مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان۹۶

استفاده از نقشه یابی QTL برای بررسی تعدادی از صفات رشد و شاخص نسبت کلیبر روی کروموزوم دو بلدرچین ژاپنی

احسان نصیری فر[۱] و علی اسمعیلی زاده کشکوئیه[۲] و سعید سهرابی[۳] و حسن مرادیان[٤]

۱. دانش آموخته دکتری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم دامی، تهران، ایران - دانش آموخته دکتری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم دامی، تهران، ایران

۲. استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران - استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۳ و ٤. دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران - دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

ehsan.nasirifar@gmail.com

چکیده

برای شناسایی جایگاه های صفات کمی (QTL) موثر بر رشد روی کروموزوم دو در بلدرچین از یک طرح تلاقی F_2 استفاده شد. در این تحقیق یک جمعیت سه نسلی از تلاقی دوجانبه دو سویه بلدرچین ژاپنی (نر سفید تخمگذار × ماده وحشی گوشتی و نر وحشی گوشتی × ماده سفید تخمگذار) ایجاد شد. رکوردهای فنوتیپی صفات مربوط به رشد پرندگان نسل F_2 (٤٢٢) ثبت شدند. تمامی پرندگان مربوط به هر سه نسل برای ٤ نشانگر ریزماهواره موجود بر روی کروموزوم دو تعیین ژنوتیپ شدند. تجزیه و تحلیل QTL به روش مکان یابی درون فاصله ای مبتنی بر رگرسیون در ۳ مدل مختلف آماری انجام شد. در مدل اول اثر افزایشی و غلبه QTL برازش شد و صفات وزن بدن چهار هفتگی ($P<۰/۰۵$)، میانگین افزایش وزن روزانه در دو تا سه هفتگی ($P<۰/۰۵$) و نسبت کلیبر یک تا دو هفتگی ($P<۰/۰۵$) معنی دار شدند. در مدل دوم اثر متقابل QTL و هچ بررسی شد. برای چهار صفت وزن بدن در دو هفتگی ($P<۰/۰۵$)، وزن بدن در چهار هفتگی ($P<۰/۰۵$)، میانگین افزایش وزن روزانه یک تا دو هفتگی ($P<۰/۰۱$) و نسبت کلیبر یک تا دو هفتگی ($P<۰/۰۵$)، QTL

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

معنی دار شناسایی شد. در مدل سوم اثر متقابل جنس با اثر افزایشی و غلبه QTL بررسی شد و صفت معنی داری یافت نشد. واریانس QTL های شناسایی شده در این پژوهش در محدوده ۱۶/۶۷- ۱/۵۸ بود. در این تحقیق تعدادی از نواحی ژنومی مرتبط با رشد و صفات وابسته شناسایی شد.

واژه های کلیدی: بلدرچین ژاپنی، نقشه یابی QTL، نشانگرهای ریزماهواره

مقدمه

بلدرچین ژاپنی (*Coturnix japonica*)، در حدود قرن یازدهم به عنوان یک پرنده آواز خان خانگی، اهلی شد و از ۱۹۱۰ به عنوان یک پرنده دارای ارزش غذایی معرفی شد. جنبه های مختلف استفاده از این پرنده در وهله اول از نظر اهمیت اقتصادی به عنوان یکی از گونه های تولید کننده تخم و گوشت (دارای طعم منحصر به فرد) میباشد. در ژاپن و جنوب شرقی آسیا تولید تخم آن برتری دارد در حالی که گوشت آن محصول اصلی در اروپا بشمار می رود. در وهله دوم، هزینه کم نگهداری، وجود اندازه کوچک بدن (۳۰۰-۸۰)، فاصله نسلی کوتاه، مقاومت در برابر بیماری ها و تولید تخم بالا و استفاده از آن به عنوان موردی مناسب در پژوهش ها آزمایشگاهی از دلایل اهمیت این پرنده است (۱). مانند مرغ، بلدرچین ژاپنی نیز متعلق به خانواده *Phasianidae* است. برای درک بهتر رابطه تکاملی بلدرچین و مرغ، وجود نشانگرهایی برای تکثیر متقابل DNA این دو گونه لازم است (۲). مطالعه سیتوژنتیک با استفاده از هیبریداسیون فلورسانس درجا (FISH)نشان داد که نظام ژنی بلدرچین ژاپنی به طور کامل شبیه به مرغ است. به منظور تعیین محل و شناسایی ژن های موثر بر صفات اقتصادی مهم و بیماری های زمینه ای و همچنین برای مقایسه کروموزوم بلدرچین و مرغ ایجاد یک نقشه ژنتیکی در بلدرچین ژاپنی لازم است. گذشتهاً نقشه های پیوستگی ژنتیکی بلدرچین ژاپنی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره توسط کایانگ Kayang (2004) و چند شکلی طول قطعات تکثیر شده (AFLP) توسط راسوت Roussot (2003) ایجاد شده است (۳). تنوع ژنتیکی صفات کمی به طور معمول توسط چندین ژن کنترل می شود که تحت تأثیر محیط قرار دارند. پیشرفت های چشمگیری که در سال های گذشته در زمینه نشانگرهای مولکولی ایجاد شده است و از طرف دیگر ابداع روش های آماری و بیومتریک پیشرفته و تلفیق آن ها با دانسته ها حاصل از نشانگرهای مولکولی، امکان بررسی دقیق تر و جزئی تر صفات کمی

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

را فراهم کرده است. به کمک این روش ها می توان تعداد و جایگاه ژن های کنترل کننده یک صفت کمی (QTL) را شناسایی و پارامترهای ژنتیکی (اثرها افزایشی، غلبه و اپیستازی) و سهم اثرها فنوتیپی آنها را برآورد کرد (٤). مطالعات بسیار زیادی به منظور نقشه یابی جایگاه های صفات کمی در طیور صورت گرفته است و QTL های معنی دار فراوانی برای صفات مختلف در مرغ گزارش شده است (٧-٦-٥). در بلدرچین نیز چندین مطالعه به منظور شناسایی QTL های مرتبط با صفات مختلف مانند وزن بدن در ٥ هفتگی بر روی کروموزوم دو Minvielle (2005) و همچنین بر روی صفات رشد و لاشه بر روی کروموزوم های ١،٣ و٥ انجام شده است (٨-٩-١٠) اما بر روی صفات رشد در کروموزوم دو پژوهش ها چندانی صورت نگرفته است و هدف از انجام این پژوهش شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با صفات رشد روی کروموزوم شماره دو در یک جمعیت F_2 بلدرچین ژاپنی است.

مواد و روش ها

جمعیت نقشه یابی و رکوردگیری فنوتیپی

تعداد ٨ جفت پرنده از سویه سفید (تخمگذار) و ٨ جفت پرنده از سویه وحشی (گوشتی) به عنوان نسل والد (P) انتخاب و تلاقی دو طرفه بین آنها (نر سفید × ماده وحشی و نر وحشی × ماده سفید) انجام شد. تعداد ٣٤ پرنده (٩ پرنده نر و ٢٥ پرنده ماده) از بین پرندگان نسل F_1 برای تولید نسل دوم (F_2) انتخاب شدند. از تلاقی پرندگان نسل F_1 تعداد ٤٢٢ پرنده نسل F_2 (٢٤٦ پرنده نر و ١٧٦ پرنده ماده) در طی ٥ هچ متوالی تولید شد. برای تولید نسل اول (F_1)، هر پرنده نر در نسل P با یک پرنده ماده تلاقی داده شد و در نسل F_1 هر پرنده نر با سه پرنده ماده (به صورت چرخشی و هر سه روز یک بار با یکی از پرندگان ماده) تلاقی داده شد. به منظور رکوردگیری فنوتیپی از پرندگان نسل F_2، رکوردهای صفات رشد، شامل وزن تولد و وزن یک تا پنج هفتگی بوسیله ترازویی با دقت ٠/١ اندازه گیری شد. نسبت کلیبر (Kleiber Ratio) مربوط به دوره های زمانی ١ تا ٢ هفتگی، ٢ تا ٣ هفتگی، ٣ تا ٤ هفتگی، ٤ تا ٥ هفتگی و هچ تا ٥ هفتگی با استفاده از رابطه ارائه شده توسط کلیبر (Kleiber, 1947) و با تقسیم میانگین افزایش وزن روزانه در هر یک از دوره های زمانی ذکر شده در بالا به وزن متابولیکی پرنده در انتهای همان دوره محاسبه شد که در این رابطه: ADG، میانگین افزایش وزن روزانه محاسبه شده برای یک بازه زمانی مشخص و $W^{0.75}$، وزن متابولیکی در انتهای بازه زمانی مورد نظر است (١١).

١)

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

$$Kleiber\ Ratio\ (KR) = {}^{ADG}/_{W}\,0.75$$

استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ

در هنگام کشتار از تمام پرندگان هر سه نسل خون گیری بعمل آمد. نمونه‌های خون وارد لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA شد. سپس نمونه ها به فریزر منتقل شد و تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA با روش نمکی انجام گرفت (۱۲). در این پژوهش، ٤ جایگاه ریزماهواره روی کروموزوم دو بلدرچین ژاپنی مورد مطالعه قرار گرفت (جدول۱، شکل۱) و پرندگان هر سه نسل (تعداد ٤٧٢ پرنده) برای این ٤ نشانگر ریزماهواره تعیین ژنوتیپ شدند. نشانگرهای ریزماهواره با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲ میکرولیتر DNA، ۲/۵میکرولیتر بافر PCR، یک میکرولیتر MgCl2، ۰/۵میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر پرایمر رفت، یک میکرولیتر پرایمر برگشت، ۱٦/۵ میکرو لیتر آب استریل و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک پلی مراز به ازای هر نمونه، تکثیر یافتند. واکنش PCR تحت شرایط زیر انجام شد: واسرشته سازی ابتدایی (۵ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد)، سپس ۳۰ چرخه شامل مراحل واسرشته سازی (۳۰ ثانیه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد)، اتصال آغازگر به رشته الگو (۳۰ ثانیه با دمای بهینه هر آغازگر)، بسط توسط پلیمراز (٤٥ ثانیه با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد) و در نهایت مرحله بسط نهایی (۵ دقیقه با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد) (۱۳). جهت الکتروفورز محصولات PCR و تفکیک قطعات حاصله از ژل پلی آکریل آمید واسرشته ساز ۸ درصد استفاده شد. برای رنگ آمیزی ژل از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد (١٤).

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

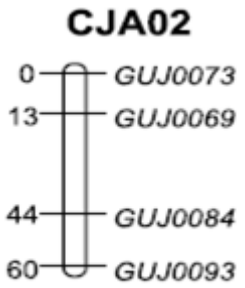
جدول۱- مشخصات کلی نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه در این تحقیق

Table 1. General characteristics of the microsatellites markers used in this study

نشانگر Marker Name	موقعیت[a] Position (cM)	توالی آغازگر برگشت Reverse primer (5'-3')	توالی آغازگر رفت Forward primer (5'-3')	دامنه اندازه آللی[b] Size range (bp)	دمای بهینه اتصال[c] TA (˚C)
GUJ0073	0	CAACTGCAAAGACAACATCC	GCTGCTATTCTGTTGATGTG	144-160	52
GUJ0069	13	CACCAACCACCTTCATCTTC	TTCAGGGTAGCAGTCATCTC	201-211	54
GUJ0084	44	TCCCGTCTCCCGATGTGTTT	ACTCCTCCTCTTTCTCCCTC	159-165	55
GUJ0093	60	AGCCATAGAGGGCTATTAAG	CTCTTGTATTGTAACTGGGC	213-231	60

[a]موقعیت نشانگرها روی کروموزوم دو بلدرچین ژاپنی بر اساس نقشه پیوستگی، [b] جفت باز، [c] دمای بهینه اتصال آغازگر به رشته الگو

[a] Markers position on chromosome 2 of Japanese quail based on linkage map (cM), [b] Base pair, [c] Annealing Temperature.



شکل ۱- نشان دهنده نشانگرها و موقعیت هر یک بر روی کروموزوم دو بلدرچین ژاپنی.

Fig. 1- Indicative of markers and position of them on chromosome 2 of Japanese quail.

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

تجزیه و تحلیل QTL

به منظور تجزیه و تحلیل داده های جمع آوری شده از مدل آماری زیر استفاده شد. (۲

$$Y_{ijkl} = \mu + H_i + S_j + aP_{ak} + dP_{dk} + e_{ijkl}$$

در مدل فوق، Y_{ijkl} فنوتیپ مشاهده شده افراد l، μ میانگین جمعیت، H_i و S_j اثرها ثابت هچ و جنس به ترتیب، a و d اثرها افزایشی (اختلاف ژنوتیپ های هموزیگوت qq با QQ) و غلبه (انحراف از میانگین Qq از میانگین دو ژنوتیپ هموزیگوت qq و QQ)، P_{ak} احتمال شرطی حیوان k برای حمل آلل سویه وحشی، P_{dk} احتمال شرطی حیوان k که هتروزیگوس باشد و e_{ijkl} اثر تصادفی باقیمانده است. علاوه بر مدل فوق، اثرها متقابل نوبت جوجه کشی و جنس با اثر افزایشی یا غلبه QTL نیز در دو مدل دیگر برآورد شد. برای تجزیه و تحلیل QTL از روش نقشه یابی درون فاصله ای مبتنی بر رگرسیون استفاده شد (۸). بر اساس مدل های آماری فوق، یک QTL در فواصل یک سانتی مورگان در طول کروموزوم دو برازش شد. نقطه ای که دارای حداکثر آماره F بود به عنوان محتمل ترین موقعیت QTL در نظر گرفته شد. تعیین آستانه های معنی دار کروموزومی در سطوح ۵ درصد و ۱درصد با استفاده از روش تبدیل محاسبه شد (۱۵). مقادیر بدست آمده از تجزیه و تحلیل تعداد ده هزار سری داده برای ایجاد یک توزیع تجربی از آماره آزمون تحت فرض صفر مبنی بر عدم وجود QTL، رتبه بندی شدند. تجزیه و تحلیلها با استفاده از نرم افزار آنلاین GridQTL انجام شد.

نتایج و بحث

خلاصه آماری داده های فنوتیپی صفات مورد بررسی پرندگان نسل F_2 بلدرچین ژاپنی در جدول (۲) آورده شده است. نتایج نشان می دهد که واریانس مقادیر مشاهده شده از تنوع گسترده ای برخوردار است که ممکن است به دلیل تفاوت ژنتیکی میان پرندگان نسل F_2 باشد.

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

جدول ۲- خلاصه آمار توصیفی داده‌های فنوتیپی پرندگان نسل F2

Table 2. Summary of Descriptive statistics, phenotypic data of F2 generation

صفت[a] Trait	تعداد Number	میانگین[b] Mean	حداقل Min	حداکثر Max	انحراف معیار باقی مانده[c] r.s.d	درصد ضریب تغییرات CVدرصد
W_0	422	6.8	4.80	9.50	0.69	10.1
W_1	419	23.1	11.30	41.40	4076	20.6
W_2	420	47.6	21.00	74.80	9.30	19.8
W_3	420	83.0	15.90	124.10	13.55	16.6
W_4	417	120.9	63.10	168.30	17.96	15.1
W_5	353	153.1	82.50	202.70	18.15	12.0
ADG.0-1	419	2.3	0.59	4.86	0.65	27.9
ADG.1-2	418	3.5	0.79	6.21	0.79	23.1
ADG.2-3	418	5.0	1.73	8.03	0.91	18.5
ADG.3-4	416	5.4	2.01	11.33	1.14	21.0
ADG.4-5	348	4.6	1.60	7.90	1.32	28.4
ADG.0-5	353	4.1	2.17	5.59	0.51	12.4
KR.0-1	419	0.2	0.10	0.30	0.03	13.8
KR.1-2	418	0.2	0.07	0.25	0.02	12.5
KR.2-3	418	0.2	0.09	0.31	0.02	12.8
KR.3-4	416	0.1	0.06	0.42	0.02	15.3
KR.4-5	348	0.9	0.04	0.46	0.03	29.5
KR.0-5	353	0.2	0.01	0.10	0.005	5.1

[a]W0: وزن هچ؛ W1-W5: وزن زنده از ۱ تا ۵ هفتگی (گرم) ؛ KR.01-05: نسبت کلیبر در سنین ۱ تا ۵ هفتگی؛ ADG.01-05: افزایش وزن روزانه در سنین ۱ تا ۵ هفتگی (گرم) ؛ [b] میانگین تصحیح شده صفت برای اثرها ثابت مدل؛ [c] انحراف معیار باقی مانده برازش شده بر اساس اثرها ثابت.

[a]W0: hatching weight;W1–W5: live weight at 1 (W1), 2 (W2), 3 (W3), 4 (W4) and at 5 (W5) weeks of age (g); KR.01–05 and ADG.01–ADG.05: Kleiber ratio and average daily gain (g) between consecutive ages, respectively; [b] Trait mean adjusted for fixed effects included in the model. [c] Residual standard deviation after fitting the basic fixed effects.

برای شناسایی QTL های موثر بر صفات مورد مطالعه، از سه مدل آماری مختلف استفاده شد. در مدل اول اثر افزایشی و غلبه QTL برازش شد و سه صفت وزن بدن در سن چهار هفتگی ($P<۰/۰۵$)، میانگین افزایش وزن روزانه در دو تا سه هفتگی ($P<۰/۰۵$) و نسبت کلیبر یک تا دو هفتگی ($P<۰/۰۵$) معنی دار شدند. اثر معنی دار (غلبه ژنی) و موقعیت QTL (صفر سانتی مورگان) برای همه این صفات یکی بود. نزدیکترین نشانگر به موقعیت این QTL ها نشانگر GUJ0069

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

بود. نتایج حاصل از این تجزیه و تحلیل در (جدول ۳ و شکل ۲) آمده است.

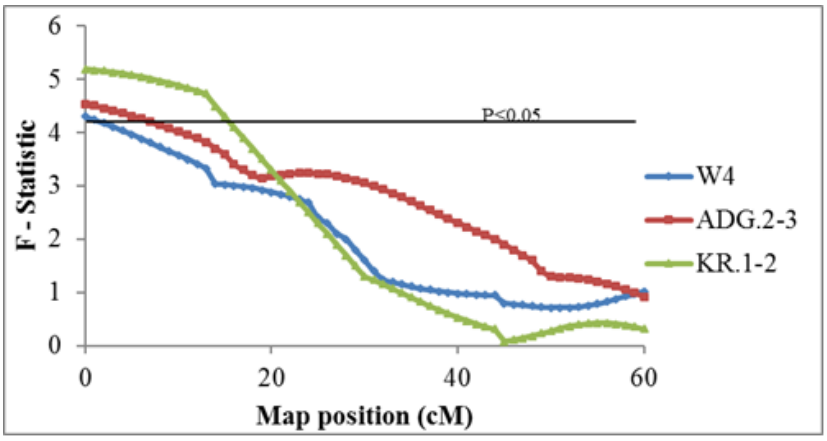
جدول ۳ – خلاصه نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل اثر افزایشی و غلبه QTL

Table 3. Summary results of Additive and Dominance QTL effect

صفت[a]	موقعیت[b]	آماره F [c]	اثر QTL QTL effect		درصد واریانس QTL	نشانگر مجاور
Trait	Position (cM)	F-Value	افزایشی Additive(s.e)	غلبه Dominance(s.e)	V_{QTL} (درصد)	Closest Marker
W4	0	4.50*	0.02(0.12)	-0.51(0.17)	1.58	GUJ0073
ADG.2-3	0	4.54*	-0.04(0.12)	-0.53(0.17)	1.68	GUJ0073
KR.1-2	0	5.19*	0.06(0.14)	-0.65(0.20)	2.11	GUJ0073

[a]W4: وزن زنده ٤ هفتگی (گرم) ، ADG.2-3: افزایش وزن روزانه ۲ تا ۳ هفتگی (گرم) ، KR.1-2: نسبت کلیبر ۱ تا ۲ هفتگی، [b]موقعیت QTLروی کروموزوم دو بلدرچین ژاپنی بر اساس نقشه پیوستگی، [c] * آستانه های معنی داری در سطح ۵ درصد..

[a] W4: live weight at 4 week of age (gr); ADG.2-3 average daily gain (gr); KR.1-2: Kleiber ratio, [b] QTL Location on chromosome 2 of Japanese quail based on linkage map. [c] *, $P < 0.05$.



شکل ۲– پروفیل آماره F حاصل از برازش مدل اثر افزایشی، غلبه QTL. خط افقی آستانه های معنی دار در سطح ۵ درصد را نشان می دهد.

Fig. 2- Test statistic curves resulted from the fitting model additive and dominance effect of QTL. The horizontal line represent of significant thresholds in 5% level.

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

در مدل دوم اثر متقابل QTL و هچ بررسی شد. بر اساس نتایج حاصل از این تجزیه و تحلیل برای چهار صفت وزن بدن در دو هفتگی ($P<۰/۰۵$)، وزن بدن در چهار هفتگی ($P<۰/۰۵$)، در موقعیت صفر سانتی مورگان و میانگین افزایش وزن روزانه یک تا دو هفتگی ($P<۰/۰۱$) و نسبت کلیبر یک تا دو هفتگی ($P<۰/۰۵$) در موقعیت ۱۳ و ۱۲ سانتی مورگان به ترتیب، QTL معنی دار شناسایی شد. نزدیکترین نشانگر به موقعیت این QTL ها برای صفات وزن بدن در ۲ و ٤ هفتگی، نشانگر GUJ0069 و برای صفات میانگین افزایش وزن روزانه یک تا دو هفتگی و نسبت کلیبر یک تا دو هفتگیGUJ0073 بود. اثر متقابل این QTL ها با هچ چهارم معنی دار بود. نتایج حاصل از این تجزیه و تحلیل در (جدول ٤) خلاصه شده است.

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

جدول ٤- خلاصه نتایج حاصل از برازش مدل اثر متقابل QTL و هچ

Table 4. Summary results of fitting model QTL by hatch interaction

صفت[a] Trait	موقعیت[b] Position (cM)	F آماره[c] F-Value	درصد واریانس QTL V_{QTL} (درصد)	نشانگر مجاور Closest Marker	هچ Hatch	اثر متقابل QTL و هچ QTL by hatch interaction	
						افزایشی Additive(s.e)	غلبه Dominance(s.e)
W2	0	2.17*	2.17	GUJ0073	1	0.40(0.25)	0.47(0.40)
					2	0.48(0.36)	0.16(0.40)
					3	-0.46(0.24)	-0.58(0.35)
					4	-0.14(0.27)	-0.93(0.35)
					5	0.44(0.26)	-0.03(0.47)
W4	0	2.11*	9.82	GUJ0073	1	0.23(0.25)	0.06(0.41)
					2	-0.09(0.38)	-0.23(0.40)
					3	-0.41(0.24)	-0.61(0.35)
					4	-0.08(0.27)	-1.13(0.35)
					5	0.47(0.26)	-0.36(0.47)
ADG.1-2	13	2.73**	4.03	GUJ0069	1	0.41(0.19)	-0.08(0.28)
					2	0.55(0.28)	0.41(0.32)
					3	-0.34(0.18)	-0.49(0.26)
					4	-0.11(0.21)	-0.74(0.25)
					5	0.26(0.20)	-0.19(0.33)
KR.1-2	12	2.55**	16.67	GUJ0069	1	0.33(0.23)	-0.41(0.34)
					2	0.69(0.34)	0.52(0.38)
					3	-0.30(0.22)	-0.70(0.31)
					4	-0.25(0.25)	-0.82(0.30)
					5	0.11(0.24)	-0.55(0.41)

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

[a] W2 و W4: وزن زنده در ۲ و ٤ هفتگی (گرم)، ADG.1-2: افزایش وزن روزانه ۱ تا ۲ هفتگی (گرم) ، KR.1-2: نسبت کلیبر ۱ تا ۲ هفتگی، [b]موقعیت QTL روی کروموزوم دو بلدرچین ژاپنی بر اساس نقشه پیوستگی، [c] آستانه های معنی داری به ترتیب در سطح ۵ و ۱ درصد.

[a] W2,4: live weight at 2 and 4 weeks of age (gr); ADG.1-2 average daily gain (gr); KR.1-2: Kleiber ratio, [b] QTL Location on chromosome 2 of Japanese quail based on linkage map. [c] *, $P < 0.05$ - ** ,$P<0.01$.

در مدل سوم اثر متقابل جنس با اثر افزایشی یا غلبه QTL بررسی شد که هیچ یک از صفات معنی دار نشد.

به طور کلی با برازش سه مدل مختلف آماری به منظور شناسایی جایگاه صفات کمی مرتبط با ۱۸ صفت مورد مطالعه در این تحقیق روی کروموزوم شماره ۲ بلدرچین ژاپنی، هفت QTL معنی دار برای پنج صفت وزن بدن در دو هفتگی، وزن بدن در چهار هفتگی، میانگین افزایش روزانه وزن بدن در یک تا دو هفتگی، میانگین افزایش روزانه وزن بدن در دو تا سه هفتگی و نسبت کلیبر یک تا دو هفتگی در ابتدای کروموزوم و در موقعیت صفر تا ۱۳ سانتی مورگان با اثر غلبه ژنی نقشه یابی شد. منظور از اثر غلبه QTL یعنی انحراف میانگین دو ژنوتیپ هموزیگوت QTL (QQ و qq) از ژنوتیپ هتروزیگوت (Qq) است. برآورد های اثر غلبه QTL برای این صفات همگی منفی بود.

از معنی دار بودن اثرها متقابل QTL و هچ برای صفات ذکر شده می توان چنین نتیجه گرفت که احتمال دارد جایگاه های ژنی متفاوتی در هچ های مختلف بر صفات مورد نظر اثر معنی دار دارند که در این مطالعه اثر متقابل QTL و هچ برای تمام صفات در هچ چهارم معنی دار بود. از آنجا که امکان ایجاد تمام جمعیت F_2 در طی یک هچ امکان پذیر نبود، برای تولید حداکثر میزان نتاج F_2 به ازای هرکدام از والدین نر، در طی پنج هچ متوالی این جمعیت ایجاد شد. بنابراین اثر هچ به عنوان یک اثر ثابت تاثیر قابل توجهی در شناسایی جایگاه های مورد نظر داشت.

منظور از واریانس فنوتیپی ناشی از QTL، بخشی از واریانس فنوتیپی صفت مورد نظر است که به وسیله QTL ایجاد می شود. در هر موقعیت روی کروموزوم، نقشه یابی QTL با استفاده از مدل های مختلف تعیین می کند که آیا میزان واریانس معنی دار موجود در آن صفت کمی را می توان به یک QTL موجود در آن نقطه ربط داد یا خیر. واریانس QTL های شناسایی شده در این پژوهش در محدوده ۱/۵۸–۱٦/٦۷ بود.

در بیشتر مطالعات نقشه یابی QTL، جمعیت ها به وسیله تلاقی ژنتیکی دو سویه یا لاین

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

ایجاد می شوند که متعاقباً نسل بعدی از تلاقی نرها و ماده های F_1 یا از نتاج تلاقی برگشتی F_1 با والدینشان برای بررسی دقیق تر QTL ایجاد می شوند (۱۰). قدرت کشف QTL به وراثت پذیری صفت، متوسط اثر جایگزینی آللی از آلل های دیگر، فاصله نوترکیبی میان QTL و مارکرهای مرتبط و تعداد نمونه نتاج بستگی دارد (۱۶). در این مطالعه به دلیل واگرایی بالای منشاء والدی (نوع گوشتی وحشی و سویه تخم گذار سفید) بررسی و یافتن QTL به طور نسبی با دقت بیشتری همراه بود.

هر چند که صفات رشد به صورت مستقیم مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفتند اما بازده غذایی به صورت غیر مستقیم و با محاسبه نسبت کلیبر و بر اساس داده های مربوط به وزن زنده و نرخ رشد پرندگان بدست آمد که می تواند به عنوان شاخصی مناسب برای تعیین بازده انرژی و اقتصادی بودن رشد حیوان مورد استفاده قرار گیرد Kleiber (1947) که از لحاظ اقتصادی شاخص های مهی محسوب می شوند (۱۷). در این مطالعه برای نسبت کلیبر یک تا دو هفتگی در موقعیت ۱۲ سانتی مورگان QTL معنی داری شناسایی شد که با هچ اثر متقابل داشت. QTL های معنی دار شناسایی شده برای وزن بدن دو و چهار هفتگی و میانگین افزایش روزانه وزن دو تا سه هفتگی و نسبت کلیبر یک تا دو هفتگی در موقعیت های مشابه قرار داشتند که احتمال دارد نشان دهنده تک ژنی بودن این صفات و اثر پلیوتروپی در کروموزوم دو بلدرچین ژاپنی است.

از آنجا که بلدرچین از لحاظ فیلوژنی به گونه مرغ (*Gallus gallus*) بسیار نزدیک است و هر دو گونه دارای کاریوتیپی متشکل از ۲n=۷۸ کروموزوم و طول ژنوم مشابه (bp $۱/۲\times۱۰^{۹}$) شامل ماکروکروموزوم های متمایز و قابل تشخیص از لحاظ مورفولوژیکی (کروموزوم های ۱ تا ۸ و کروموزوم های جنسی ZW) و میکروکروموزوم های غیر قابل تشخیص از لحاظ سیتولوژی بوده و همولوژی بسیار زیادی بین ژنوم دو گونه وجود دارد بنابراین این دو گونه شباهت کروموزومی بالایی داشته و تقریباً اصلی تفاوت محدود آن ها بر اثر جابجایی و بازآرایی کروموزومی است (۱۸). بنابراین از آنجا که دانسته ها چندانی در مورد بلدرچین وجود ندارد و بیشتر بررسی ها بر روی مرغ انجام شده است بنابراین از مرغ می توان به عنوان یک مدل حیوانی برای مقایسه با بلدرچین استفاده کرد.

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

در یک تحقیق برای تشخیص جایگاه صفات کمی در بلدرچین و مقایسه ماهیت و موقعیت QTL های معنی دار شناسایی شده با مرغ، دانسته های از یک جمعیت F_2 (٤٣٤) بلدرچین های ماده جمع آوری کردند که در نتیجه منجر به کشف QTL معنی داری برای وزن بدن در ٥ هفتگی روی کروموزوم دو بلدرچین ژاپنی در موقعیت ٥٤ سانتی مورگان با اثر غلبه شد (٢). در تحقیق دیگری چند QTL معنی دار از صفات وزن چربی محوطه شکمی در موقعیت ١٣ سانتی مورگان با اثر افزایشی، درصد وزن فیله (از وزن زنده بعد از انتقال به مرکز فراوری) با اثر مادری منفی در موقعیت ٦٧ سانتی مورگان، درصد وزن گوشت سفید (از وزن زنده بعد از انتقال به مرکز فراوری) در موقعیت ٦٩ سانتی مورگان با اثر مادری منفی و ٨٦ سانتی مورگان با اثر افزایشی منفی، درصد وزن لاشه بدون احشاء داخلی (از وزن زنده بعد از انتقال به مرکز فراوری) در موقعیت ١٦٣ سانتی مورگان با اثر غلبه بر روی کروموزوم دو جوجه های گوشتی تجاری یافتند (١٩). همچنین بر روی کروموزوم دو جوجه های گوشتی در موقعیت ٤١ سانتی مورگان، یک QTL برای وزن بدن یافت. همچنین آنها QTL ی برای وزن بدن در سیزده و شانزده هفتگی بر روی کروموزوم دو در ٦٠ سانتی مورگان گزارش کردند (٢٠). در تحقیق دیگری معنی داری QTL در یک جمعیت مرغ F_2 (N=٥٠٠) که از تلاقی لاین جوجه های گوشتی نر و لاین تخم گذار (لگهورن سفید) بدست آمده بود بررسی شد. برای صفات وزن زنده در شش و نه هفتگی در موقعیت ٣٠٢ سانتی مورگان و با سطح معنی داری ($P<0.01$) QTL معنی داری گزارش شد (٢١). همچنین لاین های پدری گوشتی از دو جنس که از لحاظ ژنتیکی متفاوت و از نژاد پلیموت راک سفید منشاء گرفته بودند را برای تولید ٣ نسل بزرگ از جمعیت جوجه های گوشتی تلاقی دادند که از این جمعیت برای تشخیص و نقطه یابی QTLموثر در چاقی مرغ استفاده شده بود. ٢٠ پرنده تنی در نسل ١ و ٤٥٦ پرنده تنی در نسل دوم برای بررسی نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه قرار گرفتند و مشاهدات فنوتیپی برای٣ گروه از نسل٣ پرندگان (تقریباً ١٨٠٠ پرنده در هر گروه) جمع آوری شد. برای صفات وزن زنده در هفت هفتگی در موقعیت ٣٢٧ سانتی مورگان و درصد چربی شکمی در هفت هفتگی در موقعیت ٣٥٦ سانتی مورگان پیوستگی پیشنهادی گزارش شد (٢٢). در مطالعه دیگر برای تشخیص مناطق کروموزومی و QTL های موثر بر صفات

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

کمی مهم اقتصادی مطالعاتی بر روی مرغ انجام دادند. تلاقی های F_2 منحصر به فردی از لاین نر تجاری جوجه های گوشتی و ۲ لاین همخون که از نظر ژنتیکی مجزا بودند (لگهورن و فایومی) برای شناسایی QTL موثر بر صفات وزن بدن و میانگین افزایش وزن روزانه در مرغ مورد استفاده قرار گرفت. در تلاقی لگهورن، صفات وزن بدن در ۲ ، ٤ ، ٦ و ۸ هفتگی در سطح ۱درصد ژنومی دارای QTL معنی دار بودند و بیشتر اثرها آنها افزایشی بود. میانگین افزایش وزن روزانه ۰-۲ ، ٤-۲ در سطح ۱درصد ژنومی و ٤-٦ هفتگی در سطح ۵ درصد ژنومی و بیشتر با اثرها افزایشی دارای QTL معنی دار بودند. در تلاقی نایومی وزن بدن در ۲ ، ٦ هفتگی در سطح ۵ درصد ژنومی و ۸ هفتگی در سطح ۱درصد کروموزومی دارای QTL معنی دار بود و میانگین افزایش وزن روزانه ۰-۲ هفتگی در سطح ۵ درصد ژنومی با اثر افزایشی دارای QTL معنی دار بود (۲۳). در تحقیق دیگر QTL معنی داری در مرغ که وزن بدن را در ۳، ٦ و ۹ هفتگی تحت تاثیر قرار می داد بر روی کروموزومهای ۱، ۲، ٤، ۷ و ۸ گزارش شد (٢٤). QTL معنی داری برای صفت وزن بدن در ۷ هفتگی روی کروموزوم دو از تلاقی گوشتی و تخم گذار در موقعیت ۳۲۷ سانتی مورگان یافتند (۲۱). همچنین QTL معنی داری را برای صفت درصد چربی شکمی در سن ۷ هفتگی روی کروموزوم دو جوجه های گوشتی در موقعیت ۳۵٦ سانتی مورگان یافتند (۲۲).

در این تحقیق تعدادی از نواحی ژنومی مرتبط با رشد و صفات وابسته روی کروموزوم دو بلدرچین ژاپنی شناسایی شد. نتایج این پژوهش نقش اثرها پلیوتروپی و تک ژنی را در صفات رشد و نسبت کلیبر مرتبط با رشد نشان می دهد که در اصلاح نژاد بلدرچین صفات مهمی محسوب می شوند. این نتایج نشان دهنده این است که صفات ذکر شده در ارتباط بالایی با یکدیگر هستند. در صورت تایید تفرق QTL های شناسایی شده در سویه های تجاری بلدرچین، می توان از نتایج این پژوهش در برنامه های انتخاب به کمک نشانگر استفاده کرد.

سپاسگزاری

هزینه انجام این تحقیق از محل گرانت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به نگارنده مقاله و همچنین از محل بودجه پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی کرمان (قرارداد شماره ۱/۱۱٤۲) تامین شده است. نگارندگان مقاله از کارکنان و دانشجویان دو مرکز یاد شده کمال تشکر و سپاسگزاری را دارند.

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

References منابع مورد استفاده

1- **Kayang BB, Vignal A, Inoue-Murayama M, Miwa M., Monvoisin JL, Ito S and Minvielle F. 2004.** A first-generation microsatellite linkage map of the Japanese quail. Animal Genetics 35: 195-200.

2- **Minvielle F, Kayang B, Inoue-Murayama M, Miwa M, Vignal A, Gourichon D, Neau A, Monvoisin J, Ito S. 2005.** Microsatellite mapping of QTL affecting growth, feed consumption, egg production, tonic immobility and body temperature of Japanese quail. BMC Genomics 6: 87.

3- **Sasazaki S, Hinenoya T, Lin B, Fujiwara A, Mannen H. 2006.** A comparative map of macrochromosomes between chicken and Japanese quail based on orthologous genes. Animal Genetics 37: 316-320.

4- **Xu HM, Wei CS, Tang YT, Zhu ZH, Sima YF, Lou XY. 2011.** A new mapping method for quantitative trait loci of silkworm. BMC Genetics 12: 19.

5- **Navarro P, Visscher PM, Knott SA, Burt DW, Hocking PM, Haley CS. 2005.** Mapping of quantitative trait loci affecting organ weights and blood variablesin a broiler layer cross. British Poultry Science 46: 430-442.

6- **Nones K, Ledur MC, Ruy DC, Baron EE, Melo CM, Moura AS, Zanella EL, Burt DW, Coutinho LL. 2006.** Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. Animal Genetics 35: 95-100.

7- **Gao Y, Du ZQ, Wei WH, Yu XJ, Deng XM, Feng CG, Fei J, Feng JD, Li N, Hu XX. 2009.** Mapping quantitative trait loci regulating chicken body composition traits. Animal genetics 40: 952-954.

8- **Haley CS, Knott SA, Elsen JM. 1994.** Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. Genetics 136: 1195-1207.

9- **Sohrabi SS, Esmailizadeh AK, Baghizadeh A, Moradian H, Mohammadabadi MR, Askari N, Nasirifar E. 2012.** Quantitative trait loci underlying hatching weight and growth traits in an F2 intercross between two strains of Japanese quail. Animal Production Science 52(1): 1012-1018.

10- **Jabbari Ori R, Esmailizadeh AK, Charati H, Mohammadabadi MR, Sohrabi SS 2014.** Identification of QTL for live weight and growth rate using DNA markers on chromosome 3 in an F2 population of Japanese quail. Molecular Biology Reports 41:1049–1057.

11- **Kleiber M. 1947.** Body size and metabolic rate. Physiological Reviews 27:511-541.

12- **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16: 1215.

13- **Zhan A, Bao Z, Lu W, Hu X, Peng W, Wang M, Hu J. 2007.** Development and characterization of 45 novel microsatellite markers for sea cucumber (apostichopus japonicus). Molecular Ecology Notes 7: 1345–1348.

14- **Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. 1991**. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 196: 80-83.

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

15- **Churchill GA, Doerge RW. 1994.** Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138: 963-971.

16- **Mackay TFC. 1996.** The nature of quantitative genetic variation revisited: lessons from Drosophila bristles. BioEssays 18:113–121.

17- **Scholtz MM, Roux CZ. 1988.** The Kleiber ratio (growth rate/metabolic mass) as possible selection criteria in the selection of beef cattle. In: Proceedings of the 3rd world congress on sheep and beef cattle breeding. Paris, pp 373-375.

18- **Shibusawa M, Minai S, Nishida-Umehara C, Suzuki T, Mano T, Yamada K, Namikawa T, Matsuda Y. 2001.** A comparative cytogenetic study of chromosome homology between chicken and Japanese quail. Cytogenet. Cell Genet 95: 103-109.

19- **McElroy JP, Kim JJ, Harry DE, Brown SR, Dekkers JCM, Lamont SJ. 2006.** Identification of Trait Loci Affecting White Meat Percentage and Other Growth and Carcass Traits in Commercial Broiler Chickens. Poultry Science 85:593–605.

20- **Xuan Liu. 2009.** Association of single nucleotide polymorphisms with phenotypic production traits in broiler chickens. Master of Science. Thesis submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park, in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.

21- **Sewalem A, Morrice DM, Law A, Windsor D, Haley CS, Ikeobi C O N, Burt DW, Hocking PM. 2002.** Mapping of Quantitative Trait Loci for Body Weight at Three, Six, and Nine Weeks of Age in a Broiler Layer Cross. Poultry Science 81:1775–1781.

22- **Jennen DGJ, Vereijken ALJ, Bovenhuis H, Crooijmans RPMA, Veenendaal A, van der Poel JJ, Groenen MAM 2004.** Detection and Localization of Quantitative Trait Loci Affecting Fatness in Broilers. Poultry Science 83:295–301.

23- **Zhou H, Deeb N, Evock-Clover CM, Ashwell CM, Lamont SJ. 2006.** Genome-Wide Linkage Analysis to Identify Chromosomal Regions Affecting Phenotypic Traits in the Chicken. I. Growth and Average Daily Gain. Poultry Science 85:1700–1711.

24- **Sazanov A, Sazanova A, Barkova O, Jaszczak K. 2010.** QTL in chicken: a look back and forward − a review. Animal Science Papers and Reports vol. 28 (2010) no. 4, 307-314.

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

The use of QTL mapping to survey the some of growth traits and the Kleiber ratio index on chromosome two of Japanese quail

Ehsan Nasirifar[1*], Ali K. Esmailizadeh[2], Saeed Sohrabi3, Hasan Moradian[3]

PhD, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, PB 76169-133, Iran

PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, PB 76169-133, Iran

ehsan.nasirifar@gmail.com

Abstract

A cross F2 plan was used to identify quantitative trait loci (QTL) affecting growth on chromosome 2 of quail. In this study, a three-generation population was developed of reciprocal crosses of two strains of Japanese quail (white male layer × wild female broiler and wild male broiler × white female layer). Phenotypic records related to birds' growth traits of F2 generation (422) were recorded. All three generations of birds for four microsatellite markers on chromosome 2 were genotyped. QTL analysis was performed with least squares interval mapping method based on regression in three various statistical models. In the first model, additive and dominance effects of QTL were fitted and body weight traits in four weeks ($p<0.05$), average daily gain in two to three weeks ($p<0.05$) and Kleiber ratio one to two weeks ($p<0.05$) were significant. In the second model the interaction of QTL and hatching were investigated. For the following four traits: body weight in two weeks ($p<0.05$), body weight in four weeks ($p<0.05$), average daily gain of one to two weeks ($p<0.01$) and Kleiber ratio of one to two weeks ($p<0.05$), significant QTLs were identified. In the third model, the additive and dominance effects of QTL by sex interaction were investigated and no significant trait was found. QTL variance identified in this study was in the range of 16.67 – 1.58. In this study, a number of genomic regions associated with growth and related traits were identified.

Keywords: Japanese quail, microsatellite markers, QTL mapping

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.2.6.7]