دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

شناسایی چند شکلی ژن MC4R و ارتباط آن با صفات تولید تخم در بوقلمون

مهرانگیز فتحی[۱]، علی هاشمی[۲]، قربان الیاسی زرّین قبایی[۳] و نوشین قهرمانی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲- دانشیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، (نویسنده مسوول: A.hashemi50@gmail.com)
۳- عضو هیات علمی بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، تبریز، ایران
۴- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲
صفحه: ۱۳۰ تا ۱۳۶

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: بوقلمون به دلیل خصوصیاتی از قبیل میزان وزن‌گیری و سرعت رشد زیاد، ظریب تبدیل غذایی پایین و تولید تخم و گوشت بیشتر، به منظور رفع بخشی از نیازهای منابع‌غذایی در سراسر جهان حائز اهمیت است. ژن MC4R به‌عنوان یک ژن کاندید در هومئوستازی انرژی و تنظیم وزن بدن در گونه‌های مختلف شناخته شده است. شناسایی جنبه‌های ژنتیکی و ژن‌های عمده تاثیرگذار بر روی توازن انرژی، تولید، باروری و ایمنی از علاقه‌مندی‌های اخیر محققان ژنتیک و اصلاح‌نژاد می‌باشد. این پژوهش به‌منظور بررسی چند شکلی موجود در ژن MC4R با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و ارتباط آن با صفات عملکردی تخم در بوقلمون انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه به‌منظور بررسی چند شکلی ژن MC4R از ۱۰۰ بوقلمون تخم‌گذار به صورت تصادفی خون‌گیری به عمل آمد. DNA ژنومی با کیفیت مطلوب از نمونه‌های خون استخراج شد و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۴۶۹ جفت بازی از ژن MC4R انجام گرفت. از روش تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) جهت تعیین الگوهای ژنوتیپی نمونه‌ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری ارتباط بین صفات عملکردی تخم و الگوهای ژنوتیپی با استفاده از رویه GLM نرم افزار SPSS انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج SSCP محصولات PCR با استفاده از ژل پلی‌آکریلآمید و نیترات نقره نشان داد که جایگاه ژنی MC4R چند شکل بوده و چهار الگوی ژنوتیپی مختلف AB، AC، BC و CC به ترتیب با فراوانی‌های ۵۲/۱، ۴/۱۳، ۲۲/۹۳ و ۲۰/۸۴ درصد حاصل شد. ژنوتیپ AB و AC به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی ژنوتیپی را دارا بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج ارائه شده در این تحقیق نشان داد که بین الگوهای ژنوتیپی و عملکرد تخم شامل توده، وزن متوسط و تعداد تخم از لحاظ آماری هیچ ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. با توجه به اهمیت ژن MC4R، مطالعه این جایگاه ژنی در جمعیت‌هایی با اندازه نمونه بزرگ‌تر پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بوقلمون، چندشکلی، ژن MC4R، عملکرد تخم، PCR-SSCP

مقدمه

استراتژی‌های موجود در برنامه‌های پرورش طیور تجاری با هدف افزایش راندمان غذایی، سرعت رشد، افزایش وزن بدن و کاهش چربی و هزینه‌های تولیدی همراه است. ویژگی و خصوصیات مولکولی ژن‌های تنظیم‌کننده صفات تولیدی می‌تواند برای پیشرفت ژنتیکی مفید واقع گردد. این ویژگی‌ها شامل شناسایی QTLها همراه با شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی مرتبط با صفات تولیدی است (۲۴،۲۹). امروزه با کمک ژنتیک مولکولی امکان بررسی ژن‌های موثر بر صفات کمی فراهم شده است. تنظیم ژنتیکی مصرف غذا و تعادل انرژی در طیور برای تولید صفات اقتصادی برای پرورش‌دهندگان حائز اهمیت می‌باشد به همین دلیل شناخت جنبه‌های ژنتیکی و ژن‌های عمده تأثیرگذار در تنظیم رفتار تغذیه‌ای مورد توجه محققان اصلاح‌نژاد قرارگرفته و تحقیقات برای یافتن ژن‌های کاندید موثر بر تنظیم مصرف غذا منجر به کشف ژن MC4R شده است (۱۷،۴۰). تاکنون پنج نوع ژن گیرنده MCR کشف شده که در بین آن‌ها MCR-4 و MCR-3 اهمیت زیادی در رفتار تغذیه‌ای و تعادل انرژی دارند، همچنین در طیور ژن گیرنده ملانوکورتین ۴ پروتئینی را به طول ۳۳۱ اسیدآمینه کد می‌کند (۳۵). تأمین مواد غذایی یکی از ضروری‌ترین مسائلی است که جوامع بشری را تحت تأثیر قرار داده و از آن تأثیر می‌پذیرد. از جمله مواد غذایی مورد نیاز، پروتئین حیوانی است و برای تأمین این نیاز، گوشت و تخم طیور مورد توجه مردم بوده است (۱). افزایش روزافزون مصرف گوشت و تخم در سراسر جهان موجب شده است تا پرورش بوقلمون به صورت صنعتی انجام گیرد. بنابراین برای تأمین پروتئین حیوانی و رفع کمبود غذایی جوامع بشری توسعه صنعت پرورش بوقلمون، می‌تواند اقدامی موثر و سریع در رفع کمبود پروتئین باشد (۳). شناسایی مکانیسم‌های احتمالی دخیل در تنظیم اشتها در پرندگان به‌منظور کاهش دوره پرورش حائز اهمیت بوده و به همین دلیل بهترین راه جهت بالا بردن سرعت رشد و کاهش طول دوره پرورش، شناخت مکانیسم‌های اصلی دخیل در تنظیم اشتهای پرندگان است (۶). تنظیم ژنتیکی مصرف غذا و تعادل انرژی در طیور به‌منظور تولید صفات اقتصادی برای پرورش‌دهندگان حائز اهمیت می‌باشد، لذا شناخت جنبه‌های ژنتیکی و ژن‌های عمده تاثیرگذار در تنظیم رفتار تغذیه‌ای مورد توجه محققان ژنتیک و اصلاح‌نژاد قرار گرفته است و تحقیقات برای یافتن ژن‌های کاندیدای موثر بر تنظیم مصرف غذا منجر به کشف ژن MC4R[1] شده است (۱۸). تعدادی گیرنده در بافت‌های محیطی و سیستم عصبی مرکزی طیور شناسایی و مشخص شده است. برخی از این نمونه‌های برجسته شامل گیرنده لپتین (۲۳،۲۰)، گیرنده NPY (۵،۱۱) و گیرنده‌های ملانوکورتین (۳۵،۳۶) و گیرنده گرلین (۳۶) هستند که همه آن‌ها به جز لپتین متعلق به GPCR[2] می‌باشند. بنابراین درک بهتر از ساختار، بیان و عملکرد ژن‌های GPCR جهت نقش

1- Melanocortin 4 receptor
2- G-protein-coupled receptor

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.6.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.130]

منحصر بفرد آن‌ها در طیور ضروری است (۷،۲۱،۲۷،۳۵). ژن MC4R دارای یک اگزون و فاقد اینترون است، این ژن رمزکننده پروتئینی با همین نام است که از ۳۲۰ اسیدآمینه تشکیل شده است (۳۷). گیرنده ملانوکورتین ۴ به‌میزان زیادی در هیپوتالاموس بیان می‌شود (۴۱). مرکز اصلی اشتها در هیپوتالاموس قرار دارد و به وسیله سیستم مرکزی ملانوکورتین تنظیم می‌شود (۳۳). ثابت شده است که ژن MC4R در هومئوستازی انرژی و تنظیم وزن بدن نقش دارد (۲). در واقع فعالیت این ژن موجب ممانعت از مصرف خوراک می‌شود، اما اختلال در این ژن به وسیله جهش موجب چاقی، افزایش انسولین و سطح گلوکز خون می‌شود (۳۲). همچنین ارتباط چندشکلی ژن MC4R با صفات تولیدی در دام‌های مزرعه‌ای از قبیل خوک (۳۳)، گاو (۱۲a) و گوسفند (۳۰) بطور گسترده مطالعه شده است. MC4R در سال ۱۹۹۳ به وسیله واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) کلون شد اما با این حال عملکرد آن ناشناخته ماند، مطالعات بعدی نشان داد که MC4R در تنظیم هموستازی انرژی موش نیز درگیر بوده (۱۴) و در سال ۱۹۹۸ در انسان مطالعات ژنتیکی حاکی از آن بود که جهش در MC4R به‌عنوان شایع‌ترین علت شناخته شده‌ی تک ژنی چاقی است (۳۸). ژن MCR در طیف گسترده‌ای از بافت‌های پرندگان در مقایسه با پستانداران تشخیص داده شده که بطور گسترده در سیستم عصبی مرکزی از جمله تالاموس، هیپوتالاموس و ساقه مغزی وجود دارد. این ژن در بازوی بلند کروموزوم ۲ نزدیک به سانترومر (GGA2q12) قرار گرفته، این جایگاه ژنی مشابه کروموزوم ۱۸ انسانی (HSA18q) می‌باشد. توالی ژن MC4R و نقش آن در پرندگان و پستانداران تا حدودی بررسی شده است ولی اطلاعات اندکی بر روی این ژن و ارتباط آن با صفات تولید تخم در بوقلمون گزارش شده است. دست کم پنج گیرنده ملانوکورتینی وجود دارد که در این بین MCR4 وMCR3 اهمیت زیادی در رفتار تغذیه‌ای و تعادل انرژی دارند (۳۹،۲۸). MC4R میانجی مهمی در تاثیرات لپتین روی مصرف مواد غذایی است (۲۸). فعال شدن گیرنده ژن MC4R باعث کاهش خوردن و در عین حال افزایش مصرف انرژی می‌شود (۱۴،۱۶). ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی ژن MC4R با صفات لاشه در طیور گزارش شد (۲۲). همچنین ارتباط ژن MC4R با صفات رشد و ترکیب بدن در طیور مورد بررسی قرار گرفت و تجزیه و تحلیل حداقل مربعات و آنالیز واریانس ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد (۱۸). ویژگی‌های چندشکلی در MC4R و MC3R (ژن‌های مرتبط با تعادل انرژی در طیور) ممکن است برای کمک به طراحی سریع و آسان انتخاب به کمک نشانگرها در پرورش تجاری طیور مفید واقع شود. نشانگرهای مولکولی تفاوت و تنوع ژنتیکی افراد را در سطح ماده ژنتیکی نشان می‌دهند. در این خصوص، نشانگر SSCP به دلیل آشکارسازی تفاوت‌های کوچک در قطعه قابل تکثیر و ردیف‌های بازی، مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. وجود چندشکلی ژن MC4R و ارتباط آن با صفات رشد و عملکرد تخم به طور محدود بررسی شده است. تحقیق روی ژن‌های کاندید و ارتباط آن‌ها با صفات اقتصادی برای تعیین مبنای ژنتیکی صفات تولیدی یک ابزار انتخاب در طرح‌های اصلاح نژاد می‌باشد (۲۶). بر اساس مطالب فوق نشان داده می‌شود که ژن MC4R در تنظیم مصرف غذا و تعادل انرژی موثر بوده و می‌تواند برای طراحی سریع و آسان نشانگرها در انتخاب لاین‌های تجاری طیور مفید واقع شود. لذا شناسایی مکانیسم‌های احتمالی دخیل در تنظیم اشتها در پرندگان به منظور کاهش دوره پرورش و بالا بردن سرعت رشد حائز اهمیت بوده و به دلیل اهمیت ژن MC4R و نقش آن در تنظیم اشتها به وضوح روشن است. وجود چندشکلی ژن MC4R و ارتباط آن با صفت تولید تخم به طور محدود بررسی شده است، بنابراین هدف از این تحقیق شناسایی چندشکلی موجود در ژن MC4R با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و برآورد فراوانی الگوهای ژنوتیپی و در فنوتیپی عملکرد تخم در جمعیت بوقلمون بومی آذربایجان شرقی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این پژوهش به طور تصادفی از ۱۰۰ قطعه بوقلمون مرکز پرورش و اصلاح‌نژاد ایستگاه تاتار واقع در شهرستان خداآفرین آذربایجان شرقی استفاده شد. نمونه‌های خون از ناحیه ورید زیربالی با استفاده از سرنگ‌های ۱/۵ میکرولیتری اخذ شد و ماده ضد انعقاد EDTA اضافه گردید و همراه یخ به آزمایشگاه ژنتیک و اصلاح‌نژاد گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج و تعیین کیفیت DNA

استخراج DNA از ۱۰ میکرولیتر خون کامل با ستفاده از پروتکل توصیف شده (۴) انجام گرفت. کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA استخراج شده با کمک ژل آگارز یک درصد تهیه شده با بافر TBE(0/5 X) حاوی اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

انتخاب آغازگرها

ابتدا توالی نوکلئوتیدی ژن MC4R با طول ۴۶۹ جفت‌بازی در پایگاه داده نوکلئوتید NCBI (www.ncbi.com) جستجو شد. آغازگرهای استفاده شده با شماره ثبت توالی DQ482582.1 در این پایگاه که توسط (۱۲a) پیشنهاد شده بود در این پژوهش استفاده گردید. اطلاعات مربوط به آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای قطعه ۴۶۹ جفت بازی در جدول ۱ قید شده است.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.6.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.130]

جدول ۱- توالی پرایمرها

Table 1. Primer sequences

Primer name	Primer sequence
Forward	5´-TTCACCCAGCATCGTGGAAC-3´
Reverse	5´-TGTTATGATACTGGAGGGCGT- 3´

لازم به ذکر است که صحت آغازگرهای مورد استفاده براساس طول پرایمر، دمای ذوب پرایمرها، دمای اتصال و محتوای GC با استفاده از نرم‌افزار Amplifx 1.7 مورد تایید قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

پس از طراحی آغازگرها، جهت تعیین دمای اتصال آن‌ها از برنامه حرارتی استفاده شد. برای تکثیر ژن مورد نظر و تعیین دمای اتصال آغازگر به رشته‌های DNA هدف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد و بر همین اساس مناسب‌ترین دما برای. اتصال آغازگرها به‌طور اختصاصی به DNA هدف، دمای ۵۳ درجه سلسیوس مشخص شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر dNTP ۱/۲۵ میلی‌مولار، یک میکرولیتر $mgcl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۱۰ میکرومولار از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، یک واحد آنزیم Taq پلی‌مراز و ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی انجام شد. برنامه حرارتی شامل دمای واسرشت اولیه ۹۴ سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ مرحله با دمای واسرشت‌سازی ۹۴ سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۳ سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر۷۲ سلسیوس به مدت ۴۵ و در پایان یک مرحله توسعه نهایی با دمای۷۲ سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Master cycler (اپندروف – آلمان) برای تکثیر رشته DNA استفاده شد. بعد از انجام واکنش PCR، محصولات واکنش روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت ۱ ساعت با استفاده از بافر(1X) TAE الکتروفورز شده و با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی گردیدند.

تکنیک SSCP

به‌منظور تعیین الگوهای ژنوتیپی محصولات PCR از روش چندشکلی فرم‌فضایی رشته‌های منفرد استفاده گردید. در این روش ابتدا بایستی محصولات PCR تک رشته‌ای شوند. ژل مورد استفاده در این روش پلی آکریلآمید ۶٪ و غیر واسرشت‌ساز می‌باشد که نسبت پلی آکریلآمید به بیس آکریلآمید ۲۹ به یک است. به‌منظور آنالیز محصولات PCR با روش SSCP مقدار ۵ میکرولیتر از هر نمونه با ۱۰ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (شامل فرمامید ۹۵ درصد، EDTA ۰/۰۲ مولار، بروموفنل بلو ۰/۰۵ درصد و گزیلن سیانول ۰/۰۵ درصد) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۹۵ سلسیوس قرار داده شد و سپس بلافاصله نمونه‌ها به سرعت به روی یخ منتقل شدند تا از به هم چسبیدن مجدد تک رشته‌های DNA ممانعت به عمل آید. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها با استفاده از الکتروفورز عمودی نمونه‌های تک رشته‌ای شده به چاهک‌ها منتقل و به مدت ۱۶ ساعت با بافر TBE(0/5X) الکتروفورز شدند. جهت مشاهده الگوهای باندی از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید (۱۰).

تجزیه و تحلیل آماری

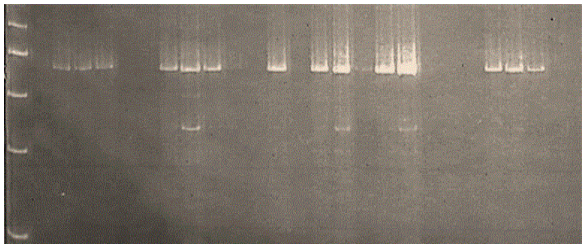
جهت ارزیابی اثر الگوهای ژنوتیپی مختلف بر روی صفات مورد مطالعه از مدل خطی آماری زیر استفاده شد (۱).

$$y_{ijk} = \mu + g_i + h_j + e_{ij}$$

که در آن y_{ijk}: میزان صفات برای هر بوقلمون، μ: میانگین ارزش فنوتیپی صفات، g_i: اثرات تصادفی مربوط به iامین ژنوتیپ، h_j: اثرات ثابت مربوط به jامین هچینگ و e_{ijk}: خطای آزمایش (اثرات باقیمانده). صفات مورد بررسی میانگین وزن تخم، توده تخم و تعداد تخم بودند. صفات مورد مطالعه با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SPSS Statistics 15 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۸). همچنین مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد (۲۵).

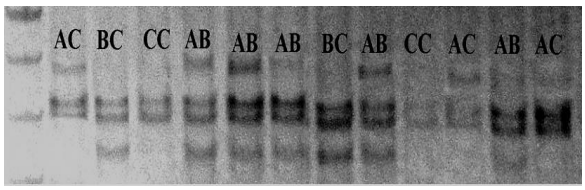
نتایج و بحث

قطعه ۴۶۹ جفت‌بازی از ژن MC4R 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 ۱). محصولات تکثیر شده PCR با توجه به کیفیت آنها مستقیماً برای آنالیز SSCP استفاده شدند. تجزیه و تحلیل باندهای حاصل از الکتروفورز با ژل پلی آکریلآمید غیر واسرشت ساز و رنگ آمیزی با نیترات نقره منجر به شناسایی چهار الگوی باندی متفاوت در جمعیت مورد مطالعه شد (شکل۲). چندشکلی ژن MC4R در طیور در مطالعات بسیاری گزارش شده است.



شکل ۱- محصولات PCR بارگذاری شده روی ژل آگارز
Figure 1. PCR products loaded on agarose gel

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.6.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.130]



شکل ۲- الگوهای SSCP ژن MC4R در بوقلمون
Figure 2. SSCP patterns of MC4R gene on turkey

فراوانی الگوهای ژنوتیپی AB، AC ،BC و CC به‌ترتیب ۵۲/۱، ۴/۱۳، ۲۲/۹۳ و ۲۰/۸۴ درصد محاسبه گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که ژنوتیپ AB و ژنوتیپ AC به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در جمعیت مورد مطالعه دارا بودند.

با مشخص کردن الگوهای ژنوتیپی بدست آمده و هم‌چنین کسب رکوردهای ثبت شده صفات تولید تخم از ایستگاه اصلاح نژاد بوقلمون تاتار در ارتباط با صفات مذکور آنالیز ارتباط بین الگوهای ژنوتیپی و صفات تخم مورد بررسی قرار گرفت. جدول مقایسه میانگین اثر الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده بر صفات تخم (میانگین وزن تخم، توده تخم و تعداد تخم) نشان داد که بین صفات تخم با الگوهای ژنوتیپی AB، AC، BC و CC ارتباط معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد (p-value>0.05) (جدول۲). در مطالعه حاضر با استفاده از روش PCR-SSCP چند شکلی ژن MC4R به وضوح دیده شد و می‌توان گفت تکنیک SSCP دارای قدرت تفکیک بالایی در شناسایی جهش‌ها در ردیف‌های تک نوکلئوتیدی و چندشکلی آللی می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های مختلف ژن MC4R در بوقلمون (میانگین ± انحراف معیار)
Table 2. LSM comparison the mean of different MC4R gene patterns on Turkey

Patterns	Trait		
	Egg Mass	Egg Number	Mean egg Weight
	ns	ns	ns
AB	۳۹۰۳/۳۴±۱۴۴۱/۱	۵۰/۵۸±۱۸/۴	۷۷/۰۲±۳/۲
AC	۴۱۲۰/۰±۱۲۳۳/۹	۵۳/۰±۱۶/۱	۷۷/۸۷±۱/۰
BC	۳۷۸۷/۴۱±۱۵۰۹/۰	۴۹/۷۲±۱۹/۹	۷۶/۴۴±۳/۹
CC	۳۸۹۳/۰۲±۱۱۹۷/۹	۵۱/۱۵±۱۵/۴	۷۶/۱۵±۴/۷
Total	۳۸۸۳/۸±۱۳۸۳/۸	۵۰/۶۱±۱۷/۰۸	۷۶/۷۵±۳/۷

چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در سطح DNA نقش کلیدی در تنوع ژنتیک حیوانات دارد. در این تحقیق، الگوهای چندشکلی از ژن MC4R به رو PCR-SSCP تعیین شد و سپس ارتباط آنها با صفات تولید تخم در بوقلمون مورد بررسی قرار گرفت. تکنیک SSCP روش مؤثری در شناسایی تنوع توالی تکثیر شده می‌باشد. اساس این تکنیک مهاجرت رشته‌های DNA از میان ژل آکریلآمید بر اساس اندازه و توالی آن می‌باشد؛ بنابراین، وجود حتی یک جهش نقطه‌ای، با تفاوت حرکت روی ژل قابل مشاهده است. نتایج حاصل از SSCP و رنگ آمیزی پلی اکریلآمید بیانگر ۴ الگوی باندی متفاوت بود که در شکل ۲ مشاهده می‌شود؛ بنابراین، الگوهای باندی متفاوت حاکی از وجود تنوع بالا در قطعه تکثیر شده از ژن MC4R می‌باشد که فراوانی آنها محاسبه و برای الگوهای ۱ تا ۴ به ترتیب۵۲/۱، ۴/۱۳، ۲۲/۹۳ و ۲۰/۸۴ درصد محاسبه شد. مطالعات گذشته نیز حاکی از وجود تعداد قابل توجهی چندشکلی در ژن MC4R بوده است. در این مطالعه هیچ ارتباط معنی‌داری بین این الگوهای ژنوتیپی با صفات تولید تخم یافت نشد؛ بنابراین انتخاب بر اساس چندشکلی ژن MC4R نمی‌تواند در بهبود ژنتیکی صفات تولید تخم مؤثر باشد. در بوقلمون به دلیل مشکلاتی که در جمع‌آوری اطلاعات وجود دارد بررسی ارتباط بین ژن‌های کاندید و صفات تولید تخم مربوط به این صفات با محدودیت‌هایی همراه است. چندشکلی ژن MC4R در بوقلمون‌های بومی ایران گزارش نشده و اکثر گزارشات محدود به مرغ‌های بومی یا تجاری می‌باشد (۱۲،۱۸،۳۱،۴۴b). چندشکلی ژن MC4R و ارتباط معنی‌داری با صفات تولیدی در غاز گزارش شده است (۱۲a). طی مطالعه‌ای گزارش کردند که چندشکلی تک نوکلئوتیدی در MC4R مرغ با صفات رشد و وزن بدن ارتباط معنی داری دارد (۱۸). نشان داده شد که MC4R می‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی برای رشد و کیفیت گوشت در برنامه اصلاح‌نژاد مرغ استفاده شود (۱۷). نتایج مطالعه کریم و آگاگ (۱۵) بر روی مرغان قهوه‌ای لوهمان نشان داد بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده با تولید تخم و وزن توده تخم تولیدی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. ژن MC4R در گاو و خوک نیز بررسی شده است (۳۴)، در گاو نیز MC4R جداسازی و نقشه‌برداری و در موقعیت کروموزومی (q27 BTA24) گزارش گردید (۴۲،۴۳) و SNPها متعددی در منطقه برنامه‌نویسی ژن MC4R گاو با استفاده از SSCP و RFLP تشخیص داده شد (۹،۱۹). در گاوشیری شناسایی چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی انجام شد که به میزان قابل توجهی با صفات تولیدی معنی‌داری داشت (۱۲،۳۰a،۹،۴۲). از آنجایی که مطالعات اندکی در مورد گیرنده ملانوکورتین ۴ در بوقلمون، انجام گرفته است و با توجه به تاثیر مستقیم این ژن بر روی صفات تولیدی و تولیدمثلی، مطالعه در سطح وسیع‌تر

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.6.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.130]

و بررسی ارتباط چندشکلی‌های احتمالی آن ها با صفات می‌تواند منجر به افزایش تولید و بیشینه کردن سود اقتصادی در صنعت طیور شود.

نتیجه‌گیری کلی

شناخت مکانیسم‌های ژنتیکی اکثر ژن‌ها، بسیار پیچیده بوده و مستلزم تلاش بیشتر در پروسه زمان می‌باشند. برنامه‌های اصلاح‌نژادی در طیور پیچیده بوده و بنابراین استفاده از روش مولکولیMAS[1] برای پیشرفت نرخ رشد و صفات تولیدی بهتر، می‌تواند مفید واقع شود. با توجه به اینکه مطالعه چندشکلی ژن MC4R در بوقلمون‌های بومی آذربایجان‌شرقی برای نخستین بار مورد بررسی قرارگرفته، نمی‌توان نظر قطعی در مورد نتایج آن صادر کرد. برای اطمینان از نتیجه‌گیری باید تعداد نمونه‌های بیشتری مورد بررسی قرار گیرد و تمامی چندشکلی‌ها را در تمام مناطق ژنی مورد بررسی قرار داد تا درک بهتری را در توضیح مکانیسم‌های زیربنایی تنظیم هورمونی و متابولیکی این ژن داشت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولان محترم مرکز تحقیقات کشاورزی آذربایجان شرقی جهت همکاری در این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Akbari, M., M. Ghaffari, A. Hashemi and G.E. Zarringhabaie. 2018. Investigation of Polymorphism in 5-Flanking Region of Pit-1 gene and its association with growth traits in Iranian native Goose. Iranian Veterinary Journal, 14: 5-12 (In Persian).
2. Benoit, S., M. Schwartz, D. Baskin, S.C. Woods and R.J. Seeley. 2000. CNS melanocortin system involvement in the regulation of food intake. Hormones and Behavior, 37: 299-305.
3. Blevins, J.E., M.W. Schwartz and D.G. Baskin. 2002. Peptide signals regulating food intake and energy homeostasis. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 80: 396-406.
4. Boom, R., C. Sol, M. Salimans, C. Jansen, P.W.V. Dillen and J.V.D. Noord. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology, 28: 495-503.
5. Bromée, T., P. Sjödin, R. Fredriksson, T. Boswell, T.A. Larsson, E. Salaneck, R. Zoorob, N. Mohell and D. Larhammar. 2006. Neuropeptide Y- family receptors Y6 and Y7 in chicken: Cloning, pharmacological characterization, tissue distribution and conserved synteny with human chromosome region. The FEBS journal, 273: 2048-63.
6. Evock, C.M., S.M. Poch, M.P. Richards, C.M. Ashwell and J.P. McMurtry. 2002 Expression of an uncoupling protein gene homolog in chickens. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 133: 345-58.
7. Gantz I., H. Miwa, Y. Konda, Y. Shimoto, T. Tashiro, S. Watson, J. DelValle and T. Yamada. 1993. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. Journal of Biological Chemistry, 268: 15174-9.
8. Gao, Y., M. Yang and L. Li. 2018. Excel and SPSS analysis of independent sample t-test. Animal Husbandry and Feed Science (Inner Mongolia), 39: 79-82.
9. Haegeman, A., F.Coopman, K. Jacobs, M. Mattheeuws, A.V. Zeveren and J. Peelman. 2001. Bovine melanocortin receptor 4: cDNA sequence, polymorphisms and mapping. Animal Genetics, 32: 189-92.
10. Herring, A., N. Inglis, C. Ojeh, D.A. Snodgrass and J. Menzies. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. Journal of Clinical Microbiology, 16; 473-7.
11. Holmberg, S.K., S. Mikko, T. Boswell, R. Zoorob and D. Larhammar. 2002. Pharmacological characterization of cloned chicken neuropeptide Y receptors Y1 and Y5. Journal of Neurochemistry, 81: 462-71.
12. Huang, M., X. Gao, J.Y. Li, H.Y. Ren, J.B. Chen and S.Z. Xu. 2010a. Polymorphisms in MC4R gene and correlations with economic traits in cattle. Molecular Biology Reports, 37: 3941-4.
13. Huang, Y., Y. Wang, D. H and Y. Liu. 2010b. Genetic diversity of the melanocortin 4 receptor (MC4R) gene and its association with slaughter traits in the landes goose. Biochemical Genetics, 48: 944-53.
14. Huszar, D., C.A. Lynch, V. Fairchild-Huntress, J.H. Dunmore, Q. Fang, L.R. Berkemeier, W. Gu, R.A. Kesterson, B.A. Boston and R.D. Cone. 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in Obesity In Mice, Cell, 88: 131-41.
15. Karim, E.S. and S. Aggag. 2018. Association of Single Nucleotide Polymorphism in Melanocortin receptor gene with egg production traits in Lohmann Brown chickens. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 24.
16. Kask, A., L. Rägo, J.E. Wikberg and H.B. Schiöth. 1998. Evidence for involvement of the melanocortin MC4 receptor in the effects of leptin on food intake and body weight. European Journal of Pharmacology, 360: 15-9.
17. Kubota, S., A. Vandee, P. Keawnakient, W. Molee, J. Yongsawatdikul and A. Molee. 2019. Effects of the MC4R, CAPN1, and ADSL genes on body weight and purine content in slow-growing chickens. Poultry Science, 98: 4327-37.
18. Li, C.Y. and H. Li. 2006. Association of MC4R gene polymorphisms with growth and body composition traits in chicken. Asian-australasian Journal of Animal Sciences, 19: 763-8.
19. Liu, H., W. Tian, L. Zan, H. Wang and H. Cui. 2010. Mutations of MC4R gene and its association with economic traits in Qinchuan cattle. Molecular Biology Reports, 37: 535-40.

1- Marker-assisted selection

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.6.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.130]

20. Liu, X., I. Dunn, P. Sharp and T. Boswell. 2007. Molecular cloning and tissue distribution of a short form chicken leptin receptor mRNA. Domestic Animal Endocrinology, 32: 155-66.
21. Mountjoy, K.G., M.T. Mortrud, M.J. Low, R.B. Simerly and R.D. Cone. 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. Molecular Endocrinology, 8: 1298-308.
22. Qiu, X., N. Li, X. Deng, X. Zhao., Q. Meng and X. Wang. 2006. The single nucleotide polymorphisms of chicken melanocortin-4 receptor (MC4R) gene and their association analysis with carcass traits. Science in China Series C: Life Sciences, 49: 560-6.
23. Richards, M.P. and S.M. Poch. 2003. Molecular cloning and expression of the turkey leptin receptor gene. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 136: 833-47.
24. Sadee, W., D. Wang, A. Papp, J. Pinsonneault, R. Smith, R. Moyer and A. Johnson. 2011. Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 89: 355-65.
25. Salehi, R., A. Hashemi, M. Ghaffari and G.E. Zarringhabari. 2019. Polymorphism of alpha-lactalbumin gene in exon 1 and intron 2 and its association with milk production traits in buffaloes of Eastern Azarbaijan province by PCR–SSCP technique. Iranina Veterinary Journal, 15: 52-59 (In Persian).
26. Sarghale, A., H. Shahrebabak, H. Amini and M. Kholghi. 2013. The role of major genes in main productive and economical traits in goat. Genetics in the Third Millennium, 11: 3136-55.
27. Schioth, H.B. 2006. G protein-coupled receptors in regulation of body weight. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders), 5: 241-9.
28. Seeley, R.J., K.A. Yagaloff, S.L. Fisher, P. Burn, T.E. Thiele, G.V. Dijk, D.G. Baskin and M.W. Schwartz. 1997. Melanocortin receptors in leptin effects. Nature, 390: 349-362.
29. Sell-Kubiak, E., K. Wimmers, H. Reyer and T. Szwaczkowski. 2017. Genetic aspects of feed efficiency and reduction of environmental footprint in broilers: a review. Journal of Applied Genetics, 58: 487-98.
30. Seong, J., D.S. Suh, K.D. Park, H.K. Lee and H.S. Kong. 2012. Identification and analysis of MC4R polymorphisms and their association with economic traits of Korean cattle (Hanwoo). Molecular Biology Reports, 39: 3597-601.
31. Sharma, P., W. Bottje and R. Okimoto. 2008. Polymorphisms in uncoupling protein, melanocortin 3 receptor, melanocortin 4 receptor, and pro-opiomelanocortin genes and association with production traits in a commercial broiler line. Poultry Science, 87: 2073-86.
32. Stemarie, L., G.L. Miura, D.J. Marsh, K. Yagaloff and R.D. Palmiter. 2000. A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97: 12339-44.
33. Strader, A.D., H.B. Schiöth and J.D. Buntin. 2003. The role of the melanocortin system and the melanocortin-4 receptor in ring dove (Streptopelia risoria) feeding behavior. Brain research, 960: 112-21.
34. Switonski, M., M. Mankowska and S. Salamon. 2013. Family of melanocortin receptor (MCR) genes in mammals-mutations, polymorphisms and phenotypic effects. Journal of Applied Genetics, 54: 461-72.
35. Takeuchi, S. and S. Takahashi. 1998. Melanocortin receptor genes in the chicken-tissue distributions. General and Comparative Endocrinology, 112: 220-31.
36. Takeuchi, S., S. Takahashi, R. Okimoto, H.B. Schiöth and T. Boswell. 2003. Avian Melanocortin System: α- MSH May Act as an Autocrine/Paracrine Hormone: A Minireview. Annals of the New York Academy of Sciences, 994: 366-72.
37. Tao, Y.X. and D.L. Segaloff. 2003. Functional characterization of melanocortin-4 receptor mutations associated with childhood obesity. Endocrinology, 144: 4544-51.
38. Vaisse, C., K. Clement, B. Guy-Grand and P. Froguel. 1998. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. Nature genetics, 20: 113-4.
39. Vergoni, A.V. and A. Bertolini. 2000. Role of melanocortins in the central control of feeding. European Journal of Pharmacology, 405: 25-32.
40. Wang, Y., Y. Su Y, X. Jiang, Y. Liu, X. Li, Z. Zhang, H. Du and Q. Zhu. 2009. Study on association of single nucleotide polymorphism of MC3R and MC4R genes with carcass and meat quality traits in chicken. The Journal of Poultry Science, 46: 180-7.
41. Yeo, G.S., I.S. Farooqi, S. Aminian, D.J. Halsall, R.G. Stanhope and S. O'Rahilly. 1998. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. Nature Genetics, 20: 111-2.
42. Zhang, C.L., Y.H. Wang, H. Chen, X.Y. Lan, C.Z. Lei and X.T. Fang. 2009. Association between variants in the 5′-untranslated region of the bovine MC4R gene and two growth traits in Nanyang cattle. Molecular Biology Reports, 36: 1839-43.
43. Zhang, C., H. Chen, Y. Wang, X. Lan, L. Zhang, A. Zhang and R. Zhang. 2006. Association of a missense mutation of the MC4R gene with growth traits in cattle (Brief reportArchives Animal Breeding, 49: 515-6.
44. Zhou, Y., D. Cao, Q. Lei, H. Han, F. Li, G. Li and B. Huang. 2012. Associations of melanocortin-4 receptor (MC4R) gene Single Nucleotide Polymorphisms with carcass traits in a synthetic broiler line. Journal of Animal and Veterinary Advances, 11: 13-9.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.6.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.130]

Identification of Polymorphism Melanocortin 4 Receptor Gene and its Association with Egg Production Traits in Turkey

Mehrangiz Fathi[1], Ali Hashemi[2], Ghorban Elyasi Zaringhobaie[3] and NooshinGhahramani[4]

1- Graduated M.Sc. 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, (Corresponding author: A.hashemi50@gmail.com)
3-Animal Science Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran
4-PhD candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
Received: 24 Jun, 2021 Accepted: 21 February, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: Turkey is important all over the world in order to improve some of food supply required for several reasons such as its weight gain and high growth rate, low feed conversion ratio, and production of more eggs and meat. The MC4R gene is one of the most important candidate genes in different species which can affect the energy homeostasis and body weight regulation. Identity the genetic aspects and major gene influence on energy balance, production, fertility, safety are the recent interests of genetic and breeding researchers. The objective of this study was undertaken to identify polymorphisms of the MC4R gene using PCR single-strand conformational polymorphism (PCR–SSCP) analysis and to evaluate association of these polymorphisms with egg performance in turkey.

Material and Methods: For doing this research in order to investigate polymorphism of MC4R, 100 laying turkeys, randomly selected then all animals were blooded. Genomic DNA with optimal quality was extracted from blood samples and PCR was done for amplifying a fragment in size of 469 bp of MC4R gene. The single strand conformation polymorphism technique (SSCP) was used to determine genotype. A statistical model was done by using GLM of SPSS software to find the association between the SSCP genotype patterns of PCR products with egg performance in turkey.

Results: The results of PCR-SSCP by using polyacrylamide gel and silver nitrate showed that this population was polymorphic at the studied loci and four different genotypes AB, AC, BC and CC, were observed with the frequencies of 52.1%, 4.13%, 22.93% and 20.48%, respectively. Genotype AB and genotype AC had the highest and lowest genotypic frequencies, respectively.

Conclusion: The results indicated that the MC4R gene is polymorph and there was no significant difference between the genotype patterns and egg performance (egg mass, mean egg weight, and the number of eggs). Due to the importance of the MC4R gene, it is suggested to study this gene locus in populations with larger sample size.

Keywords: MC4R gene, PCR-SSCP, Performance Egg, Polymorphism, Turkey

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.6.4]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.130]