different ages.

Conclusion: The goal of this study was to determine genetic polymorphism of IGF-I gene in Japanese quail. According to this research, the selected locus for investigating of IGF-I gene in quail can be considered as a locus that effects on body weight and growth rate of quails. It can be also measured as the factor that cause of difference of body weight in different periods.

Keywords: Body weight, Insulin-Like Growth Factor-I, Japanese quail, Polymorphism