

DOI: 10.22034/AS.2022.42063.1585

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

نوشین قهرمانی^۱، علی هاشمی^{۲*}، مختار غفاری^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 خصوصیتی از قبیل کوچک بودن اندازه بدن، فاصله نسلی کوتاه، میزان رشد بالا و تولید تخم و گوشت بیشتر به طور 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 بلدرچین ژاپنی انجام گرفت. روش کار: در مطالعه حاضر رکوردهای مربوط به وزن بدن ۱۱۰ قطعه بلدرچین ژاپنی در دوره‌های پرورشی مختلف ثبت و DNA ژنومی با کیفیت مطلوب از نمونه‌های خون با استفاده از پروتکل پروناز استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۴۶۵ 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 ۴ چندشکل بوده و سه الگوی ژنوتیپی با فراوانی‌های ۷/۲۷، ۵۰/۹۱ و ۴۱٪/۸۲ 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 ۶۰ 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.

واژگان کلیدی: وزن بدن، ژن IGF-I، بلدرچین ژاپنی، چندشکلی

مقدمه

است و برای تأمین این نیاز، گوشت و تخم طیور مورد توجه مردم بوده است (اکبری ۱۳۹۲). چند سالی است که علاقه‌مندان به سرمایه‌گذاری در بخش تولید به ویژه در صنعت طیور به سمت پرنده‌های دیگری به جز مرغ، گرایش پیدا کرده‌اند که از آن جمله می‌توان به بلدرچین، بوقلمون،

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

ژنتیکی نشان می‌دهند (نقوی و همکاران ۱۳۹۲). در این خصوص، نشانگر^۵SSCP به 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 و ساز چربی در ماکیان شناسایی شده است. ژن IGF-I از کبد در اثر تحریک هورمون رشد ساخته می‌شود و در متابولیسم و رشد سلولی مؤثر است. IGF-I پلی‌پپتید تک‌زنجیره‌ای با وزن مولکولی ۶۷۴۹ دالتون با پایه ۷۰ اسید آمینه است. IGF-I یک هورمون کاملاً آنابولیکی بوده و عامل توسعه عضلانی و سوخت و ساز در پرندگان و سایر گونه‌های مهره‌داران است (بارکا و همکاران ۱۹۸۹). اغلب انجام فعالیت هورمون رشد در بدن جوجه‌ها وابسته به IGF است (لئی و همکاران ۲۰۰۵). طی مطالعه‌ای که بر روی جوجه‌های گوشتی انجام گرفت ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ژن IGF-I با صفات چربی درون ماهیچه‌ای، ترکیب بدن و ماهیچه‌ای اسکلتی گزارش شد (ژو و همکاران ۲۰۰۵). در بررسی دیگری بر روی ژن IGF-I در بلدرچین ژاپنی، چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه اگزون ۵ شناسایی و ارتباط معنی‌داری با صفات چربی لاشه گزارش شد (طهمورث پور و همکاران ۱۳۹۴).

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 ۴ با کل اگزون ۴ و قسمتی از اینترون ۵ از ژن IGF-I با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و برآورد فراوانی الگوهای ژنوتیپی و در نهایت ارتباط آن با صفت وزن بدن در بلدرچین ژاپنی است.

شترمرغ، کبک و قرقاول اشاره کرد (رجایی اربابی ۱۳۸۴). بلدرچین ژاپنی 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 مواد غذایی و درمان باعث شده است که پرورش بلدرچین به یک صنعت پربازده و سودآور در بسیاری از کشورها تبدیل شود (نستور و همکاران ۱۹۹۶، شریفی و همکاران ۲۰۱۱ و رستم‌زاده و همکاران ۱۳۹۵). برخلاف مرغ که بیشتر مطالعات ژنومی بر روی آن متمرکز شده است، تحقیقات اندکی روی بلدرچین صورت گرفته است (طهمورث پور و همکاران ۱۳۹۴). بلدرچین به عنوان یک پرنده آزمایشگاهی دارای مزایای فراوانی است اما توالی ژنوم آن هنوز به طور کامل شناسایی نشده است (کاوهارا و همکاران ۲۰۱۳). 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 همکاران ۲۰۰۳). تنوع ژنتیکی در بین موجودات زنده ناشی از اثر ژنتیک، محیط و اثر متقابل ژنتیک و محیط است. جهش^۱ و نوترکیبی^۲ منجر به افزایش تنوع ژنتیکی و رانش ژنتیکی^۳ و انتخاب منجر به کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های حیوانی می‌شوند. وجود تنوع ژنتیکی لازمه‌ی برنامه‌های اصلاح‌نژادی است (هیز و همکاران ۲۰۰۹). 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

⁵ Growth Hormone

⁶ Polymerase Chain Reaction- Single Strand Conformation Polymorphism

¹ Mutation

² Recombination

³ Random Drift

⁴ Insulin-Like Growth Factor 1

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در این پژوهش به طور تصادفی از ۱۱۰ قطعه بلدرچین ژاپنی (۶۶ قطعه بلدرچین نر و ۶۴ 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، ۴۵ و ۶۰ 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 همکاران ۲۰۰۷). کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸٪ مورد ارزیابی قرار گرفت.

طراحی آغازگرها: ابتدا توالی نوکلئوتیدی ژن IGF-I با طول ۶۵ جفت‌بازی از بانک اطلاعات ژنی www.ncbi.com دریافت شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Primer3 plus 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 جدول ۱ قید شده است.

Table 1- Primer sequences

Primer name	Primer sequence
Forward	5'-TGGCCCAGAAACTATGCG -3'
Reverse	5'-GGGAGAATGCCCATTTGGTTG -3'

واکنش PCR: پس از سنتز پرایمرها، جهت تعیین دمای اتصال آغازگرها از گرادینت حرارتی استفاده شد. برای تکثیر ژن مورد نظر و تعیین دمای اتصال آغازگر به رشته‌های DNA هدف واکنش زنجیره ای پلی‌مراس 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 به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه واکنش اصلی (واسرشته‌سازی^۲ در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال^۳ پرایمرها ۵۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای توسعه^۴ ۷۲ درجه به مدت ۴۰ 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 (1X) TAE الکتروفورس 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.

واکنش SSCP: به منظور 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 (فرماید ۹۵٪)، برموفنل بلو ۰/۲٪، زایلن سیانول ۰/۳۵٪، EDTA ۱۰ میلی‌مول بر لیتر) مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس سریعاً بر روی نمونه‌ها یخ قرار داده شد تا از به هم چسبیدن دوباره رشته‌های مکمل DNA ممانعت به

³ Annealing⁴ Extension/Elongation¹ Primers² Denaturation

برای تعیین دمای اتصال مناسب آغازگرهای اختصاصی ژن IGF-I واکنش PCR شیب دمایی انجام شد و بر همین اساس مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگرها به طور اختصاصی به تارگت اصلی، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد مشخص شد. قطعه ۶۵ جفت بازی از ژن IGF-I به خوبی توسط PCR تکثیر شد که نشان می‌دهد پرایمرها به خوبی طراحی شده‌اند و کاملاً اختصاصی عمل کردند، زیرا هیچ‌گونه باند غیراختصاصی در محصولات PCR دیده نشد (شکل ۲).

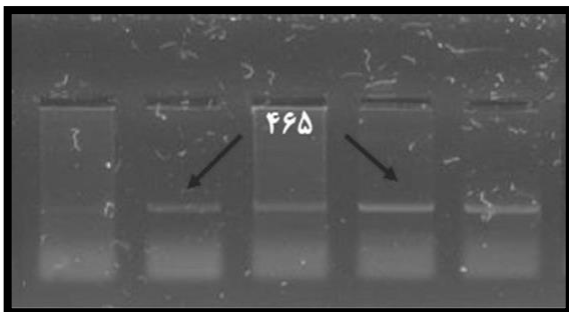


Figure 2- Electrophoresis results of PCR products of IGF-I gene on 1.5% agarose gel

نتایج حاصل از الکتروفورز عمودی محصولات SSCP سه الگوی ژنوتیپی متفاوت ۱، ۲ و ۳ را روی ژل پلی‌آکریلامید نشان داد و این بیانگر چندشکلی در ناحیه اگزون ۴ از ژن IGF-I و وجود تنوع در ژن IGF-I در بلدرچین است (شکل ۳).

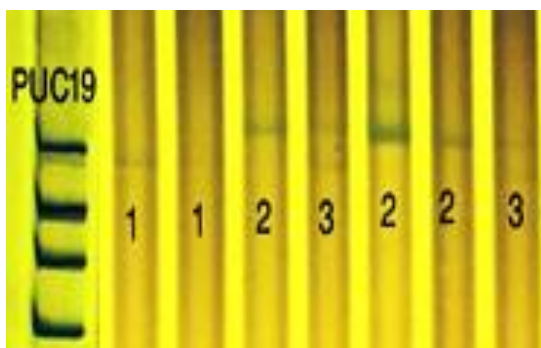


Figure 3- SSCP patterns of IGF-I gene on 8% polyacrylamide gel

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 (پپایالیا و همکاران ۲۰۰۴، بنبوزا و همکاران ۲۰۰۶).

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_i اثر ثابت مربوط به i امین جنس، g_j اثر تصادفی^۲ مربوط به j امین ژنوتیپ و e_{ijk} اثرات باقیمانده (خطای آزمایش) می‌باشد. صفت وزن بدن، توسط نرم‌افزار SAS 9.1 با 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 (شکل ۱).

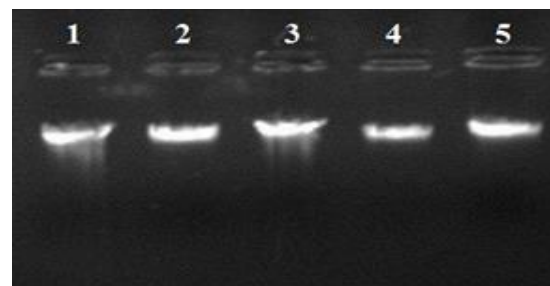


Figure 1- DNA samples extracted from quail blood and DNA quality determination on 0.8% agarose gel

² Random effect

¹ Fixed effect

بررسی چندشکلی ژن IGF-I و شناسایی SNP^v در بلدرچین ژاپنی 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 اسید آمینه والین به ایزولوسین شد. با توجه به آنالیزهای آماری انجام گرفته اثر الگوهای ژنوتیپی بر روی صفت وزن بدن در سنین ۱۰، ۱۰-۴ و ۱۰-۶ هفتگی ارتباط معنی داری وجود داشت (مونه 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 بلدرچین ژاپنی 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 ۴۱، ۳۵ و ۲۴٪ شناسایی شد. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که ژن IGF-I در ناحیه اگزون ۵ با صفت چربی داخل عضله‌ای ارتباط معنی داری دارد. در ارتباط با تأثیر جنس بر صفت لاشه نیز تفاوت معنی داری گزارش شد (طهمورث پور و همکاران ۱۳۹۴). 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، ۶۲ و ۳۳٪ و دو آلل A و G به ترتیب با فراوانی‌های ژنی ۳۶ و ۶۴٪ بدست آمد (اعرابی و همکاران ۱۳۹۵). بررسی چندشکلی ژن IGF-I در جمعیت جوجه‌های گوستی (Cobb و Ross) توسط تکنیک SSCP انجام شد. نتایج نشان‌دهنده تأثیر الگوی ژنوتیپی AC در افزایش وزن جوجه‌های گوستی بود. آنالیزهای آماری انجام گرفته نشان داد که تفاوت معنی داری در ارتباط با تأثیر الگوهای ژنوتیپی بر روی صفت وزن بدن وجود داشت

فراوانی سه الگوهای ژنوتیپی ۱، ۲ و ۳ به دست آمده در این تحقیق در جمعیت بلدرچین به ترتیب ۷/۲۷، ۵۰/۹۱، ۴۱/۸۲٪ 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 (جدول ۲).

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، ۴۵ و ۶۰ روزگی مشاهده نشد و ارتباط بین الگوهای ژنوتیپی با صفت وزن بدن فقط در ۳۰ روزگی تفاوت معنی داری داشت ($P<0/05$) 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 وزن نیز در ناحیه مد نظر از ژن IGF-I تفاوت معنی داری در دوره پرورشی ۶۰ روزگی وجود داشت ($P<0/05$). وزن بلوغ بلدرچین‌های ماده بیشتر از بلدرچین‌های نر گزارش گردید که با نتایج (اعرابی و همکاران ۱۳۹۵) و (الطرابانی و همکاران ۲۰۱۴) در افزایش وزن روزانه ماده‌ها در مقایسه با نرها مطابقت وجود داشت (جدول ۳).

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

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 می‌تواند 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 بررسی‌ها، چندشکلی ژن IGF1 در مرغ ارتباط معنی‌داری با صفات رشد و وزن بدن داشته است بنابراین جایگاه منتخب برای این بررسی در بلدرچین نیز ممکن است به‌عنوان یک جایگاه پیشنهادی مؤثر بر صفات مرتبط با وزن بدن به‌شمار 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 بلدرچین ژاپنی 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.

(کدک و همکاران ۲۰۱۱). همچنین با بررسی سایر صفات مرتبط با وزن مانند ضریب تبدیل و مصرف خوراک می‌توان 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 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، ۲۹ و ۵۶٪ برآورد شد (پیریونسی و همکاران ۱۳۹۱). 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، AB و 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 همکاران ۲۰۱۰). 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 آلی 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 همکاران ۲۰۱۰)، صفت رشد در بز (ژانگ و همکاران ۲۰۰۸)، صفات بیومتریک در گوسفند مغانی (پوربایرامیان و همکاران ۱۳۹۱) ایفا کند. لذا بررسی نحوه تعامل این ژن با صفت وزن بدن در بلدرچین ژاپنی موجب درک بهتر پروسه رشد و عوامل مؤثر 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.

¹ Restriction Fragment Length Polymorphism

منابع مورد استفاده

- Arabi H, Moradi Shahrabak M, Pakdel A, Moradi Shahrabak 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 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 (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 Yazdi 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, Esmailzadeh 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 Ghahramani¹, A Hashemi^{2*}, M Ghaffari and Gh Elyasi Zaringhobaie

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

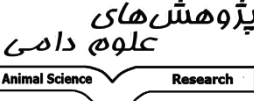

¹Former MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

²Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

³Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

⁴Scientific Member of Agriculture and Natural Resources Research Center of East Azerbaijan Province, Tabriz, Iran

*Corresponding author: Email: A.hashemi50@gmail.com

 <p>پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research</p>	<p>Journal of Animal Science/vol.31 No.3/ 2021/pp 89-98 https://animalscience.tabrizu.ac.ir</p>	
<p>© 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</p>		

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 μ l volumes containing 1 unit Taq DNA Polymerase, reaction buffer 1X (Sina Gene, Tehran, Iran), 1/5 mM MgCl₂, 0/2 μ M each of dNTPs, 10 μ M 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 μ l 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 μ l. 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