بررسی چندشکلی ژن IGF-1 و ارتباط آن با صفات کیفیت لاشه در بلدرچین ژاپنی (*Coturnix japonica*)

- **مجتبی طهمورث‌پور:** گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی، مشهد، صندوق پستی: **91775-1163**
- **حسین عطارچی*:** گروه علوم دامی، پردیس بین الملل دانشگاه فردوسی، مشهد، صندوق پستی: **64955**
- **مجتبی آهنی‌آذری:** دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: **15739-49138**
- **محمدرضا نصیری:** گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی، مشهد، صندوق پستی: **91775-1163**

تاریخ دریافت: بهمن 1392 تاریخ پذیرش: اردیبهشت 1393

چکیده

پژوهش حاضر با هدف مطالعه چندشکلی ناحیه 5 ژن IGF-I و ارتباط آن با صفات کیفیت لاشه شامل PH، رنگ گوشت، ظرفیت نگه‌داری آب و چربی داخل عضله‌ای در بلدرچین ژاپنی انجام شد. برای این منظور تعداد 100 قطعه بلدرچین ژاپنی که در شرایط یکسان پرورش داده شدند در سن 5 هفتگی کشتار شده و صفات کیفیت لاشه اندازه‌گیری و ثبت شد. همچنین قبل از کشتار از پرندگان نمونه خون تهیه و استخراج DNA از نمونه‌ها با کیت دیاتوم صورت گرفت. سپس با استفاده از روش PCR-RFLP و آنزیم برشی PST-I قطعه 621 جفت بازی از ناحیه مورد نظر، تکثیر و برش داده شد. در مجموع در بلدرچین‌های مورد مطالعه سه ژنوتیپ AA ، AB و BB به‌ترتیب با فراوانی‌های 41، 35 و 24 درصد به‌دست آمد. فراوانی آلل‌های A و B نیز به‌ترتیب 58/5 و 41/5 درصد بود. بررسی تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون کای مربع نشان داد که جمعیت مورد مطالعه در جایگاه ژنی مورد نظر در تعادل نیست. تجزیه و تحلیل داده‌های فنوتیپی نشان داد که ژنوتیپ‌های ژن IGF-I در جایگاه مورد نظر با صفت چربی داخل عضله‌ای ارتباط معنی‌داری دارد. براساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که ژن IGF-I می‌تواند به‌عنوان ژن کاندید برای صفات کیفیت لاشه در برنامه‌های اصلاح نژادی بلدرچین ژاپنی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: IGF-I، چندشکلی، کیفیت لاشه، بلدرچین

مقدمه

بلدرچین با داشتن اکثر خصوصیات مناسب مثل رشد سریع، بلوغ زودرس، تولید بالای تخم، فاصله کوتاه ایجاد نسل، بالا بودن تراکم پرورش در واحد سطح، مقاومت به بسیاری از بیماری‌های متداول جوجه‌های گوشتی، کیفیت بالای گوشت و تخم، قیمت بالای تولیدات، هزینه کم مواد غذایی و بازگشت سریع سرمایه به‌عنوان پرنده‌ای با ارزش و اقتصادی شناخته شده و هم اکنون در بسیاری از کشورهای جهان پرورش داده می‌شود (بنی‌اسدی، 1374).

گوشت بلدرچین به‌دلیل طعم مطبوع و داشتن کلسترول بسیار کم، طرفداران زیادی را به‌خود جلب نموده است (دیانی، 1376). امروزه کیفیت لاشه و بازارپسند بودن آن مورد توجه تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان می‌باشد و روز به روز بر اهمیت آن در بازارهای جهانی افزوده می شود. کیفیت گوشت طیور را می‌توان با شاخص‌هایی مانند pH،

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: hossein.attarchi@gmail.com

رنگ گوشت، ظرفیت نگه‌داری آب و چربی داخل عضله‌ای سنجید. pH گوشت خام از حدود 5/7 تا بیش از 7/2 متغیر است که به مقدار گلیکوژن موجود به هنگام ذبح و تغییرات بعد از آن وابسته است. pH بالاتر، رشد میکروب‌ها را افزایش می‌دهد و pH پایین‌تر رشد آن‌ها را کندتر می‌کند (پرهیزگار، 1388).

رنگ گوشت معمولاً به‌وسیله سه شاخص روشنی، زردی و قرمزی توصیف می‌شود. گوشت‌های تیره به‌دلیل اسیدیته کم‌تر به فساد باکتریایی در شرایط نگه‌داری در یخچال حساس‌تر از گوشت‌های روشن هستند درحالی‌که اسیدیته گوشت‌های روشن فعالیت آن‌ها را به‌طور موثری کنترل می‌کند (Allen و همکاران، 1997). ظرفیت نگه‌داری آب در گوشت هرچه بیشتر باشد، کیفیت گوشت در زمان نگه‌داری افزایش یافته و طعم، مزه و خصوصیات تغذیه‌ای آن بیشتر حفظ می‌شود (Huff-langeran، 2002). چربی داخل عضله‌ای نیز هرچه بیشتر باشد گوشت از کیفیت بالاتری برخوردار است (Le-Bihan-Duval و همکاران، 2008).

این صفات مهم اقتصادی توسط تعداد زیادی ژن که اثر برخی از آن‌ها زیاد و اثر برخی دیگر کم می‌باشد کنترل می‌شوند. مدل ژن عمده پیشنهاد می‌کند تعداد کمی ژن می‌تواند سهم عمده‌ای از تنوع ژنتیکی را به‌خود اختصاص دهد. پیشرفت‌های اخیر در ژنتیک مولکولی امکان شناسایی و تعیین توالی این ژن‌ها را فراهم نموده است (Falconer و Mckay، 1996). هم‌چنین پیشرفت‌های ژنتیکی در طول دهه‌های اخیر، بهبود قابل توجهی را در عملکرد طیور ایجاد نموده است (Havenstein و همکاران، 2003).

عملکرد هورمون رشد به‌واسطه هورمون فاکتورهای رشد شبه انسولین (IGF) در طیور انجام می‌گیرد. هورمون‌های IGF تنظیم‌کننده‌های مهمی در تحریک رشد، سنتز پروتئین و تکثیر و تمایز سلول‌ها در انواع سلول‌های مختلف محسوب می‌شوند (Scanes و همکاران، 1999).

ژن IGF-I یکی از مهم‌ترین ژن‌هایی است که در رشد و توسعه بافت‌های بدن حیوانات نقش دارد (Scanes و همکاران، 1984). تحقیقات نشان داده که هورمون IGF-I رشد بدن و عضلات را در طیور تنظیم می‌کند (Duclos و همکاران، 1999). اگرچه روش انتخاب مرسوم براساس ارزش‌های فنوتیپی طیور به‌طور قابل توجهی سرعت رشد و تولید گوشت را در چند دهه گذشته افزایش داده است ولی به‌دلیل آن‌که انتخاب فنوتیپ برتر همواره به معنای انتخاب ژنوتیپ برتر نیست و بسته به میزان دخالت واریانس محیطی در واریانس فنوتیپی، اختلاف بین فنوتیپ و ژنوتیپ وجود خواهد داشت، دقت انتخاب کاهش می‌یابد (Burt و همکاران، 1995).

از سوی دیگر انتخاب براساس ارزش‌های فنوتیپی برای صفات کیفیت گوشت قبل از کشتار امکان‌پذیر نمی‌باشد، لذا امروزه انتخاب به‌کمک نشانگرهای مولکولی برای افزایش بازده انتخاب و بهبود عملکرد تولیدی مدنظر می‌باشد و تلفیقی از روش‌های مرسوم انتخاب و روش‌های جدید مولکولی در آینده اصلاح نژاد طیور ترجیح داده خواهد شد (Emara و Kim، 2003). نشانگر RFLP با توجه به تکرارپذیری و دقت بالای آن قادر به تشخیص چندشکلی در هر جایگاهی از ژنوم می‌باشد (نقوی و همکاران، 1388).

هدف از پژوهش حاضر، شناسایی چندشکلی موجود در ناحیه 5□ ژن IGF-I و برآورد میزان فراوانی الگوهای ژنوتیپی مختلف این جایگاه و بررسی رابطه بین چندشکلی این الگوهای ژنوتیپی با صفات کیفیت لاشه در بلدرچین‌های ژاپنی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از 100 قطعه بلدرچین ژاپنی که در شرایط

یکسان پرورش داده شدند، استفاده گردید و همگی در سن 5 هفتگی کشتار شده و نمونه‌های گوشت عضله سینه آن‌ها به‌مدت 10 روز در فریزر با دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد و بعد از انجمادزدایی در دمای محیط، صفات مربوط به کیفیت لاشه شامل pH، رنگ گوشت، ظرفیت نگه‌داری آب و چربی داخل عضله‌ای اندازه‌گیری و ثبت گردید. برای تعیین pH گوشت از دستگاه pH متر بافتی استفاده شد. رنگ گوشت (روشنی) با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج مدل Lavibond cam system 500 تعیین شد. ظرفیت نگه‌داری آب با اندازه‌گیری وزن نمونه گوشت قبل و بعد از سانتریفیوژ به‌مدت 4 دقیقه با سرعت 1500 دور در دقیقه و سپس قرار دادن آن در آون به‌مدت 24 ساعت در دمای 70 درجه سانتی‌گراد و مجدد وزن‌کشی آن، با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری چربی داخل عضله‌ای از دستگاه سوکسله استفاده شد.

همچنین قبل از کشتار، از تمام پرندگان به‌مقدار 2 میلی‌لیتر خون از سیاهرگ گردنی، در تیوب‌های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA گرفته شد و نمونه‌های خون اخذ شده تا زمان استخراج DNA در فریزر در دمای c 20□- نگه‌داری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت دیاتوم 100 شرکت ژن فن آوران و براساس دستور کار شرکت سازنده انجام شد. برای تعیین کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد. برای تکثیر DNA در این تحقیق از دستگاه ترموسایکلر مدل Personal Cycler ™ شرکت بیومترا استفاده شد و جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از مستر کیت شرکت سیناژن استفاده شد.

به‌منظور تکثیر یک قطعه 621 جفت بازی از ناحیه 5□ ژن IGF-I از آغازگرهای پیشنهاد شده توسط Li و همکاران (2009) استفاده شد که توالی آن‌ها به‌صورت زیر است:
F: 5´-GACTATACAGAAAGAACCCAC-3´ و R: 5´-TATCACTCAAGTGGCTCAAGT-3´ که پس از آزمایش غلظت‌های مختلف اجزا PCR، شرایط بهینه PCR با حجم نهایی 12 میکرولیتر شامل 6 میکرولیتر Master، آغازگرها هرکدام 1/5 میکرولیتر با غلظت 10 پیکومول بر میکرولیتر، 1/5 میکرولیتر DNA با غلظت 50 تا 100 نانوگرم در میکرولیتر و 1/5 میکرولیتر آب مقطر استفاده شد.

تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله ابتدایی واسرشته‌سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 5 دقیقه و 35 چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 60 ثانیه، دمای اتصال آغازگرها 56 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 70 ثانیه و دمای تکثیر 72 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 70 ثانیه و یک دمای تکثیر نهایی 72 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 10 دقیقه انجام شد. پس از تکثیر جایگاه مورد نظر، قطعه 621 جفت بازی حاصل شد. عمل هضم آنزیمی با حجم 12 میکرولیتر با استفاده از آنزیم برشی PST-I در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و برای 16 ساعت بر روی محصول PCR انجام شد.

برای مشاهده قطعات هضم شده و تعیین ژنوتیپ از ژل پلی اکریل آمید 8 درصد و ولتاژ 180 به‌مدت 5 ساعت استفاده شد و رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از روش نیترات نقره صورت گرفت.

برای محاسبه فراوانی آلل‌ها، ژنوتیپ‌ها و آزمون کای مربع از نرم‌افزار Popgene 32 استفاده گردید. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از مدل آماری زیر در نرم‌افزار آماری SAS 9/12 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

$$y_{ij}=M+Genotype_i+Sex_j+e_{ij}$$

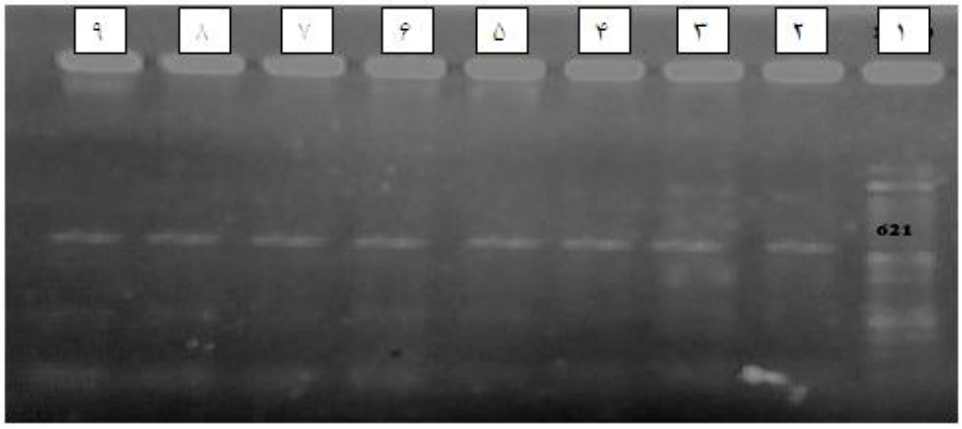
که در این مدل y_{ij}: ارزش فنوتیپی صفات مورد مطالعه، M: میانگین ارزش‌های فنوتیپی صفات و

e_{ij}: اثر باقی‌مانده می‌باشد. عوامل ژنوتیپ (Genotype) و جنس (Sex) به‌عنوان اثرات ثابت در مدل وارد گردیدند. آنالیز واریانس با رویه GLM و مقایسه بین میانگین‌ها با آزمون توکی مورد بررسی قرار گرفت.

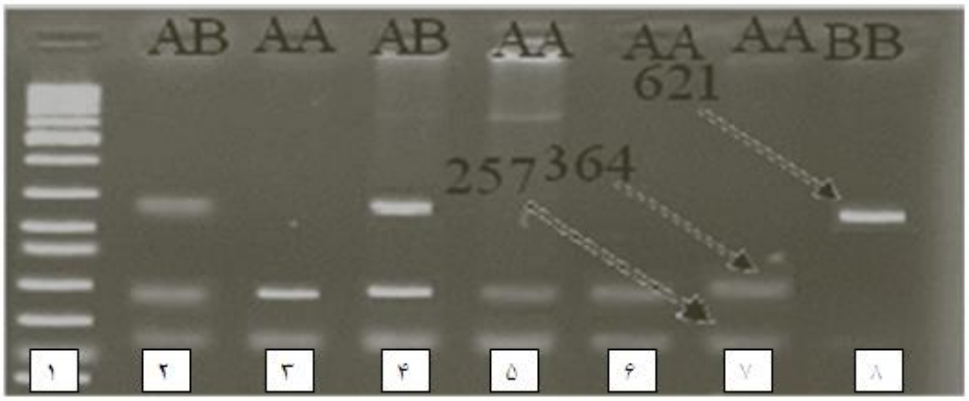
نتایج

طی واکنش PCR، قطعه 621 جفت بازی ناحیه 5 ژن IGF-I تکثیر شد (شکل 1). با استفاده از روش PCR-RFLP هضم محصول مذکور با آنزیم PST-I باعث ایجاد دو قطعه برش خورده 364 و 257 جفت باز برای ژنوتیپ هموزیگوت AA، یک قطع برش نیافته 621 جفت باز برای ژنوتیپ هموزیگوت BB و سه قطعه 621، 364 و 257 جفت باز برای ژنوتیپ هتروزیگوت AB گردید (شکل 2). در این تحقیق سه ژنوتیپ AA، AB و BB شناسایی شدند که به‌ترتیب دارای فراوانی‌های 41، 35 و 24 درصد بودند و فراوانی آلل‌های A و B به‌ترتیب 58/5 و 41/5 درصد بود. بررسی تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون کای مربع نشان داد که جمعیت مورد مطالعه در جایگاه ژنی مورد نظر در تعادل نمی‌باشد. در این تحقیق میزان متوسط pH، ظرفیت نگه‌داری آب، روشنی گوشت و چربی داخل عضله‌ای در عضله سینه بلدرچین ژاپنی به‌ترتیب 6/47، 45/35 درصد، 64/72 و 1/2 درصد به‌دست آمد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ژنوتیپ و جنس روی صفت چربی درون ماهیچه‌ای معنی‌دار است ($p<0/05$).

اما بین سایر صفات کیفیت لاشه شامل pH، رنگ گوشت و ظرفیت نگه‌داری آب با ژنوتیپ‌ها و جنس ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد ($p<0/05$). مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی نشان داد که بین ژنوتیپ‌های AA و AB با ژنوتیپ BB اختلاف معنی‌داری برای صفت چربی درون ماهیچه‌ای وجود دارد و بین ژنوتیپ AA با AB برای این صفت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p<0/05$). بلدرچین‌های با ژنوتیپ AB دارای بیشترین میانگین برای صفت چربی درون ماهیچه‌ای بودند و کم‌ترین میانگین برای صفت مذکور مربوط به بلدرچین‌های با ژنوتیپ BB بود (جدول 1).



شکل 1: قطعات 621 جفت بازی تکثیر شده به‌وسیله PCR
شماره **1** نشانگر مولکولی**100** جفت بازی، شماره‌های **2** تا **9** محصولات **PCR**



شکل 2: الگوهای RFLP حاصل از برش با آنزیم PST-I
شماره **1** نشانگر مولکولی**100** جفت بازی، شماره‌های **3**، **5**، **6** و **7** ژنوتیپ **AA**، شماره‌های **2** و **4** ژنوتیپ **AB** و شماره **8** ژنوتیپ **BB**

جدول 1: مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های مختلف ناحیه 5 ژن IGF-I برای صفات کیفیت لاشه (میانگین ± انحراف معیار) در بلدرچین ژاپنی

صفت	ژنوتیپ		
	AA	AB	BB
pH	6/53 ± 0/26	6/40 ± 0/32	6/48 ± 0/21
رنگ گوشت (روشنی)	64/98 ± 2/86	64/05 ± 2/29	65/13 ± 2/36
ظرفیت نگه‌داری آب	45/17 ± 1/38	45/93 ± 1/05	44/96 ± 1/47
چربی داخل عضله‌ای	1/32 ± 0/18 [a]	1/33 ± 0/22 [a]	./94 ± 0/16 [b]

حروف انگلیسی متفاوت نمایانگر وجود معنی‌داری می‌باشد ($p<0/05$).

بحث

در تحقیق حاضر بر روی جایگاه ژنی مورد نظر دو الگوی هضمی مختلف مشاهده شد که بیشترین فراوانی ژنوتیپی آن مربوط به ژنوتیپ AA و کم‌ترین مربوط به ژنوتیپ BB بود و هم‌چنین بیشترین فراوانی آللی آن مربوط به آلل A و کم‌ترین مربوط به آلل B است که با نتایج تحقیقات صورت گرفته توسط Li و همکاران (2009) بر روی جوجه‌های گوشتی و تخم‌گذار مطابقت دارد.

عدم تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه، احتمالاً ناشی از کوچک بودن اندازه جمعیت مورد بررسی و یا سایر عوامل برهم زننده تعادل مانند انتخاب به‌دلیل اجرای برنامه‌های اصلاحی برای این پرندگان می‌باشد.

Genchev و همکاران (2010) میزان متوسط pH در عضله سینه بلدرچین ژاپنی را 6/1، میزان متوسط ظرفیت نگه‌داری آب در عضله سینه بلدرچین ژاپنی را 20/14 درصد و میزان متوسط روشنی گوشت بلدرچین ژاپنی را 44/32 گزارش نمودند.

چربی داخل عضله‌ای در مطالعه Genchev و همکاران (2005) در بلدرچین ژاپنی 49/. درصد گزارش شد. تفاوت در مقادیر به‌دست آمده تحقیق حاضر و مطالعه موجود در بلدرچین ژاپنی ممکن است به‌دلیل تفاوت در سویه بلدرچین، شرایط پرورش، سن کشتار، زمان اندازه-

گیری صفات پس از کشتار و دستگاه-های مورد اندازه‌گیری باشد.

Lamont و همکاران (2005)، در تحقیقی که بر روی جوجه گوشتی انجام دادند، ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ژن IGF-I با صفت چربی درون ماهیچه‌ای به‌دست آوردند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که چندشکلی ناحیه 5□ ژن IGF-I با برخی صفات کیفیت لاشه در بلدرچین ژاپنی ارتباط معنی‌داری دارد. لذا انتخاب به‌کمک نشانگر می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مطلوب برای بهبود برنامه‌های اصلاح نژادی مورد توجه قرار گیرد. بنابراین می‌توان با استفاده اطلاعات به‌دست آمده از جایگاه فوق در شاخص‌های بهینه انتخاب، ضمن افزایش صحت انتخاب، پیشرفت ژنتیکی و پاسخ به انتخاب را برای صفات مذکور افزایش داد.

منابع

1. **بنی‌اسدی، م.، 1374.** بلدرچین و تغذیه آن. مجله تغذیه دام و طیور. شماره 14، صفحات 36 تا 39.
2. **پرهیزگار، س.، 1388.** کیفیت گوشت طیور و عوامل موثر بر آن. ماهنامه صنعت خوراک دام، طیور و آبزیان. شماره 35، صفحات 11 تا 12.
3. **دیانی، ا.، 1376.** پرندگان خاورمیانه و خاور نزدیک. جلد اول. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران. 184 صفحه.
4. **نقوی، م.؛ قره‌یاضی، ب. و حسینی-سالکده، ق.، 1388.** نشانگرهای مولکولی. چاپ سوم، انتشارات دانشگاه تهران. 360 صفحه.
5. **Allen, C.D.; Russell, S.M. and Fletcher, D.L., 1997.** The relationship of broiler breast meat color and PH to shelf-life and odor development. Poultry Science. Vol. 76, pp: 1042-1046.
6. **Burt, D.W.; Dey, B.R.; Paton, I.R.; Morrice, D.R. and Law, A.S., 1995.** The chicken transforming growth factor-beta 3 gene: genomic structure, transcriptional analysis, and chromosomal location. DNA Cell Biology. Vol. 14, pp: 111-123.
7. **Duclos, M.; Beccavin, C. and Simon, J., 1999.** Genetic models for the study of insulin-like growth factors and muscle development in birds compared to mammals. Domestic Animal Endocrinology. Vol. 17, No. 2-3, pp: 231-243.
8. **Emara, M.G. and Kim, H., 2003.** Genetic markers and their application in poultry breeding. Poultry Science. Vol. 82, pp: 952-957.
9. **Falconer, D.S. and Mckay, T.F.C., 1996.** Introduction to quantitative genetics. 4th ed. Longman Sel., Harlow, UK. 218 p.
10. **Genchev, A.G.; Ribarski, S.S.; Afanasjev, G.D. and Blohin, G.I., 2005.** Fattening capacities and meat quality of Japanese quails of Pharaon and White English breeds. Central European Agriculture. Vol. 4, No. 6, pp: 501-505.
11. **Genchev, A.G.; Ribarski, S.S. and Zhelyazkov, G., 2010.** Physicochemical and technological properties of Japanese quail meat. Trakia Journal of Sciences. Vol. 8, pp: 86-94.
12. **Havenstein, G.B.; Ferket, P.R. and Qureshi, M.A., 2003.** Growth, livability and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. Poultry Science. Vol. 82, pp: 1500-1508.
13. **Huff-langeran, E., 2002.** Water holding capacity of fresh meat. Amreican Meat Science Association, National Pork Board. pp: 1-8.
14. **Lamont, S.J.; Zhou, H.; Mitchell, A.D. and Mcmurtry, J.P., 2005.** Insulin-Like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity and metabolic traits in chickens. Poultry Science. Vol. 84, pp: 212-219.
15. **Le-Bihan-Duval, E.; Debut, M.; Berri, C.M.; Sellier, N.; Sante-Lhoutellier, V.; Jego, Y. and Beaumont, C., 2008.** Chicken meat quality: Genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. BMC Genetics. Vol. 9, pp: 1471-1477.
16. **Li, W.; Li, F. and Li, D., 2009.** IGF-I gene polymorphism and weight-related analysis. International Journal of Biology. Vol. 1, No. 2, pp: 113-118.
17. **Scanes, C.; Harvey, S.; Marsh, J. and King, D., 1984.** Hormones and growth in poultry. Poultry Science. Vol. 10, pp: 2062-2074.
18. **Scanes, C.; Proudman, J.A. and Radecki, S.V., 1999.** Influence of continuous growth hormone insulin-like growth factor I administration in adult female chickens. General and Comparative Endocrinology. Vol. 114, pp: 315-323.