دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

آنالیز چند شکلی‌های ژنتیکی در چهار جایگاه نشانگری ژن PEPCK-C در سویه‌های مختلف مرغ

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

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: yosefi_2004@yahoo.com)
۲- استاد و دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۲۹

چکیده

این پژوهش به منظور شناسایی چند شکلی‌های آللی در چهار جایگاه ژنی PEPCK-C در سویه‌های مرغ تجاری گوشتی، تخم‌گذار و مرغ‌های مولد از ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام شد. نمونه‌های خون به طور تصادفی از ۱۵۰ قطعه مرغ (هر جمعیت ۵۰ قطعه) جمع‌آوری و استخراج DNA با روش نمکی بهینه یافته انجام گرفت. با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی در مجموع قطعه‌ای با طول ۳۷۹۲ جفت باز از ناحیه ۱۷۲۳- تا اگزون ٤ ژن PEPCK-C تکثیر شد. فراوانی آللی در جایگاه RsaI، در جمعیت مرغان بومی مازندران A (۳۳٪) و B (٦٧٪) و ژنوتیپ AB و BB به ترتیب با فروانی ٦٦ و ٣٤ درصد، در جمعیت مرغ‌های گوشتی A (٣٤٪) و B (٦٦٪) و ژنوتیپ‌های AB و BB به ترتیب با فروانی ٦٨ و ٣٢ درصد و در جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار A (٢٤٪) و B (٧٦٪) و ژنوتیپ‌های AB و BB به ترتیب با فراوانی ٤٨ و ٥٢ درصد مشاهده شد. برای جایگاه BstEII در جمعیت مرغ‌های بومی فراوانی آللی A (٢٨٪) و B (٧٢٪) و سه ژنوتیپ AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی هر یک ۲، ٥٢ و ٤٦ درصد، در جمعیت مرغ‌های گوشتی A (١٩٪) و B (٨١٪) ، سه ژنوتیپ AA، AB وBB به ترتیب با فراوانی هر یک ۲، ٣٤ و ٦٤ درصد و در جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار A (٥٩٪) و B (٤١٪) ، ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی هر یک ٤٢، ٣٤ و ٢٤ درصد محاسبه شد. فراوانی آللی در جایگاه PstI، در جمعیت مرغ‌های بومی مازندران A (٤٣٪) و B (٥٧٪) و سه ژنوتیپ AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی هر یک ١٦، ٥٤ و ٣٠ درصد، در جمعیت مرغ‌های گوشتی A (٥٢٪) و B (٤٨٪) و سه ژنوتیپ AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی هر یک ١٨، ٦٨ و ١٤ درصد و در جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار A و B (٥٠٪) و سه ژنوتیپ AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی هر یک ٦، ٨٨ و ٦ درصد برآورد شد. نتایج برای جایگاه BstEII (موقعیت ٢٦+ تا ١٠٣٥+) نشان داد که همه نمونه‌ها در سویه‌های مختلف الگوی باندی یکسان (ژنوتیپ وحشی BB) دارند. از میان سه SNP شناسایی شده دو SNP در ناحیه پروموتور و یک SNP در ناحیه اینترون ۲ واقع شده بود. با توجه به چند شکل بودن و همچنین بزرگ اثر بودن آن بر صفات تولیدی مختلف، مانند تولید تخم مرغ، ضریب تبدیل غذایی و رشد، این جایگاه ژنی می‌تواند به عنوان ژن کاندید در مطالعات شناسایی QTL مرتبط به این صفات در صنعت طیور مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: چند شکلی، PEPCK-C، مرغ، PCR-RFLP

مقدمه

مطالعه تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها از مباحث مبنایی در علم بیوشیمی بوده و تقریباً درک ابتدایی‌مان از خصوصیات کنترلی هورمون‌ها و دیگر تأثیرات تنظیمی بر عملکرد سلولی را فراهم کرده است. گلوکز برای همه‌ی بافت‌هایی که به جهت تأمین انرژی وابسته به گلیکولیزمی باشند، ضروری است (۸). هموستازی گلوکز در کوتاه مدت توسط تجزیه گلیکوژن کبدی فراهم می‌شود. هرچند پس از چند ساعت گرسنگی، ذخایر گلیکوژن کبد تمام شده و گلوکونئوژنز، مقدمتاً از آمینواسیدها، لاکتات و گلیسرول تحریک می‌شود (۵). محرک‌های گلوکونئوژنیک در ابتدا به پیروات یا اگزالواستات تبدیل می‌شوند و سپس در چرخه گلوکونئوژنز از طریق برگشت گلیکولیز به فرم گلوکز در می‌آیند. تعدادی از آنزیم‌های گلیکولیتیک هم در گلیکولیز و گلوکونئوژنز عمل می‌کنند. این آنزیم‌ها اغلب بیشتر از حد مجاز حضور دارند و نرخ محدود برای گلوکونئوژنز ندارند (۹).

فسفو انول پیروات کربوکسی کیناز[۱] (PEPCK) آنزیمی با نرخ محدودکنندگی در گلوکونئوژنز در کبد می‌باشد و بنابراین نقش عمده‌ایی در فرایند گلوکونئوژنز دارد (۱۵). دو ایزوفرم PEPCK (فرم‌های سیتوزولی و میتوکندریایی) با الگوهای تنظیمی و توزیعی متفاوت در گونه‌های مختلف (۲۱) هم در سیتوزول و هم در میتوکندری واقع شده و هر دو در تولید گلوکز نقش دارند (۲۲،۱۳). در گونه‌هایی از ماکیان مانند مرغ، این آنزیم تنها در میتوکندری سلول‌های کبد وجود دارد، در حالی که در کلیه هم در میتوکندری و هم سیتوزول حضور دارد (۱). ایزوزیم‌های PEPCK اگر چه دارای وزن مولکولی نسبی متفاوتی می‌باشند اما ویژگی‌های کاتالیتیکی تقریباً مشابه‌ی دارند (۲۴،۶). در کبد، فاکتورهای اصلی مؤثر در افزایش بیان این ژن cAMP PEPCK، گلوکورتیکوییدها و هورمون تیرویید می‌باشند در حالی که انسولین این فرآیند را ممانعت می‌کند (۴). در بافت کبدی پرندگان در مقایسه با دیگر حیواناتی که تا کنون از حیث توزیع داخل سلولی PEPCK در میان بافت‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفتند تنها ایزومر PEPCK-M[۲]وجود دارد، در حالی که هر دو فرم ایزوزایم در کلیه حضور دارند. در بافت‌هایی که PEPCK-M فرم غالب باشد گلوکونئوژنز از لاکتات (چرخه کوری) اتفاق می‌افتد و در کلیه سنتز گلوکز خالص از آمینو اسیدها با حضور PEPCK-C[۳] رخ می‌دهد (۱۹). نتایج وات فورد (۲۳) از این

1- Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
2- Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
3- Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

فرضیه حمایت کرد که کلیه در مرغ، مکان اصلی گلوکونئوژنز از سوبستراهایی با منشاء غیر از لاکتات می‌باشد و نقش مهمی را در حفظ هموستازی گلوکز بازی می‌کند. از جمله نقش‌های متابولیکی این دو فرم آنزیمی، شرکت در هموستازی گلوکز و لیپید در بافت‌های مختلف می‌باشد (۴). محرک‌های تغذیه‌ای و هورمونی مختلف سبب تغییر در نرخ رونویسی ژن PEPCK-C می‌شوند (۲۰)، در حالیکه فرم میتوکندریایی به طور مداوم بیان می‌شود (۲۳،۳).

محور اصلی تنظیم سنتز PEPCK-C تحت تأثیر cAMP و انسولین قرار می‌گیرد به طوریکه انسولین اثر مهارکنندگی روی نسخه‌برداری ژن PEPCK-C دارد اما میزان بالای کربوهیدرات جیره از طریق افزایش ترشح انسولین باعث کاهش سنتز PEPCK-C کبد می‌شود. عدم یکنواختی زیادی در بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مهم مسیرهای متابولیکی در کبد وجود دارد. این فرم توزیع و سنتز آنزیم‌ها در سلول می‌تواند به عنوان مکانیسمی باشد که سلول به طور همزمان عملکردهای متابولیک مخالف، مانند گلیکولیز و گلیکونئوژنز را کنترل می‌کند (۴).

ژن PEPCK-C در طیور با طولی معادل ۸ کیلو باز شامل ۸ اگزون روی کروموزم ۲۰ قرار دارد (۱۲) و مشخص شده که طول mRNA این ژن حدود ۲/۸ کیلو باز بوده که پروتئینی به طول ۶۲۲ اسید آمینه و وزن مولکولی ۶۹۵۲۲ دالتون را کد می‌کند (۱۰،۷،۱۸). ناحیه ۵ غیر ترجمه ای این ژن ۲۴۶ جفت باز طول داشته که ۲ کدون راه‌انداز غیر عملکردی AUG را شامل می‌شود (۱). توالی غیرترجمه‌ای ۳ حدود ۶۴۹ جفت باز طول داشته و پیام‌های مربوط به پلی‌آدنیلاسیون را شامل می‌شود. یک ناحیه غنی از A+U بین توالی ۳ ترجمه شده و توالی غیرترجمه‌ای از mRNA ژن PEPCK-C وجود دارد که می‌تواند عملکرد مهمی داشته باشد (۱۸).

در پژوهش‌های مختلف نشان داده شد که در ژن PEPCK چند شکلی وجود دارد و آلل‌های متفاوتی از این ژن وجود دارند که در اکثر آزمایشات این آلل‌ها (کلاس‌های هاپلوتایپ)، توسط روش RFLP[1] شناسایی شده‌اند (۱۴،۳، ۱۷،۱۶). همچنین تأثیر ژن PEPCK-C در بهبودی صفات تولیدی طیور نظیر ضریب تبدیل غذایی و مقدار تخم‌مرغ تولیدی گزارش شده است (۱۶).

هدف از مطالعه حاضر آنالیز یک قطعه ۳۷۹۲ جفت بازی ناحیه ۵ (موقعیت ۱۷۲۳- تا ۲۰۶۹) شامل ۱۷۲۳ جفت باز از پروموتور، ۱۵۷۸ جفت باز از اینترون و ۴۹۱ جفت باز از اگزون (اگزون ۱ تا ۳) به منظور شناسایی چند شکلی آللی ژن PEPCK-C و تعیین فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی در سویه‌های مرغ تجاری گوشتی، تخم‌گذار و مرغ‌های مولد ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

مرغ‌های مورد استفاده در این مطالعه، به ۳ سویه مختلف تعلق داشت: مرغ بومی مازندران (۵۰ قطعه، مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی ساری)، مرغ گوشتی (۵۰ قطعه، سویه راس) مرغ تخم‌گذار (۵۰ قطعه، سویه لگهورن سفید). نمونه‌های خون به طور تصادفی از ۱۵۰ قطعه از سویه‌های مختلف جمع آوری و خون‌گیری از ورید زیر بال انجام و از هر پرنده حدود ۲-۱ میلی لیتر خون گرفته شد. برای جلوگیری از انعقاد خون از محلول EDTA[2] به نسبت ۱ به ۱۰ استفاده شد. نمونه‌ها بلافاصله بعد از شماره گذاری با حفظ شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. DNA ژنومی از نمونه‌های خون با استفاده از روش نمکی بهینه یافته استخراج شد (۱۱). تعیین ژنوتیپ برای تکثیر توالی ۳۷۹۲ جفت بازی که از ۱۷۲۳- جفت باز در پروموتر شروع شده و تا ۲۰۶۹ جفت باز در اگزون ۴ ژن PEPCK سیتوپلاسمی ادامه داشت از چهار جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد. اندازه محصولات PCR و توالی آغازگرها در جدول ۱ نشان داده شد.

جدول ۱- توالی آغازگرها و موقعیت ناحیه تکثیری ژن PEPCK-C

Table 1. The primer sequences and the position of amplified region of PEPCK-C gene

منبع	آنزیم برشی	دمای اتصال	اندازه محصول (bp)	موقعیت	ناحیه تکثیر شده	توالی آغازگرها 3′.....5′	جایگاه
(۱۷)	RsaI	۶۳°C	۸۴۳	۱۷۲۳- تا ۸۸۰-	پروموتور	F- CTGGGACCACCAGCAAGTACTG R- GCCTGTGCAGTCGGTGTGTGA	PEPCK-C (1)
	BstEII	۶۲°C	۱۰۶۴	۹۸۵- تا ۷۹+	بخش‌هایی از پروموتور و اگزون ۱	F-GCTGGGACTGAATGGAAGAGGAG R-CTGTTGAGTCGGATGGGTGTCAG	PEPCK-C (2)
	BstEII	۶۰°C	۱۰۱۰	۲۶+ تا ۱۰۳۵+	اگزون ۲	F- CACCATCAGCTGAAAGGGAGCC R- GTTGGGTTCGTTGGGAGAGACAAC	PEPCK-C (3)
	PstI	۵۸°C	۱۰۵۰	۱۰۱۴+ تا ۲۰۶۹+	اگزون ۳	F-GTCTCTCCCAACGAACCCAACATG R-CCTTTCCTGACATCCAGCGACC	PEPCK-C (4)

F: توالی رفت و R: توالی برگشت

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر DNA ژنومی (۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱X (۱۰ میلی مولار تریس، ۵۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۰/۱ ٪ ژلاتین، PH=۸.۴) ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۲۰۰ میکرومولار) و ۱ واحدآنزیم Taq پلیمراز که در نهایت

1- Restriction Fragment Length Polymorphism

2- Ethylene diamin tetra acetic acid disodium salt

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 ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به مدت ۸۰ ثانیه، تکثیر ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و از دمای تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. صحت تکثیر محصولات PCR توسط ژل آگارز ۲٪ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید انجام شد و با استفاده از دستگاه مستندسازی ژل (بایورد، آمریکا) باندها رویت و مورد آزمون قرار گرفتند.

آزمون PCR-RFLP

پس از تکثیر، محصولات PCR تحت تیمار آنزیم مربوطه (جدول ۱) در دمای ۳۷°C به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند. واکنش هضم در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل، ۱ میکرولیتر بافر هضم (10X)، ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۱ واحد آنزیم برشی و ۳/۸ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. سپس محصولات هضم شده روی ژل آگارز ۳/۵ درصد الکتروفورز و بعد از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید، تعیین ژنوتیپ شدند.

آنالیز آماری

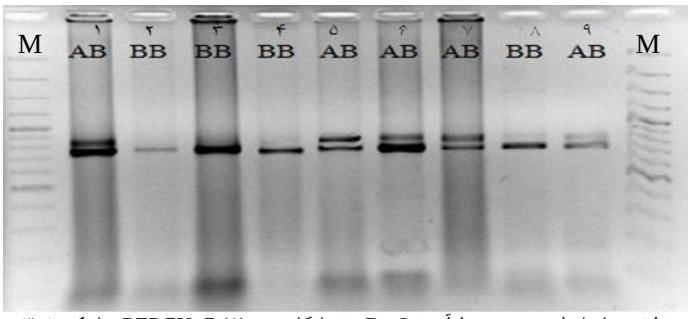
فراوانی ژنی و ژنوتیپی با شمارش مستقیم آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها از روی ژل محاسبه شد. مقایسه فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه‌های مورد مطالعه بین سه سویه مرغ‌های بومی مازندران، گوشتی و تخم‌گذار از روش دقیق فیشر و روش آزمون مربع-کای و نیز آزمون تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از برنامه SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت. سطح معنی‌داری ۵٪ برای همه مقایسات آماری در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

شناسایی و توزیع SNP

RsaI- RFLP برای جایگاه PEPCK-C (1)

قطعه‌ای از ناحیه پروموتور ژن PEPCK-C به اندازه ۸۴۳ جفت باز (موقعیت ۱۷۲۳- تا ۸۸۰-) به وسیله آغازگر PEPCK-C (1) تکثیر شد. آنزیم RsaI برای اولین بار، در این پژوهش به منظور شناسایی چند شکلی در این جایگاه مورد استفاده قرار گرفت. در نتیجه هضم آنزیمی دو آلل A (۸۴۳، ۷۳۷، ۸۸ و ۱۸ جفت باز) و B (۷۳۷، ۸۸ و ۱۸ جفت باز) شناسایی شد. در شکل ۱ دو ژنوتیپ به‌دست آمده ژن PEPCK-C (1) توسط این آنزیم از راه تکنیک RFLP در سه سویه مختلف مرغ نشان داده شد.



شکل ۱- الکترفورز محصولات حاصل از هضم توسط آنزیم RsaI در جایگاه ژنی PEPCK-C (1). چاهک ۱-۳ مرغ تخم‌گذار، ۴-۶ مرغ گوشتی و ۷-۹ مرغ بومی. M خط کش مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

Figure 1. Electrophoresis of digestion products by RsaI enzyme in PEPCK-C (2) locus. Lane 1-3 layer, 4-6 broiler and 7-9 native fowls. M is the 100bp molecular ruler

ژنوتیپ AA در هیچ یک از جمعیت‌ها مشاهده نشد که علت آن می‌تواند احتمالا به دلیل کم بودن تعداد نمونه‌ها باشد. فراوانی آلل A در جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار کمترین مقدار ولی در مقابل وفور آلل B در این جمعیت نسبت به دو جمعیت دیگر بیشترین بود (جدول ۲). به علت عدم وجود مقاله مشابه که با آنزیم RsaI در رابطه با جایگاه مورد نظر کار کرده باشند امکان مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج محققین دیگر میسر نبوده است.

جدول ۲- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی جایگاه ژنی PEPCK-C (1) در سه سویه مختلف مرغ

Table 2. The allelic and genotypic frequencies of PEPCK-C (1) locus in three different strains of chickens

جمعیت	فراوانی ژنوتیپی		فراوانی آللی		سطح احتمال (P-value)		
	AB	BB	A	B	مرغ بومی	مرغ گوشتی	مرغ تخم‌گذار
مرغ بومی	۰/۶۶	۰/۳۴	۰/۳۳	۰/۶۷	-----	۰/۸۳۱۶^{ns}	۰/۰۶۹۱^{ns}
مرغ گوشتی	۰/۶۸	۰/۳۲	۰/۳۴	۰/۶۶	۰/۸۳۱۶^{ns}	-----	۰/۰۴۲۸*
مرغ تخم‌گذار	۰/۴۸	۰/۵۲	۰/۲۴	۰/۷۶	۰/۰۶۹۱^{ns}	۰/۰۴۲۸*	-----

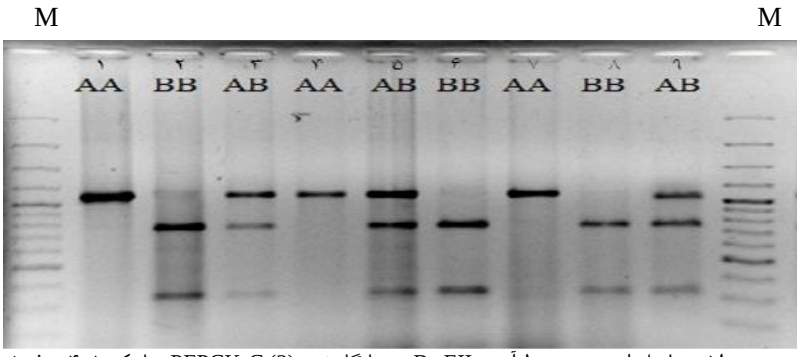
*: $P < 0.05$ ns : عدم معنی‌داری

در پژوهش پارسانژاد و همکاران (۱۷)، چند شکلی ژن PEPCK-C در نژاد تجاری لگهورن مورد بررسی قرار گرفت، که ۵ جهش در فاصله ۱۷۲۳- تا ۸۸۰- جفت بازی در ناحیه پروموتور این ژن توسط آنزیم AciI و BstEII شناسایی شده بود. عمرانی بیدی و همکاران (۱۴) در پژوهشی که روی مرغ‌های بومی سیستان با استفاده از آنزیم‌های AciI و BsteΠ انجام دادند، عدم وقوع جهش در این جایگاه ژنی را گزارش کردند. بر اساس نتایج بدست آمده در پژوهش ما در

هیچ کدام از سه جمعیت، ژنوتیپ هموزیگوت AA مشاهده نشد. همچنین فراوانی ژنوتیپ‌های AB و BB در جمعیت مرغ‌های بومی و مرغ‌های گوشتی تقریباً یکسان بوده است. یکی از عوامل اصلی مؤثر بر عدم مشاهده همه ژنوتیپ‌های محتمل در این جمعیت‌ها می‌تواند اندازه کوچک نمونه در جمعیت‌های مورد مطالعه باشد. فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت AB در جمعیت مرغ‌های بومی و گوشتی نسبت به مرغ‌های تخم‌گذار بیشتر بوده که حاکی از تنوع بیشتر این جایگاه از ژن PEPCK-C در این دو جمعیت نسبت به جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار می‌باشد. فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی نیز از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین جمعیت مرغ بومی با مرغ گوشتی و مرغ تخم‌گذار نشان نداد.

BstEII –RFLP برای جایگاه PEPCK-C (2)

محصولات PCR با اندازه مطلوب ۱۰۶۴ جفت باز (۹۸۵- تا ۷۵+) برای شناسایی چند شکلی در معرض آنزیم BstEII قرار گرفت. حضور باندهای با وزن مولکولی مختلف در ژل به طور واضح وقوع تنوع در توالی DNA را نشان داد. جایگاه نشانگری BstEII در ناحیه پروموتور در موقعیت ۶۶۴- واقع بود (۲۵). هضم محصولات PCR ۱۰۶۴ جفت بازی با آنزیم برشی BstEII دو آلل A و B و سه ژنوتیپ AA، AB و BB را آشکار ساخت. آلل B یک سایت BstEII داشته و دو باند ۷۴۲ و ۳۲۲ جفت بازی ایجاد نموده و آلل A بدون برش باقی ماند (۱۰۶۴ جفت باز) (شکل ۲).



شکل ۲ – الکترفورز محصولات حاصل از هضم توسط آنزیم BstEII در جایگاه ژنی PEPCK-C (2). چاهک ۱-۴ مرغ تخم‌گذار، ۵ و ۶ مرغ گوشتی و ۷-۹ مرغ بومی. M خط کش مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.

Figure 2. Electrophoresis of digestion products by BstEII enzyme in PEPCK-C (2) locus. Lane 1-4 layer, 5 and 6 broiler and 7-9 native fowls. M is the 100bp molecular ruler.

ژنوتیپ‌های AA، AB و BB در هر سه جمعیت شناسایی شد. در مجموع، فراوانی ژنوتیپ AA در جمعیت مرغ‌های بومی و گوشتی بسیار پائین بوده که می‌تواند احتمالا به دلیل فشار بیشتر انتخاب برای افزایش رشد در این جمعیت‌ها باشد (جدول ۳). مقایسه فراوانی ژنی و ژنوتیپی جمعیت مرغ‌های تخم‌گذار با جمعیت مرغ‌های بومی مازندران و مرغ‌های گوشتی از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۳- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی ژن PEPCK-C (2) در سه سویه مختلف مرغ

Table 3. The allelic and genotypic frequencies of PEPCK-C (2) in three different strains of chickens

جمعیت	فراوانی ژنوتیپی		فراوانی آللی		سطح احتمال(P- value)		
	AA	AB	BB	A	B	مرغ بومی	مرغ گوشتی	مرغ تخم‌گذار
مرغ بومی	۰/۰۲	۰/۵۲	۰/۴۶	۰/۲۸	۰/۷۲	-----	۰/۱۸۶۷^{ns}	۰/۰۰۰۱**
مرغ گوشتی	۰/۰۲	۰/۳۴	۰/۶۴	۰/۱۹	۰/۸۱	۰/۱۸۶۷^{ns}	-----	۰/۰۰۰۱**
مرغ تخم‌گذار	۰/۴۲	۰/۳۴	۰/۲۴	۰/۵۹	۰/۴۱	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۰۱**	-----

*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ ns: عدم معنی‌داری

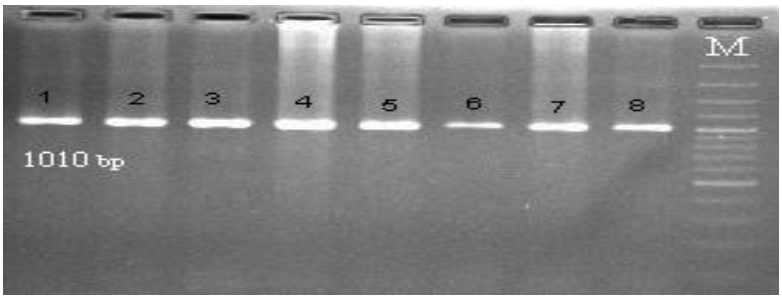
چند شکلی مشاهده شده در موقعیت ۶۶۴- در همه سویه‌ها مطابق با نتایج پارسانژاد و همکاران (۱۷) بود. همچنین، در مطالعه آن‌ها پنج SNP در همین ناحیه (موقعیت ۹۸۵ تا ۷۹+) در مرغ لگهورن شناسایی شد.

عمرانی بیدی و همکاران (۱۴)، به بررسی چند شکلی در ناحیه پروموتور تا اگزون ۲ ژن PEPCK-C در طیور بومی سیستان (دو توده نژادی خزک و دشتیاری) پرداختند. در آن پژوهش که با استفاده از تکنیک RFLP و آنزیم برشی BstEII انجام شد تنها دو ژنوتیپ AA و AB از سه ژنوتیپ ممکن در هر دو جمعیت مشاهده شد. فراوانی آلل A و B در جمعیت خزک به ترتیب ۰.۹۸ و ۰.۰۲ و در جمعیت دشتیاری A (۰/۹۲) و B (۰/۰۸) گزارش شد.

پارسانژاد و همکاران (۱۶) با استفاده از تکنیک RFLP در جایگاه AciI و BstEII، شش ژنوتیپ AA، AB، AC، BB، BC و CC را برای محدوده ۱۷۲۳- تا ۷۹ جفت باز از ژن PEPCK-C شناسایی کردند که ژنوتیپ AA بر سن اولین تخم‌گذاری و ژنوتیپ BB بر وزن تخم مرغ اثر معنی داری داشته و ژنوتیپ‌های AA و AB باعث بیشترین مصرف خوراک در طیور نژاد لگهورن شدند.

BstEII – RFLP برای جایگاه PEPCK-C (3)

قطعه تکثیر شده برای ژن PEPCK-C (3) توسط اندونوکلئاز BstEII هضم شد. آنالیز PCR-RFLP هیچ گونه چند شکلی برای ژن PEPCK-C (3) در میان سویه‌های مطالعه شده نشان نداد. به عبارت دیگر این جایگاه (موقعیت ۲۶+ تا ۱۰۳۵+) در همه نمونه‌های مورد بررسی ژنوتیپ وحشی BB را نشان داد (شکل ۳).



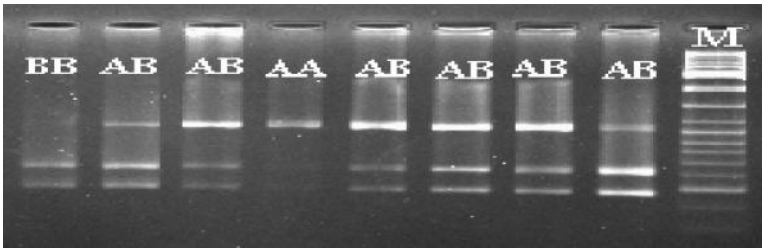
شکل ۳- الکترفورز محصولات حاصل از هضم توسط آنزیم BstEII در جایگاه ژنی PEPCK-C (3). چاهک ۱-۳ مرغ تخم‌گذار، ۴-۶ مرغ گوشتی و ۷-۹ مرغ بومی. ژنوتیپ BB در همه نمونه‌های مورد بررسی مشاهده شد، M خط کش مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.

Figure 3. Electrophoresis of digestion products by BstEII enzyme in PEPCK-C (3) locus. Lane 1-3 layer, 4-6 broiler and 7-8 native fowls. BB genotype observed in all samples. M is the 100bp molecular ruler

چند شکلی ژن PEPCK-C (3) در هیچ کدام از جمعیت‌ها شناسایی نشد و در تطابق با گزارش عمرانی بیدی و همکاران (۱۴) بود که نشان دادند جایگاه PEPCK-C (3) در جمعیت مرغ بومی سیستان هموزیگوت بوده است. اگرچه پارسانژاد و همکاران (۱۷) با توالی یابی DNA از نوکلئوتید ۲۶+ تا ۱۰۳۵+ حضور شش SNP را در ژن PEPCK-C در سویه تجاری لگهورن نشان دادند. بنابراین عدم وقوع چند شکلی مربوط به این جایگاه مارکری در جمعیت مورد بررسی ممکن است به دلیل شدت انتخاب به نفع این ژنوتیپ و یا اندازه کوچک جمعیت باشد.

PstI –RFLP برای جایگاه PEPCK-C (4)

در نتیجه هضم قطعه ۱۰۵۰ جفت بازی (۱۰۱۴+ تا ۲۰۶۹+) با آنزیم برشی PstI سه نوع ژنوتیپ AA، AB و BB مشاهده شد. در صورت وجود جایگاه برش، تیمار آنزیمی دو قطعه به طول‌های ۴۰۵ و ۶۴۵ جفت بازی (آلل A) و در صورت عدم وجود جایگاه برش همان قطعه ۱۰۵۰ جفت بازی (آلل B) ایجاد نمود (شکل ۴).



شکل ۴- الکترفورز محصولات حاصل از هضم توسط آنزیم PstI در جایگاه ژنی PEPCK-C (4).. چاهک ۱ و ۲ مرغ بومی، ۳-۵ مرغ گوشتی و ۶-۸ مرغ تخم‌گذار. M خط کش مولکولی ۱۰۰ جفت بازی

Figure 4. Electrophoresis of digestion products by PstI enzyme in PEPCK-C (4) locus. Lane 1 and 2 native fowls, 3-5 broiler and 6-8 layer. M is the 100bp molecular ruler

توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی حاصل از تیمار آنزیم PstI برای ژن PEPCK-C (4) در جدول ۴ نشان داده شد. فراوانی ژنوتیپ AB در همه سویه‌ها در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر بیشتر و آلل‌های A و B برای جایگاه PstI با فراوانی متوسط حفظ شده‌اند، که احتمالا نشانه‌ای از حضور انتخاب طبیعی یا انتخاب به نفع هتروزیگوت‌ها در این جمعیت‌ها می‌باشد.

جدول ۴- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی ژن PEPCK-C (4) در سه سویه مختلف مرغ

Table 4. The allelic and genotypic frequencies of PEPCK-C (4) in three different strains of chickens

جمعیت	فراوانی ژنوتیپی			فراوانی آللی		سطح احتمال (P- value)		
	AA	AB	BB	A	B	مرغ بومی	مرغ گوشتی	مرغ تخم‌گذار
مرغ بومی	۰/۱۶	۰/۵۴	۰/۰۳	۰/۴۳	۰/۵۷	-----	۰/۱۵۱۷^{ns}	۰/۰۰۰۸**
مرغ گوشتی	۰/۱۸	۰/۶۸	۰/۱۴	۰/۵۲	۰/۴۸	۰/۱۵۱۷^{ns}	-----	۰/۰۵۲۸*
مرغ تخم‌گذار	۰/۰۶	۰/۸۸	۰/۰۶	۰/۵	۰/۵	۰/۰۰۰۸**	۰/۰۵۲۸*	-----

*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ ns: عدم معنی‌داری

عمرانی بیدی و همکاران (۱۴) یک جایگاه برش برای آنزیم AciI (موقعیت ۱۸۰۸+) در اینترون ۲ تا اگزون ۳ این ژن در مرغ بومی سیستان شناسایی کردند. پارسانژاد و همکاران (۱۷) ۳ SNP در همین ناحیه در مرغ لگهورن ردیابی کردند. درحالیکه، امامقلی بگلی و همکاران (۲) عدم وقوع چند شکی توسط اندونوکلئاز AciI در این ناحیه را در مرغان بومی یزد گزارش کردند.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر چند شکلی ژنتیکی در ژن PEPCK-C در نمونه‌های سویه‌های تجاری و مرغ بومی مازندران را نشان داد. 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 آتی در برنامه‌های اصلاح نژادی باشد. از آنجایی که ژن PEPCK-C به‌عنوان ژنی بزرگ و کاندید برای صفات تولیدی مختلفی مانند، مقدار تولید تخم مرغ، ضریب تبدیل غذایی، درصد جوجه درآوردی و رشد در نظر گرفته شد. می‌توان با در دست داشتن رکورد برای صفات تولیدی، تأثیر تنوع ژنی و ژنوتیپی این ژن بر صفات تولیدی را بیشتر مورد بررسی قرار داد.

منابع

1. Cook, J.S., S.L. Weldon, J.P. Garcia-Ruiz and Y. Hod. 1986. Nucleotide sequence of the mRNA encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the chicken. National Academy of Science, 83: 7583-7587.
2. Emamgholi Begli, H., S. Zerehdaran, S. Hassani, M. Ali Abbasi and A.R. Khan Ahmadi. 2010. Polymorphism in prolactin and PEPCK-C genes and its association with economic traits in native fowl of Yazd province. Iranian Journal of Biotechnology, 8: 172-177.
3. Garaber, A.J., F.J. Ballard and R.W. Hanson. 1972. In metabolism and the regulation of metabolic processes in mitochondria (Mehlman M.A. and R.W. Hanson, eds) Academic press. New York, 109-135.
4. Hanson, R. and L. Reshef. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. Annual Review. Journal of Biochemistry, 66: 581-611.
5. Hers, H.G. and L. Hue. 1983. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. Annual Review. Journal of Biochemistry, 52: 617-53.
6. Hod, Y., J.S. Cook, S.L. Weldon, J.M. Short, A. Wynshaw-Boris and R.W. Hanson. 1986. Differential expression of the genes for the mitochondrial and cytosolic forms of phosphoenolpyruvate carboxykinase. Annual. New York. Academic. Science, 478: 31-45.
7. Hod, Y., M.F. Utter and R.W. Hanson. 1982. The mitochondrial and cytosolic forms of avian phosphoenolpyruvate are encoded by different messenger RNA_S. Journal of Biological Chemistry, 257: 13787-13794.
8. Krebs, H.A. 1972. Essays. Biochem, 8: 1-34.
9. Krebs, H.A. and H.L. Kornberg. 1957. Energy transformations in living matter: a survey. Springer- verlag press, Berlin and Heidelberg GmbH Co. KG, Germany, 273 pp.
10. Lamers, W., R.W. Hanson and H. Meisner. 1982. cAMP stimulates transcription of the gene for the gene for cytosolic Phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei. Proceeding of National Academy of Science U.S.A, 79(17): 5137-5141.
11. Miller, S.A., D.D. Dykesand and H.F. Polesky.1988.A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16: 1215.
12. Nelson, D.L. and M.M. Cox. 2009. Lehninger, Principles of Biochemistry. 5rd edn, 1100 pp.
13. Nordlie, R.C. and H.A. Lardy. 1963. Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. Journal of Biological Chemistry, 238: 2259-2265.
14. OmraniBidi, J., M. Alipanah, A. Torkamanzehi, S.A. Hoseini and M.R. Nasiri. 2011. Polymorphism in the PEPCK-C gene of sistan and baluchestan native chicken breeds. Genetics-novin, 4: 39-46 (In Persian).
15. Panserat, S., E. Plagnes-Yuan, J. Breaue and S. KAushik. 2001. Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout. The Journal of Experimental Biology, 204: 359-365.
16. Parsanejad, R., A. Torkamanzehi, D. Zadworny and U. Kuhnlein. 2003. Alleles of cytosolic Phospho-enolpyruvate carboxy-kinase: trait association and interaction with mitochondrial PEPCK in a strain of white leghorn chickens. Journal of Poultry Science, 82: 1708 -1715.
17. Parsanejad, R., D. Zadworny and U. Kuhnlein. 2002. Genetic variability of the cytosolic Phospho-enolpyruvate carboxy-kinase gene in White Leghorn chickens. Journal of Poultry Science, 81: 1668-1670.
18. Sato, A., H. Takahashi, K. Konishi, T. Suzuki and H. Kochi. 1997. Nucleotide sequence of the promoter region of chicken cytosolic phosphoenol- pyruvate carboxykinase gene. Journal of Biochemistry, 121: 711-716.
19. Savon, S., P. Hakimi and R.W. Hanson. 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.
20. Shrago, E., H.A. Lardy, R.C. Nordlie and D.O. Foster. 1963. Metabolic and Hormonal Control of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and Malic Enzyme in Rat liver. Journal of Biological Chemistry, 238(10): 3188-3192.
21. Soling, H.D. and J. Kleineke. 1976. In Gluconeogenesis: Its regulation in mammalian species (R.W. Hanson and M.A. Mehlman, Eds.). wiiey, New York, pp: 369-462.
22. Utter, M.F. and K. Kurahashi. 1954. Purification of Oxalacetic Carboxylase from Chicken Liver. Journal of Biological Chemistry, 207: 787-802.
23. Watford, M., Y. Hod, Y.B. Chiao, M.F. Uttert and R.W. Hanson. 1981. The unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken. Journal of Biological Chemistry, 256: 10023-10027.
24. Weldon, S.L., A. Rendo, A.S. Mathias, Y. Hod P.A. kalonick, S. Sanon and R.W. Hanson. 1990. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase form the chicken: comparison of the cDNA and protein sequences whit the cytosolic isozyme. Journal of Biological Chemistry, 265: 7308-7317.

Analysis of Genetic Polymorphisms in Four Marker Sites of PEPCK-C Gene in Different Strains of Chickens

Zohreh Yousefi[1], Ghodrat Rahimi Mianji[2] and Zarbakht Ansari Pirsaraei[3]

1- M.Sc. Student Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (Corresponding author: yosefi_2004@yahoo.com)
2 and 3- Professor and Associate Professor Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
Received: July 2, 2015 Accepted: October 21, 2015

Abstract

This research was carried out in order to detect the polymorphisms in four sites of PEPCK-C gene by PCR-RFLP method in a commercial layer and broiler strains and breeder hens of Mazandaran native fowls breeding station. Blood samples were collected randomly from 150 birds from a three populations and DNA was extracted using modified salting out method. Using polymerase chain reaction (PCR) and specific primers pairs a region with the length of 3792 bp from position -1723 to exon 4 from PEPCK-C gene was amplified. In RsaI marker site two alleles of A (33%) and B (67%) were detected in Mazandaran native fowls, A (34%), B (66%) in commercial broiler and A (24%) and B (76%) in commercial layer population. Two genotypes of AB and BB were detected with the frequency of 66 and 34% in Mazandaran native fowls 68 and 32% in commercial broiler and 48 and 52% in commercial layer hens. In BstEII marker site two alleles of A (28%) and B (72%) were detected in Mazandaran native fowls population, A (19%), B (81%) in commercial broiler and A (59%) and B (41%) in commercial layer lines. Three genotypes of AA, AB and BB were detected with the frequency of 2, 52 and 46 in Mazandaran native fowls, 2, 34 and 64% in commercial broiler and 42, 34 and 24% commercial layer. In PstI marker site two alleles of A (43%) and B (57%) were detected in Mazandaran native fowls population, A (52%), B (48%) in commercial broiler and A and B (50%) in commercial layer samples. Three genotypes of AA, AB and BB were detected with the frequency of 16, 54 and 30% in Mazandaran native fowls, 18, 68 and 14% in commercial broiler and 6, 88 and 6% in commercial layer population. In BstEII marker site (position +26 to +1035) the results showed that all samples from different strains had the same banding pattern with monomorphic BB genotype. Among 3 observed SNPs 2 were in the promoter site and 1 in intron 2 region. As a result of finding polymorphism in this marker site and also its major effect on production traits such as egg for production, feed conversion ratio and growth rate it can be considered as a candidate gene in detection of QTL related to these traits in poultry industry.

Keywords: Polymorphism, PEPCK-C, Chicken, PCR-RFLP