

شناسایی یک چندشکلی جدید در راه‌انداز ژن عامل رشد شبه انسولین-۱ (igf1) در بلدرچین ژاپنی به روش PCR-SSCP

هما اعرابی^۱، محمد مرادی شهرباک^{۲*}، عباس پاکدل^۳، حسین مرادی شهرباک^۴

و علی اسمعیلی زاده کشکویه^۵

۱، ۲ و ۴. دانشجوی سابق دکتری، استاد و استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳. دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۵. استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹)

چکیده

ژن عامل رشد شبه انسولین-۱ (igf1) یک ژن کاندیدا برای بررسی صفات مرتبط با رشد، وزن بدن و رشد عضله در گونه‌های مختلف است. به منظور بررسی ارتباط این ژن با صفات رشد در بلدرچین، هشت جفت بلدرچین سفید و وحشی به عنوان جمعیت صفر برای تولید افراد نسل اول (f1) با یکدیگر تلاقی داده شدند. از تلاقی بین ۳۴ قطعه بلدرچین در نسل F1، ۴۲۲ قطعه بلدرچین در نسل دوم (f2) ایجاد شد. رکوردهای مربوط به وزن بدن در سنین مختلف در نسل دوم ثبت و ارتباط بین چندشکلی بخشی از جایگاه راه‌انداز (پروموتور) ژن IGF1 و این رکوردها بررسی شد. با استفاده از روش PCR-SSCP یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی G → A در ناحیه مورد نظر ژن IGF1 در ۴۷۲ قطعه بلدرچین در سه نسل تشخیص داده شد. فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AG و GG به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۶۲ و ۰/۳۳ و فراوانی همردیف (آلل)‌های ژنی A و G به ترتیب ۰/۳۶ و ۰/۶۴ محاسبه شد. وزن بدن در سن ۱ تا ۵ هفتگی و زمان کشتار و همچنین میانگین افزایش وزن روزانه از هفته اول تا چهارم پرورش در ژنوتیپ AA، کمتر از ژنوتیپ AG و GG بود و این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. میانگین افزایش وزن روزانه ماده‌ها در ژنوتیپ AG بیشتر از نرها بود (P < ۰/۰۰۱). نتایج ارائه شده در این نوشتار در مقایسه با گزارش‌های دیگر در مرغ، نشان‌دهنده یک چندشکلی جدید در ناحیه راه‌انداز ژن IGF1 در بلدرچین بود، اما ارتباط آن با صفات مرتبط با وزن بدن و نرخ رشد از لحاظ آماری معنی دار نبود.

واژه‌های کلیدی: بلدرچین ژاپنی، توالی‌یابی، روش PCR-SSCP، عامل رشد شبه انسولین، صفات رشد.

مقدمه

از جمله بلوغ جنسی سریع، فاصله نسل کوتاه، درصد تخم‌گذاری بالا، هزینه نگهداری پایین و جثه کوچک، بلدرچین را به عنوان مدل آزمایشگاهی و اقتصادی مناسبی برای تحقیقات تبدیل کرده است (Nestor et al., 2014).

بلدرچین، کوچک‌ترین گونه از پرندگان بومی آسیاست که به منظور تولید تخم و گوشت پرورش می‌یابد (Tarabany et al., 2014). همچنین به دلایل زیادی

(Ikeobi *et al.*, 2002). در پژوهشی عملکرد ناحیه راهانداز (پروموتور) ژن *igf1* با ساخت (سنتر) کایمرهای حاوی توالی‌های 5' ژن *igf1* در جوجه و ژن گیرنده لوسیفراز بررسی شد. نتایج نشان داد که راهانداز ژن جوجه‌ها می‌تواند بیان لوسیفراز در یاخته‌های انسانی و ساخت *igf1* را افزایش دهد که بیانگر این است که بخش مهمی از راهانداز ژن IGF1 در جوجه‌ها و انسان تا حدود زیادی حفاظت شده است (Kajimoto & Rotwein, 1991; McMurtry *et al.*, 1997). نتایج برخی تحقیقات نشان داده است که تراکم SNPها در نواحی غیر ترجمه‌ای و اینترون بالا بود که می‌تواند به دلیل تأثیر این نواحی روی سطوح بیان ژن (به دلیل تنظیم عنصرهای موجود در نواحی 5'UTR و 3'UTR) باشد (Laere *et al.*, 2003; Nie *et al.*, 2004). چون snpهای موردبررسی در این آزمایش در ناحیه راهانداز ژن بوده‌اند، می‌توان فرض کرد که این چندشکلی ممکن است با تنظیم بیان ژن روی رشد اثر داشته باشد (Zhou *et al.*, 2005).

در انسان بین چندشکلی ژن *igf1* باصفت قد در افراد کوتاه‌قد (Pygmy) در آفریقای جنوبی هیچ‌گونه همبستگی ملاحظه نشد (Bowcock & Sartorelli, 1990). در نژاد مرغ بومی اسپانیا چندشکلی جایگاه راهانداز ژن *igf1* با میانگین نرخ رشد روزانه در ۱۰۷ روزگی و بازده (راندمان) خوراک مصرفی در سن ۴۴، ۷۳ و ۱۰۷ روزگی ارتباط معنی‌داری ملاحظه شد (Amills *et al.*, 2003). ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ناحیه راهانداز این ژن و وزن کبد، در جوجه‌های گوشتی رگه (لاین) کاب (Cobb 500) مشاهده شد. همچنین وزن عضله سینه و وزن عضله پا در ژنوتیپ ac بیشتر و وزن چربی شکمی در مقایسه با ژنوتیپ aa کمتر بود اما این اختلاف‌های معنی‌دار (در سطح ۰/۰۱ و نیز ۰/۰۵) نبود (Kadlec *et al.*, 2011). یک SNP در ناحیه راهانداز ژن IGF1 در جوجه‌های نسل F2 حاصل از تلاقی نژادهای گوشتی و ماده‌های دو نژاد تخم‌گذار لگهورن و فایومی (نژاد بومی چینی) مشاهده و ارتباط چندشکلی این ناحیه با اغلب صفات رکوردبرداری شده مانند رشد، ترکیب بدن و صفات مربوط به استخوان مانند محتوا و

(*al.*, 1996). طعم تخم و گوشت بلدرچین ژاپنی کیفیت مناسبی دارد و در بسیاری از کشورهای جهان از جمله چین، ژاپن، برزیل، هنگ‌کنگ، فرانسه و اسپانیا در مقیاس بزرگ پرورش داده می‌شود (Minvielle, 2004). بلدرچین متعلق به جنس کوتورنیکس (*Coturnix*) و همسان مرغ از خانواده قرقاول‌سانان (*Phasianidae*) و راسته ماکیان‌سانان (*Galliformes*) است (Kan *et al.*, 2010). برخلاف مرغ که بیشتر بررسی‌های ژنگانی (ژنومی) روی آن متمرکز شده است، تحقیقات اندکی روی بلدرچین صورت گرفته است (Kayang *et al.*, 2006).

رشد، نتیجه فرآیندهای پیچیده‌ای است که شامل همکاری منظم انواع مسیرهای هورمونی است (Zhou *et al.*, 1995). هورمون‌هایی مانند هورمون رشد، *igf*، هورمون‌های تیروئیدی و انسولین نقش‌های مهم و مختلفی را در رشد حیوانات بر عهده دارند (Zhou *et al.*, 2005). اغلب فعالیت هورمون رشد در بدن جوجه‌ها با عامل‌های رشد شبه انسولین (*igf*) انجام می‌شود (Lei *et al.*, 2005). این ژن مرتبط با عملکرد رشد در جوجه‌ها است (Zhou *et al.*, 2005). تحقیقات نشان داده است که ژن *igf1* نسبت به ژن *igf2* تأثیر بیشتری بر صفات مرتبط با رشد دارد (Beccavin *et al.*, 2003; Amills *et al.*, 2001). عامل رشد شبه انسولین-۱ (*igf1*) یک ژن کاندیدا برای رشد، ترکیب بدن و سوخت‌وساز (متابولیسم) چربی در پرندگان است (Zhou *et al.*, 2005; Kadlec *et al.*, 2011) که منجر به رشد عضله در گونه‌های مختلف می‌شود (Duclos *et al.*, 1999). همبستگی ژنتیکی غلظت *igf1* سرم خون موش با وزن بدن این حیوان در سن دوازده هفتگی ۰/۶ برآورد شده است (Baker *et al.*, 1991). این هورمون روی افزایش، تمایز و سوخت‌وساز شمار زیادی از یاخته‌های ماهیچه‌ای در گونه‌های مختلف مؤثر بوده است (Florini *et al.*, 1996).

ژن *igf1* در بلدرچین در کروموزوم شماره ۷ و در مرغ در فاصله ۱۶۵/۹۵ سانتی‌مورگان در کروموزوم شماره ۱ قرار دارد. یک *qtl* در فاصله ۱۵۰ سانتی‌مورگان کروموزوم شماره ۱ شناخته شده است که بر وزن چربی شکمی در جوجه‌ها مؤثر است.

اندازه‌گیری‌های فنوتیپی

در نتاج نسل F2 وزن تفریخ، وزن زنده در یک هفتگی، دو هفتگی، سه هفتگی، چهار هفتگی و پنج هفتگی اندازه‌گیری شد. همچنین وزن بدن پیش از کشتار (در ۳۵ روزگی)، اندازه‌گیری و از والدین اولیه و نیز نتاج نسل‌های اول و دوم خون‌گیری شد (Sohrabi *et al.*, 2012; Moradian *et al.*, 2014).

آماده‌سازی DNA، طراحی آغازگر و افزایش PCR و انجام SSCP^۱

پیش از کشتار از همه پرنده‌گان با استفاده از لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA خون‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به فریزر منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. استخراج DNA به روش تغییر یافته نمکی (Miller *et al.*, 1988) انجام شد. با استفاده از نرم‌افزارهای طراحی آغازگر (پرایمر) شامل Primer designing tool و Primer3 plus یک جفت آغازگر (-5' F: GTTAGTCAGCATGTAGGCGTG-3'؛ -3' R: GGCATGGTGACAAATAACATC) برای افزایش قطعه ۴۱۸ جفت بازی از جایگاه راه‌انداز ژن IGF1 بلدرچین از سایت NCBI بر پایه توالی مرغ با شماره دسترسی KM596748.1 طراحی شد و برای افزایش این قطعه، حجم نهایی PCR، ۱۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. این مخلوط حاوی ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنگانی، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر، بافر PCR 1X، ۰/۴ میکرومولار dNTPs، ۲ میلی‌مولار MgCl2 و ۱ واحد آنزیم Tag پلیمرز بود. شرایط بهینه برای دما و زمان واکنش PCR به شرح زیر بود:

مرحله واسرشت‌سازی اولیه (پنج دقیقه با دمای ۹۶ درجه سلسیوس) و ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی (یک دقیقه با دمای ۹۵ درجه سلسیوس)، اتصال آغازگر به توالی مورد نظر (یک دقیقه با دمای ۶۱ درجه سلسیوس)، گسترش (۱/۵ دقیقه با دمای ۷۲ درجه سلسیوس) و در نهایت گسترش نهایی (ده دقیقه با دمای ۷۲ درجه سلسیوس) انجام شد. تعیین الگوهای

چگالی ماده کانی استخوان، طول درشت‌نی، طول و وزن استخوان ساق پا و نسبت طول به وزن استخوان معنی‌دار بود (Zhou *et al.*, 2005).

توالی ژن IGF1 و نقش آن در پرنده‌گانی مانند ماکیان و مرغان خانگی تا حدودی بررسی شده است ولی بررسی‌های اندکی روی این ژن و ارتباط آن با رشد و وزن بدن در طیور به‌ویژه بلدرچین گزارش شده است. با توجه به اینکه ناحیه راه‌انداز ژن IGF1 در بیشتر پژوهش‌ها بر صفات تولیدی مؤثر بوده است، تأثیر چندشکلی‌های موجود در ناحیه راه‌انداز این ژن بر صفات رشد بلدرچین ژاپنی یک موضوع شایان‌بررسی است. هدف از این تحقیق، بررسی ارتباط بین چندشکلی بخشی از جایگاه راه‌انداز ژن IGF1 با وزن بدن در سنین مختلف و زمان کشتار در بلدرچین ژاپنی بود.

مواد و روش‌ها

شمار هشت پرنده از سویه سفید یا S (تخم‌گذار) و هشت پرنده از سویه وحشی یا W (گوشتی) به‌عنوان نسل والد (P) انتخاب و تلاقی متقابلی بین آن‌ها (نر سفید × ماده وحشی و نر وحشی × ماده سفید) انجام شد. پرنده‌گان نسل F1 شامل ۱۷ قطعه SW و ۱۷ قطعه WS به ترتیب با تلاقی دو طرفه W ماده × S نر و S ماده × W نر تولید شدند. در نسل F1، نرهای SW با ماده‌های WS و نرهای WS با ماده‌های SW تلاقی داده شدند. از تلاقی پرنده‌گان نسل F1، شمار ۴۲۲ پرنده نسل F2 (۲۴۶ پرنده نر و ۱۷۶ پرنده ماده) شامل ۱۵۳ قطعه SWWS، ۲۳۰ قطعه WSSW و ۳۹ قطعه WSWS در فرآیند ۵ مرحله جوجه‌کشی (Hatching) متوالی تولید شدند. برای تولید پرنده‌گان نسل اول (F1)، هر پرنده نر در نسل P با یک پرنده ماده تلاقی داده شد. برای ایجاد پرنده‌گان نسل دوم (F2)، هر پرنده نر در نسل F1 با سه پرنده ماده از همین نسل (به‌صورت چرخشی و هر سه روز یک‌بار با یکی از پرنده‌گان ماده) تلاقی داده شد تا از باروری پرنده‌گان اطمینان به دست آید (Sohrabi *et al.*, 2012; Moradian *et al.*, 2014).

Alex فراوانی‌های همردیف (آلی) ژنی و ژنوتیپی محاسبه و بررسی تعادل فراوانی‌های همردیف ژنی و ژنوتیپی با آزمون کای مربع انجام شد. همچنین بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و صفات موردنظر در ۴۲۲ قطعه بلدرچین جمعیت F_2 با استفاده از رویه Mixed نرم‌افزار SAS انجام شد. مدل آماری موردنظر برای تجزیه داده به شرح زیر بود (Khaldari, 2012):

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + H_j + G_k + (SG)_{ik} + a_{ijk} + e_{ijkl}$$

که y_{ijkl} امین مشاهده مربوط به i امین جنس، j امین تفریح و k امین ژنوتیپ است. μ میانگین کل، S_i اثر ثابت i امین جنس، H_j اثر ثابت j امین تفریح و G_k اثر ثابت k امین ژنوتیپ، $(SG)_{ik}$ اثر متقابل i امین جنس و k امین ژنوتیپ، a_{ijk} اثر تصادفی حیوان و e_{ijkl} اشتباه تصادفی با میانگین صفر و σ_e^2 است.

نتایج و بحث

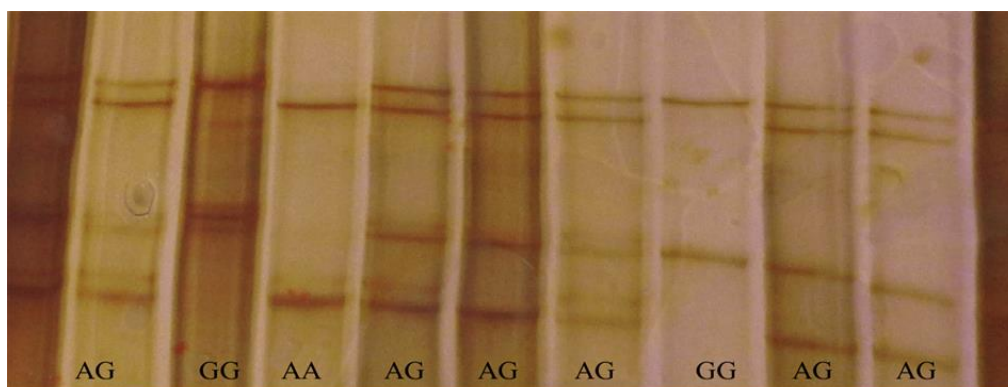
افزایش و تعیین الگوهای ژنوتیپی

پس از انجام SSCP در آغاز پنج الگوی ژنوتیپی متفاوت مشاهده شد که پس از توالی‌یابی تنها سه الگو از لحاظ ژنوتیپی با یکدیگر متفاوت بودند. با توجه به توالی‌یابی الگوهای ژنوتیپی مختلف بخشی از جایگاه راه‌انداز ژن IGF1، جهش $G \rightarrow A$ نخستین بار در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۷۲ (شکل ۲) با سه ژنوتیپ AA، AG و GG شناسایی شد (شکل ۱) که با شماره دسترسی KT587341.1 و KT587342 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد.

ژنوتیپی، با استفاده از دای SSCP به نسبت ۱۸ به ۲ به مدت ده دقیقه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس SSCP انجام و رشته‌های DNA تک‌رشته‌ای شدند و بی‌درنگ به دمای ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از ده دقیقه محصولات SSCP درون چاهک‌های ایجادشده در ژل آگارز ۱۲ درصد بارگذاری شدند. الکتروفورز با ولتاژ ۳۰۰ ولت به مدت نوزده ساعت برای تعیین الگوهای ژنوتیپی انجام و رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره در سه مرحله تثبیت (اتانول ۱۰ درصد و اسید استیک ۰/۵ درصد به مدت چهار دقیقه تکان داده شد)، لکه‌گذاری (اتانول ۱۰ درصد، اسید استیک ۰/۵ درصد و نیترات نقره ۰/۲ درصد به مدت هفت دقیقه تکان داده شد و سپس شستشوی ژل به مدت بیست ثانیه با آب دو بار تقطیر) و ظهور (محلول حاوی ۳ درصد NaOH و فرمالدئید ۰/۵ درصد تا هنگام مشاهده باند (نزدیک به ۱۰ تا ۲۵ دقیقه) صورت گرفت. پس از تعیین الگوهای ژنوتیپی از هر الگو شماری نمونه برای توالی‌یابی به شرکت بایونیز کره جنوبی ارسال شد. پس از انجام توالی‌یابی و همردیف کردن توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit، چندشکلی‌های مشاهده‌شده تعیین و بلدرچین‌ها تعیین ژنوتیپ شدند.

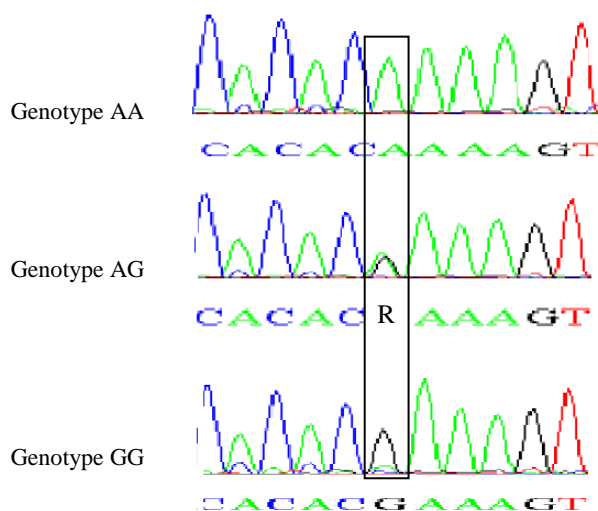
تجزیه و تحلیل آماری

پس از انجام مراحل آزمایشگاهی و بررسی توالی هر یک از الگوهای ژنوتیپی، با استفاده از نرم‌افزار Gene



شکل ۱. نگاره الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید ژنوتیپ‌های G172A ژن عامل رشد شبه انسولینی (igf1) در بلدرچین ژاپنی: یک جهش G172A وجود داشت. سه رخ‌نمای (AA، AG و GG) از تصویر ژل مشاهده شد.

Figure 1. Picture of Polyacrylamide gel electrophoresis of insulin-like growth factor1 (IGF1) gene G172A genotypes in Japanese quail: There were 1 SNP of G172A and three profiles (AA, AG, and GG) are observed in the gel picture.



شکل ۲. نمونه‌ای از توالی‌یابی در راهانداز ژن IGF1 در بلدرچین ژاپنی. بنا بر توالی‌یابی، سه رخ‌نمای (AA، AG و GG) از نگاره ژل مشاهده شد.

Figure 1. An example of sequencing in the promoter of the IGF1 gene in Japanese quail. According to sequencing, three profiles (AA, AG, and GG) were observed from the gel picture.

هیچ‌گونه جهشی در بین سویه‌ها مشاهده نشد ولی متفاوت با SNP ۱۹۷ و ۳۴۱ نسبت به مرغ ($T \rightarrow C$) (Nikzad *et al.*, 2012).

در این پژوهش، تفاوت نوکلئوتیدیهای بخشی از ناحیه راهانداز بلدرچین با مرغ (۱۵ SNP متفاوت) بیشتر از ناحیه آگزون (۲ SNP متفاوت) (Nikzad *et al.*, 2012) بود و با توجه به اینکه بخش کلیدی راهانداز در جوجه و انسان تا حدود زیادی حفاظت شده (Kajimoto & Rotwein, 1991; McMurtry *et al.*, 1997)، ممکن است بین مرغ و بلدرچین نیز حفاظت شده باشد.

فراوانی‌های ژنوتیپی و همردیف ژنی

فراوانی‌های ژنوتیپی و همردیف ژنی جهش $G \rightarrow A$ شناسایی شده در جدول ۱ خلاصه شده است. میانگین فراوانی‌های ژنوتیپی AA، AG و GG به ترتیب برابر با ۰/۰۵، ۰/۶۲ و ۰/۳۳ و فراوانی‌های همردیف ژنی A و G به ترتیب برابر با ۰/۳۶ و ۰/۶۴ بود. در هر سه جمعیت والدین، F1 و F2، فراوانی همردیف ژنی G به ترتیب ۰/۶۶، ۰/۶۵ و ۰/۶۴ بیشتر از همردیف ژنی A یعنی ۰/۳۴، ۰/۳۵ و ۰/۳۶ بود. ژنوتیپ AA در هر سه جمعیت کمترین فراوانی

چندشکلی ژن IGF1 در جوجه‌ها در بررسی‌های زیادی گزارش شده است (Amills *et al.*, 2003; Nei *et al.*, 2004; Lei *et al.*, 2007; Khadem *et al.*, 2009; Kadlec *et al.*, 2011). در مرغ در موقعیت ۵۷۰ ناحیه راهانداز، جهش $A \rightarrow C$ گزارش شد (Amills *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2005; Kadlec *et al.*, 2011). جهش مشاهده شده در این پژوهش، تاکنون در مرغ مشاهده نشده است ولی نوکلئوتید همردیف با موقعیت ۱۷۲ نسبت به این پژوهش (موقعیت ۴۱۲ در مرغ)، شامل نوکلئوتید G بود. توالی این پژوهش پس از همردیفی مشخص کرد که به جز در ناحیه جهش، در موقعیت‌های نوکلئوتیدی دیگر نیز نسبت به توالی مرغ متفاوت بود (تفاوت $A \rightarrow T$ در موقعیت نوکلئوتیدی ۶۳، ۷۷ و ۹۹، تفاوت $T \rightarrow C$ در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۳۰ و ۲۱۲، تفاوت $C \rightarrow T$ در موقعیت نوکلئوتیدی ۴۳، ۴۹، ۱۵۳، ۲۴۹ و ۲۵۹، تفاوت $A \rightarrow G$ در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۴۹ و ۲۰۰، تفاوت $C \rightarrow A$ در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۰۶ و ۲۲۵ و تفاوت $T \rightarrow A$ در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۱۰)، که بیانگر اختلاف بسیار زیاد این راهانداز با توالی همردیف آن در مرغ است. پس از افزایش قطعه ۴۰۷ جفت بازی ناحیه آگزون ۱ در ماده‌های ۴ سویه بلدرچین،

AA یک چهارم خواهد بود. ۳) هنگامی که والدین دارای ژنوتیپ AA با ژنوتیپ AG تلاقی کنند، یک دوم افراد دارای ژنوتیپ AA می‌شوند. با توجه به آنکه فراوانی افراد دارای ژنوتیپ AA در نسل صفر و نیز در نسل اول پایین بود، احتمال وجود تلاقی‌هایی که تولیدکننده افراد دارای ژنوتیپ یادشده شوند نیز پایین بود. احتمال دوم می‌تواند ناشی از تأثیر نمونه‌گیری مندلی به دلیل اندازه کوچک جمعیت پایه باشد. مقایسه شمار افراد مشاهده شده و مورد انتظار برای هر یک از فراوانی‌ها و ژنوتیپ‌ها با استفاده از آزمون کای مربع نشان داد که فراوانی همردیف ژنی در ۴۷۲ قطعه پرنده در تعادل نبود ($X^2_{0.001,1}=10.83$). همچنین فراوانی ژنوتیپی نیز در این جمعیت در تعادل نبود ($X^2_{0.001,2}=13.82$).

(۰/۰۶، ۰/۰۶، ۰/۰۵) و ژنوتیپ AG بیشترین فراوانی (۰/۵۶، ۰/۵۹، ۰/۶۲) را داشت. فراوانی ژنوتیپ AA در هر سه جمعیت کم بود که ناشی از ساختار شجره و نوع تلاقی‌گری‌های بین والدین ژنوتیپ‌های مختلف دارد. از آنجاکه باوجود دو همردیف ژنی A و G، احتمال وجود سه نوع ژنوتیپ AA، AG و GG در جمعیت وجود دارد، بنابراین در مجموع شش نوع آمیزش در جمعیت وجود خواهد داشت. از تلاقی بین سه نوع ژنوتیپ زیر احتمال تولید نتایج AA وجود دارد: ۱) هنگامی که والدین دارای ژنوتیپ‌های AA با والدین دارای ژنوتیپ همسان خود آمیزش کنند همه فرزندان AA می‌شوند. ۲) هنگامی که افراد دارای ژنوتیپ AG با یکدیگر تلاقی یابند احتمال وجود نتایج

جدول ۱. فراوانی همردیف ژنی و ژنوتیپی بخشی از جایگاه راه‌انداز ژن IGF1 در بلدرچین ژاپنی

Table 1. Allelic and genotypic frequencies of the promoter of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF1) gene in Japanese quail

Frequency	Generation				
	Parent (F0) n=16	F1 n=34	F2 n=422	Total n=472	
Allele	A	0.34	0.35	0.36	0.36
	G	0.66	0.65	0.64	0.64
Chi-squared test		3.13 ^{ns}	5.88*	65.99**	74.95**
Genotype	AA	0.06	0.06	0.05	0.05
	AG	0.56	0.59	0.62	0.62
	GG	0.38	0.35	0.33	0.33
Chi-squared test		3.38 ^{ns}	6.94*	88.75**	98.76**

ns, *, **, بیانگر نبود معنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و سطح ۰/۰۰۱ است.

ns, *, **: Non significant, and P ≤ 0.05 and P ≤ 0.001 level.

ناحیه راه‌انداز این ژن با صفات مرتبط با رشد در برخی از بررسی‌ها مشاهده شده است (Nagaraja *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005; Moe *et al.*, 2009). وجود ارتباط چندشکلی ژن IGF1 با وزن بدن و صفات مرتبط با رشد در بررسی‌های دیگر ممکن است به دلیل وجود پیوستگی بین چندشکلی‌های دیگر در این ژن و یا ژن‌های پیوسته با آن باشد که به دلیل نبود تعادل پیوستگی از بین رفته باشد (Amills *et al.*, 2003).

وزن بدن در همه سنین به‌جز در هنگام تفریح، در ژنوتیپ AA کمتر از دیگر ژنوتیپ‌ها بود اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود که این امر ممکن است به دلیل شمار کم افراد دارای ژنوتیپ AA و در نتیجه افزایش میزان اشتباه استاندارد و نبود معنی‌داری باشد. همچنین میزان افزایش وزن روزانه در بیشتر هفته‌های پرورش در ژنوتیپ AA کمتر از ژنوتیپ‌های دیگر بود که

بررسی ارتباط SNP بخشی از جایگاه راه‌انداز ژن IGF1 با صفات فنوتیپی

مقادیر میانگین وزن بدن و میزان افزایش وزن روزانه هفته‌های مختلف پرورش در جدول ۲ ارائه شده است. بین صفات رشد، وزن بدن و میانگین افزایش وزن روزانه با ژنوتیپ‌های AA، AG و GG ارتباط معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد. در جوجه‌های گوشتی مازندران نیز ارتباط چندشکلی ژن IGF1 با وزن بدن معنی‌دار نبود (Khadem *et al.*, 2009). لیکن در بررسی دو سویه مرغ بومی اسپانیا رابطه معنی‌داری بین چندشکلی ناحیه راه‌انداز ژن IGF1 و میانگین رشد روزانه در ۱۰۷ روزگی و بازده خوراک در ۴۴، ۷۳ و ۱۰۷ روزگی ملاحظه شد اما با میانگین نرخ رشد در ۴۴ و ۷۳ روزگی ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (Amills *et al.*, 2003). ارتباط بین چندشکلی

دیگری، تأثیر جنس در وزن بدن جوجه‌ها مشاهده شد (Kadlec *et al.*, 2011). هیچ‌گونه اثر متقابل بین وزن و جنس در چندشکلی ناحیه راهانداز ژن IGF1 در این پژوهش مشاهده نشد (جدول ۳). در بررسی که روی جوجه‌های نسل دوم حاصل از تلاقی نرهای گوشتی و ماده‌های لگهورن انجام شد نیز هیچ‌گونه اثر متقابل بین چندشکلی ناحیه راهانداز ژن IGF1 و جنس برای صفات مرتبط با رشد، صفات سوخت‌وسازی (متابولیسم) یا صفات ساختار بدنی (اسکلتی) مشاهده نشد (Zhou *et al.*, 2005). در این پژوهش تفاوت معنی‌داری بین وزن بدن نرها و ماده‌ها در ژنوتیپ AA مشاهده نشد (به جز در سه هفتگی). تا پیش از سه هفتگی تفاوت معنی‌داری بین وزن بدن نر و ماده‌ها در هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌ها وجود نداشت (جدول ۳). در تحقیقات موجود روی بلدرچین، نشان داده شد که وزن بدن بلدرچین‌های نر و ماده از سن سه هفتگی به بعد با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند (Ayatollahi, Mehrgardi, 2008; Arabi *et al.*, 2010).

این تفاوت نیز از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲). میانگین افزایش وزن روزانه ماده‌ها در مقایسه با نرها در ژنوتیپ AG بالاتر بود ($p < 0.001$) (جدول ۳). در پژوهشی که روی چندشکلی ناحیه راهانداز ژن IGF1 در جوجه‌های گوشتی رگه کاب صورت گرفت ملاحظه شد که جوجه‌های با ژنوتیپ AA تا سن هشت هفتگی نسبت به ژنوتیپ AC وزن بدن کمتری داشتند (Kadlec *et al.*, 2011). در حالی که وزن بدن و میانگین افزایش وزن روزانه جوجه‌های با ژنوتیپ AA به دست آمده از تلاقی نرهای گوشتی و ماده‌های لگهورن در نسل دوم در همه سنین بیشتر بود (Zhou *et al.*, 2005). تأثیر جنس در وزن‌های سنین ۴ و ۵ هفتگی و پیش از کشتار در ژنوتیپ‌های AG و GG و تأثیر این عامل‌ها در سن ۳ هفتگی در ژنوتیپ AA از لحاظ آماری معنی‌دار بود (در سطح ۰/۰۰۱). ماده‌های ژنوتیپ GG و AA به ترتیب بیشترین و کمترین میانگین وزن بدن را داشتند ولی اختلاف بین آن‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول ۳). در پژوهش

جدول ۲. ارتباط بین ژنوتیپ‌های چندشکلی تک نوکلئوتیدی ژن IGF1 و وزن بدن و میانگین افزایش وزن روزانه در یک روزگی تا پنج هفتگی و زمان کشتار در بلدرچین ژاپنی

Table 2. Association between the single nucleotide polymorphisms of insulin-like growth factor 1 gene genotypes and body weight, average daily gain from day one to five weeks of ages and slaughter time in Japanese quail

Trait	Age (day)	Genotype		
		AA	AG	GG
		± Least squares means Standard error	± Least squares means Standard error	± Least squares means Standard error
Body weight, g	1	6.13±0.63 n=22	6.13±0.61 n=260	6.13±0.61 n=139
	7	21.46 ±1.47 n=22	21.49 ±0.46 n=258	21.66 ±0.60 n=138
	14	43.88 ±3.06 n=22	45.62 ±0.98 n=258	44.81 ±1.32 n=139
	21	75.88 ±4.52 n=22	80.71 ±1.48 n=257	79.61 ±1.92 n=140
	28	110.82 ±5.80 n=22	116.50 ±1.88 n=256	118.01 ±2.47 n=138
	35	149.45 ±7.23 n=15	156.03 ±1.95 n=220	156.65 ±2.31 n=115
	pre-slaughter weight	141.52 ±5.44 n=22	150.00 ±1.74 n=255	148.75 ±2.11 n=139
Average daily gain, g/d	1-7	2.09 ±0.19 n=22	2.11 ±0.07 n=258	2.11 ±0.79 n=138
	7-14	3.27 ±0.24 n=22	3.51 ±0.12 n=258	3.38 ±0.09 n=138
	14-21	4.51 ±0.31 n=22	4.94 ±0.10 n=257	4.98 ±0.13 n=139
	21-28	5.06 ±0.34 n=22	5.18 ±0.13 n=256	5.33 ±0.11 n=138
	28-35	4.61 ±0.48 n=15	4.50 ±0.14 n=220	4.39 ±0.15 n=115

جدول ۳. تغییرهای وزن بدن و میانگین افزایش وزن در جنس‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف چندشکلی تک نوکلئوتیدی ژن IGF1 در پرند‌های نسل دوم حاصل از تلاقی دو سویه بلدرچین ژاپنی

Table 3. Variation of body weight and average daily gain for different genotypes of insulin-like growth factor 1 gene single nucleotide polymorphism and birds' sex in F2 generation' birds obtained from an intercross between two strains of Japanese quail

Trait	Age (day)	Genotype					
		AA		AG		GG	
		± Least squares means Standard error		± Least squares means Standard error		± Least squares means Standard error	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	
Body weight, g	1	6.13±0.62	6.14 ±	6.11±	6.17 ±	6.12 ±	6.17±
		n=14	n=8	n=154	n=106	n=77	n=62
	7	20.14 ±	24.97 ±	21.50 ±	21.37 ±	21.81 ±	21.64±
		1.69	2.64	0.54	0.62	0.73	0.88
	14	41.21 ±	49.44 ±	44.83 ±	46.24 ±	44.15 ±	45.32 ±
		3.51	5.49	1.20	1.29	1.59	1.91
	21	70.84 ^{b**} ±	84.74 ^a ±	78.28 ^a ±	83.03 ^a ±	76.92 ^{ab} ±	82.33 ^a ±
		5.22	7.97	1.72	1.89	2.32	2.90
	28	104.73 ^b ±	120.09 ^{ab} ±	112.8 ^b ±	120.58 ^a ±	113.00 ^b ±	121.40 ^a ±
		6.73	10.58	2.21	2.48	2.97	3.72
	35	147.04 ^b ±	152.04 ^{ab} ±	150.81 ^b ±	160.20 ^a ±	151.17 ^b ±	162.55 ^a ±
		8.88	12.47	2.31	2.54	3.25	3.91
	pre-slaughter weight	135.29 ^b ±	149.52 ^{ab} ±	144.33 ^b ±	154.45 ^a ±	142.61 ^b ±	152.87 ^a ±
		6.44	10.13	2.06	2.32	2.80	3.51
Average daily gain, g/d	1-7	1.90 ±	2.58 ±	2.11 ±	2.08 ±	2.14 ±	2.07 ±
		0.23	0.36	0.07	0.08	0.09	0.13
	7-14	3.07 ^b ±	3.57 ^{ab} ±	3.37 ^b ±	3.62 ^a ±	3.24 ^b ±	3.47 ^{ab} ±
		0.30	0.49	0.11	0.14	0.11	0.15
	14-21	4.19 ^b ±	4.98 ^b ±	4.74 ^b ±	5.16 ^a ±	4.71 ^b ±	5.28 ^a ±
		0.34	0.55	0.14	0.14	0.15	0.19
	21-28	4.86 ^b ±	5.05 ^{ab} ±	4.98 ^b ±	5.37 ^a ±	5.08 ^{ab} ±	5.56 ^a ±
		0.36	0.58	0.13	0.15	0.17	0.21
	28-35	4.60 ^{ab} ±	4.43 ^{ab} ±	4.31 ^b ±	4.67 ^a ±	4.17 ^b ±	4.62 ^{ab} ±
		0.58	0.81	0.17	0.17	0.21	0.25
		n=9	n=6	n=130	n=90	n=66	n=49

** حروف ناهمسان در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است.

** The rows that have different letter represent this significant differences ($P \leq 0.01$).

دیگر بود اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. میانگین افزایش وزن روزانه ماده‌ها در مقایسه با نرها در ژنوتیپ AG بیشتر بود ($p < 0.001$). با توجه به آنکه در بیشتر منابع و گزارش‌ها، چندشکلی جایگاه راه‌انداز ژن IGF1 در مرغ ارتباط معنی‌داری با صفات رشد دارد بنابراین این جایگاه در بلدرچین نیز ممکن است به‌عنوان یک جایگاه پیشنهادی مؤثر بر صفات مرتبط با رشد به شمار آید، که به آزمایش دیگری با طراحی جمعیت اما در این پژوهش ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد که می‌تواند به علت ساختار شجره، نوع

به‌طور خلاصه در این بررسی یک چندشکلی در بخشی از جایگاه راه‌انداز ژن IGF1 مشاهده شد. اما ارتباط بین این چندشکلی و صفات مرتبط با وزن بدن و نرخ رشد از نظر آماری معنی‌دار نبود. در مجموع فراوانی ژنوتیپ AA در هر سه جمعیت پایین بود که احتمال دارد به علت وجود تأثیر نمونه‌گیری مندلی ناشی از پایین بودن اندازه جمعیت باشد. وزن بدن در سن ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ هفتگی و نیز زمان کشتار و همچنین نرخ افزایش وزن روزانه در هفته‌های اول تا چهارم پرورش در ژنوتیپ AA پایین‌تر از ژنوتیپ‌های

تلاقی‌گری بین افراد دارای ژنوتیپ‌های مختلف و نبود احتمال یکسان برای تولید فرزندان دارای ژنوتیپ‌های مختلف باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود با توجه به آنکه ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ناحیه راه‌انداز ژن IGF1 با صفات مرتبط با رشد و وزن بدن در مرغ مشاهده شده است، از یک جمعیت تصادفی و یا با نسل پایه بزرگتر برای بررسی وجود ارتباط بین این چندشکلی و صفات مرتبط با رشد در بلدرچین نیز استفاده شود.

REFERENCES

1. Amills, M., Jimenez, N., Villalba, D., Tor, M., Molina, E., Cubilo, D., Marcos, C., Francesch, A., Sanchez, A. & Estany, M. (2003). Identification of three single nucleotide polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits. *Poultry Science*, 82, 1485-1493.
2. Arabi, H., Moradi Shahrababak, M. & Nejati Javaremi, A. (2010). Divergent selection for four and five weeks body weight in Japanese quail. *Iranian Journal of Animal Science*, 4, 373-380. (in Farsi)
3. Ayatollahi Mehrgardi, A. (2008). *Selection for growth traits and reproduction in Japanese quail*. Ph.D. Thesis. Faculty of Tehran University, Iran. (in Farsi)
4. Baker, R.L., Peterson, A.J., Bass, J.J., Amyes, N.C., Breier, B.H. & Gluckman, P.D. (1991). Replicated selection for insulin-like growth factor-1 and body weight in mice. *Theoretical and Applied Genetics*, 81, 685-692.
5. Beccavin, C., Chevalier, B., Cogburn, L.A., Simon, J. & Duclos, M.J. (2001). Insulin-like growth factors and body growth in chickens divergently selected for high or low growth rate. *Journal of Endocrinology*, 168, 297-306.
6. Bowcock, A. & Sartorelli, V. (1990). Polymorphism and mapping of the IGF1 gene, and absence of association with stature among African pygmies. *Human Genetics*, 85, 349-54.
7. Duclos, M.J., Beccavin, C. & Simon, J. (1999). Genetic models for the study of insulin-like growth factors (IGF) and muscle development in birds compared with mammals. *Domestic Animal Endocrinology*, 17, 231-243.
8. El-Tarabany, M.S., Awad, A. & El-Bayomi, K.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.
9. Florini, J.R., Ewton, D.Z. & Coolican, S.A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 17, 481-517.
10. Ikeobi, C.O., Woolliams, J.A., Morrice, D.R., Law, A., Windsor, D., Burt, D.W. & Hocking, P.M. (2002). Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. *Animal Genetics*, 33, 428-435.
11. Kadlec, J., Hosnedlova, B., Rehout, V., Citek, J. & Vecerek, L. (2011). Insulin-like growth factor-I gene polymorphism and its association with growth and slaughter characteristics in broiler chickens. *Journal of Agrobiolology*, 28(2), 157-163.
12. Kajimoto, Y. & Rotwein, P. (1991). Structure of the chicken insulin-like growth factor I gene reveals conserved promoter elements. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 266, 9724-9731.
13. Kan, X.Z., Li, X.F., Lei, Z.P., Chen, L., Gao, H., Yang, Z.Y. & et al. (2010). Estimation of divergence times for major lineages of galliform birds: evidence from complete mitochondrial genome sequences. *African Journal of Biotechnology*, 9, 3073-3078.
14. Khaldari, M. (2012). *Statistical methods*. (1st ed.). Jahad daneshgahi publication, Tehran. (in Farsi)
15. Kayang, B.B., Vignal, A., Inoue-Murayama, M., Miwa, M., Monvoisin, J.L., Ito, S. & Minvielle, F. (2004). A first-generation microsatellite linkage map of the Japanese quail. *Animal Genetics*, 35, 195-200.
16. Khadem, A., Hafezian, H. & Rahimi-Mianji, G.H. (2010). Association of single nucleotide polymorphisms in IGF- I, IGF-II and IGFBP-II with production traits in breeder hens of Mazandaran native fowls breeding station. *African Journal of Biotechnology*, 9(6), 805-810.
17. Laere, A.V., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L., Archibald, A.L., Haley, C.S., Buys, N. & et al. (2003). A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*. 425, 832-836.
18. Lei, M.M., Nie, Q.H., Peng, X., Zhang, D.X. & Zhang, Q. (2005). Single nucleotide polymorphisms of the chicken insulin-like factor binding protein 2 gene associated with chicken growth and carcass traits. *Poultry Science*, 84, 1191-1198.
19. Lei, M., Luo, C., Peng, X., Fang, M., Nie, Q., Zhang, D., Yang, G. & Zhang, X. (2007). Polymorphism of growth-correlated genes associated with fatness and muscle fiber traits in chickens. *Poultry Science*, 86, 835-842.

20. McMurtry, J.P., Francis, G.L. & Upton, Z. (1997). Insulin-like growth factors in poultry. *Domestic Animal Endocrinology*, 14, 199-229.
21. Minvielle, F. (2004). The future of Japanese quail for research and production. *World's Poultry Science Journal*, 60, 500-507.
22. Moe, H.H., Shimogiri, T., Kawabe, K., Nishibori, M., Okamoto, S., Hashiguchi, T. & Maeda, Y. (2009). Genotypic frequency in Asian native chicken populations and gene expression using Insulin-like Growth Factor I (IGF1) gene promoter polymorphism. *Poultry Science*, 46, 1-5.
23. Moradian, H., Esmailizadeh, A., Sohrabi, S., Nasirifar, E., Askari, N., Mohammadabadi, M.R. & Baghizadeh, A. (2014). Genetic analysis of an F2 intercross between two strains of Japanese quail provided evidence for quantitative trait loci affecting carcass composition and internal organs. *Molecular Biology Reports*, 41, 4455-4462.
24. Nagaraja, S.C., Aggrey, S.E., Yao, J., Zadworny, D., Fairfull, R.W. & Kühnlein, U. (2000). Trait association of a genetic marker near the IGF-I gene in egg-laying chickens. *Heredity*, 91, 150-156.
25. Nestor, K.E., Bacon, W.L., Anthony, N.B. & Noble, D.O. (1996). Divergent selection for body weight and yolk precursor in *Coturnix coturnix Japanica*. 10. Response to selection over thirty generation. *Poultry Science*, 75, 303-310.
26. Nie, Q., Lei, M., Ouyang, J., Zeng, H., Yang, G. & Zhang, X. (2004). Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. *Genetics Selection Evolution*, 37, 339-360.
27. Nikzad, S., Ghorbani, A., Salamatdoust, R. & Maheri, N. (2012). IGF-I gene (exon 1) polymorphism in four colorful strain of the female Japanese quail. *Annals of Biological Research*, 3(6), 2979-2982.
28. Sohrabi, S., Esmailizadeh, A., Baghizadeh, A., Moradian, H., Mohammadabadi, M.R., Askari, N. & Nasirifar, E. (2012). Quantitative trait loci underlying hatching weight and growth traits in an F2 intercross between two strains of Japanese quail. *Animal Production Science*, 52(11), 1012-1018.
29. Zhou, M., Ma, Z. & Sly, W.S. (1995). Cloning and expression of the cDNA of chicken cation-independent mannose-6-phosphate receptor. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92, 9762-9766.
30. Zhou, H., Mitchell, A.D., McMurtry, J.P., Ashwell, C.M. & Lamont, S.J. (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 novel SNP in promoter of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF1) gene in Japanese quail by PCR-SSCP assay

Homa Aarabi¹, Mohammad Moradi Shahrabak^{2*}, Abbas Pakdel³,
Hossein Moradi Shahrabak⁴ and Ali Esmailizadeh Koshkoiyeh⁵

1, 2, 4. Former Ph.D. Student, Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science,
Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Isfahan, Iran

5. Professor, Faculty of agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

(Received: Sep. 30, 2015 - Accepted: Mar. 9, 2016)

ABSTRACT

Insulin-like growth factor-1 gene (IGF1) is a biological candidate gene for investigation traits such as growth, body weight and muscles growth in different species. In this research eight pairs of white and wild quails were crossed reciprocally as a base population. A total of 34 quails were produced in first generation (F1) and 422 quails were generated by intercrossing the F1 population. Body weights at the time of hatching and different weeks were recorded in the second generation. The association between IGF1 promoter region polymorphism and body weight in different ages was investigated in F2 generation. Using PCR-SSCP assay and sequencing, a novel single nucleotide polymorphism (SNP) was identified in IGF1 promoter region in 472 birds from three Generations. Genotypic frequencies of AA, AG and GG genotypes were 0.05, 0.62 and 0.33, respectively for all generations. The frequency of A and G alleles were 0.36 and 0.64, respectively. The AA genotype was lower than AG and GG genotypes for body weights in ages of one to five weeks and slaughter time and the average of daily gain was also lower from week first to four but these differences weren't significant. The average of daily gain was higher in females compared to males for AG genotype ($P < 0.001$). Comparison between detected allele in the present study with reported allele by other research groups in chickens revealed a novel SNP in promoter of IGF1 gene in Japanese quail, but association between this polymorphism with body weight and growth rate were not significant.

Keywords: Growth traits, Insulin-Like Growth Factor-I, Japanese quail, PCR-SSCP assay, sequencing.