مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تنوع ژنتیکی اگزون ۹ ژن فسفو انول پیروات کربوکسی کیناز میتوکندریایی در سویه‌های مختلف مرغ با استفاده از تکنیک PCR-RFLP

زهره یوسفی*[۱]، قدرت رحیمی میانجی[۲]، زربخت انصاری[۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۲] استاد گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۳] استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۰۷

چکیده

فسفو انول پیروات کربوکسی کیناز، اولین مرحله واکنش را در چرخه گلوکونئوژنز کاتالیز می‌کند. دو فرم ایزوزیمی از این آنزیم، شامل فسفو انول پیروات کربوکسی کیناز سیتوپلاسمی و فسفو انول پیروات کربوکسی کیناز میتوکندریایی (PEPCK-M) وجود دارد که در سیتوپلاسم و میتوکندری حضور دارند. پژوهش حاضر برای مقایسه چند شکلی‌های آللی در جایگاه ژنی PEPCK-M در سویه‌های مرغ تجاری گوشتی، تخم‌گذار و مرغ‌های مولد از ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران انجام گرفته است. نمونه‌های خون به طور تصادفی از ۱۵۰ قطعه مرغ از این سه جمعیت جمع‌آوری و استخراج DNA باروش نمکی بهینه یافته انجام شد. یک قطعه‌ی ٤٠١ جفت بازی از اگزون ۹ ژن PEPCK-M تکثیر و سپس جهت تعیین ژنوتیپ، محصولات PCR با آنزیم برشی AccI مورد تیمار آنزیمی قرار گرفتند. فراوانی هر یک از آلل‌های –AccI و+AccI به‌ترتیب در مرغ بومی مازندران برابر با ۰/۷۳ و ۰/۲۷، در مرغ گوشتی برابر با ۰/٦ و ۰/٤ و در مرغ تخم‌گذار برابر با ۰/۸۵ و ۰/۱۵ محاسبه شد. دو ژنوتیپ -/-AccI و -/+AccI با فراوانی هر یک به ترتیب ۰/٤٦ و ۰/٥٤ در جمعیت مرغ بومی مازندران، ۰/۲ و ۰/۸ در جمعیت مرغ گوشتی و ۰/۷ و ۰/۳ در جمعیت مرغ تخم‌گذار مشاهده شد. مقایسه فراوانی ژنی بین جمعیت مرغ‌های بومی مازندران با مرغ‌های گوشتی و تخم گذار اختلاف معنی‌داری نداشت، اما این اختلاف در بین جمعیت مرغ‌های گوشتی و تخم گذار از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<0.05$). همچنین مقایسه فراوانی ژنوتیپی بین هر سه جمعیت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<0.05$). در نمونه‌های مورد مطالعه ژنوتیپ +/+AccI مشاهده نشد. اختلاف در توزیع ژنوتیپی ممکن است در نتیجه اختلاف در استراتژی‌های انتخاب استفاده شده در این جوامع باشد. با توجه به اینکه ژن PEPCK-M در جمعیت‌های مورد بررسی دارای چند شکلی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد می‌توان از آن در برنامه‌های انتخاب و اصلاح نژادی آینده استفاده نمود.

کلمات کلیدی: *چند شکلی، فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز، PCR-RFLP ، مرغ بومی، مرغ گوشتی، مرغ تخم‌گذار.*

* نویسنده مسئول: زهره یوسفی تلفن: ۰۹۱۱۲۵٦۳٦۰٦ Email: yosefi_2004@yahoo.com

مقدمه

امروزه ژنتیک مولکولی اهمیت ویژه و خاصی در انتخاب و اصلاح نژاد دام‌ها، پیدا نموده است، زیرا امکان انتخاب دقیق‌تر و دستیابی به پاسخ سریعتر را ممکن می‌سازد. انتخاب بر اساس نشانگرهای ژنتیکی یکی از راهکارهای مؤثر در اصلاح نژاد است که منجر به افزایش تولید می‌شود. به دلیل پیشرفت شایان توجه در تکنیک‌های ژنتیک مولکولی و اهمیت به‌سزای آن در طراحی برنامه‌های اصلاحی، نیاز به انجام بررسی‌های مولکولی خصوصاً در برنامه‌های انتخاب بر پایه نشانگرهای ژنتیکی (MAS)[1] بیش از پیش احساس می‌شود (Mohammadabadi *et al.*, 2010; Mohammadifar *et al.*, 2013). در این راستا استفاده از تکنیک PCR-RFLP[2] به منظور شناسایی SNP[3]ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Beccavin *et al.*, 2001).

فسفو انول پیروات کربوکسی کیناز[4] (PEPCK) به عنوان یک آنزیم کلیدی در فرایند گلوکونئوژنیک نقش مهمی را در تنظیم گلوکونئوژنز دارد که تولید فسفو انول پیروات را از اگزالواستات کاتالیز می‌کند (Tilghman *et al.*, 1976; Scrutton & Utter, 1968). عملکرد این آنزیم با توجه به گونه حیوانی (Nordlie & Lardy, 1963; Soling & Kleineke, 1976)، مراحل مختلف رشد در گونه‌های مختلف (Savon *et al.*, 1993; Ballard & Hanson, 1967) و ارگان (Iynedjian *et al.*, 1975) متفاوت می‌باشد. در مرغ، PEPCK-C[5] فرم غالب در کلیه می‌باشد، اما این آنزیم در کبد مرغ حتی در طول گرسنگی‌های طولانی مدت نیز مشاهده نشده است (Watford *et al.*, 1981). بنابراین فرض شده است که احتیاج به گلوکونئوژنز کبدی در مرغ توسط نوع میتوکندریایی این آنزیم که به مقدار زیاد صرف نظر از شرایط تغذیه‌ای وجود دارد برطرف می‌شود (Kochi *et al.*, 1980).

فرم‌های سیتوزولی (C) و میتوکندریایی (M) فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز توسط ژن‌های هسته‌ای مختلفی کد می‌شوند (Garber *et al.*, 1972)، که پس از رمزگذاری و ساخت آنزیم، هر یک از آنزیم‌ها وارد اندامک یا بخش مربوطه خود می‌شود (Parsanejad *et al.*, 2003). آنزیم تولید شده حاصل از ژن PEPCK-M[6] درون اندامک میتوکندری سلول مورد استفاده قرار گرفته و همان عملکرد نوع سیتوزولی را در چرخه گلوکونئوژنز انجام می‌دهد. ساختار ژنی این آنزیم هنوز شناخته نشده است، اما پیشنهاد شده است که حداقل ۱٦ کیلو باز طول دارد. در مطالعات مختلف مشخص شده است که در برخی شرایط بیوشیمیایی خاص درون سلول با افزایش اتصال نوکلئوتیدهای حلقوی، اندازه mRNA این ژن به مقدار ۳/٤ کیلو باز افزایش می‌یابد (Weldon *et al.*, 1990) اما در آنالیز Northern-blot مشخص

[1] Marker Assisted Selection
[2] PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism
[3] Single Nucleotide Polymorphism
[4] Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
[5] Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
[6] Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

شده که طول mRNA این ژن در انسان، ۲/۲۵ کیلو باز بوده که حدود ۰/٦ کیلو باز از mRNA ژن PEPCK-C کوتاه‌تر می‌باشد. همین طور آزمایشات مبتنی بر بسط آغازگر نشان داده است که ناحیه ´۵ غیرترجمه‌ای mRNA ژن مربوطه حدود ۱۳٤ جفت باز طول دارد (Modaressi *et al.*, 1996).

فعالیت PEPCK-M توسط تنوع غذایی و تحریک هورمونی که فعالیت PEPCK-C را تغییر می‌دهد، تحریک نمی‌شود. فرم میتوکندریایی PEPCK، برخلاف PEPCK-C که در سطوح خیلی کم در جگر جنینی حضور دارد، در طی نمو جنین بیان می‌شود (Savon, 1991).

توالی اسید آمینه PEPCK-M در مرغ از توالی نوکلئوتیدی ۳۵۷۱ جفت بازی و از هم-پوشانی ۳ کلون cDNA به دست آمده است. در مرغ توالی پروتئینی حاصل از این ژن شامل ٦۰۷ اسید آمینه در آنزیم بالغ و یک توالی رهبر با ۹ پپتید در فرم پیش ساز می‌باشد. ناحیه ´۳ غیر ترجمه‌ای این ژن ۱/٦ کیلو باز طول داشته که چندین عامل تکراری را شامل می‌شود، ولی در این ناحیه توالی سیگنالی برای پلی‌آدنیلاسیون وجود ندارد. هر سه cDNA کلون شده ژن، دو mRNA به طول ٤/۲ و ۳/٤ کیلو باز در جگر و کلیه جوجه‌هایی که گرسنگی داده شده و هم جوجه‌هایی که تغذیه طبیعی شده‌اند، نشان داده شد (Weldon *et al.*, 1990). آنالیز اسیدهای آمینه پروتئین در نوع میتوکندریایی نشان از وجود غنی از اسید آمینه‌های پرولین و تریپتوفان در ساختمان پروتئین دارد (Hebda & Nowak, 1982).

تنوع ژنتیکی موجود در این ژن در جوجه-های سویه تخم‌گذار حاکی از آن است که نژاد-های با چندشکلی زیاد در این ژن نسبت به بیماری‌های توموری و "مارک" مقاوم‌تر هستند. لذا، احتمال دارد که این ژن بتواند به عنوان یک ژن کاندید برای مقاومت به بیماری مارک و بیماری‌های توموری در طیور مورد توجه قرار گیرد (Li *et al.*, 1998).

هدف از این پژوهش مطالعه چندشکلی‌های آللی و چگونگی توزیع آن‌ها در بین سویه‌های مختلف مرغ تجاری گوشتی، تخم‌گذار و مرغ‌های مولد ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران بود.

مواد و روش ها

جمع‌آوری نمونه‌های خون

در پژوهش حاضر از سویه‌های مرغ‌های تجاری گوشتی، تخم‌گذار و مرغ‌های بومی مازندران به طور تصادفی ۵۰ قطعه مرغ از هر جمعیت انتخاب و خون‌گیری از سویه‌های مورد بررسی از طریق ورید زیر بال انجام شد. از هر پرنده حدود ۲-۱ میلی لیتر خون گرفته شد. برای جلوگیری از انعقاد خون از محلول EDTA[1] به نسبت ۱ به ۱۰ استفاده شد. نمونه‌ها بلافاصله بعد از شماره‌گذاری با حفظ شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری

[1] Ethylene diamin tetra acetic acid

شدند.

جداسازی DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

DNA ژنومی از نمونه‌های خون با روش استخراج نمکی ارائه شده توسط Miller et al (1998) استخراج شد. با استفاده از آغازگرهای پیشنهاد شده توسط Torkamanzehi et al (2007)، یک قطعه ٤٠١ جفت بازی از ناحیه اگزون ۹ ژن PEPCK-M به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد که توالی این آغازگرها به صورت: (آغازگر رفت) -5' CCTTCGCCATGAGCCCCTTTTTC -3'و (آغازگر برگشت) -5' CAGCTCCGCCATGACATCCCT -3' بود (Torkamanzehi & Kuhnlein, 2007). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۰/۷۵ میکرولیتر MgCl2 (۱/٦ mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت 1X، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگر-های رفت و برگشت (۱۰Pmol)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM) و۱ واحدآنزیم Taq پلیمراز که در نهایت با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید، انجام گرفت. شرایط تکثیر به صورت زیر بود: واسرشته سازی اولیه ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی ثانویه در °C ۹٤ به مدت ٦۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها °C ٦۲ به مدت ۸۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و از دمای تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه استفاده شد.

آنالیز RFLP

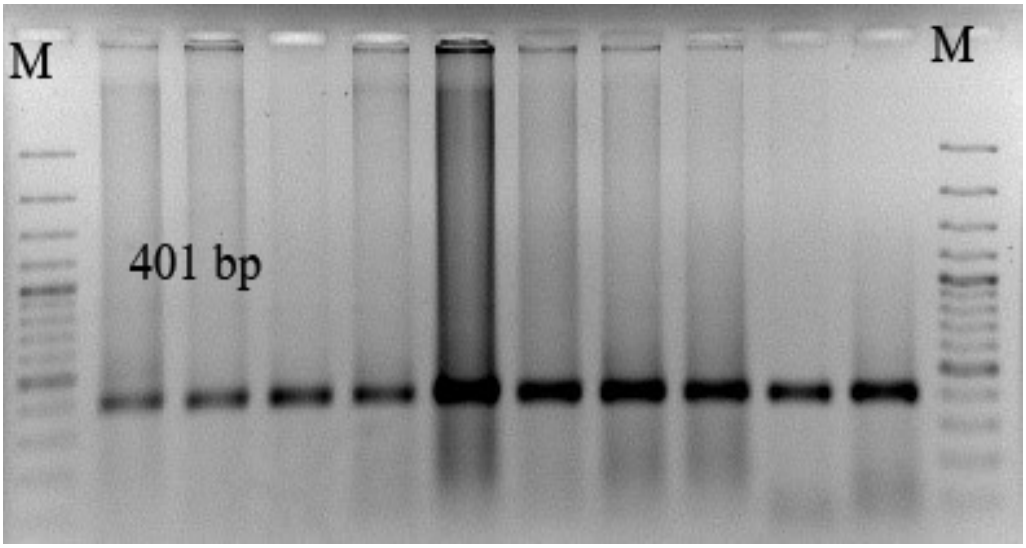
برای تعیین ژنوتیپ هر نمونه از روش PCR-RFLP و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. واکنش هضم آنزیمی محصولات PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر حاوی ۱ واحد آنزیم AccI، ۱ میکرولیتر بافر R، ۷ میکرولیتر محصول PCR و ٦/۸ میکرولیتر آب مقطر آماده و در دمای ۳۷°C به مدت ۱۲ ساعت تیمار آنزیمی انجام گرفت. پس از هضم آنزیمی و الکتروفورز محصولات برش داده شده با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد، از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید برای رویت سازی باندها استفاده شد.

آنالیز آماری

فراوانی ژنی و ژنوتیپی با استفاده از نرم افزار Pop Gene نسخه ۳/۲ تعیین شد. مقایسه فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه مورد مطالعه بین سه سویه مرغ‌های بومی مازندران، گوشتی و تخم‌گذار از روش دقیق فیشر و روش آزمون مربع – کای و نیز آزمون تعادل هاردی– واینبرگ با استفاده از برنامه SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت.

نتایج

با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و یک جفت آغازگر اختصاصی یک قطعه ٤٠١ جفت بازی از اگزون ۹ ژن PEPCK-M تکثیر و صحت اندازه قطعه تکثیری توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد به همراه نشانگر وزنی ۱۰۰M مورد تأئید قرار گرفت (شکل ۱).

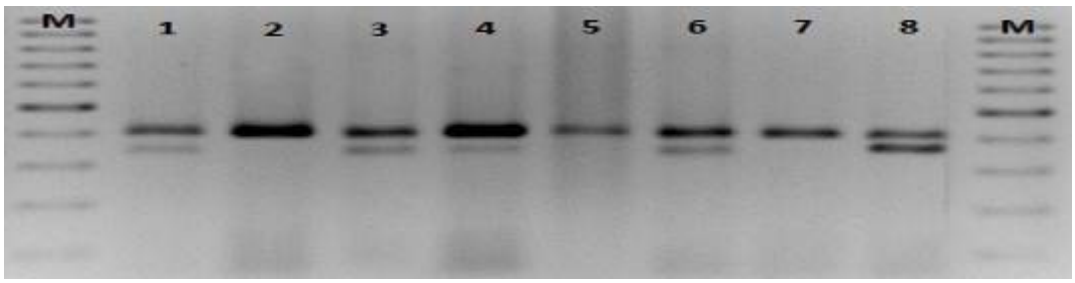


شکل۱- الگوی باندی حاصل از تکثیر ژن PEPCK-M از موقعیت ۱۵۱۷ تا ۱۹۱۷ اگزون ۹. M اندازه باندهای خط‌کش مولکولی 100 جفت بازی از پایین به بالا به قرار زیر می باشد (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000).

Figure 1- Banning pattern of PEPCK-M gene amplification from position 1517 to 1917 of exon 9.M is the 100bp molecular ruler.

تیمار آنزیمی

آنزیم AccI دارای یک جایگاه برش روی محصول PCR اگزون ۹ ژن PEPCK-M است. در نتیجه عمل هضم آنزیمی دو نوع ژنوتیپ روی ژل آگارز مشاهده شد. به این ترتیب که در یک حالت شناسایی آنزیم روی هر دو کروموزم همولوگ برش می‌خورد و دو باند در محدوده ٦١ و ٣٤٠ جفت بازی تشکیل می‌شود (آلل +AccI). در حالت دوم هیچ یک از دو رشته DNA برش نمی‌خورد، در نتیجه تنها قطعه ٤٠١ جفت بازی حضور خواهد داشت (آلل -AccI). نتایج هضم آنزیمی در شکل ۲ نشان داده شد.



شکل۲- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم توسط آنزیم AccI. چاهک شماره ۲، ۵ و ۷ ژنوتیپ -/- AccI، و بقیه چاهک‌ها ژنوتیپ +/- AccI. M اندازه باندهای خط‌کش مولکولی ۱۰۰ جفت بازی از پایین به بالا به قرار زیر می‌باشد (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500,

.2000, 3000)

Figure 2- Electrophoresis of digestion products by AccI enzyme. Lanes 2, 5 and 7 AccI -/- genotype and other lanes AccI +/- genotype. M is the 100bp molecular ruler.

فراوانی ژنی و ژنوتیپی محصولات هضم آنزیم AccI جایگاه PEPCK-M

از سه ترکیب ژنوتیپی ممکن، دو ژنوتیپ -/-AccI و -/+AccI در جمعیت‌های مورد بررسی با فراوانی‌های مختلف محاسبه شدند. ضمناً ژنوتیپ +/+AccI در هیچ یک از این جمعیت‌ها مشاهده نشد. فراوانی آللی و ژنوتیپی در جایگاه PEPCK-M در هر یک از جمعیت‌های مورد بررسی به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده است.

جدول ۱- مقایسه فراوانی آللی جایگاه PEPCK-M در بین سویه‌های مورد مطالعه.

Table 1- comparison of PEPCK-M allelic frequency in between studied strains.

جمعیت Population	فراوانی آللی Allelic frequency		سطح احتمال P-value		
	AccI-	AccI+	مرغ بومی Native fowls	مرغ گوشتی broiler	مرغ تخم‌گذار layer
مرغ بومی Native fowls	0.73	0.27	---	0.2912	0.1396
مرغ گوشتی broiler	0.6	0.4	0.2912	---	0.0063
مرغ تخم گذار layer	0.85	0.15	0.1396	0.0063	---

فراوانی آلل-AccI در جمعیت مرغ‌های تخم گذار نسبت به جمعیت مرغ‌های بومی و گوشتی بیشتر و در مقابل آلل +AccI در جمعیت مرغ‌های گوشتی بیشترین مقدار فراوانی را داشت.

مقایسه فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه PEPCK-M بین سویه‌های مختلف

بر اساس نتایج به دست آمده ژنوتیپ AccI -/- در جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار با فراوانی ۷۰ درصد برآورد شده است که بیشتر از جمعیت مرغ‌های بومی و گوشتی بوده است. فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت -/+AccI در جمعیت مرغ‌های گوشتی ۸۰ درصد محاسبه شد که نسبت به دو جمعیت دیگر بیشتر بود و نشان از تنوع بیشتر

این جایگاه آللی در این سویه دارد. در هیچ کدام از سه جمعیت، ژنوتیپ هموزیگوت +/+ AccI مشاهده نشد (جدول ۲). آلل -AccI در جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار با فراوانی ۰/۸۵ و آلل +AccI با فراوانی ۰/٤ در جمعیت مرغ‌های گوشتی بیشترین مقدار را داشتند. مقایسه فراوانی ژنی جمعیت مرغ‌های بومی مازندران با مرغ‌های گوشتی و تخم‌گذار اختلاف معنی‌داری نداشت اما مقایسه فراوانی ژنی بین جمعیت مرغ‌های گوشتی و تخم‌گذار از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P< 0.05$). همچنین مقایسه فراوانی ژنوتیپی بین هر سه جمعیت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P< 0.05$).

جدول ۲- مقایسه فراوانی ژنوتیپی جایگاه PEPCK-M در بین سویه‌های مورد مطالعه.

Table 1- comparison of PEPCK-M genotypic frequency in between studied strains.

جمعیت Population	فراوانی ژنوتیپی(تعداد) Genotypic frequency (Number)		سطح احتمال P-Value		
	AccI -/-	AccI +/-	مرغ بومی Native fowls	مرغ گوشتی broiler	مرغ تخم‌گذار layer
مرغ بومی Native fowls	(23) 0.46	(27) 0.54	---	0.0057	0.0150
مرغ گوشتی broiler	(10) 0.2	(40) 0.8	0.0057	---	0.0001
مرغ تخم گذار layer	(35) 0.7	(15) 0.3	0.0150	0.0001	---

- اعداد داخل پرانتز تعداد افراد تعیین ژنوتیپ شده در هر یک از جمعیت‌ها می‌باشند.

همچنین در نتیجه تجزیه و تحلیل آماری ژنوتیپ ها توسط نرم افزار Pop Gene، پارامترها و شاخص‌های آماری از قبیل تعداد آلل در هرلوکوس (N)، تعداد آلل مؤثر (Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و شاخص شانون نیز برای هر جمعیت محاسبه شد که نتایج در جدول ۳ ارائه شده است. جمعیت مرغ بومی دارای بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده و جمعیت مرغ گوشتی دارای کمترین مقدار می‌باشد (به‌ترتیب ۰/۸ و ۰/۳). بیشترین و کمترین تعداد آلل مؤثر نیز به ترتیب مربوط به جمعیت مرغ بومی (۱/۹۲۳) و جمعیت مرغ گوشتی (۱/۳۲٤) بود.

بحث

فرم میتوکندریایی ژن PEPCK همان واکنش PEPCK-C را انجام می‌دهد اما توسط ژن‌های هسته‌ای مختلفی کد می‌شود. در مرغ PEPCK میتوکندریایی تنها فرم این آنزیم در جگر می‌باشد و ٦٠ درصد PEPCK را در کلیه تشکیل می‌دهد (Watford *et al.*, 1981). در حالی که سطح فعالیت فرم سیتوپلاسمی توسط هورمون‌هایی از قبیل گلوکاگون، انسولین و گلوکوکورتیکوییدها تعدیل می‌شود (Lamers *et al.*, 1982; Granner *et al.*,1983) اما فرم میتوکندریایی به طور مداوم بیان می‌شود (Graber *et al.*, 1972).

جدول ۳- تعداد آلل واقعی و مؤثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و شاخص شانون در هر جمعیت.

Table 3- number of effective and different allele, Expected and Observed Heterozygosity and Shannon's Index in each Population.

جمعیت Population	اندازه نمونه (N) Sample size	آلل واقعی (Na) Different Alleles	آلل مؤثر (Ne) Effective Alleles	شانون (I) Shannon's Index	هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) Observed Heterozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) Expected Heterozygosity
مرغ بومی Native fowls	50	2.000	1.923	0.673	0.800	0.480
مرغ گوشتی broiler	50	2.000	1.342	0.423	0.300	0.255
مرغ تخم‌گذار layer	50	2.000	1.651	0.583	0.540	0.394

با توجه به نقش مهم PEPCK در متابولیسم انرژی، در مطالعه حاضر تنوع ژن PEPCK-M مورد بررسی قرار گرفته است. اندازه قطعه تکثیر یافته از اگزون ۹ ژن PEPCK-M در پژوهش حاضر ٤٠١ جفت باز بوده که با پژوهش Torkamanzehi et al (2007) مطابقت داشت. نتایج حاصل از هضم این ژن شامل آلل -AccI یک قطعه‌ی ٤٠١ جفت باز و آلل +AccI شامل دو قطعه‌ی ٣٤٠ و ٦١ جفت بازی بوده است. نتیجه بررسی چند شکلی در جایگاه مورد نظر منجر به شناسایی دو ژنوتیپ-/-AccI و -/+AccI شد. فراوانی آلل -AccI در هر سه جمعیت نسبت به آلل +AccI بیشتر بوده است. مقایسه فراوانی ژنی جمعیت مرغ‌های بومی مازندران با مرغ‌های

گوشتی و تخم‌گذار اختلاف معنی‌داری نداشت، اما مقایسه فراوانی ژنی بین جمعیت مرغ‌های گوشتی و تخم‌گذار تجاری از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P< 0.05$).

آلل -AccI در جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار بالاترین میزان فراوانی را دارا بود که این وضعیت ممکن است به دلیل وجود همبستگی احتمالی بین این آلل با صفات مطلوب تولیدی نظیر تولید تخم‌مرغ در جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار تجاری باشد.

گزارش شده است که صفت تولید تخم‌مرغ و سن در اولین تخم گذاری به طور معنی‌داری تحت تأثیر این جایگاه ژنی قرار می‌گیرد. در پژوهش Torkamanzehi et al (2007) اثر ژنوتیپ‌های PEPCK-M، در مکان‌های -/- AccI، -/+ AccI و +/+ AccI بر سه صفت سن در اولین تخم‌گذاری، نرخ تولید تخم‌مرغ و تعداد تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار نژاد لگهورن مورد آزمون قرار گرفت. آنالیز حداقل مربعات نشان داد اگزون ۹ ژن PEPCK-M به طور معنی‌داری سن در اولین تخم‌گذاری را تحت تأثیر قرار می‌دهد، در پژوهش این محققین با استفاده از تکنیک RFLP و برش آنزیمی، سه ژنوتیپ در جایگاه AccI مشاهده شد. فراوانی ژنوتیپ‌های-/-AccI، -/+AccI و +/+AccI به ترتیب ۰/۱۳۱، ۰/٤۹۲ و ۰/۳۷۷ گزارش شد و بر اساس آنالیز RFLP در جنس ماده، ژنوتیپ‌های AccI در تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشتند. به علاوه، هر دو آلل با فراوانی متوسط برآورد شدند که این نشانه‌ای از حضور انتخاب طبیعی به نفع هتروزیگوت‌ها بود.

در پژوهش حاضر ژنوتیپ +/+AccI در هیچ کدام از جمعیت‌های مورد مطالعه مشاهده نشد و فراوانی ژنوتیپ‌های -/- AccI و -/+AccI به ترتیب در جمعیت مرغ‌های بومی ۰/٤٦ و ۰/٥٤، در مرغ‌های گوشتی ۰/۲ و ۰/۸ و در مرغ-های تخم گذار ۰/۷ و ۰/۳ برآورد شد. ضمناً در این پژوهش فراوانی آلل -AccI ۰/۳۸ و فراوانی آلل +AccI ۰/٦۲ گزارش شد که با فراوانی آللی در جمعیت‌های مورد مطالعه ما کاملاً مغایرت دارد که این ممکن است در نتیجه استراتژی‌های مختلف انتخاب در جوامع مذکور باشد.

در پژوهش حاضر مقایسه فراوانی ژنوتیپی بین جمعیت‌های مورد مطالعه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<0.05$). با وجود ارتباط معنی‌دار بین این ژنوتیپ‌ها می‌توان گفت آلل‌های موجود در این لوکوس تحت تأثیر عوامل تغییر دهنده فراوانی آللی و ژنوتیپی قرار دارند و ظاهراً انتخاب در این جمعیت‌ها برای افزایش یا کاهش صفات فنوتیپی مورد نظر صورت گرفته است.

در صورت وجود رکوردهای فنوتیپی در جمعیت‌های مورد مطالعه می‌توان در مورد اثر ژن مورد نظر روی رکوردها اظهار نظر کرد. ژن کد کننده PEPCK-M که جز مؤثر در فرایند گلوکونئوژنز از لاکتات از طریق چرخه کوری می‌باشد تنوع زیادی را در سویه‌های مختلف از مرغ‌های تخم‌گذار (لگهورن) نشان داد. Li et al (1998) بر اساس آنالیز RFLP در جایگاه MspI

ژن PEPCK-M در مجموع ۷ آلل را تشخیص دادند.

فراوانی‌های آللی در ٦ جفت از سویه‌های منتج شده از جمعیت‌های پایه ژنتیکی مختلف، مورد برآورد قرار گرفته بود. هر جفت شامل ۲ سویه بودند که در حساسیت به بیماری مارک[1] (MD)، ویروس القا کننده بیماری نئوپلاستیک اختلاف داشتند.

فراوانی معمول‌ترین هاپلوتایپ (M2) به طور پیوسته در سویه‌های حساس نسبت به سویه‌های مقاوم بیشتر بود. بر اساس این نتایج PEPCK-M ممکن است به عنوان یک ژن کاندید، مؤثر بر حساسیت به بیماری مارک باشد. تغییرات در گلوکونئوژنز ممکن است اثر متقابل بین ازدیاد نئوپلازیا[2] و متابولیسم میزبان را تحت تأثیر قرار دهد.

بررسی چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) و ارتباط دادن ژنوتیپ‌ها با صفات متعدد در طیور می‌تواند منجر به پیشرفت ژنتیکی و بهبود تولیدات آن‌ها شود. در این پژوهش مقایسه فراوانی ژنوتیپ -/- AccI بین دو جمعیت تجاری مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری نشان داد که ممکن است در نتیجه برنامه‌های اصلاح نژادی برای صفات تولیدی مختلف ایجاد شده باشد.

از آنجایی که نژاد لگهورن برای افزایش عملکرد تخم‌گذاری انتخاب شده است پس می‌توان احتمال داد فراوانی بالای آلل –AccI در جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار با تولید تخم‌مرغ در ارتباط می‌باشد و این امر احتمالا دلیل بر وجود اختلاف معنی‌دار در وفور این آلل بین دو سویه مرغ گوشتی و تخم‌گذار شده است.

با توجه به وقوع چند شکلی در این جایگاه‌ها و ارتباط آن‌ها با صفات تولیدی و تولید مثلی طیور، این پژوهش می‌تواند نقطه شروع برای پژوهش‌های بیشتر به منظور شناسایی نقش دقیق‌تر این جایگاه ژنی در ارتباط با صفات عملکردی در طیور باشد.

[1] Marek's disease
[2] Neoplasia

منابع

Ballard FJ, Hanson RW (1967). Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and Pyruvate Carboxylase in Developing Rat Liver. Journal of Biological Chemistry 104:866.

Beccavin C, Chevalier B, Cogburn LA,Simon J, Duclos MJ (2001). Insulin-like growth factors and body growth in chickens divergently selected for high or low growth rate. Journal of Endocrinol 168: 297-306.

Garber AJ, Ballard FJ, Hanson RW (1972). The significance of mitochondrial phosphoenolpyruvate formation in the regulation of gluconeogenesis in guinea pig liver. In metabolism and the regulation of metabolic processes in mitochondria (Mehlman MA, HansonRW, eds) Academic press. New York pp: 109-135.

Granner D, Andreone T, Sasaki K, Beale E (1983). Inhibition of transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. Journal of Nature. 305: 549-551.

Hanson W, Reshef L (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. Annual ReviewJournal of BiologicalChemistry 66: 581-611.

Hebda CA, Nowak T (1982). The purification, characterization and activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase from chicken liver mitochondria. Journal of Biological Chemistry 257: 5503 – 5514.

Hod Y, Utter MF, Hanson RW (1982). The mitochondrial and cytosolic forms of avian phosphoenolpyruvate are encoded by different messenger RNAS. Journal of Biological Chemistry 257: 13787- 13794.

Iynedjian PB, Ballard FJ, Hanson RW (1975). The regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis in rat kidney cortex. The role of acid-base balance and glucocorticoids. Journal of Biological Chemistry 250(14): 5596–603.

Kochi H, Serizawa K, Kikuchi G (1980).On the nature of three forms of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurring in cytosol of chicken liver. Journal of Biochem 88: 895-904.

Lamers W, Hanson RW, Meisner H (1982). cAMP stimulates transcription of the gene for the gene for cytosolic Phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver. Nuclei. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 79: 5137-5141.

Li S, zadworny D, Aggrey SE, KuhnLein U (1998). Mitochondrial PEPCK: a highly polymorphic gene with allele's co- selected with marek's disease resistance in chickens. Journal. Anim. Genet 29: 395-397.

Miller SA, Dykesand DD, Polesky HF (1988).A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 16: 1215.

Modaressi S, Christ B, Bratke J, Zahn S, Heise T, Germann KJ (1996). Molecular cloning, sequencing and expression of the cDNA of the mitochondrial form of PEPCK form human Liver. Journal. Biochem 315: 807- 814.

Mohammadabadi M.R, Nikbakhti, Mirzaee MHR, Shandi MA, Saghi DA, Romanov MN, Moiseyeva IG (2010).Genetic variability in three native Iranian chicken Populations of the khorasan province based On microsatellite markers. Russian Journal of Genetics 46: 1–5.

Mohammadifar A, Faghih Imani SA, Mohammadabadi MR, Soflaei M (2013). The effect of TGFβ3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. Iranian Journal of Agricultural Biotechnology 5: 125-136

Nordlie RC, Lardy HA (1963). Mammalian Liver Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Activities. Journal of Biological Chemistry 238: 2259-2265.

Nordlie RC, Varricchio FE, Holten DD (1965). Effects of altered hormonal states and fasting on rat-liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinaselivers. Journal of.Biochem. Biophys. Acta 97: 214.

Parsanejad R, TorkamanZehi A, Zadworny D, Kuhnlein U (2003). Alleles of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinas: trait association and interaction with mitochondrial PEPCK in a strain of white leghorn chickens. Journal of Poultry Science 82: 1708 - 1715.

Savon S (1991). Studies of PEPCK gene expression on in the avian system. PhD. Thesis Case Western Reserve University (health sciences).

Savon S, Hakimi P, Hanson RW (1993). Expression of the genes for the mitochondrial and cytosolic forms of phosphoenolpyruvate carboxykinase in avian liver during development. Journal. Biological. Neonate 64(1): 62-68.

Savon S, Hakimi P, Hanson RW (1993). Expression of the genes for the mitochondrial and cytosolic forms of phosphoenolpyruvate carboxykinase in avian liver during development. Journal of Biological. Neonate 64(1): 62-68.

Scrutton MC, Utter MF (1968). The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues. Annual. Review. Biochem 37:249-302.

Soling HD, Kleineke J (1976). Species dependent regulation of hepatic gluconeogenesis in higher animals in Gluconeogenesis: Its regulation in mammalian species (Hanson R.W. and Mehlman, M.A. Eds.). John wiley & Sons, New York. pp: 369-462.

Tilghman SM, Hanson RW, Ballard FJ (1976). Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in mammalian tissues in Gluconeogenesis: It's Regulation in Mammalian Species (Hanson RW, Mehlman, MA, eds.) pp. 47-91, John Wiley & Sons, New York.

Torkamanzehi A, Kuhnlein U (2007). Restriction fragment length and single strand conformational polymorphisms in chicken mitochondrial phosphoenolpyruate carboxykinase (PEPCK) gene and its association with egg production. Pakistan. Journal of Biological. Sciences 10(22): 4075-4080.

Watford M, Hod Y, Chiao YB, Uttert MF, Hanson RW (1981). The unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken.Journal of Biological Chemistry 256: 10023- 10027.

Weldon SL, Rendo A, Mathias AS, Hod Y, kalonick PA, Sanon S, Hanson RW (1990). Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase form the chicken: comparison of the cDNA and protein sequences whit the cytosolic isozyme. Journal of Biological Chemistry265: 7308-7317.

Genetic variability in exon 9 of PEPCK-M gene in different strains of chickens using PCR-RFLP method

Yousefi Z.*[1], Rahimi Mianji Gh.[2], Ansari Z.[3]

[1] M.Sc. Student of animal breeding, Animal Science Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
[2] Professor of Animal Science Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
[3] Assistant Professor of Animal Science Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Abstract

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) catalyzes the first step of the gluconeogenesis cycle. There are two isozymes forms of this enzyme, cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) and mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) which present in mitochondria and cytoplasm Current research has been conducted to identify the allelic polymorphism in the PEPCK-M gene in breeder hens of native fowls and commercial broiler and layer chickens. Blood samples were collected randomly from 150 birds of three strains and DNA was extracted using modified salting out method. A fragment of 401 bp in length was amplified from exon 9 of PEPCK-M gene. For genotyping of each sample the PCR products were digested by AccI restriction enzyme. The frequency of AccI- and AccI+ allele was estimated at 0.73 and 0.27 in native fowls population, 0.6 and 0.4 in broiler and 0.85 and 0.15 in layer lines, respectively. Two genotypes of AccI -/- and AccI -/+ were observed with the frequency of 0.46 and 0.54 in native fowls, 0.20 and 0.80 in broiler line and 0.70 and 0.30 in commercial layer line, respectively. The comparison of allelic frequency showed no statistical differences between native fowls population with broiler and layer lines, but this results indicated significantly differences between broiler and layer lines ($P<0.05$).The comparison of genotypic frequency showed that there were significant differences between three populations ($P<0.05$). No any AccI +/+genotype was detected in the genotyped samples. The difference in genotypic distribution may be as a consequence of different selection strategies used in these populations.

Keywords: *polymorphism, posphoenolpyruvatecarboxykinase, native fowls, broiler, layer.*

* Corresponding Author: Yousefi Z. Tel: 09112563606 Email: yosefi_2004@yahoo.com