بررسی چندشکلی ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 و ارتباط آن با صفات رشد در غاز بومی ایران

مهسا اکبری[۱]، مختار غفاری[۲*]، علی هاشمی[۳] و قربان الیاسی‌زرین‌قبایی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۸

چکیده

هدف از این تحقیق، مطالعه‌ی چندشکلی در ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 و ارتباط آن با صفات رشد در غاز بومی ایران با روش PCR-SSCP می‌باشد. برای این منظور در این پژوهش از ۱۶۰ قطعه غاز مرکز اصلاح نژاد آذربایجان شرقی، واقع در شهرستان ملکان خون‌گیری انجام شد. برای استخراج DNA از روش بایلس استفاده گردید و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر قطعه‌ی ۲۴۱ جفت بازی ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 انجام گرفت. روش تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) جهت شناسایی چندشکلی در نمونه‌ها به کار برده شد. الکتروفورز عمودی نمونه‌ها روی ژل آکریلامید ۸ درصد به مدت ۱۸ ساعت و با اختلاف پتانسیل ۱۲۰ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره انجام گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که ناحیه‌ی مورد بررسی این ژن چندشکل است که در نتیجه آن الگوهای ژنوتیپی ۴،۳،۲،۱ به ترتیب با فراوانی ۰/۳۱۲، ۰/۳۶۴، ۰/۰۷۰، ۰/۲۵۴ درصد مشاهده شد. آنالیز واریانس صفات با استفاده از نرم‌افزار SAS رویه GLM انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، بین جنس‌های مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و همچنین بین الگوهای مشاهده شده با وزن بدن در ۳۰ روزگی اختلاف معنی‌داری یافت شد، ولی بین این الگوها و وزن بدن در ۶۰، ۹۰ و ۱۵۰ روزگی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: چندشکلی، ژن، غاز، صفات رشد، نشان‌گر، ایران

مقدمه

غازها گونه‌ای از پرندگان متعلق به خانواده‌ی آناتید، زیر خانواده‌ی آنسرین و دسته‌ی غازها هستند. دارای خصوصیات سرعت رشد بالا، پایین بودن هزینه‌های بهداشتی به دلیل مقاومت بسیار زیاد به بیماری‌ها، تولید محصول ارگانیک به دلیل عدم استفاده از دارو و واکسن در پرورش، چند منظوره بودن پرورش این پرنده به دلیل تولید گوشت، تخم، پر و کرک از مزایای این پرنده می‌باشد. نژادهای بومی از سرمایه‌های ملی هستند و نگهداری آن‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. با بررسی منابع ژنی و کاربرد روش‌های نوین حفظ و ازدیاد نژادهای بومی برتر، درآمد حاصل از آن‌ها بیش‌تر خواهد شد. استراتژی‌های موجود در برنامه‌های پرورش طیور تجاری با هدف افزایش راندمان غذایی، سرعت رشد، وزن بدن همراه است (Barker 1994). در سال‌های اخیر با وارد شدن روش‌های مولکولی از جمله استفاده از استراتژی ژن‌های کاندید در تحقیقات اصلاح نژادی به نظر می‌رسد که تغییرات بنیادی در علم اصلاح نژاد به وقوع پیوسته است. تنوع ژنتیکی ماده‌ی اصلی اصلاح‌گر دام است و کمبود یا فقدان این تنوع قدرت انتخاب‌های ژنتیکی را کاهش می‌دهد (Barker 1994). البته در حال حاضر

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۲*] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه E-mail: m.ghaffari@urmia.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۳] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۴] مربی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی، تبریز

ژن‌های عمده و مؤثر روی صفات کمی و تغییرات مورفولوژیکی آن‌ها در طیور به تأیید رسیده و بر روی ژنوم نقشه‌یابی شده است. بیش‌تر صفات اقتصادی در حیوانات اهلی به عنوان صفات کمی شناخته شده‌اند که تحت تأثیر تعداد بسیار زیادی ژن قرار دارند، اما تحقیقات اخیر نشان داده است که این صفات تحت کنترل تعدادی ژن‌های اصلی و ژن‌های بزرگ اثر می‌باشد که شناسایی آن‌ها در حیوانات مزرعه‌ای از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. اگر پیوستگی این ژن‌ها و مارکرهای مولکولی وجود داشته باشد، می‌توانند باهم به نسل بعد منتقل شوند، در این صورت می‌توان از این مارکرهای مولکولی جهت کشف ژن‌های عمده استفاده کرد. از جمله این ژن‌ها می‌توان ژن Pit-1 را که مرتبط با صفات رشد است اشاره کرد (Moody et al. 1995). ژن Pit-1 در پستانداران شامل ۶ اگزون و ۵ اینترون می‌باشد و در پرندگان و ماهی‌ها دارای ۷ اگزون و ۶ اینترون می‌باشد که یک پروتئین ۳۳-۳۱ کیلو دالتونی را بیان می‌کند (Haugen et al. 1993). ژن Pit-1 بر روی کروموزم شماره ۱ مرغ قرار دارد و دارای ۱۴Kb طول است (Nie et al. 2008). mRNA ژن pit-1 در همه‌ی سلول‌های هیپوفیزی وجود دارد، ولی به طور عمده پروتئین این ژن در سه سلول سوماتوتروپین، لاکتوتروپین و تیروتروپین از هیپوفیز قدامی بیان می‌شود که به ترتیب باعث بیان GH، PRL و TSH می‌شوند (Sornson et al. 1996, Tatsumi 1992). سه شکل مختلف این ژن Pit-1، Pit-1β و Pit-1ω، به ترتیب دارای ۳۳۵، ۳۶۳ و ۳۲۷ آمینواسیدی هستند (Van et al. 2000). ژن Pit-1 ماکیان برای اولین بار توسط Tanaka و همکاران در سال ۱۹۹۹ شناسایی شد. از وظایف این ژن تنظیم توسعه‌ی هیپوفیز قدامی (Li et al. 1990) و تکثیر سلول‌های هیپوفیز (Castrillo et al. 1991) و خاموش یا به تأخیر انداختن تولید آدرنالین در انسان را بر عهده دارد (Taha et al. 2005). هفت اگزون در ژن Pit-1 مرغ وجود دارد و گزارش شده است که وجود موتاسیون در این اگزون‌ها باعث هیپوپلازیای غده‌ی هیپوفیز و کمبود هورمون رشد، پرولاکتین و هورمون محرک تیروئید می‌شود (Araskog 1997). گزارش شده است که تغییر در ژن Pit-1 با صفات رشد، خصوصیات لاشه، صفات تولیدی و اسیدهای چرب در حیوانات مزرعه‌ای مرتبط می‌باشد (Brunsch et al. 2002, Jiang et al. 2004, Song et al. 2005). Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۱ ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 را در سه نژاد غاز بومی چین یک SNP (C-930T) گزارش کردند. Cheng و همکاران در سال ۲۰۰۹ تنوع ژنتیکی ژن Pit-1 را در پنج نژاد غاز بومی چین و یک نژاد غاز غربی فرانسه با استفاده از PCR-SSCP چندشکل گزارش کردند. برخی محققان نواحی اگزون یک، دو، سه و چهار ژن Pit-1 را در مرغ چندشکل گزارش کردند (Bhattacharya et al. 2011). برخی مطالعات دیگر وجود چند شکلی در نواحی اینترون دو، پنج و اگزون شش ژن Pit-1 را در مرغ را تأیید می‌نمایند (Nei et al. 2008). اثرات این ژن در حیواناتی مانند گاو و گوسفند بیش‌تر بررسی شده ولی اطلاعات در مورد عملکرد این ژن در طیور از جمله غاز بسیار محدود است. ویژگی‌های چندشکلی در ژن Pit-1 ممکن است برای کمک به طراحی سریع و آسان انتخاب به کمک نشان‌گرها در پرورش تجاری طیور مفید واقع شود. غاز به عنوان گونه‌ی مهمی از پرندگان است که گوشت آن یک منبع پروتئینی در رژیم غذایی انسان به شمار می‌رود. وجود چند شکلی در ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 و ارتباط آن با صفات رشد به طور محدود بررسی شده است، از این رو، هدف این تحقیق شناسایی چندشکلی ناحیه‌ی 5-Flanking از ژن Pit-1 در غاز بومی ایران با استفاده از روش چند شکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR-SSCP) و همچنین تعیین فراوانی الگوهای مشاهده شده و ارتباط الگوهای مشاهده شده با صفات رشد در غاز بومی کشور می‌باشد.

مواد و روش کار

برای انجام این تحقیق از ۱۶۰ قطعه غاز گله تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی (ایستگاه تحقیقاتی غاز ملکان) از هر دو جنس نر و ماده (۱۰۲ قطعه ماده غاز و ۵۸ قطعه غاز نر) از ناحیه‌ی ورید زیر بال خون‌گیری انجام گردید. برای انجام خون‌گیری از میکروتیوب‌های استریل ۱/۵ میکرولیتر، حاوی ماده ضد انعقادی EDTA استفاده گردید، بعد از اتمام خون‌گیری لوله‌های حاوی خون تا زمان انتقال به آزمایشگاه ژنتیک و اصلاح نژاد گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه، در فلاسک حاوی یخ نگهداری شدند و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. اطلاعات مربوط به صفات رشد شامل، وزن‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۵۰ روزگی از مرکز تحقیقاتی اخذ گردید.

در این پژوهش برای استخراج DNA از روش ارائه شده توسط بایلس و همکاران استفاده گردید (Bailes et al. 2007). DNA استخراجی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌های بعدی، نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به وسیله‌ی روش الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد و اسپکتوفتومتری (Thermo, NanoDrop 1000) تعیین گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر قطعه‌ی ۲۴۱ جفت بازی ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 انجام شد. برای این منظور توالی آغازگرهای از مطالعه‌ی Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۱ اقتباس گردید (با شماره ثبت توالی JX051832.1 در پایگاه اطلاعاتی NCBI) و اختصاصی بودن آن‌ها از سایت (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ tools/primer-blast/) توسط نرم‌افزار Primer-Blast بررسی شد، که توالی پرایمرهای مورد استفاده عبارتند از:

Pit-1 F: 5′–CTTAAACCAAGAGTATCGT-3′

Pit-1 R: 5′-AACAGAATGACTTTGGAAC-3′

واکنش PCR در حجم نهایی به میزان ۲۵ میکرولیتر شامل (۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰- ۱۰۰ نانوگرم، ۰/۵۰ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۰/۲ میکرومولار، ۱۵/۹۰ میکرولیتر H_2O، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، نیم واحد آنزیم Taq پلی‌مراز، ۲/۵۰ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰x، ۱/۵۰ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول) تهیه گردید. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از سیستم گرادیانت دستگاه ترموسایکلر، برنامه‌های دمایی مختلفی به صورت آزمون و خطا مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت برنامه‌ی دمایی زیر بهینه-سازی و مورد استفاده قرار گرفت.

واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۸ چرخه شامل واسرشته-سازی در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر ۴۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سرانجام بسط نهایی آغازگر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بهینه شدند، به منظور تشخیص محصولات PCR از الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد با رنگ‌آمیزی DNA Safe Stain (محصول شرکت سینا کلون) استفاده گردید، الکتروفورز افقی به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۸۰ ولت در دمای اتاق انجام گردید.

برای تجزیه‌ی محصولات PCR به وسیله‌ی SSCP، ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۰ میکرولیتر از بافر SSCP (فرمامید ۹۸ درصد، برموفنل بلو ۰/۰۲۵ درصد، گزیلن سیانول ۰/۰۲۵ درصد، EDTA ۱۰ میلی‌مول بر لیتر، گلیسرول ۱۰ درصد) مخلوط گردید و به مدت ۱۵دقیقه با دمای ۹۵ درجه‌ی در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد، سپس نمونه‌ها به سرعت در داخل یخ قرار داده شدند تا از به هم چسبیدن دوباره رشته‌ها ممانعت به عمل آید. به منظور مشاهده ژنوتیپ‌ها از الکتروفورز عمودی ساخت شرکت فناوران سهندآذر تبریز استفاده شد که محصولات

PCR تک رشته‌ای به مدت ۱۸ ساعت با ولتاژ ۱۲۰ بر روی ژل اکریل آمید ۸ ٪/۰ الکتروفورز و با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند.

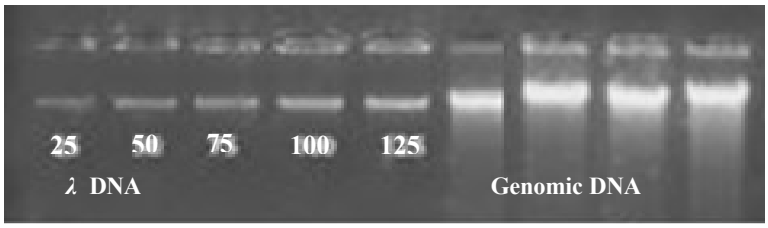
ارتباط بین چندشکلی الگوهای مشاهده شده برای ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 با صفت رشد شامل ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۵۰ روزگی با استفاده از نرم‌افزار SAS ورژن 9.1 انجام شد و مقایسه میانگین صفات مذکور با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن طبق مدل آماری زیر بررسی شد.

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + B_j + S_k + e_{ijkl}$$

که در این رابطه، Y_{ijkl}: رکورد فنوتیپی هر یک از صفات مطالعه شده (وزن ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۵۰ روزگی)، μ: میانگین مشاهدات، G_i: اثرثابت مربوط به ژنوتیپ iام، B_j: اثرثابت مربوط به سویهjام، S_k: اثرثابت مربوط به جنسkام و e_{ijkl}: اثر باقی‌مانده می‌باشد.

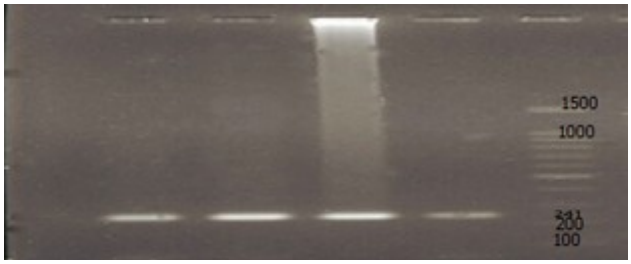
نتایج

نتایج طیف سنجی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که DNA های استخراج شده دارای کیفیت مناسبی برای انجام PCR می‌باشند. DNAهای استخراج شده با غلظت ۲۰۰-۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر برای انجام PCR انتخاب شدند (شکل ۱).



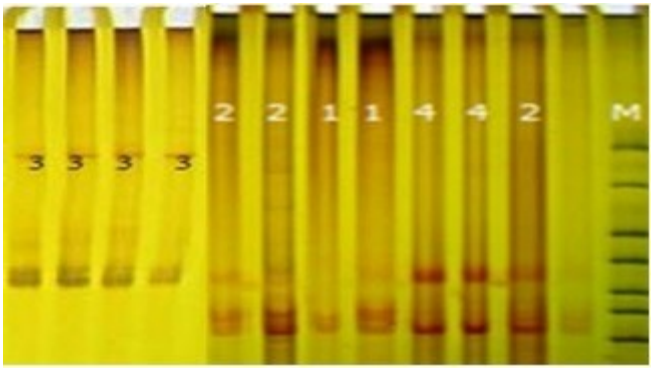
شکل ۱: DNA استخراج شده از خون غاز بومی ایران در کنار λDNA با غلظت‌های مختلف

نتایج بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد نشان داد که الگوی باندی مربوط به تکثیر ناحیه‌ی 5- Flanking ژن Pit-1 به قطعه ۲۴۱ جفت بازی به خوبی و بدون تکثیر قطعات اضافی و فاقد اسمیر و دایمر بود که موید اختصاصی بودن جفت آغازگرها می‌باشد. صحت این مطلب با حضور سایز مارکر در کنار نمونه‌های الکتروفورز شده تأیید شدند. در شکل ۲ الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز نشان داده شده است.



شکل ۲: قطعات ۲۴۱ جفت بازی ناحیه 5-Flanking ژن Pit-1 تکثیر شده به وسیله‌ی PCR روی ژل آگاروز در کنار سایز مارکر ۱۰۰ bp (سینا ژن)

نتایج حاصل از الکتروفورز عمودی محصولات PCR و رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید برای بررسی و تعیین ژنوتیپ تجزیه شدند، نتایج به دست آمده ۴ الگوی مختلف را روی ژل آکریل آمید نشان داد (شکل ۳) و این بیانگر چند شکلی بودن ناحیه‌ی 5-Flanking از ژن Pit-1 در غاز است.



شکل ۳: الگوی باندی مختلف مشاهده شده ناحیه 5-Flanking ژن Pit-1 بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد

الگوهای باندی متفاوت حاکی از وجود تنوع در این جایگاه می‌باشد که فراوانی الگوهای به دست آمده در این تحقیق شامل الگوی ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب ۰/۳۱۲، ۰/۳۶۴، ۰/۰۷۰، ۰/۲۵۴ درصد بودند که الگوی ۲ بیش-ترین فراوانی و الگوی ۳ کم‌ترین فراوانی را از بین ۴ الگوی مختلف داشتند. ارتباط بین الگوهای ژنوتیپی و صفات رشد در سنین مختلف مورد بررسی قرار گرفته و در جدول ۱ ذکر گردیده‌اند. جدول ۱ مقایسه‌ی میانگین-ها تأثیر الگوهای مشاهده شده ژن Pit-1 بر افزایش وزن بدن غاز را نشان می‌دهد. اثر همه‌ی الگوهای مشاهده شده برای وزن بدن در ۳۰ روزگی معنی‌دار شده است (P<۰/۰۵). همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد الگوی ۱ و ۲ نسبت به الگوی ۳ در وزن ۳۰ روزگی اختلاف معنی‌داری دارند و بین الگوهای مختلف در وزن ۶۰ ، ۹۰ و ۱۵۰ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (P>۰/۰۵). همچنین نتایج به دست آمذه نشان داد که اثر سویه بر روی وزن بدن معنی‌دار نمی‌باشد (P>۰/۰۵)، که احتمالاً این نتایج بیان‌گر این است که منشاء تمامی غازهای مورد مطالعه در این پژوهش از یک نژاد می‌باشد. در جدول ۲ نتایج تأثیر جنس بر صفات وزن، ۶۰، ۹۰ و ۱۵۰ روزگی نشان داده شده است که بیان‌گر اختلاف معنی‌داری بین دو جنس می‌باشد (P<۰/۰۵).

جدول ۱: ارتباط بین ژنوتیپ‌های ناحیه‌ی 5- Flanking ژن Pit-1 با صفات رشد در غاز بومی ایران

ژنوتیپ	وزن ۳۰ روزگی (گرم)	وزن ۶۰ روزگی (گرم)	وزن ۹۰ روزگی (گرم)	وزن ۱۵۰ روزگی (گرم)
۱	^{a}۸۳۵/۶۱	۱۸۴۷/۸۶	۲۵۵۵/۸۰	۳۲۸۲/۹۰
۲	^{a}۸۰۸/۶۴	۱۷۲۹/۳۷	۲۴۹۳/۷۳	۳۱۹۸/۱۱
۳	^{b}۶۰۴/۶۵	۱۶۰۱/۲۶	۲۲۹۴/۰۸	۲۹۹۹/۸
۴	^{ab}۷۳۹/۹۵	۱۷۳۶/۴۱	۲۴۵۴/۳۴	۳۲۱۸/۷۳
سطح معنی‌داری	۰/۰۳	۰/۱۸	۰/۳۲	۰/۴۳

جدول ۲: ارتباط بین جنس (نر و ماده) با صفات رشد در غاز بومی ایران

جنس	وزن ۳۰ روزگی (گرم)	وزن ۶۰ روزگی (گرم)	وزن ۹۰ روزگی (گرم)	وزن ۱۵۰ روزگی (گرم)
ماده	^{b}۶۹۷/۰۳	^{b}۱۶۰۸/۹۵	^{b}۲۲۴۲/۴۲	^{b}۲۸۶۹/۸۶
نر	^{a}۷۹۷/۴۰	^{a}۱۸۴۸/۵۰	^{a}۲۶۵۶/۵۶	^{a}۳۴۷۸/۹۵
سطح معنی‌داری	۰/۰۲۱۸	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

بحث

تحقیق حاضر به منظور شناسایی چند شکلی در ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 و ارتباط چندشکلی‌های مشاهده شده با صفات رشد در غاز بومی استان آذربایجان‌شرقی، با استفاده از تکنیک PCR-SSCP انجام گرفت. امروزه SSCP به عنوان یک تکنیکی سریع، آسان، توانمند و قابل اطمینان برای شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) در تعیین ژنوتیپ به شمار می‌رود و همچنین تکنیک SSCP روش مؤثری در شناسایی تنوع توالی تکثیر شده می‌باشد (Hayashi 1991) اساس این تکنیک مهاجرت DNA از میان ژل پلی‌اکریل‌آمید غیر دناتوره بر اساس اندازه و توالی آن می‌باشد. بنابراین وجود حتی یک جهش نقطه‌ای، با تفاوت حرکت روی ژل قابل تشخیص است (Hayashi 1991). در این مطالعه با استفاده از تکنیک SSCP تنوع ژنتیکی موجود برای ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 در بین غازهای مورد مطالعه تشخیص داده شد، همچنین آنالیز آماری نشان داد که رابطه‌ی بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده با صفت ۳۰ روزگی دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد. Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی پلی‌مورفیسم در ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 در جمعیت ۳ نژاد غاز بومی چین با روش PCR-SSCP دو ژنوتیپ متفاوت شناسایی کردند و نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین این ژنوتیپ‌ها با صفات رشد وجود دارد (P<۰/۰۱). Cheng و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از تکنیک PCR-SSCP چهار ژنوتیپ CC، CD، DD، EE را در جمعیت شش غاز بومی چین گزارش کردند که نشان دهنده‌ی چندشکلی بالا برای ژن Pit-1 می‌باشد. Nie و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از روش PCR-RFLP سه ژنوتیپ CC، TT، TC در ناحیه‌ی اینترون پنجم ژن Pit-1 مرغ گزارش کردند که نشان‌گر چندشکلی بودن این ناحیه از ژن Pit-1 می‌باشد. نتایج بررسی آن‌ها وجود ارتباط معنی‌داری بین جهش‌های صورت گرفته در ناحیه‌ی اینرون پنج با وزن بدن در ۲۸ و ۴۲ روزگی و افزایش وزن روزانه در ۰-۴ هفتگی و ۴-۸ هفتگی داشت (P<۰/۰۵). در بخشی از پروموتور و اگزون یک و همچنین اگزون دو، سه و چهار ژن Pit-1 چندشکلی در مرغ گزارش شد (Bhattacharya et al. 2012). اما در مطالعه‌ی Borumand و همکاران در سال ۲۰۱۴ در ناحیه‌ی اگزون ششم ژن Pit-1 سه ژنوتیپ AA، AB و BB با روش PCR-SSCP در مرغ مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی چندشکلی در این ناحیه است که مطابق با نتایج حاضر بود. جلیل و همکاران در سال ۱۳۹۱ در مطالعه‌ای وجود چندشکلی در ژن Pit-1 در گوسفند بختیاری و زل با روش PCR-RFLP نشان دادند.

Bhattacharya و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مطالعه بر بخشی از پروموتور و اگزون یک و همچنین اگزون دو، سه و چهار ژن Pit-1 چندشکلی در سه لاین مرغ را گزارش کردند. هاپلوگروه Pit-1 نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین وزن بدن در سن ۷ هفتگی در سویه‌ی گوشتی مرغ وجود دارد که در توافق با نتایج مطالعه‌ی حاضر است. همچنین Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۵ چندشکلی ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 و اثر بر تولید تخم را در اردک‌های مسکو مورد بررسی قرار دادند. سه ژنوتیپ در ژن Pit-1 مشاهده کردند (AA، AG، GG) که نشان‌دهنده‌ی چندشکل بودن این ناحیه در اردک‌های مسکو می‌باشد. ارتباط چندشکلی ژن Pit-1 با صفات رشد در جمعیتی از جوجه‌ها که دارای رکورد مرتبط با رشد بودند نیز مورد آزمایش قرار گرفت، نتایج نشان داد ارتباط مثبتی بین ژنوتیپ AA و AT در ۸ هفتگی وجود دارد (P<۰/۰۵) که نشان می‌دهد احتمالاً ژن Pit-1 به عنوان نشان‌گر مناسبی جهت انتخاب برای صفات رشد اولیه در مرغ قابل کاربرد می‌باشد. ولی بین ۱۰ هفتگی ارتباط مثبتی بین ژنوتیپ و وزن بدن وجود ندارد (P>۰/۰۵) که نشان می‌دهد چندشکلی تک نوکلئوتیدی ممکن است اثر ژنتیکی بر روی نرخ رشد اولیه داشته

باشد و این اثرات ممکن است با افزایش سن کاهش یابد، که مطابق با نتایج پژوهش حاضر بود چون اثر ژنوتیپ در ۳۰ روزگی معنی‌دار بود در حالی که در ۶۰، ۹۰ و ۱۵۰ روزگی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (Jiang et al. 2004). به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که روش PCR-SSCP برای مطالعه‌ی چند شکلی موجود در بررسی ناحیه‌ی 5-Flanking ژن Pit-1 و بررسی ارتباط آن‌ها با صفات رشد مناسب می‌باشد. از آن جایی که مطالعات گسترده‌ای اثر چند شکلی ژن pit-1 را بر صفات رشد در گونه‌های مختلف طیور و به ویژه در غاز را تأیید می‌کنند، بنابراین این ژن می‌تواند به عنوان نشان‌گر ژنتیکی برای صفات رشد در انتخاب به کمک مارکر استفاده شود. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش و نتایج حاصل از سایر جایگاه‌های مرتبط با صفات رشد، می‌توان با یک برنامه منظم و بلندمدت افراد دارای ژنوتیپ مطلوب برای صفات مورد نظر را شناسایی و با انتخاب آن‌ها میانگین جامعه را برای دوره‌های بعد بهبود بخشید. با توجه به اهمیت حفظ نژادهای بومی می‌توان با یک برنامه‌ریزی دقیق و مدون اصلاح نژادی و با وجود زیر ساخت‌های لازم (مطالعه و شناسایی) به صورت حساب شده‌ای به اصلاح ذخایر ژنتیکی بومی کشور از جمله غاز بومی که کم‌تر مورد توجه قرار گرفته، برای صفات مد نظر اصلاح‌گر اقدام نمود. تا بدین وسیله تولیدات حیوانات بومی را اقتصادی نموده و به حفظ ذخایر ژنتیکی ارزنده‌ی کشور کمک شایان توجهی کرد. از طرفی با توجه به محدود بودن نیازهای نژادهای بومی به غذا، مقاومت نسبی این دام‌ها نسبت به برخی بیماری-های بومی منطقه و سازگاری آن‌ها با شرایط اقلیمی و محیطی منطقه، موجب شده تا پرورش این حیوانات به عنوان یک گزینه‌ی مناسب، مد نظر قرار گیرد. در مرحله-ی بعد برای اصلاح این دام‌ها باید برنامه‌ریزی دقیقی صورت پذیرد تا در آینده طیور بومی کشور از نظر سطوح تولیدی بتوانند با حیوانات خارجی رقابت کنند در غیر این صورت آینده‌ی طیور بومی چیزی غیر از نابودی یا محدود شدن جمعیت آن‌ها نخواهد بود.

منابع

Bhattacharya, T.K.; Priyanka, M.; Chatterjee, R.N.; Sharma, R.P.; Bhanja, S.K.; Raj, Kumar and Niranjan, M. (2011). Polymorphism at exon 1 of pit-1 gene and its association with immunocompetence traits in layer chicken. Journal ofApplied Animal Research, 39(4): 298-302.

Borumand, J.; Hashemi, A.; Mardani, K. and Ghaderzadeh, M. (2014). Detection of polymorphism of Pit1 gene exon 6 in West Azerbaijan native chickens using PCR-SSCP technique. Iranian Veterinary Journal. 9(4): 36-44. (In Persian).

Brunsch, C.; Sternstein, I.; Reinecke, P. and Bieniek, J. (2002). Analysis of associations of PIT1 genotypes with growth, meat quality and carcass composition traits in pigs. Journal of Applied Genetics, 43(1): 85-91.

Castrillo, J.L.; Theill, L.E. and Karin, M. (1991). Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. Science, 253(5016): 197-199.

Aarskog, D.; Eiken, H.G.; Bjerknes, R. and Myking, O.L. (1997). Pituitarydwarfism in the R271W Pit-1 gene mutation. European Journal of Pediatrics,156(11): 829-834.

Bailes, S.M.; Devers, J.J.; Kirby, D. and Rhoads, D.D. (2007). An Inxpensive, Simpel Protocol for DNA Isolation from Blood for High-Throughput Genotyping by Polymerase chain Reaction or Restiction Endonoclease Digestion. Poultry Science, 86(1): 102-106.

Barker, JS.F. (1994). A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds, In: Proceeding of the 5th World congress on Genetics Applied to Livestock Production. University of Guelph, Guelph Canada, 21: 501-508.

Bhattacharya, T.K.; Chatterjee, R.N. and Priyanka, M. (2012). Polymorphisms of Pit-1 gene and its association with growth traits in chicken. Poultry Science, 91(5): 1057-1064.

Cheng, J.H.; Zhao, W.M.; Bao, W.B.; Chen, Q.; Qiao, N.; Wang, X.B. et al. (2009). Polymorphism of the Insertion/Deletion in Goose Pit-1 Gene and Its Effects on Early Stage Bodyweight of Wanxi White Goose. Journal of Agricultural Biotechnology, 16(3): 426-429.

Haugen, B.R.; Wood, W.M.; Gordon, D.F. and Ridgeway, E.C. (1993). A Thyrotrope-specific Variant of Pit-1 Transactivates the Thyrotropin β Promoter. The Journal of Biological Chemistry, 268(28): 20818-20824.

Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. Genome Research, 1(1): 34-38.

Jiang, R.; Li, J.; Qu, L.; Li, H. and Yang, N. (2004). A new single nucleotide polymorphism in the chicken pituitary-specific transcription factor (POU1F1) gene associated with growth rate. Animal Genetics, 35(4): 344-346.

Lan, X.Y.; Pan, C.Y.; Chen, H.; Zhang, C.L.; Li, J.Y.; Zhao, M. et al. (2007). An AluI PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat POU1F1 locus and its association with production traits. Small Ruminant Research, 73(1-3): 8-12.

Li, S.; Crenshaw, E.B.; Rawson, E.J.; Simmons, D.M.; Swanson, L.W. and Rosenfeld, M.G. (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. Nature, 347(6293): 528-533.

Moody, D.E.; Pomp, D. and Berendse, W. (1995). Restriction fragment length polymorphism in amplification products of bovine PIT1 gene and assignment of PIT1 to bovine chromosome 1. Animal Genetics, 26(1): 45-47.

Nie, Q.H.; Fang, M.X.; Xie, L.; Zhou, M.; Liang, Z.M.; Luo, Z.P. et al. (2008). The PIT-1 gene polymorphisms were associated with chicken growth traits. BioMed Central Genetics, 9(1): 20-24.

Song, C.B.; Gao, Y.; Teng, X.; Wang, Z.; Wang, Q.; Li, H. et al. (2005). MspI polymorphisms in the 3rd intron of the swine POU1F1 gene and their association with growth performance. Journal of Applied Genetics, 46(3): 285-289.

Sornson, M.; Wu, W.; Dasen, J.; Flynn, S.E.; Norman, D.I.; O'Connell, S.M. et al. (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. Nature, 384 (6607): 327-333.

Taha, D.; Mullis, P.E.; Ibanez, L. and deZegher, F. (2005). Absent or delayed adrenarche in Pit-1/POU1F1 deficiency. Hormon Researcher in Paediatrics, 64(4): 175-179.

Tatsumi, K.; Notomi, T.; Amino, N. and Miyai, K. (1992). Nucleotide sequence of the complementary DNA for human Pit-1/GHF-1. Biochimica et Biophysica Acta, 1129 (2): 231-234.

Tanaka, M.; Yamamoto, I.; Ohkubo, T.; Wakita, M.; Hoshino, S. and Nakashima, K. (1999). cDNA cloning and developmental alterations in gene expression of the two Pit-1/GHF-1 transcription factors in the chicken pituitary.General and Compatitive Endocrinol, 114(3): 441-448.

Van, A.S.; Buys, N.; Onagbesan, O.M. and Decuypere, E. (2000). Complementary DNA cloning and ontogenic expression of pituitary-specific transcription factor of chickens (Gallus domesticus) from the pituitary gland.General Comparative Endocrinology, 120(2): 127-136.

Zhao, W.M.; Zhoa, R.X.; Qiao, N.; Xu, Q.; Huang, Z.Y.; Zhang, Y. et al. (2011). Association of 5-Flanking Region of Pit-1 Gene Polymorphisms with Growth Trait in Goose. Journal of Animal and Veterinary Advances, 10(5): 651-655.

Zhang, D.X.; Xu, Z.Q.; He, j.; Ji, C.L.; Zhang, Y. and Zhang, X.Q. (2015). Polymorphisms in the 5′-flanking regions of the GH, PRL, and Pit-1 genes with Muscovy duck egg production1. Journal of Animal Science. 93(1): 28-34.

Investigation of Polymorphism in 5- Flanking Region of Pit-1 gene and its association with growth traits in Iranian native Goose

Akbari, M.[1]; Ghaffari, M.[2]; Hashemi, A.[3] and Elyasi Zarringhabaie, Gh.[4]

Received: 21.02.2017 Accepted: 19.09.2017

Abstract

The objective of this study was the detection of polymorphism in 5- Flanking region of Pit-1 gene and its association with growth traits in Iranian native Goose by PCR-SSCP method. For this purpose, blood samples were taken from 160 Goose from East Azerbaijan breeding station located in Malekan. DNA was extracted from whole blood using the Bailes method and polymerase chain reactions were performed for amplification of 241 bp fragment containing in 5- Flanking region of Pit-1 gene. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) was used for genotyping. For this purpose, vertical electrophoresis of PCR products was performed on 8% acrylamide gel, at 120 V, for 18 h at 4 C°. Silver-staining of gels is used to detect, resulted in four genotypic patterns of 1, 2, 3 and 4 with frequencies of 31.2%, 36.4%, 7% and 25.4%, respectively. Analysis of variance was performed using GLM proc of SAS software. The statistical analysis indicated that the effect of different patterns was significant on the 30-Day Bodyweight, but on the 60-90-150 -Day Bodyweight had no significant effect.

Key words: Polymorphism, Gene, Goose, Growth traits, Marker, Iran

1- MSc Graduated of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science, Urmia University, Urmia, Iran
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science, Urmia University, Urmia, Iran
4- Instructor, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Tabriz, Iran
Corresponding Author: Ghaffari, M, E-mail: m.ghaffari@urmia.ac.ir