



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

Study of the molecular relationship between the jejunum angiogenesis pathway and feed efficiency in Iranian native turkeys

E. Darang¹, S. Z. Mirhoseini^{1*}, Sh. Ghovvati¹, M. Khansefid^{2,3}

1. Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Agriculture Victoria Research Division, AgriBio Centre for AgriBioscience, 5 Ring Road, Bundoora, Victoria 3083, Australia

3. School of Applied Systems Biology, La Trobe University, Bundoora, Victoria 3083, Australia

(Received: 15-05-2025 – Revised: 12-07-2025 – Accepted: 13-07-2025 – Available online: 16-07-2025)

Abstract

Introduction: Real-time PCR has become a powerful tool for quantifying nucleic acids and assessing gene expression. Its accuracy and sensitivity have made it indispensable in biological research, allowing for detailed analysis of gene expression changes in response to various stimuli. In the livestock and poultry industry, improving feed efficiency is a key goal in breeding programs due to its significant economic benefits. Defined as the ratio between feed intake and weight gain or production, feed efficiency is influenced by genetic, physiological, nutritional, and environmental factors. Understanding its molecular mechanisms can lead to targeted breeding strategies and the selection of superior genotypes. The intestine is critical for feed utilization efficiency, serving as the main site of nutrient digestion and absorption; its epithelial structure, including villi and microvilli, is essential for effective absorption. Furthermore, a rich vascular network, formed through angiogenesis, is crucial for efficient feed metabolism and nutrient absorption within the intestinal tissue. This study investigated the expression of *RHOA*, *ACTA2*, and *ENO1* genes in the jejunum of high feed efficiency (HFE) and low feed efficiency (LFE) turkeys. *RHOA* is involved in angiogenesis. Meanwhile, *ACTA2* is essential for maintaining vascular structure and integrity. Additionally, *ENO1* provides the adenosine triphosphate (ATP) required for endothelial cell proliferation and migration, processes involved in angiogenesis. The expected higher expression of these genes in HFE turkeys suggests improved intestinal function, energy metabolism, and angiogenesis, contributing to better feed efficiency. This research aimed to lay the groundwork for identifying genetic markers to enhance feed efficiency in turkey, contributing to more sustainable animal protein production.

Materials and methods: Samples from native Iranian turkeys were used in this study. A total of 500 male turkey poults were raised under standard production protocols until 20 weeks of age. Subsequently, 75 turkeys were selected and transferred to individual cages to allow for precise monitoring of feed intake and weight gain. Body weight was measured at 20 weeks of age (the initiation of the cage period) and at 24 weeks of age (the termination of the experimental period). The turkeys were then ranked based on their feed conversion ratio (FCR), with FCR ranging from 3.59 to 16.346. Jejunum tissue samples were collected post-slaughter from three turkeys exhibiting HFE and three turkeys exhibiting LFE. The collected tissue samples were immediately stored at -80°C to preserve RNA integrity. Total RNA was extracted from 250 mg of jejunum tissue samples using the RNeasy Midi Kit (Qiagen). The quality and concentration of the extracted RNA were assessed using a spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. Primers for the target genes (*RHOA*, *ACTA2*, and *ENO1*) and the reference gene (*RPS7*) were designed using specialized software. Real-time PCR was performed to quantify the expression levels of the target genes, and gene expression levels were calculated using the Pfaffl method, which normalizes the data

* Corresponding author: mirhosin@guilan.ac.ir



to the reference gene. Statistical analyses, including Shapiro-Wilk and Spearman's rank correlation, were performed using GraphPad Prism 8, with significance set at $P < 0.05$.

Results and discussion: High-quality RNA was confirmed by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. *RPS7* was selected as the stable reference gene, its stability having been confirmed in previous studies. Melting curve analysis confirmed primer specificity and lack of non-specific products. Real-time PCR analysis showed that the expression of all three genes was significantly higher in the HFE group ($P < 0.05$). Specifically, *RHOA* expression was approximately 7.52 times higher, *ACTA2* about 46.17 times higher, and *ENO1* around 33.08 times higher in the HFE group compared to the LFE group. Spearman's rank correlation analysis revealed significant positive correlations for *ACTA2* and *ENO1* with feed efficiency ($r_s = 1$, $P = 0.0028$), while *RHOA* showed a strong positive correlation ($r_s = 0.8$) approaching statistical significance ($P = 0.058$). The high correlation between *ACTA2* and *ENO1* also suggests shared regulatory mechanisms, reinforcing their combined role in feed efficiency.

Conclusions: The elevated expression of *RHOA*, *ENO1*, and *ACTA2* in HFE turkeys enhanced intestinal function, vascular network development, and energy supply, underscoring their importance in nutrient absorption and overall feed efficiency. These findings align with existing evidence in other species and provide a foundation for identifying potential genetic markers and developing nutritional and genetic strategies to improve poultry production efficiency. Further research is necessary to fully elucidate the complex interactions among these genes and other factors contributing to turkey.

Keywords: Native turkey, Gene expression, Metabolism, Intestinal function, Genetic marker

Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of the University of Guilan, Iran.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The study was funded by the Iranian Biotechnology Fund under Grant No. 13829.

Acknowledgement: We would like to express our deep gratitude and appreciation for the valuable efforts of Dr. Zahra Pezeshkian, a graduate student of the Department of Animal Science at the University of Guilan, for breeding and sampling.

How to cite this article:

Darang, E., Mirhoseini, S. Z., Ghovvati, Sh., & Khansefid, M. (2025). Study of the molecular relationship between the jejunum angiogenesis pathway and feed efficiency in Iranian native turkeys. *Animal Production Research*, 14(3), 49-60. doi: 10.22124/ar.2025.30674.1897



بررسی ارتباط مولکولی بین مسیر رگ‌زایی ژژنوم و بازده خوراک در بوقلمون‌های بومی ایران

الهام دارنگ^۱، سید ضیاءالدین میرحسینی^{۱*}، شاهرخ قوتی^۱، مجید خان سفید^{۲،۳}

۱- گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- پژوهشکده تحقیقات کشاورزی ایالت ویکتوریا، مرکز علوم زیستی کشاورزی، ۵ رینگ رود، بوندورا، ویکتوریا ۳۰۸۳، استرالیا

۳- دانشکده زیست‌شناسی سامانه‌های کاربردی، دانشگاه لاتروب، بوندورا، ویکتوریا ۳۰۸۳، استرالیا

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۵ - تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۴/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۲ - تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۴/۰۴/۲۵)

چکیده

بهبود بازده خوراک در پرورش بوقلمون از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار است. ژن *RHOA* با تنظیم اسکلت اکتین و تسهیل مهاجرت سلول‌های اندوتلیال؛ ژن *ACTA2* با پایداری شبکه عروقی و ژن *ENO1* با تأمین انرژی در فرآیند رگ‌زایی، نقش کلیدی ایفا می‌کنند. مطالعه حاضر با هدف بررسی بیان ژن‌های *RHOA*، *ACTA2* و *ENO1* در ژژنوم روده بوقلمون‌های نر بومی ایران با بازده خوراک بالا (HFE) و پایین (LFE) انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل Real-time PCR روی نمونه‌های RNA استخراج شده از بافت ژژنوم سه قطعه بوقلمون از هر گروه نشان داد که بیان هر سه ژن در گروه HFE به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.05$). تجزیه همبستگی اسپیرمن، همبستگی‌های مثبت قوی و معنی‌داری برای ژن‌های *ACTA2* و *ENO1* ($r_s = 1$, $P = 0.0028$) و همچنین، همبستگی مثبت قوی برای ژن *RHOA* ($r_s = 0.18$) (نزدیک به سطح معنی‌داری آماری، $P = 0.058$) با بازده خوراک آشکار کرد. نتایج این پژوهش نشان داد که افزایش بیان ژن‌های *RHOA*، *ACTA2* و *ENO1* سبب تقویت رگ‌زایی در روده می‌شود که این امر، زمینه ساز بهبود جذب مواد مغذی و سوخت و ساز خوراک شده که در نهایت سبب افزایش بازده خوراک در بوقلمون‌های HFE شده است. یافته‌های این پژوهش، زمینه‌ساز شناسایی نشانگرهای ژنتیکی برای بهبود صفت بازده خوراک در بوقلمون هستند.

واژه‌های کلیدی: بوقلمون بومی، بیان ژن، سوخت و ساز، عملکرد روده، نشانگر ژنتیکی

* نویسنده مسئول: mirhosin@guilan.ac.ir

مقدمه

در دهه‌های اخیر، روش Real-time PCR به‌عنوان ابزاری توانمند در تحقیقات زیستی، امکان کمی‌سازی دقیق و حساس اسیدهای نوکلئیک را فراهم آورده و به‌طور گسترده در ارزیابی تغییرات بیان ژن در پاسخ به محرک‌های گوناگون مورد استفاده قرار گرفته است (Cao et al., 2018; Nassiri et al., 2018; Pezeshkian et al., 2022a). صنعت رو به رشد تولید دام و طیور، بهبود راندمان خوراک به‌عنوان یک هدف کلیدی در برنامه‌های اصلاح نژادی از اهمیت زیادی برخوردار است. بازده خوراک، که به‌صورت نسبت بین خوراک مصرفی و افزایش وزن یا تولید تعریف می‌شود، یک صفت پیچیده و چندعاملی است که تحت تأثیر عوامل ژنتیکی، فیزیولوژیکی، تغذیه‌ای و محیطی قرار دارد (Willems et al., 2013; Carmelo et al., 2020; Pezeshkian et al., 2022b). مزایای اقتصادی برای تولیدکنندگان، در راستای دستیابی به پایداری بیشتر در تولید پروتئین حیوانی نیز نقش حائز اهمیتی ایفا می‌کند.

در این میان، گوشت بوقلمون به‌دلیل ارزش غذایی بالا و محتوای چربی پایین‌تر، به‌طور فزاینده‌ای در سبد غذایی جهانی مورد توجه قرار گرفته است (Kálmán & Szöllősi, 2023). پیشرفت‌های چشمگیر در پرورش بوقلمون‌های اهلی منجر به افزایش سرعت رشد و بهبود عملکرد تولیدی آن‌ها شده است. در این راستا، درک مبانی مولکولی و ژنتیکی مرتبط با بازده خوراک در این گونه می‌تواند مسیرهای نوینی را برای برنامه‌های اصلاح نژادی هدفمند گشوده و به انتخاب ژنوتیپ‌های برتر با کارایی بالاتر منجر شود (Pezeshkian et al., 2022b).

روده، به‌عنوان محل اصلی هضم و جذب مواد مغذی، نقش محوری در تعیین کارایی استفاده از خوراک ایفا می‌کند (Ghareeb et al., 2016). ساختار و عملکرد بهینه اپیتلیوم روده، به‌ویژه پرزها و میکروویلی‌ها، برای جذب مؤثر مواد مغذی ضروری است. مطالعات متعددی به بررسی ژن‌های مرتبط با بازده خوراک در گونه‌های مختلف طیور پرداخته‌اند، یعنی ژن‌هایی که در مسیرهای متابولیسمی متنوعی از جمله هضم، سوخت و ساز انرژی، پاسخ به تنش، رگ‌زایی و ساختار اسکلت سلولی نقش دارند. رگ‌زایی در روده با افزایش سطح دسترسی به مواد غذایی و جذب آن‌ها می‌تواند بر بهبود بازده خوراک اثر گذار باشد (Schlieve et

al., 2016). در این راستا، ژن *RHOA* با تنظیم دینامیک اسکلت سلولی اکتین در تشکیل و حفظ ساختار میکروویلی‌ها و ساخت عروق خونی آن‌ها نقش داشته و در حفظ یکپارچگی ساختاری سلول‌های اپیتلیال روده نیز مؤثر است (Bruewer et al., 2004; Song et al., 2012; Pillay et al., 2022; Dopeso et al., 2024). ژن *ACTA2* در ساختار عروق خونی و فرآیند رگ‌زایی دخیل بوده و تأمین خون کافی برای جذب مواد مغذی را تسهیل می‌نماید (Vincent et al., 2015; Yuan, 2015). همچنین، ژن *ENO1* به‌عنوان ژن تولیدکننده آنزیم کلیدی آنولاز در مسیر گلیکولیز در تامین ATP مسیر متابولیسمی رگ‌زایی و همین‌طور فراهم آوردن انرژی برای انتقال فعال مواد مغذی در سلول‌های اپیتلیال روده نقش مهمی ایفا می‌کند (Kong et al., 2017; Ramiah et al., 2019; Xu et al., 2022). با وجود نقش شناخته‌شده این ژن‌ها در فرآیندهای مرتبط با ساختار و عملکرد روده و سوخت و ساز انرژی، تاکنون مطالعه‌ای به‌طور خاص به بررسی میزان بیان ژن‌های *RHOA*، *ACTA2* و *ENO1* در بافت ژنوم بوقلمون‌های با راندمان خوراک متفاوت نپرداخته است. هدف از این پژوهش، بررسی میزان بیان این سه ژن در بافت ژنوم بوقلمون‌های با راندمان خوراک بالا (HFE) و پایین (LFE) با استفاده از روش Real-time PCR و مسیر سیگنالینگ آن‌ها است.

مواد و روش‌ها

۵۰۰ قطعه بوقلمون نر تا سن ۲۰ هفتگی با پروتکل استاندارد تولید پرورش داده شدند و ۷۵ بوقلمون به‌طور تصادفی انتخاب شده و به مزرعه تحقیقاتی دانشگاه گیلان منتقل شدند (Pezeshkian et al., 2022b). آن‌ها در قفس‌های انفرادی نگهداری شده و دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. رژیم روشنایی شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. وزن بدن در ابتدای ورود به قفس (۲۰ هفتگی) و در پایان دوره آزمایش (۲۴ هفتگی)، اندازه‌گیری شد. بوقلمون‌ها بر اساس نسبت تبدیل خوراک به گوشت (FCR) رتبه‌بندی شدند. FCR در میان پرندگان ارزیابی شده از ۳/۵۹ تا ۱۶/۳۴۶ متغیر بود. سه بوقلمون با بالاترین بازده خوراک (دارای کمترین FCR، میانگین وزن برابر با ۷۱۶۶ گرم و انحراف استاندارد وزن برابر با ۸۸۴/۸۵) در گروه بازده خوراک بالا (HFE) و سه بوقلمون با کمترین

TAdvanced ساخت کشور آلمان مطابق با دستورالعمل ارائه شده به وسیله شرکت سازنده انجام پذیرفت. شرایط دمایی و زمانی و مقادیر مواد به کار رفته در این واکنش به ترتیب در جداول ۲ و ۳ ارائه شده است. برای تعیین دمای اتصال بهینه آغازگرها برای هر یک از ژنهای مورد مطالعه، آزمایش گرادینانی در دماهای ۵۷ تا ۶۲ درجه سلسیوس انجام شد.

نمونه‌ها در هر دما زیر واکنش PCR قرار گرفتند و شدت سیگنال فلورسانس تولید شده به وسیله محصولات PCR ردیابی شد. دمایی که بالاترین سیگنال را نشان داد به عنوان دمای بهینه برای اتصال آغازگرها تعیین شد.

واکنش Real-time PCR با استفاده از دستگاه LightCycler ساخت شرکت Roche در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه گیلان انجام شد. برای تکثیر نمونه‌ها، از کیت SinaSYBERBlue HS-qPCRMix با غلظت 2X شماره کاتالوگ MM2171 شرکت سیناکلون ایران استفاده شد. تکثیر نمونه‌ها برای هر ژن با سه تکرار انجام گرفت. مقادیر مواد مورد استفاده در این واکنش با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در جدول ۴ ارائه شده است.

نتایج حاصل از Real-time PCR با استفاده از نرم افزار LightCycler مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقدار چرخه آستانه (Ct) برای هر نمونه و هر ژن تعیین شد. به منظور محاسبه دقیق میزان بیان نسبی ژنهای هدف، از ژن *RPS7* برای نرمال سازی داده‌های بیان ژن استفاده شد. میزان بیان نسبی یا Fold Change ژنهای هدف، با استفاده از روش Pfaffl (2001) و با نرمال سازی نسبت به ژن کنترل داخلی منتخب محاسبه شد.

$\Delta Ct = Ct - (Ct \text{ (هدف)})$ (ژن کنترل داخلی)

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (HFE)} - \Delta Ct \text{ (میانگین)}$

$\text{Fold Change} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

بازده خوراک (دارای بیشترین FCR، میانگین وزن برابر با ۵۵۲۶ گرم، انحراف استاندارد وزن برابر با ۳۳۲/۱۱۰) در گروه بازده خوراک پایین (LFE) قرار گرفتند. همچنین، انحراف استاندارد FCR دو گروه HFE و LFE به ترتیب برابر ۴/۳۴۲ و ۰/۲۸۶ بود.

بافت ژنوم بوقلمون‌های دو گروه HFE و LFE پس از کشتار جمع‌آوری شده و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. استخراج RNA از نمونه‌های بافت ژنوم با استفاده از کیت RNeasy Midi ساخت شرکت Qiagen آلمان (Cat# 75144) طبق پروتکل شرکت سازنده با اندکی تغییرات انجام شد. به طور خلاصه، ۲۵۰ میلی گرم از بافت ژنوم روده در لوله‌های آماده‌سازی بافت Qiagen به مدت حدود سه دقیقه (به دلیل ویژگی‌های بافت روده، زمان بیشتری برای همگن سازی مورد نیاز بود) قرار داده شد و هر نمونه، خرد و همگن شد. تمامی مراحل استخراج RNA در محیط استریل و روی یخ انجام شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. کیفیت RNA استخراج شده با بررسی نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد. همچنین، یکپارچگی RNA با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. طراحی آغازگر برای ژنهای هدف *ACTA2*، *RHOA* و *ENO1* و ژن مرجع *RPS7* با استفاده از نرم افزارهای تخصصی V5 انجام شد (جدول ۱). بهترین آغازگر برای هر ژن با توجه به ویژگی‌های ساختاری و بررسی‌های پایگاه داده NCBI انتخاب شد و سفارش طراحی آن‌ها به شرکت سیناکلون در ایران داده شد. جهت ساخت cDNA از RNA کل از کیت Revert Aid First Strand cDNA Synthesis شرکت Thermo Scientific (K1621) استفاده شد. این فرآیند با استفاده از دستگاه Biometra Thermal Cycler

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژنهای هدف و ژن مرجع مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. The primer sequences of target genes and reference gene used in this study

Gene name	Sequence	Product length (bp)	Accession number
<i>ACTA2</i>	Forward 5' TGGCCCATCCATTGTTCCACC 3'	113	NM_001031229.2
	Reverse 5' GCATCTCTAAAATAGGAGCAGCGA 3'		
<i>ENO1</i>	Forward 5' ACCCCGAAGTCATTCTGCCTGT 3'	222	XM_010722759.2
	Reverse 5' CAAAGCCACCCTCATCACC 3'		
<i>RHOA</i>	Forward 5' CCCTGAAGTCTATGTTCCCACC 3'	138	NM_001303210.1
	Reverse 5' TCTGGATAAGAAAGCGGTCTAAGTC 3'		
<i>RPS7</i>	Forward 5' TGAAGTAGGTGGTGGCAGGAA 3'	165	NM_001285787
	Reverse 5' CTCGTTGGCTTGGGCAGAA 3'		

۲۶۰/۲۸۰ در نمونه‌ها برابر ۲/۸ تا ۲/۱۱ بود که نشان‌دهنده کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده است و بیانگر عدم آلودگی نمونه‌های RNA نیز است. همچنین، نتایج الکتروفورز محصولات RNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد، حضور باندهای شفاف و شارپ 18S و 28S را نشان داد که حکایت از کیفیت مناسب RNA استخراج شده برای آزمون را تأیید می‌کند.

انتخاب *RPS7* به‌دلیل پایداری بالای آن در بافت ژنوم در مطالعات پیشین صورت گرفته است. بررسی‌های Olias et al. (2014) نیز *RPS7* را یکی از پنج ژن کنترل داخلی با مطلوبیت بالا در گونه‌های مختلف پرندگان گزارش نموده‌اند (Olias et al., 2014). علاوه بر این، پژوهش Na et al. (2021) نیز ثبات و مناسب بودن *RPS7* را به‌عنوان سومین ژن کنترل داخلی پایدار در بافت چربی جوجه‌های گوشتی تأیید نموده است (Na et al., 2021). بر این اساس، با تکیه بر پایداری مشهود *RPS7* در بافت ژنوم، این ژن به‌عنوان ژن کنترل داخلی برتر برای نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن در این بافت برگزیده شد. برای تعیین دمای اتصال مناسب آغازگرهای اختصاصی ژن‌های هدف و ژن کنترل داخلی در واکنش PCR، از روش گرادیان دمایی استفاده شد. بر اساس نتایج این آزمایش، دمای ۶۰ درجه سلسیوس به‌عنوان دمای اتصال بهینه انتخاب شد، زیرا در این دما، تکثیر اختصاصی و همزمان هر دو گروه ژن (هدف و کنترل) با کارایی مطلوب صورت گرفت.

به‌منظور ارزیابی و تأیید اختصاصیت واکنش‌های تکثیر، در روش Real-time PCR مبتنی بر رنگ فلورسنت سایر گرین، تجزیه منحنی ذوب برای هر ژن به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. این تجزیه به‌منظور اطمینان از تکثیر قطعه هدف مورد نظر، عدم تشکیل محصولات جانبی غیر اختصاصی و فقدان ساختارهای ثانویه نظیر دایمرهای پرایمری و ساختارهای سنجاق سری صورت گرفت. نتایج حاصل از منحنی ذوب نشان داد که برای هر ژن، تنها یک نقطه اوج تیز و منفرد در دمای ذوب مورد انتظار مشاهده شد و هیچ نقطه اوج ثانویه کوچک یا پهن‌تری که نشان‌دهنده محصولات غیر اختصاصی یا دایمرهای پرایمری باشد، شناسایی نشد. این یافته‌ها مؤید اختصاصیت بالای آغازگرهای طراحی شده برای هر ژن و عدم وجود تقابل بین آغازگرها است (شکل ۱).

جدول ۲- شرایط دمایی و زمانی جهت ساخت cDNA
Table 2. Temperature and time conditions for cDNA synthesis

Time (minutes)	Temperature (°C)
5	25
60	45
5	70

جدول ۳- مقادیر مواد استفاده شده جهت ساخت cDNA
Table 3. Amounts of materials used for cDNA synthesis

Materials	Value (μL)
5X reaction buffer	4
RiboLock RNase inhibitor	1
dNTP	2
Reverse transcriptase	1
Oligo (dT)	1
Random hexamer	1
Water	5
RNA	5

جدول ۴- مقادیر مواد لازم در تکثیر هر نمونه
Table 4. Amounts of reagents required for amplification of each sample

Reagent	μL
Master mix (Sybr Green)	2X 10
Forward primer	10 Pmol 1
Reverse primer	10 Pmol 1
RNase-free water	- 6
Template (cDNA)	- 2

برای ارزیابی داده‌های به‌دست‌آمده، تمامی تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) انجام شد. ابتدا، نرمالیت توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به عدم نرمالیت داده‌ها و حجم نمونه محدود ($n=6$)، برای بررسی ارتباط یکنواخت بین سطح بیان ژن‌ها و صفت بازده خوراک، ضریب همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن محاسبه شد. سطح معنی‌داری آماری برای کلیه آزمون‌ها $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

کمیت RNAهای استخراج شده به‌وسیله نانودراپ سنجیده شد. غلظت و نسبت طول موج ۲۶۰/۲۸۰ در نمونه‌های روده کوچک در جدول ۵ ذکر شده است. نسبت جذب طول موج

دادند که ژن‌های *ACTA2* و *ENO1* دارای ضریب همبستگی مثبت کامل و از نظر آماری، معنی‌دار با بازده خوراک ($r_s=1, P=0/0028$) بودند. ژن *RHOA* نیز همبستگی نسبتاً قوی ($r_s=0/8$)، اما مقدار P نزدیک به سطح معنی‌داری آماری ($P=0/058$) داشت. این نتایج، بیانگر هماهنگی دقیق و یکسان در رتبه‌بندی بیان این ژن‌ها با رتبه‌بندی بازده خوراک در حیوانات مورد بررسی است و با وجود حجم نمونه محدود (سه بوقلمون در هر گروه)، می‌توانند نشانگر روندهای زیستی معتبر در بافت هدف باشند. همچنین، بررسی همبستگی بین بیان ژن‌های *ACTA2* و *ENO1* نیز نشان داد که این دو ژن از الگوی بیانی هماهنگ و مرتبطی پیروی می‌کنند ($r_s=1, P=0/0028$). این هماهنگی می‌تواند ناشی از فعال‌سازی هم‌زمان آن‌ها در شرایط فیزیولوژیکی مشابه یا تنظیم‌گرهای مشترک در سطح ترانسکریپتومی باشد. بنابراین، شباهت نتایج آماری این دو ژن در ارتباط با بازده خوراک، با توجه به همبستگی درونی آن‌ها، از نظر آماری و زیستی قابل توجیه است. این یافته‌ها در کنار هم، فرضیه مشارکت این ژن‌ها در تعیین کارایی تغذیه‌ای از مسیر ساز و کارهای تنظیمی مشابه را تقویت می‌نماید و مبنای مناسبی برای بررسی‌های تکمیلی در جمعیت‌های بزرگ‌تر فراهم می‌آورد.

میزان بیان ژن‌های *RHOA*، *ACTA2* و *ENO1* که در فرآیندهای مرتبط با بازده غذایی نقش دارند، در بوقلمون‌های نر HFE و LFE با استفاده از روش Real-time PCR و بر اساس مقادیر mRNA و CT هر ژن نسبت به ژن کنترل داخلی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که سطح بیان این سه ژن در گروه HFE به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) بالاتر از گروه LFE بود (شکل ۲). این یافته‌ها حاکی از نقش احتمالی این ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با آن‌ها (تنظیم اسکلت اکتین، ساختار عروق و سوخت و ساز انرژی) در تعیین کارایی استفاده از خوراک در بوقلمون‌ها است. میزان بیان ژن *RHOA* در گروه HFE به‌طور متوسط، ۷/۵۲ برابر بیشتر از گروه LFE بود. این افزایش برای ژن *ACTA2* به‌طور چشمگیری بالاتر و به‌میزان تقریبی ۴۶/۱۷ برابر و برای ژن *ENO1* نیز قابل توجه و در حدود ۳۳/۰۸ برابر بیشتر در گروه HFE نسبت به LFE مشاهده شد.

نتایج بررسی توزیع داده‌های بازده خوراک با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک نشان داد که این داده‌ها از توزیع نرمال پیروی نمی‌کنند ($P=0/0048$). به‌دلیل توزیع غیرنرمال و حجم نمونه محدود ($n=6$)، تجزیه همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن برای ارزیابی ارتباط یکنواخت بین بیان سه ژن منتخب و بازده خوراک در بوقلمون‌ها انجام شد. نتایج نشان

جدول ۵- غلظت و نسبت جذب طول موج ۲۶۰/۲۸۰ در نمونه‌های بافت ژئونم شش بوقلمون

(سه بوقلمون با بازده غذایی بالا و سه بوقلمون با بازده غذایی پایین)

Table 5. Concentration and absorption ratio of 260/280 wavelengths in jejunal tissue samples from six turkeys (three high feed efficiency (H) turkeys and three low feed efficiency turkeys (L))

Sample	Concentration (ng/ μ L)	Ratio 260/280	Animal Number	Efficiency
H1	581.796	2.085	1	High
H2	1609.957	2.099	2	High
H3	655.769	2.08	3	High
L4	272.8	2.11	4	Low
L5	259.3	2.09	5	Low
L6	468.4	2.11	6	Low

جدول ۶- برنامه دمایی و چرخه‌های واکنش Real-time PCR

Table 6. Thermal cycling conditions and reaction cycles of real-time PCR

Stage	Cycles	Temperature ($^{\circ}$ C)	Process	Holding time (seconds)
Before Amplify	1	95	Initial denaturation	300
Amplification	42	94	Denaturation	30
		60	Annealing	20
		72	Extension	20
Melting Curve	1	95	Denaturation	10
		65	Annealing	60
		97	Extension	1

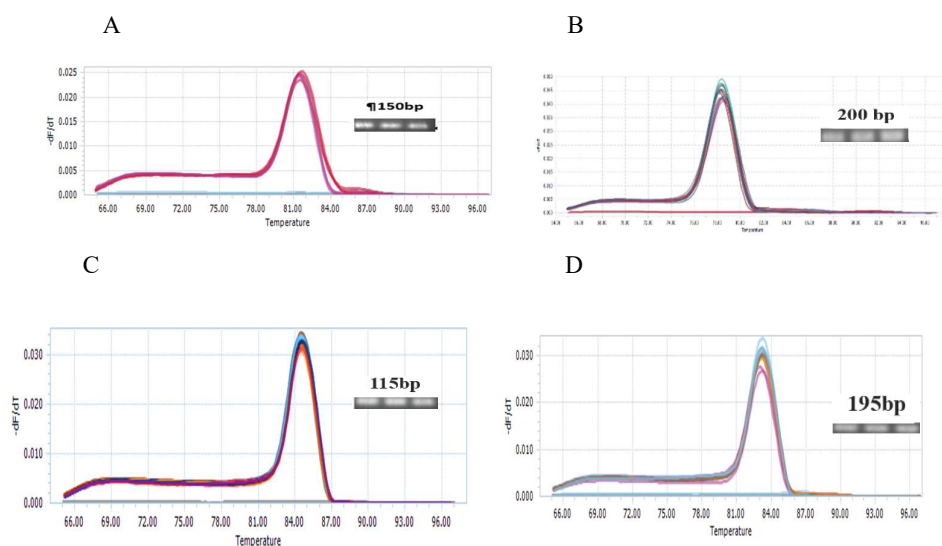


Fig. 1. Melting curves of Real-time PCR products of three main genes and one internal control gene, and image of these products on agarose gel. A. Melting curve of Real-time PCR products of *ACTA2* gene, B. Melting curve of Real-time PCR products of *RHOA* gene, C. Melting curve of Real-time PCR products of *ENO1* gene, D. Melting curve of Real-time PCR products of *RPS7* gene

شکل ۱- منحنی ذوب محصولات Real-time PCR سه ژن اصلی و یک ژن کنترل داخلی و تصویر این محصولات بر روی ژل آگارز. الف. منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن *ACTA2*، ب. منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن *RHOA*، ج. منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن *ENO1*، د. منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن *RPS7*

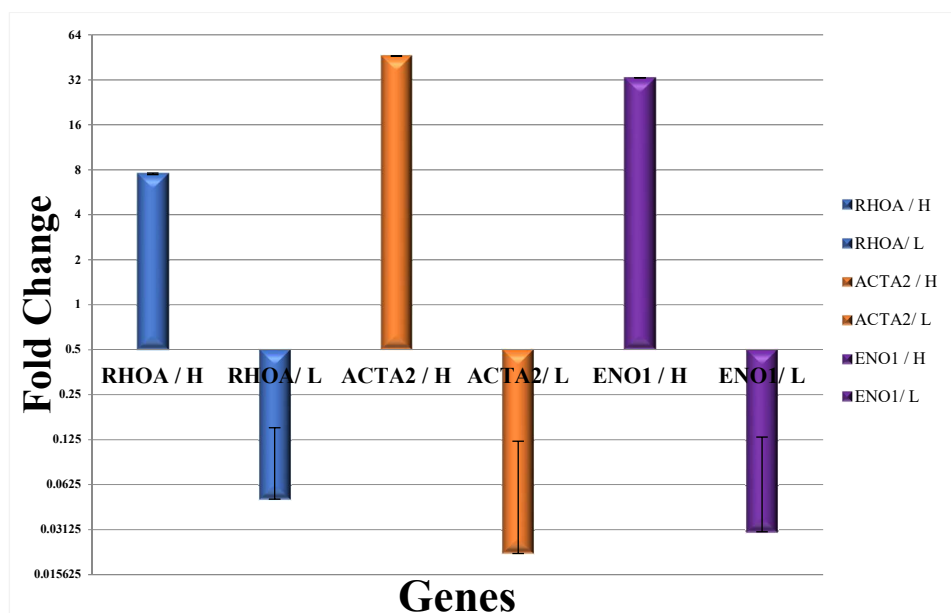


Fig. 2. Expression of *RHOA*, *ACTA2* and *ENO1* genes in male native turkeys with high feed efficiency (HFE) and low feed efficiency (LFE)

شکل ۲- بیان ژن‌های *RHOA*، *ACTA2* و *ENO1* در بوقلمون‌های بومی نر با بازده غذایی بالا (HFE) و پایین (LFE)

مورد نیاز در تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال نقش دارد (Ramiah et al., 2019).

پروتئین *ACTA2* (آلفا-اکتین عضله صاف)، به‌عنوان جزء ساختاری اصلی فیلامنت‌های اکتین در سلول‌های عضله صاف عروقی، نقش اساسی در ایجاد ساختار لازم برای انقباضات تنظیمی و همچنین، حفظ ثبات و یکپارچگی شبکه عروقی ایفا می‌نماید. تعامل دینامیک بین میوزین II فعال شده زیر کنترل مسیر سیگنالینگ (*RHOA/ROCK*) و فیلامنت‌های اکتین حاوی *ACTA2* در سلول‌های اندوتلیال، در تنظیم ساختارهای پیشرو مهاجرتی و اتصالات بین سلولی دخیل بوده و بدین ترتیب، پیشبرد صحیح جوانه‌زنی عروقی و تشکیل لومن عروقی را تسهیل می‌نماید (Yuan, 2015; Uray et al., 2020). فعالیت‌های اسکلت اکتین که به‌وسیله *RHOA* و *ACTA2* تنظیم می‌شوند به‌عنوان یک مولفه تشکیل‌دهنده رگ‌های خونی، به انرژی متابولیکی وابسته است که ژن *ENO1* از مسیر گلیکولیز در تامین آن نقش اساسی دارد (شکل ۳).

اگرچه به‌عنوان یک مطالعه مقدماتی و با حجم نمونه محدود، نتایج حاضر نیازمند تأیید در جمعیت‌های بزرگ‌تر هستند، اما به‌طور کلی، یافته‌های مطالعه حاضر با شواهد موجود در سایر گونه‌ها مبنی بر نقش سه ژن *RHOA*، *ACTA2* و *ENO1* در ساختار و عملکرد روده، رگ‌زایی و سوخت و ساز انرژی (Vincent et al., 2004; Bruewer et al., 2015b; Ramiah et al., 2019; Wu et al., 2020a) سازگار است و ارتباط بین افزایش بیان آن‌ها در بافت ژژنوم و بازده خوراک بالاتر در بوقلمون‌ها را آشکار می‌سازد. این یافته‌ها نه تنها بر اهمیت محوری ژن‌های *ENO1*، *RHOA* و *ACTA2* در فیزیولوژی روده و کارایی جذب مواد مغذی تاکید دارند، بلکه دریچه‌های جدیدی را به‌سوی درک ساز و کارهای مولکولی مرتبط با بهبود بازده خوراک در صنعت طیور می‌گشایند.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهند که افزایش سطح بیان ژن‌های *ENO1*، *RHOA* و *ACTA2* در بافت ژژنوم بوقلمون‌های با بازده خوراک بالا، نقش مهمی در بهبود عملکرد روده، توسعه شبکه عروقی کارآمد و تامین انرژی مورد نیاز برای این فرآیندها ایفا می‌کند. بررسی و تائید عملکرد این سه ژن در سطح ترانسکریپتومی در

عملکرد بهینه روده، به‌عنوان محور اصلی جذب مواد مغذی، به‌تنظیم دقیق حرکات دودی و قطعه‌ای عضلات صاف دیواره آن وابسته است. پروتئین GTPase کوچک *RHOA*، با ایفای نقش کلیدی در سازماندهی اسکلت اکتین و فعال‌سازی مسیر پایین‌دست ROCK، انقباض عضلات صاف روده را تنظیم نموده و بدین ترتیب، حرکت مؤثر محتویات لوله گوارش و اختلاط آن‌ها با آنزیم‌های گوارشی را تسهیل می‌نماید (Bruewer et al., 2004; Bryan & D'Amore, 2007; López-Colomé et al., 2017; ژن *ENO1*، کدکننده آنزیم آلفا-انولاز، از راه تسهیل مسیر گلیکولیز و تولید آدنوزین تری‌فسفات (ATP)، نقش حیاتی در تامین انرژی مورد نیاز سلول‌های اپیتلیال و عضلات صاف روده برای انجام این عملکردهای متابولیکی و حرکتی ایفا می‌نماید (Ramiah et al., 2019). علاوه بر نقش حرکات روده در جذب بهینه مواد غذایی، شبکه عروقی غنی و کارآمد در بافت روده، که از مسیر فرآیند رگ‌زایی شکل می‌گیرد، نقش بنیادینی در سوخت و ساز خوراک ایفا می‌کند (Wu et al., 2020b). این شبکه، بستر لازم برای جذب مواد مغذی هضم‌شده از لومن روده به جریان خون را فراهم می‌آورد. کاهش در رگ‌زایی و کاهش تراکم یا عملکرد عروق خونی روده می‌تواند منجر به سوء جذب مواد مغذی و در نتیجه، اختلال در سوخت و ساز خوراک و بروز مشکلات تغذیه‌ای شود (Bryan & D'Amore, 2007; Dopeso et al., 2024). بنابراین، حفظ و توسعه مناسب شبکه عروقی روده از راه ساز و کارهای تنظیم‌شده آنژیوژنیک، برای اطمینان از جذب کافی مواد مغذی و حمایت از عملکرد متابولیکی کل بدن ضروری است (Bryan & D'Amore, 2007; Wang et al., 2011). در این راستا، *RHOA* در فرآیند پیچیده رگ‌زایی نیز دخالت دارد. تحریک مسیرهای سیگنالینگ آنژیوژنیک، از جمله مسیر Wnt از راه القای فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (*VEGF*)، منجر به فعال شدن *RHOA* در سلول‌های اندوتلیال می‌شود. متعاقباً، فعال‌سازی *ROCK* به‌وسیله *RHOA*، با فسفوریلاسیون زنجیره سبک میوزی (MLC)، انقباض اسکلت اکتین را در این سلول‌ها تنظیم نموده و بدین ترتیب، مراحل کلیدی رگ‌زایی از قبیل مهاجرت سلولی، تغییر ریخت‌شناسی سلول و تنظیم دقیق نفوذپذیری عروق را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Wang et al., 2011; Zhan et al., 2017). ژن *ENO1* در این فرآیند از راه تامین ATP

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات ارزشمند سرکار خانم دکتر پزشکیان، دانش‌آموخته گروه علوم دامی دانشگاه گیلان، برای پرورش و نمونه‌برداری، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین، از حمایت مالی صندوق بیوتکنولوژی ایران با شماره گرنت ۱۳۸۲۹ نیز سپاسگزاریم.

بوقلمون‌های بومی ایران و همسویی آن با یافته‌های موجود در سایر گونه‌ها، بر نقش کلیدی آن‌ها در ساختار و عملکرد بهینه دستگاه گوارش و سوخت و ساز انرژی بوقلمون و احتمالاً سایر طیور و ماکیان تاکید دارد. این یافته‌ها می‌توانند مبنایی برای تحقیقات آتی در زمینه شناسایی نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با بازده خوراک و توسعه راهبردهای تغذیه‌ای و ژنتیکی به‌منظور بهبود کارایی تولید در صنعت طیور فراهم آورند.

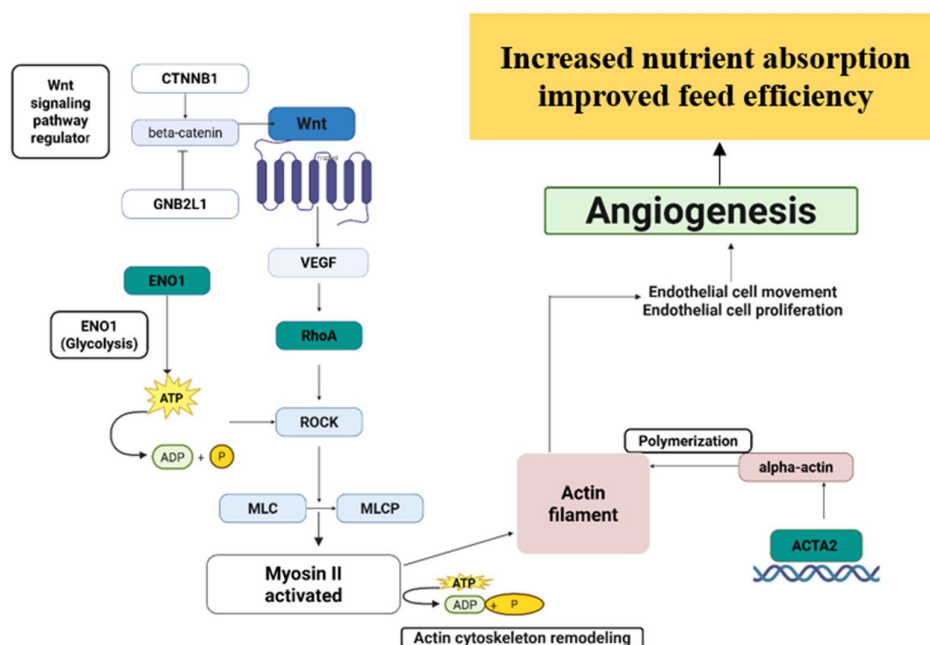


Fig. 3. Angiogenesis Signaling Pathways in intestine

(Wnt stimulates VEGF, activating *RHOA*. Activated *RHOA* activates *ROCK*, leading to ATP-dependent activation of Myosin II. Activated Myosin II remodels the actin cytoskeleton, crucial for endothelial cell movement and proliferation (angiogenesis steps). The *ACTA2* gene encodes alpha-actin, a structural component of the actin cytoskeleton involved in these movements. The *ENO1* gene provides the necessary ATP for these cytoskeletal changes. Ultimately, these processes result in new blood vessel formation (Angiogenesis))

شکل ۳- مسیرهای سیگنالینگ رگ‌زایی در روده

فهرست منابع

- Bruewer, M., Hopkins, A. M., Hobert, M. E., Nusrat, A., & Madara, J. L. (2004). RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, 287(2), 327-335. doi: 10.1152/ajpcell.00087.2004
- Bryan, B. A., & D'Amore, P. A. (2007). What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(16), 2053-2065. doi: 10.1007/s00018-007-7008-z
- Cao, L., Chen, Y., Zhang, M., Xu, D. Q., Liu, Y., Liu, T., Liu, S. X., & Wang, P. (2018). Identification of hub genes and potential molecular mechanisms in gastric cancer by integrated bioinformatics analysis. *PeerJ*, doi: 10.7717/peerj.5180

- Carmelo, V. A. O., Banerjee, P., da Silva Diniz, W. J., & Kadarmideen, H. N. (2020). Metabolomic networks and pathways associated with feed efficiency and related-traits in Duroc and Landrace pigs. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14. doi: 10.1038/s41598-019-57182-4
- Doposo, H., Rodrigues, P., Cartón-García, F., Macaya, I., Bilic, J., Anguita, E., Jing, L., Brotons, B., Vivancos, N., Beà, L., Sánchez-Martín, M., Landolfi, S., Hernandez-Losa, J., Ramon y Cajal, S., Nieto, R., Vicario, M., Farre, R., Schwartz, S., van Ijzendoorn, S. C. D., ... Arango, D. (2024). RhoA downregulation in the murine intestinal epithelium results in chronic Wnt activation and increased tumorigenesis. *IScience*, 27(4), 109400. doi: 10.1016/j.isci.2024.109400
- Ghareeb, K. A. A. W., Awad, W. A., Böhm, J., & Zebeli, Q. (2016). Impact of luminal and systemic endotoxin exposure on gut function, immune response and performance of chickens. *World's Poultry Science Journal*, 72(2), 367-380. doi: 10.1017/S0043933916000180
- Kálmán, Á., & Szöllösi, L. (2023). Global tendencies in turkey meat production, trade and consumption. *Acta Agraria Debreceniensis*, 2, 83-89. doi: 10.34101/actaagrar/2/12594
- Kong, B. W., Hudson, N., Seo, D., Lee, S., Khatri, B., Lassiter, K., Cook, D., Piekarski, A., Dridi, S., & Anthony, N. (2017). RNA sequencing for global gene expression associated with muscle growth in a single male modern broiler line compared to a foundational barred Plymouth Rock chicken line. *BMC Genomics*, 18(1), 1-19. doi: 10.1186/s12864-016-3471-y
- López-Colomé, A. M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., & López, E. (2017). Paxillin: A crossroad in pathological cell migration. *Journal of Hematology and Oncology*, 10(1), 1-15. doi: 10.1186/s13045-017-0418-y
- Na, W., Wang, Y., Gong, P., Zhang, X., Zhang, K., Zhang, H., Wang, N., & Li, H. (2021). Screening of reference genes for RT-qPCR in chicken adipose tissue and adipocytes. *Frontiers in Physiology*, 12, 676864. doi: 10.3389/fphys.2021.676864
- Nassiri, M., Torshizi, M. E., Ghovvati, S., & Doosti, M. (2018). Evaluation of different statistical methods using SAS software: An in-silico approach for analysis of real-time PCR data. *Journal of Applied Statistics*, 45(2), 306-319. doi: 10.1080/02664763.2016.1276890
- Olias, P., Adam, I., Meyer, A., Scharff, C., & Gruber, A. D. (2014). Reference genes for quantitative gene expression studies in multiple avian species. *PLoS ONE*, 9(6), e99678. doi: 10.1371/journal.pone.0099678
- Pezeshkian, Z., Mirhoseini, S. Z., Ghovvati, S., & Ebrahimie, E. (2022a). Expression of serine biosynthesis pathway genes in breast muscles of Iranian native turkeys with divergent feed efficiency. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 14(3), 427-437. doi: 10.22067/ijasr.2022.74768.1061. [In Persian]
- Pezeshkian, Z., Mirhoseini, S. Z., Ghovvati, S., & Ebrahimie, E. (2022b). Transcriptome analysis of breast muscle reveals pathways related to protein deposition in high feed efficiency of native turkeys. *Animals*, 12(10), 1240. doi: 10.3390/ani12101240
- Pillay, L. M., Yano, J. J., Davis, A. E., Butler, M. G., Ezeude, M. O., Park, J. S., Barnes, K. A., Reyes, V. L., Castranova, D., & Gore, A. V. (2022). In vivo dissection of Rhoa function in vascular development using zebrafish. *Angiogenesis*, 25(3), 411-434. doi: 10.1007/s10456-022-09836-w
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. doi: 10.1093/nar/29.9. e45
- Ramiah, S. K., Abdullah, N., Akhmal, M., Mookiah, S., Farjam, A. S., Li, C. W., Boo, L. J., & Idrus, Z. (2019). Effect of feeding less shell, extruded and enzymatically treated palm kernel cake on expression of growth-related genes in broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 997-1004. doi: 10.1080/1828051X.2019.1589393
- Schlieve, C. R., Mojica, S. G., Holoyda, K. A., Hou, X., Fowler, K. L., & Grikscheit, T. C. (2016). Vascular endothelial growth factor (VEGF) bioavailability regulates angiogenesis and intestinal stem and progenitor cell proliferation during postnatal small intestinal development. *PLoS ONE*, 11(3), e0151396. doi: 10.1371/journal.pone.0151396
- Song, J. W., Daubriac, J., Janet, M. T., Bazou, D., & Munn, L. L. (2012). RhoA mediates flow-induced endothelial sprouting in a 3-D tissue analogue of angiogenesis. *Lab on a Chip*, 12(23), 5000-5006. doi: 10.1039/C2LC40389G
- Uray, K., Major, E., & Lontay, B. (2020). MicroRNA regulatory pathways in the control of the actin-myosin cytoskeleton. *Cells*, 9(7), 1649. doi: 10.3390/cells9071649
- Vincent, A., Louveau, I., Gondret, F., Tréfeu, C., Gilbert, H., & Lefaucheur, L. (2015). Divergent selection for residual feed intake affects the transcriptomic and proteomic profiles of pig skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 93(6), 2745-2758. doi: 10.2527/jas.2015-8928
- Wang, F., Yamauchi, M., Muramatsu, M., Osawa, T., Tsuchida, R., & Shibuya, M. (2011). RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3K/Akt pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9097-9106. doi: 10.1074/jbc.M110.165605
- Willems, O. W., Miller, S. P., & Wood, B. J. (2013). Aspects of selection for feed efficiency in meat producing poultry. *World's Poultry Science Journal*, 69(1), 77-88. doi: 10.1017/S004393391300007X

- Wu, J., Wang, X., Ding, R., Quan, J., Ye, Y., Gu, T., Xu, Z., Zheng, E., Cai, G., & Wu, Z. (2020a). Identification of important proteins and pathways affecting feed efficiency in DLY pigs by ITRAQ-based proteomic analysis. *Animals*, 10(2), 189. doi: 10.3390/ani10020189
- Wu, X., Wu, Y., Ye, B., Wu, F., & Wang, P. (2020b). High expression of ghrelin and Obe statin prepropeptide in tumor tissues predicted adverse overall survival in gastric carcinoma patients. *Medicine*, 99(26), e20635. doi: 10.1097/MD.00000000000020635
- Xu, Y., Wang, Q., Yang, Y., & Cheng, J. (2022). Betaine reduces lipid anabolism and promotes lipid transport in mice fed a high-fat diet by influencing intestinal protein expression. *Foods*, 11(16), 2421. doi: 10.3390/foods11162421
- Yuan, S. M. (2015). α -Smooth muscle actin and ACTA2 gene expressions in vasculopathies. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 30, 644-649. doi: 10.5935/1678-9741.20150085
- Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461-1473. doi: 10.1038/onc.2016.304