بررسی چند شکلی ژن $TGF\beta_3$ و ارتباط آن با صفات رشد در جوجه های گوشتی سویه راس

حامد شریفی‌نژاد*[۱] و محمد باقر منتظرتربتی[۲]

۱) دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، خراسان جنوبی، ایران.
۲) استادیار علوم دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، خراسان جنوبی، ایران.

*نویسنده مسئول: **hamedsharifi99@yahoo.com**

شماره صفحات
۳۱-۴۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۵

چکیده

در این تحقیق به منظور شناسایی چند شکلی‌های قسمتی از ژن فاکتور موثر بر رشد بتا-۳ ($TGF\beta_3$) در جوجه های گوشتی سویه راس با استفاده از تکنیک واکنش های زنجیره‌ای پلیمراز و روش آرایش فرم فضایی رشته‌های منفرد (PCR-SSCP) انجام شد. به‌این منظور بطور تصادفی از تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه خونگیری به عمل آمد، و سپس DNA ژنومی آنها استخراج گردید. برای تعیین کیفیت DNA های استخراجی از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. سپس با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی طی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) قطعه‌ای از ژن به اندازه ۲۹۴ جفت باز از ناحیه قسمتی از اینترون چهار و کل اگزون پنجم این ژن تکثیر گردید، و در نهایت برای مشخص شدن باندها از ژل آکریلامید و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره استفاده شد. تجزیه و تحلیل الگوهای باندی منجر به شناسایی سه الگو باندی AA، AB و BB شد، که فراوانی آنها به ترتیب برابر با ۰/۵۲، ۰/۴۲ و ۰/۰۶ بدست آمد. و دو آلل A و B با فراوانی ۰/۷۳ و ۰/۲۷ در جمعیت مورد مطالعه شناسایی شد. شاخص شانون و تعداد آلل موثر برای این جایگاه از ژن $TGF\beta_3$ به ترتیب ۰/۵۸۳۳ و ۱/۶۵۰۷ بدست آمد. برای تایید نتایج حاصل از PCR-SSCP برخی نمونه ها از هر ژنوتیپ تعیین توالی مستقیم شدند. مقایسه میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد که چندشکلی ژن $TGF\beta_3$ با صفات درصد وزن ران و درصد وزن لاشه ارتباط معنی‌داری دارد.

کلمات کلیدی: جوجه گوشتی، چند شکلی، ژن $TGF\beta_3$، رشد و SSCP

مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن ۵ قبل از میلاد تا تقریبا قرن ۷ میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود. در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (MohammadAbadi *et al*, 2010). بر اساس پژوهش‌های West and Zhou استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ سال پیش از میلاد و ۱۰۰۰ سال پیش از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ سال پیش از میلاد (MohammadAbadi *et al*, 2010). از طرفی نیاز روزافزون جامعه به فرآوردهای پروتئینی با منشاء حیوانی، استفاده از روش‌های نوین تولید و افزایش محصول را ضروری کرده است. در میان این فرآورده‌ها، گوشت مرغ در تغذیه بشر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین دلیل در چند دهه گذشته تولید گوشت مرغ در بسیاری از کشورهای جوان از جمله ایران رشد زیادی داشته است و پیش‌بینی می‌شود که در آینده نیز ادامه یابد. برای افزایش تولید عمودی علاوه بر روش‌های نوین مدیریت، بهداشت و تغذیه، استفاده از روش‌های علمی اصلاح نژاد به همراه تکنیک‌های مولکولی ضروری می‌باشد. میزان رشد به دلیل ارزش اقتصادی‌اش یکی از مهمترین زمینه‌ها در صنعت اصلاح نژاد طیور می‌باشد، و به شکل چشمگیری در گذشته از طریق انتخاب براساس توده بدنی که وراثت متوسط به بالا را نوید می‌دهد ، بهبود یافته است. با این‌وجود رشد یک فرآیند پیچیده می‌باشد که دربرگیرنده افزایش در وزن و تمایز و نیز بلوغ بسیاری از بافت‌ها به ویژه عضلات اسکلتی می‌باشد. بنابراین تعدادی محدودیت (مانند کارایی تولید مثلی، افزایش چربی لاشه، ناهنجاری های اسکلتی و آسیت) به دلیل انتخاب براساس توده بدنی به شکل فشرده برای میزان رشد بالا بوجود آمده است. این اختلال در هموستاز فیزیولوژیک به یک سد در انتخاب جهت ادامه بهبود در رشد طیور منجر شده است (MohammadAbadi *et al*, 2010). همچنان که نشان داده شده است، چندشکلی‌های ژنتیکی با صفات کمی (برای مثال، میزان رشد) ارتباط دارد، بنابراین ممکن است که با به کارگیری نشانگرهای ژنتیکی جهت ارزیابی مستقیم ژنوم برای حذف آلل‌های ناخواسته و افزایش درجه هموزیگوتی یا هتروزیگوتی برای آلل‌های مطلوب قدم‌های اساسی در جهت بهبود ژنتیکی در طیور برداشت (Dunnington & Plotsky, 1990 ;Gu *et al*, 2004). اثرات بیولوژیکی فاکتور مؤثر بر رشد بتا شامل اثرات روی تمایز سلولی، تکثیر سلولی، رشد سلولی، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و عملکرد ایمنی است (Madeja *et al*, 2004). زیر خانواده فاکتور بتا یکی از مهمترین ژن‌های مؤثر در صفات رشد و سازگاری می‌باشد

(Burt & Law, 1994). ژن‌های خانواده بزرگ TGFβ در تولید پروتئین‌هایی نقش دارند که انتقال دهنده پیام از یک سلول به سلول دیگر می‌باشند و نقش آن‌ها در رشد و سازگاری سلول‌ها مهم است (Piek *et al*, 1999). خانواده TGFβ دارای چهار ژن به نام‌های $TGF\beta_1$، $TGF\beta_2$، $TGF\beta_3$ و $TGF\beta_4$ می‌باشد (محمدی فر و همکاران ۱۳۹۲). ژن $TGF\beta_3$ در طیور روی کروموزوم شماره ۵ قرار دارد (Mohammadifar *et al*, 2014)، که شامل ۷ اگزون و ۶ اینترون می‌باشد و فعالیت های بیولوژیکی اشکال مختلف TGFβ در طیور تقریبا مشابه پستانداران گزارش شده است (Mohammadifar *et al*, 2014). ژن-های TGFβ بر رشد و تمایز انواع مختلفی از سلول‌ها و نیز در ساخت ماهیچه، غضروف، استخوان، خون، چربی و سلول‌های پوششی نقش دارند (Mohammadifar *et al*, 2014) تعدادی از محققین رابطه ژن‌های TGFβ با جایگاه صفات کمی سازوکارهای پاسخ ایمنی در مرغ‌ها را بررسی کرده و مشخص نموده‌اند که این ژن یا ژن‌های پیوسته به آن در ارتباط با پاسخ ایمنی می‌باشند. نتایج این پژوهش‌ها نشان داد که SNP[۲] های موجود در جایگاه TGFβ ممکن است در انتخاب براساس نشانگر برای تولید آنتی بادی مفید باشند(Mohammadifar *et al*, 2014). بررسی چند شکلی تک نوکلئوتیدی روی ژن میواستاتین در لاین‌های مختلف مرغ نشان می‌دهد که میواستاتین عضو جدیدی از خانواده بزرگ فاکتور مؤثر بر رشد بتا است که به صورت اختصاصی در ماهیچه اسکلتی بیان شده و به عنوان تنظیم کننده رشد در این بافت عمل می‌کند (Gu *et al*, 2002). در پژوهشی (Li *et al*, 2003) رابطه چند شکلی ژن فاکتور مؤثر بر رشد بتا-۳ را با صفات وزن در ۲، ۴، ۶ و ۸ هفتگی بررسی و رابطه معنی‌داری بین چند شکلی‌های این ژن و صفت وزن را گزارش کردند. در پژوهش دیگری، همبستگی-های معنی داری بین ژن‌های گوناگون TGFβ با میزان SE[۳] سکوم، کبد و طحال گزارش شده است (Kramer *et al*, 2003). Mohammadifar *et al* (2014) تأثیر ژن TGFβ3 بر ارزش های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس را مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش آن‌ها فراوانی ژنوتیپ‌های TT، Tt و tt را به‌ترتیب ۰/۱۵، ۰/۲۷۵ و ۰/۵۷۵ و مقادیر شاخص شانون (I)، تعداد آلل موثر (Ne)، شاخص هتروزیگوزیسیته مشاهده شده (Ho) و شاخص هتروزیگوزیسیته مورد انتظار (He)، برای جایگاه ژنی TGFβ3 را به ترتیب برابر ۰/۶۰، ۱/۶۹، ۰/۲۸ و ۰/۴۱ گزارش کردند و نشان دادند که آلل T بر افزایش وزن بدن در یک روزگی و ۸ هفتگی تأثیر معنی داری دارد ($P\leq$۰/۰۵). در ایران مطالعات ملکولی متعددی روی طیور در ایران انجام شده است (Mohammadifar *et al*, 2014)، اما تا کنون ژن $TGF\beta_3$ و ارتباط آن با صفات رشد و ترکیبات لاشه مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا، هدف از انجام این پژوهش، شناسایی چند شکلی قسمتی از ناحیه اینترون چهار و کل اگزون پنجم ژن $TGF\beta_3$ در جمعیت جوجه های گوشتی سویه راس با استفاده از روش تفاوت آرایش فرم فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز [۴] (PCR-SSCP) و ارتباط آن با صفات رشد و ترکیبات لاشه می‌باشد.

[1] Transforming Growth Factor-β
[2] Single Nucleotide Polymorphism
[3] Salmonella Enteritis
[4] polymerase chain reaction technique and single-strand conformation polymorphism

مواد و روش ها

به‌منظور انجام این تحقیق، تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی راس به طور تصادفی از محل پرورش و در سن ۶ هفتگی انتخاب گردید. وزن بدن در پایان ۶ هفتگی(زمان کشتار) اندازه گیری شد و در ۶ هفتگی همه جوجه‌ها کشتار و پس از تجزیه لاشه، صفات وزن کل لاشه بدون محتویات شکمی، وزن پشت بدن (گردن، سینه و محوطه لگنی)، وزن عضله سینه، وزن عضله ران، وزن و درصد چربی حفره بطنی اندازه گیری و ثبت گردید. همچنین، در زمان کشتار از تمام جوجه‌ها به مقدار ۶ میلی لیتر خون گرفته شد. برای جلوگیری از انعقاد نمونه‌های خون از EDTA استفاده شد و نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA ژنومی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی انجام گردید(Iranpur & Esmailizadeh, 2010). سپس کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر-نانودراپ (Nano-Drop2000) بررسی گردید. برای تکثیر قطعه مورد نظر ژن $TGF\beta_3$، یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی زیر مورد استفاده قرار گرفت(Li *et al*, 2003).

$TGF\beta_3$ F: 5'-TCAGGGCAGGTAGAGGGTGT -3'
$TGF\beta_3$ R: 5'-GCCACTGGCAGGATTCTCAC -3'

واکنش PCR با استفاده از کیت Master PCR (Cinnagen, Iran) و مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت. برنامه حرارتی در جدول ۱ داده شده است (Li *et al*, 2003). سپس واکنش PCR با استفاده از کیت استاندارد انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. قطعه تکثیرشده با اشعه ماورابنفش(UV) عکسبرداری و مشاهده شد. برای تجزیه محصولات PCR به کمک روش SSCP از ژل آکریل‌آمید استفاده شد. برای این منظور ۴ میکرولیتر از محصول PCR با ۴ میکرولیتر SSCP- dye (شامل ۹/۵ میلی‌لیتر فرمامید+۴۰۰ میکرولیترEDTA نیم مولار+۰/۰۳ گرم بروموفنل بلو۱۰درصد) و نیز با ۳ میکرولیتر گلیسرول مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ترموسایکلر با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس نمونه‌ها به سرعت به داخل یخ منتقل شدند تا از بهم چسبیدن دوباره رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید. نمونه‌ها در ژل پلی آکریل آمید با ولتاژ ۲۰۰ و به مدت ۸ ساعت جهت مشاهده تفاوت موجود در نمونه‌ها الکتروفورز شدند. بعد از پایان الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید با استفاده از نیترات‌نقره جهت دیدن چندشکلی‌های ایجاد شده رنگ‌آمیزی شد (Benbouza *et al*, 2006). برای برآورد فراوانی الگوها از نرم افزار POPGEN نسخه ۳۱ استفاده گردید (Yeh *et al*, 1999). اطلاعات بدست آمده با استفاده از مدل آماری زیر و با روش GLM در نرم افراز آماریSAS (SAS 2006) آنالیز و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + G_j + b\,(W_i - W) + e_{ijk}$$

در این مدل؛ Y_{ijk}: ارزش فنوتیپی صفات مورد مطالعه، μ: میانگین ارزش‌های فنوتیپی صفات و e_{ijk}: اثر باقی‌مانده می‌باشد. عوامل جنس(S_i) و ژنوتیپ (G_j) به عنوان اثرات ثابت و $b(W_i-W)$ به عنوان ضرایب رگرسیون وزن اندام‌ها به کوواریت وزن زنده یا وزن لاشه (آنالیز اندام‌ها) در مدل وارد گردید.

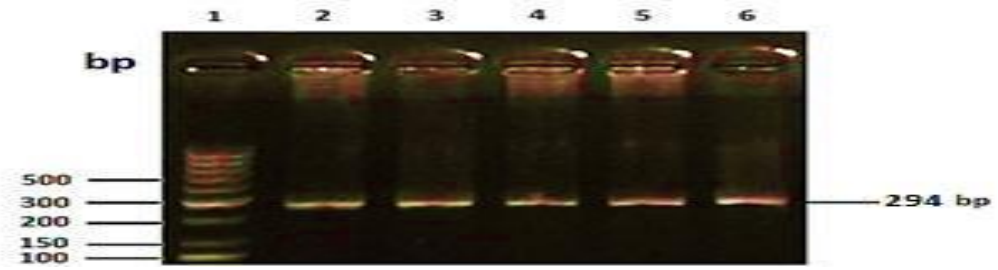
جدول ۱- برنامه حرارتی و زمانی PCR جهت تکثیر قطعه ۲۹۴ جفت بازی ژن $TGF\beta_3$

Table 1. Temperature and time program PCR for replication of 294 bp of TGFβ3 gene

ژن Gene		مراحل Steps	دما Temperature	زمان Time
	واسرشته سازی اولیه primary Denaturation	1 cycle	94°C	3 minutes
	واسرشته سازی Denaturation	35 cycle	94°C	60 seconds
$TGF\beta_3$	اتصال آغازگر Primer annealing		58°C	60 seconds
	تکثیر Extension	1 cycle	72°C	60 seconds
	تکثیر نهایی Final extension		72°C	10 minutes

نتایج و بحث

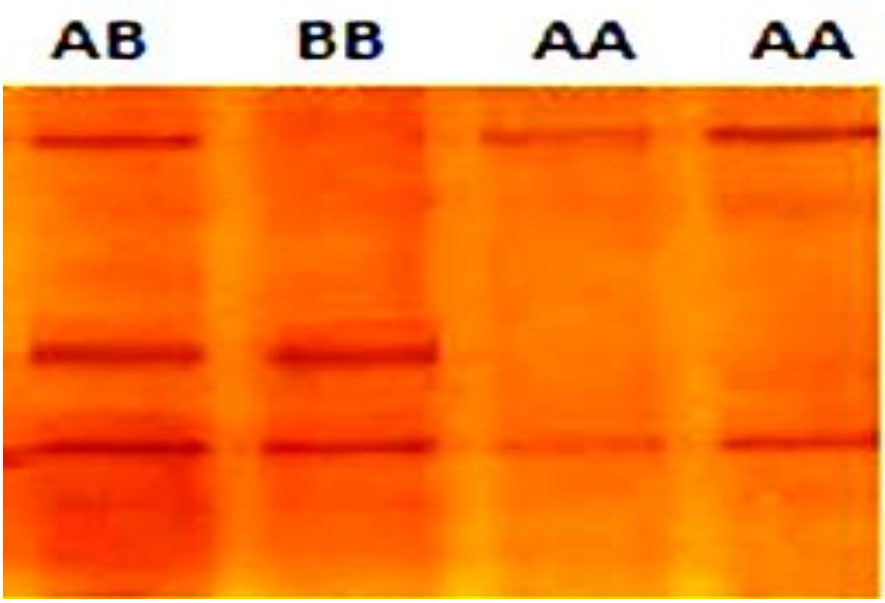
با استفاده از یک جفت آغازگرهای اختصاصی طی واکنش زنجیره ای پلیمراز، قطعه ۲۹۴bp از ناحیه قسمتی از اینترون چهار و کل اگزون پنجم ژن $TGF\beta_3$ تکثیر گردید که به منظور تشخیص تکثیر قطعه مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل).



شکل ۱- کیفیت محصول PCR

Figure 1. PCR product quality

تجزیه و تحلیل باندهای حاصل از الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره با استفاده از روش چند شکلی فضایی تک رشته ای، منجر به شناسایی سه الگوی باندی متفاوت در جمعیت مورد مطالعه گردید



شکل ۲- الگوی باندی ژن $TGF\beta_3$

Figure 2. Bands pattern of TGFβ3 gene

الگوهای باندی به صورت AA، AB و BB بودند، که فراوانی ها به ترتیب برابر با ۰/۵۲، ۰/۴۲ و ۰/۰۶ به دست آمد. و دو آلل A و B به ترتیب با فراوانی ۰/۷۳ و ۰/۲۷ در جمعیت مورد مطالعه شناسایی شد. از شاخص‌های مهم یک نشانگر مولکولی تعداد آلل، فراوانی آللی، تعداد آلل موثر و میزان هتروزیگوسیتی می‌باشد، که مقدار هر کدام از این پارامترهای موثر در تنوع درون جمعیت در (جدول ۳) ذکر شده است.

جدول ۳- پارامترهای آماری و ژنتیکی برآورد شده ژن $TGF\beta_3$ توسط نرم افزار پاپ ژن

Table 3. Statistical and genetic parameters estimated by the Application pop-gene gene TGFβ3

ژن Gene	هموزیگوسیتی مشاهده شده Observed Hemozygosity	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed Hetrozygosity	هموزیگوسیتی مورد انتظار Expected Hemozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected Hetrozygosity	هتروزیگوسیتی Nie Hetrozygosity (Nie)	مقدار Value $\chi 2$	تعداد آلل موثر N_e	شاخص شانون Shannon index(I)
$TGF\beta_3$	0.58	0.42	0.6040	0.3960	0.3942	0.36	1.6507	0.5833

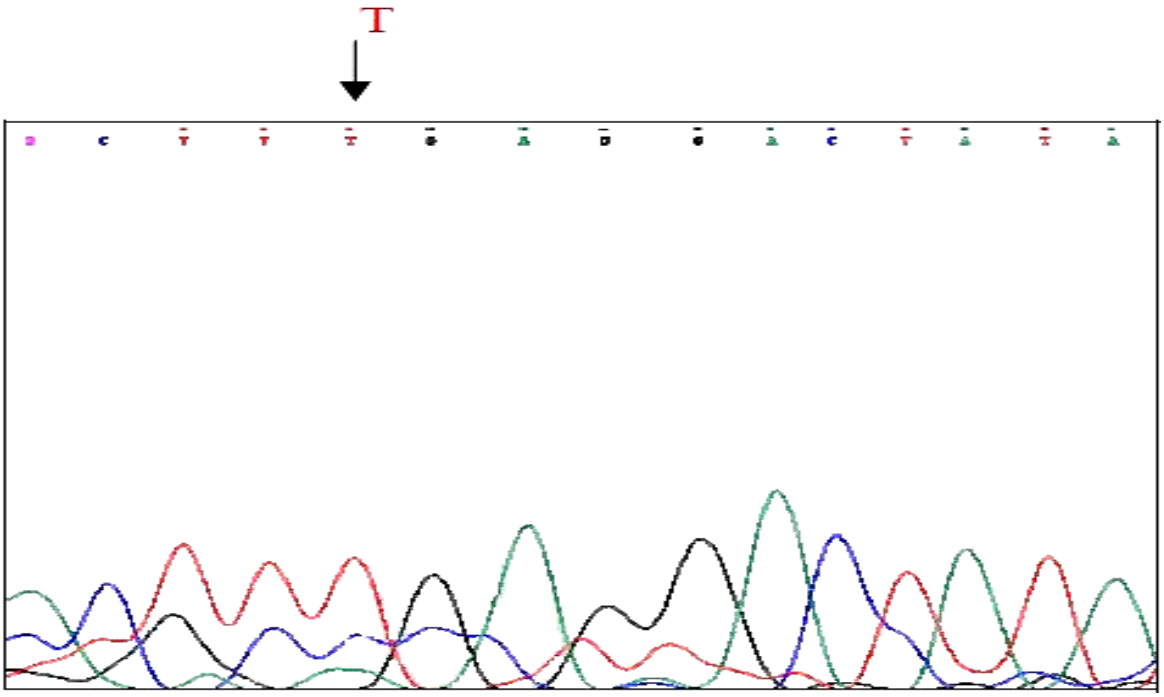
ارتباط چندشکلی این ژن با صفات رشد بوسیله رویه ی GLM نرم افزار SAS آنالیز شد و نتایج نشان داد که ژنوتیپ های مشاهده شده در ناحیه مورد مطالعه با درصد وزن لاشه و درصد وزن ران ارتباط معنی داری دارد ($P<۰/۰۵$). نتایج همچنین

نشان داد که جوجه های با ژنوتیپ BB برای صفات درصد وزن لاشه و درصد وزن ران نسبت به دیگر ژنوتیپ ها دارای میانگین حداقل مربعات بالاتری می باشند (جدول ۴).

جدول ۴- میانگین حداقل مربعات و خطای استاندارد صفات رشد براساس ژنوتیپ های ژن $TGF\beta_3$ در جوجه های گوشتی سویه راس
Table 4. Mean of the least squares and standard error of growth traits based on TGFβ3 genotypes in broiler chickens Ross strain

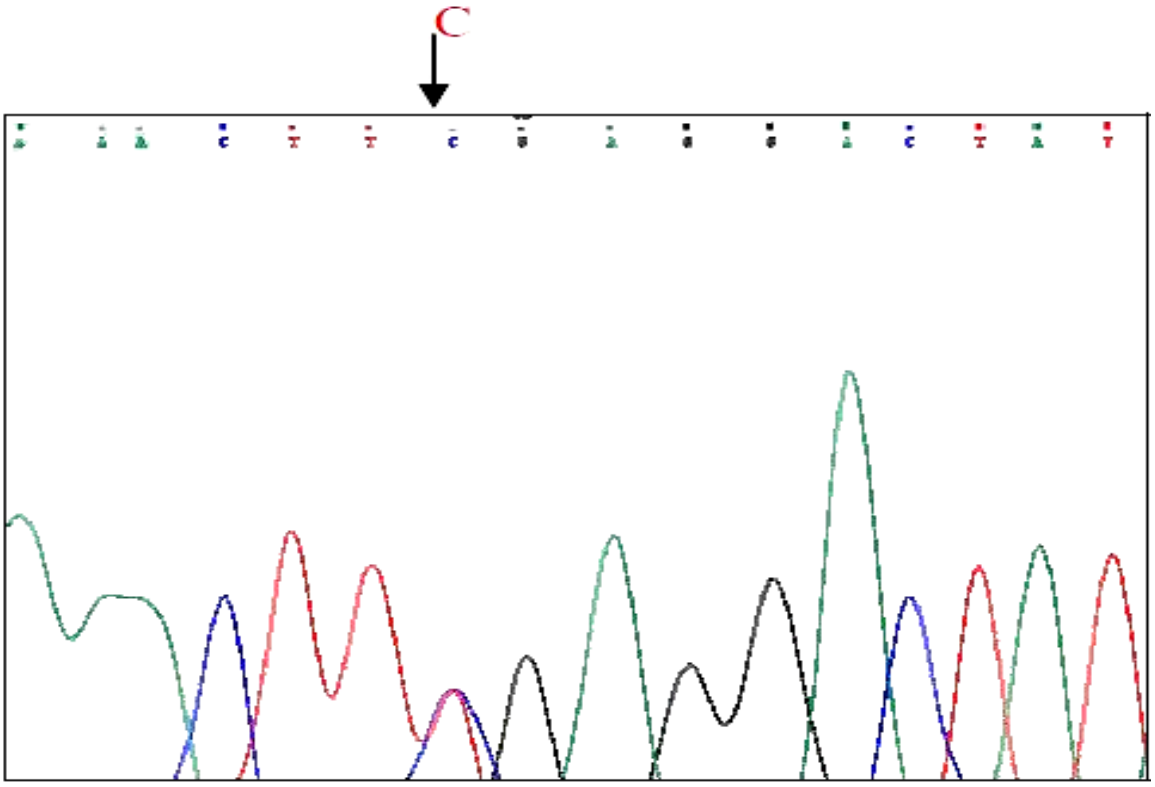
صفات Trats	ژنوتیپ genotype			P-Value
	AA	AB	BB	
وزن بدن در ۶ هفتگی Body weight at 6 week	2500.4±25.47	2543.7±20.65	2502.02±51.46	0.33
وزن لاشه Carcass weight	1727.2±18.2	۱۷۵۵/۱۴±۷/۶۶	1764.4±36.5	0.35
وزن عضله سینه Chest weight	579.5±7.49	۵۷۸/۷±۶/۲	569.11±12.92	0.51
وزن ران Femur weight	485.85±6.20	۵۰۶/۴±۴۳/۷	528±4.41	0.08
وزن بال Wing weight	200.78±19.45	203.53±1.28	195.22±4.15	0.09
وزن پشت Back weight	380.55±5.14	390.80±3.51	380.72±9.53	0.19
وزن چربی شکمی Abdominal fat	26.34±1.09	26.24±0.91	25.92±2.46	0.65
درصد وزن لاشه Percentage of carcass weight	68.82±0.46	68.97±0.38	71.25±2.2	0.039*
درصد وزن عضله سینه Percentage of chest weight	23.02±0.34	22.78±0.23	22.47±0.30	0.19
درصد وزن ران Percentage of femur weight	19.42±0.21	19.90±0.14	20.7±0.10	0.003*
درصد وزن بال Percentage of wing weight	8.05±0.06	8.02±0.05	7.8±0.12	0.57
درصد وزن پشت Percentage of back weight	15.40±0.04	15.33±0.18	15.88±0.34	0.35
درصد وزن چربی شکمی Percentage of abdominal fat	1.05±0.07	0.94±0.08	۰0.91±0.06	0.25

برای تایید نتایج حاصل از PCR-SSCP، برخی از نمونه ها با ژنوتیپ متفاوت تعیین توالی گردیدند. با بررسی نتایج تعیین توالی، نتایج حاصل از PCR-SSCP مورد تایید قرار گرفت (شکل ۳، ۴ و ۵).



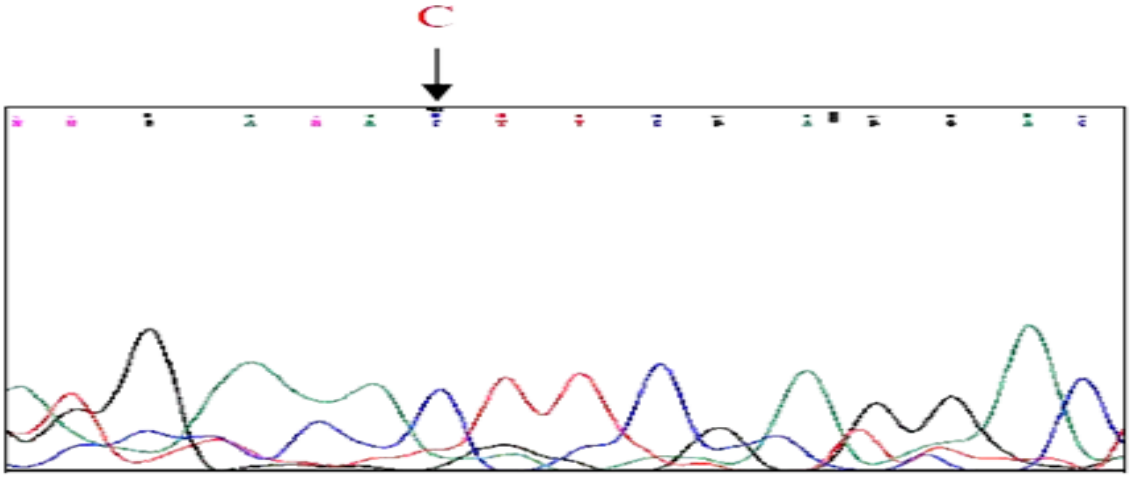
شکل ۳- نتایج تعیین توالی ژنوتیپ AA

Figure 3. Results of sequencing of AA genotype



شکل ۴- نتایج تعیین توالی ژنوتیپ AB

Figure 4. Results of sequencing of AB genotype



شکل ۵- نتایج تعیین توالی ژنوتیپ BB

Figure 5. Results of sequencing of BB genotype

صفات رشد و کیفیت لاشه جزء مهم‌ترین صفات اقتصادی در جوجه های گوشتی می‌باشند. امروزه کیفیت لاشه و بازارپسند بودن آن مورد توجه تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان می‌باشد و روز به روز بر اهمیت آن در بازارهای جهانی افزوده می‌شود. مشابه با دیگر صفات اقتصادی مهم، صفات رشد و چربی نیز به‌وسیله تعداد زیادی ژن که اثر برخی از آن‌ها زیاد (ژن عمده) و اثر بسیاری دیگر کم می‌باشد، کنترل می‌شوند. اگر چه تعداد ژن‌های موثر بر یک صفت مانند صفات رشد و چربی نامشخص است، اما تعدادی ژن کاندید موثر بر روی این صفات شناسایی شده است. مدل ژن عمده پیشنهاد می‌کند تعداد کمی ژن می‌تواند سهم عمده‌ای از تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص دهد. پیشرفت‌های اخیر در ژنتیک مولکولی امکان شناسایی و تعیین توالی این ژن‌ها را فراهم نموده است (Falconer & Mckay, 1996). ژن $TGF\beta_3$ به‌عنوان ژن کاندیدا جهت بررسی ارتباط چندشکلی این ژن با صفات رشد و ترکیبات بدن در سویه تجاری طیور گوشتی راس مورد مطالعه قرار گرفت. مشابه با تحقیق حاضر در مطالعه خود برروی ژن $TGF\beta_3$ در جوجه‌های بومی استان فارس در نتایج خود سه ژنوتیپ گزارش کردند با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. فراوانی ژنی و ژنوتیپی محاسبه شده برای جمعیت مورد مطالعه با فراوانی ژنی و ژنوتیپی تحقیق محمدی فر و همکارانش مغایرت دارد، دلیل این مغایرت می‌تواند ناشی از جمعیت‌های مورد مطالعه متفاوت باشد(محمدی فر و همکاران ۱۳۹۲). رشد و ترکیبات بدن منعکس کننده رشد و نمو همه اندام‌های بدن در طیور می‌باشد و تظاهر فنوتیپی این صفات نتیجه اثر متقابل ژنتیک، تغذیه و فاکتورهای محیطی‌می باشد (Wang *et al*, 2006). در تحقیقی که بر روی جوجه‌های گوشتی و تخم‌گذار انجام داده بودند، سه ژنوتیپ را گزارش کردند که با تحقیق حاضر هم-خوانی داشت و همچنین رابطه معنی‌داری بین چندشکلی ژن $TGF\beta_3$ را با صفات وزن در ۲، ۴ و ۶ هفتگی را گزارش نمودند (Li *et al*, 2003). در پژوهشی که برروی مرغان بومی مازندران صورت گرفته نتایج این تحقیق نشان داد که قطعه تکثیر شده دارای دو آلل و سه ژنوتیپ (+/+، +/- و -/-) می باشد که با نتایج تحقیق حاضر نیز مطابقت دارند. همچنین مقایسه اثر بین ژنوتیپ‌های حاصل از ژن فاکتور موثر بر رشد بتا-۳ بر صفات وزن بدن در یک روزگی و هشت هفتگی، عدم وجود اختلاف

معنی دار بین ژنوتیپ‌های +/+ و +/- را نشان داد (Enayati & Rahmati, 2013). تعداد الگوهای باندی مشاهده در تحقیق حاضر نیز با تعداد الگوهای تحقیق (Amirinia *et al*, 2011) مطابقت داشت که حکایت از اختصاصی عمل کردن آغازگرهای مورد استفاده برای این ژن و عملکرد صحیح PCR دارد. به‌طورکلی در جوجه‌های گوشتی که تحت برنامه‌های شدید اصلاح نژادی هستند، باید به‌طور هم‌زمان کاهش هزینه‌ها، بهبود کیفیت تولیدی و سلامت پرنده مدنظر قرار گیرد. لذا باید در شاخص‌های انتخاب صفات شایستگی و رشد منظور گردند. علاوه بر مشکل اندازه‌گیری این قبیل صفات، همبستگی بین این صفات، پیچیده می‌باشد. انتخاب به کمک نشانگر می‌تواند یک گزینه مطلوبی برای بهبود برنامه‌های اصلاح نژادی مورد توجه قرار گیرد. نتایج حاصل از مطالعه اخیر نشان داد که چندشکلی ناشی از جهش در ژن $TGF\beta_3$ با برخی از صفات ترکیبات لاشه ارتباط معنی‌داری دارد. لذا می‌توان با استفاده از 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. با این‌حال اگر چه اطلاعات حاصل از چندشکلی‌های یک جایگاه ژنی به‌منظور مطالعه تاثیر آن با صفات مورد نظر حائز اهمیت است ولی نمی‌تواند به تنهایی به‌عنوان یک معیار انتخاب در شرایط عملی مورد استفاده قرار گیرد و لازم است اطلاعات حاصل از نتایج تحقیق در جایگاه فوق در کنار اطلاعات حاصل از سایر جایگاه ها تجزیه و تحلیل شود و انجام تحقیقات بیش‌تر در این زمینه در آینده ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان گفت که تنوع آللی و ژنتیکی برای این ناحیه از ژن$TGF\beta_3$ در جمعیت جوجه های گوشتی سویه راس تقریبا بالا می باشد، و می تواند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی در بررسی ها و مطالعات آینده از آن بهره گرفت همچنین می توان برای مطالعه چند شکلی ها و تنوع بیشتر اگزون های دیگر این ژن را در برنامه های اصلاح نژادی مورد بررسی قرار داد. تکنیک PCR-SSCP یک ابزار قوی، آسان، قابل اعتماد و با هزینه پایین در جمعیتی از حیوانات جهت بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی واریانت های مختلف آللی ژن‌ها می‌باشد.

منابع

Amirinia, C., Seyedabadi, H.R., Amirmozafari, N., Vaez Torshizi, R., Chamani, M., Javanrouh Aliabad, A. and Abbasi, M.A., (2011). Association of transforming growth factor-β3 gene polymorphism with growth and body composition traits in Iranian commercial broiler lines. African Journal of Biotechnology. 10:1784-1788.

Benbouza, H., Jacquemin, M., Baudoin, J. and Mergeai, G., (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. Biotechnology Agronomy Society and Environment. 10: 77-81.

Burt, D.W. and Law, A.S., (1994). Evolution of the transforming growth factor-beta super family. Program Growth Factor Research. 5: 99-118.

Burt, D.W. and Paton, I.R., (1992). Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta gene family. DNA Cell Biological. 11: 497-510.

Burt, D.W., Paton, I.R. and Dey, B.R., (1991). Comparative analysis of human and chicken transforming growth factor-beta 2 and – beta 3 promoters. Endocrinal. 7: 175-183.

Cogburn, L.A., Burnside, J.C. and Scanes, G., (2000). Physiology of growth and development. Sturkie Avivan Physiology. 5: 635-656.

Dunnington, E.A., Gal, O. and Plotsky, Y., (1990). DNA fingerprints of chickens selected for high and low body weight for 31 generations. Journal Animal Genetics. 21: 247-257.

Enayati, B., Rahimi, G. (2012). Effect Of TGFB3 Loci On Phenotypic Data And Breeding Value Of Body Weight Traits In Mazandaran Native Fowls. *Animal Production*, 14(1), 49-57. Doi: 10.22059/Jap.2012.28893

Falconer, D.S. and Mckay, T.F., (1996). Introduction to quantitative genetics (4th Ed.). Longman Sel: Harlow, UK. Pp. 289-310.

Groenen, M.A., Cheng, H.H., Bumstead, H., Benkel, B.F., Briles, W.E., Burke, T., Burt, D.W., Crittenden, L.B., Deodgson, J., Hillel, J., Lamont, S., Soller, M., Takahashi, H. and Vignal, A., (2000). A consensus linkage map of the chicken genome. Genome Research. 10: 137-147.

Gu, Z., Zhu, D., Li, N., Li, H., Deng, X. and Wu, C., (2004). The single nucleotide polymorphisms of the chicken myostatin gene are associated with skeletal muscle and adipose growth. Science in China Life Science. 47: 26-31.

Gu, Z.L., Zhang, H.F., Zhu, D.H. and Li, H., (2002). Single nucleotide polymorphism analysis of chicken myostatin gene in different chicken lines. Yi Chuan Xue bao. 29: 599-606.

Iranpur, V. and Esmailizadeh, M.A.K., (2010). Rapid Extraction of High Quality DNA from Whole Blood Stored at 4ºC for Long Period.

Kramer, J., Malek, M. and Lamont, S.J., (2003). Association of twelve candidate gene polymorphisms and response to challenge with Salmonella enteritidis in poultry. Animal Genetics. 34: 339-348.

Li, H., Deep, N., Zhou, H., Michell, A.D., Ashwell, C.M. and Lamont, S.J., (2003). Chicken quantitative trait loci for growth and body composition association with transforming growth for-β3 genes. Poultry Science. 82: 347-356.

Madeja, Z., Adamowicz, T., Chmurzynska, A., Jankowski, T., Melonek, J., Switonski, M. and Strabel, T., (2004). Effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. Journal of Dairy Science. 87: 3925-3927.

Mohammadi Far, A., Faqih Imani, S., Mohammad Abadi, M., Soflaei, M. (2014). The effect of TGFβ3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. *Agricultural Biotechnology Journal*, 5(4), 125-136. doi: 10.22103/jab.2014.1226

Piek, E., Heldin, C.H. and Dijke, P.T., (1999). Specificity diversity, and regulation in TGFβ superfamily signaling. Federation American Societies Experimental Biology. 13: 2105-2124.

*Protocolonline*http://www.natureleads.com/protocols/cache/2012_03_31_06_37_38_PM.htm.[30 May].

Wall, N.A. and Hogan, B.L., (1994). TGF-beta genes in development. Current Opinion in Genetics & Development. 4: 517-522.

Wang,Q., Li, H., Li, N., Leng, L., Wang, Y. and Tang, Z., (2006). Identification of single nucleotide polymorphism of adipocyte fatty acid- binding protein gene and its association with fatness traits in the chicken. Poultry Science. 85:429-434.

Study of TGFβ$_3$ gene polymorphism and its association with growth traits in Ross broiler chicken

H. Sharifinejad[*1] and M.B. Montazer Torbati[2]

1) MSc. graduated, Department of Animal Science, University of Birjand, Iran.
2) Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Birjand, Iran.

Correspondence Author: **hamedsharifi99@yahoo.com**

Received: 2021/09/11 Accepted: 2021/11/16

Abstract

In this research in order to identify the part of the gene polymorphism transforming growth factor beta-3 (TGFβ$_3$) in broiler chickens Ross, polymerase chain reaction technique and single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) were performed. For this purpose randomly selection was done between 200 chicks and selected chicks were bled, and genomic DNA was extracted. To determine the quality of the DNA extracted 1% agarose gel was used. Then, by using a pair of specific primers through polymerase chain reaction (PCR) gene fragment with the size of 294 bp from parts of fourth introns and entire fifth exons of the gene was amplified, and finally to determine the bands acrylamide gel and stained with silver nitrate were used. The analysis of band patterns lead to identify three band patterns AA, AB and BB, with 0.52, 0.42 and 0.06 frequency, respectively. Two alleles A and B, with a frequency of 0.73 and 0.27 in the study population was also identified. Shannon index and effective number of alleles for the TGFβ$_3$ gene were 0.5833 and 1.6507, respectively. To confirm the results of PCR-SSCP some samples of each genotype were sequenced directly. Compare of least squares mean different genotypes showed that the gene polymorphism TGFβ3 has significant relation with leg weight and carcass traits.

Keywords: Broiler, PCR , Polymorphism , SSCP and TGFβ$_3$ gene.