

مکان‌یابی جایگاه‌های ژنی مرتبط با انواع گلبولهای سفید، دمای بدن و بهت زدگی در بلدرچین ژاپنی

Mapping quantitative trait loci affecting leukocytes, body temperature and tonic immobility in Japanese quail

هادی چراتی^{۱*}، علی اسمعیلی‌زاده کشکوئی^۱، رقیه جباری عوری^۱، احمد آیت اللهی مهرجردی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشگاه شهید باهنر کرمان

Charati H^{*1}, Esmailizadeh KA¹, Jabari R¹, Ayatollahi Mehrgardi A¹

1. MSc Student, Associate Professor, MSc Student, Assistant Professor, University of Shahid Bahonar, Kerman

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hadicharati@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳۰)

چکیده

به منظور مکان‌یابی جایگاه‌های ژنی (QTL) مرتبط با تنش (نسبت هتروفیل به لنفوسیت)، ترس (بهت زدگی) (TI)، انواع گلبولهای سفید و دمای بدن در بلدرچین ژاپنی از یک طرح سه نسلی F2 به عنوان جمعیت نقشه‌یابی استفاده شد. نمونه خون ۴۷۲ پرنده در سن ۵ هفتگی جمع‌آوری و DNA به روش استخراج نمکی - کلروفرم، استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر نشانگرهای ریزماهواره‌ای GUJ0099، GUJ0035 و GUJ0041 در کروموزوم شماره ۳ انجام شد. تجزیه QTL به روش نقشه‌یابی درون فاصله‌ای انجام شد. برای دو صفت دمای بدن و بهت‌زدگی QTL معنی‌داری روی کروموزوم شماره ۳ شناسایی نشد. اثرات اصلی QTL نیز بر هیچکدام از صفات مورد مطالعه معنی‌دار نبود، اما اثر متقابل جنس و اثر افزایشی QTL برای درصد هتروفیل، لنفوسیت، نسبت هتروفیل به لنفوسیت (درموقعیت ۳۸ سانتی مورگان نسبت به سانترومر) و درصد اتوزینوفیل (در موقعیت ۷ سانتی مورگانی) معنی‌داری ($P < 0.05$) بود. اثر متقابل هج و اثر افزایشی QTL نیز برای درصد مونوسیت درموقعیت ۳۴ سانتی مورگان ($P < 0.01$) و برای درصد اتوزینوفیل در موقعیت ۵ سانتی مورگان کروموزوم شماره ۳، معنی‌داری بود ($P < 0.05$).

واژه‌های کلیدی

بهت زدگی
دمای بدن
گلبولهای سفید
نشانگرهای ریز ماهواره
QTL

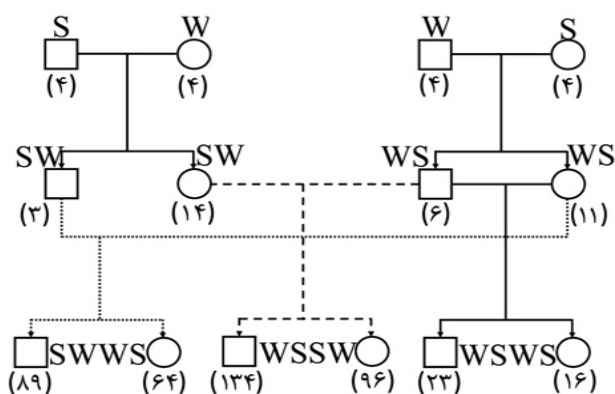
مقدمه

افزایش غیرطبیعی هتروفیل‌ها بیانگر تنش در طیور بوده (Harmon 1998; Richard 1998) و نسبت هتروفیل به لنفوسیت به عنوان یک شاخص فیزیولوژیکی مناسب و قابل اعتماد برای ارزیابی میزان تنش در طیور (Gross and Siegel 1983) از جمله در مرغ (Campo and Davila 2002) محسوب می‌شود. علاوه بر این، بهت‌زدگی (TI¹) یک پاسخ ناخودآگاه به محرک‌های بیرونی است و مدت زمان آن می‌تواند نشان‌دهنده میزان ترس حیوان باشد (Valance et al. 2008). این واکنش در تعدادی از گونه‌های مهره‌داران از جمله پرندگان (Gallup and Gordon 1979) رخ می‌دهد. بعضی از خصوصیات TI شامل بازدارندگی موقت از پاسخ مستقیم، کاهش صدادهی، به هم زدن متناوب چشم‌ها، لرزش ماهیچه‌ای زیاد شبیه پارکینسون و تغییر در ضربان قلب، تنفس و درجه حرارت بدن می‌باشد (Gallup 1977; Valance et al. 2008). این پدیده همراه با کاهش در هوشیاری نبوده و تکان دادن اتفاقی سر و پاها، بستن چشم و عدم صدادهی وضعیت کامل عدم تحرک را نشان می‌دهد. به علاوه (Jones and Faure 1981) پیشنهاد کردند که TI در مرغان بالغ دو مرحله دارد: مرحله اول ممانعت رفتاری بوده که از زمان القا تا اولین حرکت سر طول می‌کشد. پرنده در طی مرحله دوم هوشیار می‌شود و ممکن است صدا داده و چندین بار قبل از درخواستن سرش را تکان دهد. در پژوهشی Minvielle et al. (2005) لاین بلدرچین انتخاب شده برای مدت زمان بالای TI و لاین انتخاب شده برای مدت زمان کوتاه TI را با هم تلاقی دادند و نسل اول را تولید کردند. سپس افراد نسل اول را با هم تلاقی دادند و افراد نسل دوم را ایجاد کردند. در نهایت تجزیه داده‌ها بیانگر QTL های معنی‌داری برای دمای رکتوم در سن ۵ هفتگی و TI روی کروموزوم شماره یک بود. در مطالعه‌ی دیگری که روی دو لاین بلدرچین با دوره ی TI کوتاه و دوره ی TI طولانی انجام گرفت نشان داده شد که TI و رفتار در فضای باز ممکن است تحت تاثیر نواحی ژنومی یکسان باشند (Beaumont et al. 2005). اگرچه شباهت زیادی بین ژنوم بلدرچین و سایر گونه‌های طیور وجود دارد، گزارشی از QTL

مرتبط با انواع لنفوسیت‌ها، دمای بدن و روی کروموزوم شماره سه سایر گونه‌های طیور وجود ندارد و فقط نتایج QTL مرتبط با اجزا لاشه ارائه شده‌اند. برای مثال در تحقیق (Baron et al. 2010) جایگاه موثر بر نسبت وزن سر به وزن لاشه را روی کروموزوم شماره سه در موقعیت ۱۱۲ سانتی مورگان و همچنین QTL های مرتبط با نسبت وزن بال به کل وزن لاشه روی کروموزوم شماره سه مرغ گزارش شد. همچنین (Aslam et al. 2011) QTL های معنی‌داری را برای صفات وزن بدن، بازده سینه و کیفیت گوشت روی کروموزوم شماره سه بوقلمون گزارش کردند. در خصوص کروموزوم شماره سه بلدرچین نیز گزارشی از وجود QTL مرتبط با انواع گلبولهای سفید، دمای بدن و TI در دسترس نیست. لذا هدف از اجرای این تحقیق، مکان‌یابی جایگاه‌های ژنی مرتبط با درصد انواع گلبولهای سفید، دمای بدن و TI روی کروموزوم شماره سه در بلدرچین ژاپنی بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی مورد استفاده در این پژوهش شامل یک طرح سه نسلی F2 بود. تعداد ۸ پرنده نر و ۸ پرنده ماده به عنوان نسل والد (P) به تعداد مساوی از دو سویه سفید (S) و وحشی (W) انتخاب و تلاقی دوطرفه بین آنها انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱- شجره جمعیت مورد استفاده برای نقشه‌یابی QTL

(S) سویه سفید (W) سویه وحشی

کل جمعیت ایجاد شده جهت نقشه‌یابی شامل ۴۷۲ پرنده بود که نمونه خون مربوط به تمام ۴۷۲ پرنده (جهت استخراج DNA) جمع‌آوری شد. رکوردهای فنوتیپی مربوط به تعداد ۴۲۲ پرنده

¹ Tonic immobility

اتصال آغازگر GUJ0041 به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه جهت سنتز نهایی و به تعداد ۳۵ سیکل بود. برای تفکیک محصولات PCR، از الکتروفورز به وسیله ژل پلی‌اکریل آمید (الکتروفورز عمودی) استفاده شد. به منظور آشکارسازی باندهای موجود بر روی ژل، از روش رنگ-آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

مدل‌های آماری مورد استفاده

برای برآورد موقعیت و آثار مربوط به QTL، از مدل‌های آماری مختلفی استفاده شد.

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + S_j + aP_{ak} + e_{ijk} \quad (1)$$

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + S_j + aP_{ak} + dP_{dk} + e_{ijk} \quad (2)$$

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + S_j + aP_{ak} + dP_{dk} + iP_{ik} + e_{ijk} \quad (3)$$

مدل شماره یک فقط در برگرفته آثار افزایشی QTL بود، که در این مدل: Y_{ijk} مشاهده مربوط به i امین هج، j امین جنسیت و k امین پرند، μ میانگین جمعیت، H_i اثر هج که دارای ۵ سطح بود، S_j اثر جنس پرند که دارای دو سطح (نر و ماده) بود، a اثر افزایشی QTL، P_{ak} احتمال شرطی دریافت آل سویه وحشی توسط پرند k است. مدل شماره دو در برگرفته آثار افزایشی و غلبه QTL بود، که در این مدل: d اثر غلبه ژنی QTL و P_{dk} احتمال شرطی هتروزیگوت بودن پرند k بود. مدل شماره ۳ در برگرفته آثار افزایشی، غلبه و اثر منشا والدی بود، که در این مدل: i اثر منشا والدی آل Q (ایمپرینتینگ)^۱ و P_{ik} احتمال شرطی اینکه هم پرند k هتروزیگوت باشد و هم آل سویه وحشی را از والد پدری دریافت نماید. علاوه بر ۳ مدل ذکر شده، اثر متقابل هج و اثر افزایشی QTL و اثر متقابل جنس و اثر افزایشی QTL نیز در دو تجزیه دیگر مورد بررسی قرار گرفت.

روشی که برای تجزیه QTL از آن استفاده شد، روش نقشه‌یابی درون فاصله‌ای مبتنی بر رگرسیون بود (Knott et al. 1996). بر اساس مدل‌های آماری مورد استفاده، یک QTL در هر یک سانتی‌مورگان در طول کروموزوم شماره سه برآش شد. نقطه‌ای که دارای حداکثر آماره F بود به عنوان محتمل‌ترین موقعیت QTL در نظر گرفته شد. برای تعیین معنی‌دار بودن QTL نیاز به تعیین آستانه‌های معنی‌دار کروموزومی در سطوح پنج درصد و یک

نسل F2 جمع‌آوری شده بود. معیار اندازه‌گیری میزان ترس، بهت زدگی یا مدت زمان عدم تحرک حیوان پس از تحریک دستی (TI) بود (Jones 1986). برای اندازه‌گیری TI، پرند به پشت خوابانده و با دست به مدت ۱۵ ثانیه به همین حالت ثابت نگه‌داشته شد. پس از آن مدت زمان عدم تحرک حیوان تا زمانی که به خودی خود بلند شود، با استفاده از یک کرونومتر ثبت شد. تعداد تحریکات لازم برای شروع عدم تحرک (N) یعنی تعداد دفعاتی که لازم بود پرند به مدت ۱۵ ثانیه با دست نگه داشته شود نیز ثبت شد. اگر بعد از ۵ مرتبه تلاش، TI تحریک نمی‌شد، آزمایش روی آن پرند خاتمه یافته و عدد صفر برای TI آن پرند ثبت می‌شد. در صورتیکه TI بعد از ۱۵ دقیقه ادامه داشت، آزمایش روی پرند خاتمه یافته و حداکثر مقدار TI (۹۰۰ ثانیه) برای آن ثبت می‌شد. در زمان اندازه‌گیری TI (سن ۳۵ روزگی)، علاوه بر وزن زنده، دمای بدن پرند در ناحیه رکتوم با استفاده از دماسنج دیجیتال ثبت شد. برای شمارش گلبول‌های سفید خون، در هنگام کشتار در سن ۳۸ روزگی مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر خون جمع‌آوری و به داخل لوله‌های حاوی EDTA (برای جلوگیری از انعقاد خون) منتقل شد. سپس اسلایدهای خونی تهیه و در معرض هوا خشک شدند. اسلایدها با رنگ گیمسا - رایت رنگ-آمیزی شدند. شمارش گلبول‌های سفید بر اساس راهنمای استاندارد برای طیور (Ritchie et al. 1994) انجام شد. DNA به روش استخراج نمکی - کلروفورم از نمونه خون پرندگان استخراج شد. آغازگر مربوط به هر کدام از نشانگرهای ریزماهواره موجود بر روی کروموزوم شماره سه بلدرچین ژاپنی (Kayang et al. 2001) انتخاب و جهت سنتز به شرکت ژن فناوران سفارش داده شد (جدول ۱).

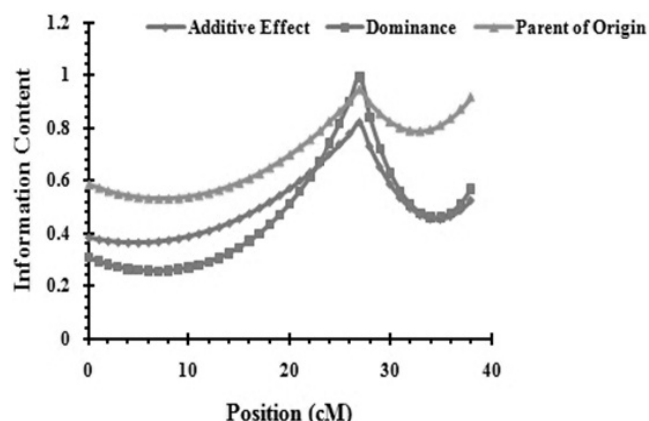
واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) شامل ۲/۲ میکرولیتر از DNA بلدرچین، ۱۶/۵ میکرولیتر آب، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Tag پلی مرز، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR و یک میکرولیتر از $MgCl_2$ بود. برنامه حرارتی مورد استفاده برای انجام واکنش PCR شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشته‌سازی دو رشته DNA برای ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرهای GUJ0099 و GUJ0035، ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای

^۱ Imprinting

جدول ۱- مشخصات جایگاه‌های ریزماهواره مطالعه شده

نام نشانگر	توالی آغازگر پیرو (5'-3')	توالی آغازگر پیشرو (5'-3')	دامنه اندازه الی (جفت باز)
GUJ0099	TTTAAAGTTTCCCCAGGCAG	CTCTTATCCATCCTTCCTTC	246-284
GUJ0035	GGGCAATAAAAAGAAAGACTG	AATACTGGTTTTGTGATGGC	144-150
GUJ0041	TGAAACATACCTGAGTGCTA	AAAATGTCTGCAAAATGGGC	114-126

میزان اطلاعات^۱ نشانگرها (IC) بر مبنای صفر تا یک (یا صفر تا ۱۰۰ درصد) نشان می‌دهد که یک نشانگر چه مقدار اطلاعات مفید را می‌تواند در هر مکان از کروموزوم یا ژنوم فراهم کند. میزان اطلاعات مفید در نقاط مختلف کروموزوم شماره سه بلدرچین در این تحقیق در جدول ۴ و همچنین شکل ۲ خلاصه شده است. از آنجا که اغلب مقدار IC در نواحی کروموزومی بین موقعیت نشانگرها، کمتر از مقدار IC در جایگاه نشانگر است (Weller 2001)، بنابراین کاهش میزان IC در نواحی کروموزومی بین موقعیت نشانگرها (شکل ۲) می‌تواند ناشی از فقدان نشانگرهای دارای اطلاعات مفید در یک یا چند خانواده باشد. در این حالت ژنوتیپ احتمالی نشانگر با توجه به ژنوتیپ نشانگرهایی که در فاصله دورتری قرار دارند، استنباط شده است. عواملی همچون تعداد افراد فاقد ژنوتیپ و عدم تساوی تفرق آلل‌های مختلف نشانگر می‌توانند بر IC تاثیر بگذارند (Esmailizadeh et al. 2008).



شکل ۲- میزان اطلاعات نشانگرها (IC) در نقاط مختلف کروموزوم شماره ۳ بلدرچین ژاپنی برای آثار افزایشی، غلبه و ایمپرینتینگ.

درصد بود که با استفاده از روش آزمون تبدیل (Churchill and Doerge 1994) محاسبه شد. مقادیر آماره F بدست آمده از تجزیه تعداد ده هزار سری داده برای ایجاد یک توزیع تجربی از آماره آزمون تحت فرض صفر مبنی بر عدم وجود QTL، رتبه‌بندی شدند. برای به دست آوردن خلاصه آماری و میانگین حداقل مربعات صفات از نرم افزار ASReml (Gilmour et al. 2006) و برای برازش مدل‌های آماری فوق، از نرم افزار GridQTL استفاده شد (Seaton et al. 2006).

نتایج و بحث

داده‌های تجزیه شده شامل TI، لگاریتم TI، تعداد دفعات تحریک پرنده، نسبت TI به تعداد دفعات تحریک پرنده، دمای رکتوم، شمار کل گلبول‌های سفید و لگاریتم طبیعی آن، درصد هتروزیل و لگاریتم طبیعی آن، درصد لنفوسیت و لگاریتم طبیعی آن، درصد منوسیت، درصد ائوزینوفیل و نسبت هتروزیل به لنفوسیت بود. آمار توصیفی صفات مورد بررسی شامل تعداد مشاهدات برای هر صفت، میانگین صفات، مقدار حداقل و حداکثر برای هر صفت، انحراف معیار باقی‌مانده و ضریب تغییرات در جدول ۲ آمده است. میانگین حداقل مربعات (LSM) و اشتباه معیار (S.E.) صفات مورد بررسی به تفکیک جنس و هج در جدول ۳ آورده شده است.

اثر هج روی صفات درصد منوسیت و درصد ائوزینوفیل معنی‌دار نشد. اثر هج روی صفات شمارش کل گلبول‌های سفید، درصد هتروزیل، درصد لنفوسیت، و نسبت هتروزیل به لنفوسیت بسیار معنی‌دار بود ($P < 0.001$). بین دو جنس نر و ماده برای صفات مورد مطالعه تفاوتی معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳).

¹ Information content

جدول ۲- آمار توصیفی صفات مورد بررسی

صفت *	میانگین تصحیح شده	حداقل	حداکثر	انحراف معیار باقیمانده	ضریب تغییرات
T	۷۵/۲۱	۹/۵۹	۵۳۸/۴۰	۵۹/۴۴	۷۹/۰۳
LogT	۱/۷۷	۰/۹۸	۲/۷۳	۰/۲۶	۱۴/۷۴
TN	۶۸/۹۱	۱/۹۲	۵۳۸/۴۰	۶۱/۴۰	۸۹/۱۰
N	۱/۳۵	۱/۰۰	۵/۰۰	۰/۶۴	۴۷/۵۲
Tm	۴۰/۲۹	۳۸/۰۰	۴۲/۲۰	۰/۶۵	۱/۶۱
WBC	۲۶۵۵۰	۲۰۰۰/۰۰	۱۸۰۰۰۰/۰۰	۲۶۹۰۳/۶۴	۱۰۱/۳۳
LnWBC	۹/۷۸	۷/۶۰	۱۲/۱۰	۰/۷۲	۷/۴۰
HET	۳۲/۷۴	۵/۰۰	۷۸/۰۰	۱۱/۲۰	۳۴/۲۰
LnHET	۳/۳۶	۱/۶۱	۴/۳۶	۰/۳۹	۱۱/۸۱
LYM	۶۷/۲۷	۲۲/۰۰	۹۵/۰۰	۱۱/۱۵	۱۶/۵۸
LnLYM	۴/۱۷	۳/۰۹	۴/۵۵	۰/۱۹	۳/۹۳
MON	۰/۰۲	۱/۰۰	۲/۰۰	۰/۱۷	۸۱۴/۲۸
EO	۰/۰۱	۱/۰۰	۵/۰۰	۰/۲۷	۱۴۵۵/۰۲
HL	۰/۵۸	۰/۰۵	۳/۵۵	۰/۳۹	۶۸/۷۹

* (T) مدت زمان عدم تحرک ناشی از ترس (ثانیه)؛ (LogT) لگاریتم (TN) نسبت مدت زمان عدم تحرک ناشی از ترس به تعداد دفعات تحریک پرنده؛ (N) تعداد دفعات تحریک پرنده؛ (Tm) دمای رکتوم (درجه سانتی گراد)؛ (WBC) شمار کل گلبول های سفید؛ (LnWBC) لگاریتم طبیعی (WBC)؛ (HET) درصد هتروفیل؛ (LnHET) لگاریتم طبیعی (HET)؛ (LYM) درصد لنفوسیت؛ (LnLYM) لگاریتم طبیعی (LYM)؛ (MON) درصد منوسیت؛ (EO) درصد ائوزینوفیل؛ (HL) نسبت هتروفیل به لنفوسیت.

مورد مطالعه در نزدیکی نشانگر GUJ0041 قرار داشت که باید در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر در بلدرچین ژاپنی مورد توجه قرار گیرد. بر اساس نتایج این تحقیق، فقط در مدل‌سازی اثر متقابل هج و اثر افزایشی QTL و مدل‌سازی اثر متقابل جنس و اثر افزایشی QTL برای صفات پارامترهای خونی QTL‌های معنی‌داری شناسایی شد که درصد واریانس و اثر QTL به واحد انحراف معیار مربوط به این صفات در جداول ۷ و ۸ آورده شده است. منظور از واریانس QTL، بخشی از واریانس فنوتیپی صفت مورد نظر است که بوسیله‌ی QTL توجیه می‌شود. واریانس QTL برآورد شده در پژوهش حاضر در محدوده‌ی ۰/۲ تا ۱/۱ درصد بود که در مقایسه با سایر پژوهش‌های نقشه‌یابی QTL انجام شده برای سایر صفات در بلدرچین (Esmailzadeh et al. 2012) این مقادیر بسیار کم به نظر می‌رسد. البته نوع طرح بکار رفته

در مدل‌سازی اثر افزایشی QTL، اثر توام افزایشی و غلبه QTL و همچنین در مدل‌سازی توام اثر افزایشی، غلبه و ایمپریتینگ QTL برای صفات مورد مطالعه، QTL معنی‌داری شناسایی نشد. در مدل‌سازی اثر متقابل هج و اثر افزایشی QTL برای صفت درصد منوسیت در موقعیت ۳۴ سانتی‌مورگانی و برای درصد ائوزینوفیل در موقعیت ۵ سانتی‌مورگانی روی کروموزوم شماره سه QTL معنی‌دار شناسایی شد (جدول ۴). در مدل‌سازی اثر متقابل جنس و اثر افزایشی QTL برای صفات، لگاریتم طبیعی درصد هتروفیل، لگاریتم طبیعی درصد لنفوسیت و نسبت هتروفیل به لنفوسیت در موقعیت ۳۸ سانتی‌مورگانی، QTL معنی‌داری شناسایی شد. همچنین در این مدل برای درصد ائوزینوفیل در موقعیت ۷ سانتی‌مورگانی روی کروموزوم شماره ۳، QTL معنی‌دار شناسایی شد (جدول ۵). بیشترین تعداد QTL شناسایی شده موثر بر صفات

جدول ۳- میانگین حداقل مربعات (LSM) و اشتباه معیار (S.E.) صفات مورد بررسی به تفکیک جنس و هج

WBC	Tm	N	TN	T	صفت ⁺
LSM±S.E.	LSM±S.E.	LSM±S.E.	LSM±S.E.	LSM±S.E.	عوامل ثابت
**	**	**	*	*	هج
۲۳۰۰۴/۴±۳۱۰۹/۰	۳۹/۹±۰/۰	۱/۱±۰/۰	۱۰۶/۶±۷/۰	۱۱۴/۵±۶/۸	۱
۷۴۸۹/۳±۳۲۴۰/۲	۳۹/۶±۰/۰	۱/۴±۰/۰	۵۳/۲±۷/۴	۶۱/۷±۷/۱	۲
۴۱۷۸۹/۰±۳۱۷۴/۲	۴۰/۴±۰/۰	۱/۷±۰/۰	۴/۳±۷/۲	۵۶/۳±۷/۰	۳
۲۴۴۳۹/۱±۲۵۷۷/۶	۴۰/۳±۰/۰	۱/۱±۰/۰	۸۱/۸±۵/۹	۸۴/۵±۵/۷	۴
۳۲۷۰۱/۰±۲۷۷۶/۰	۴۰/۸±۰/۰	۱/۳±۰/۰	۵۵/۴±۶/۳	۶۰/۴±۶/۱	۵
NS	NS	NS	NS	NS	جنس
۲۷۳۵۱/۵±۱۷۳۴/۵	۴۰/۱±۰/۰	۱/۴±۰/۰	۶۴/۷±۳/۹	۷۲/۰±۳/۸	نر
HL	EO	MON	LYM	HET	صفت
LSM±S.E.	LSM±S.E.	LSM±S.E.	LSM±S.E.	LSM±S.E.	عوامل ثابت
***	NS	NS	***	***	هج
۰/۹۹±۰/۰۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۵۴/۳۷±۱/۲۸	۴۵/۸۹±۱/۲۹	۱
۰/۹۵±۰/۰۴	۰/۰۷±۰/۰۳	۰/۱۰±۰/۰۲	۵۲/۹۰±۱/۳۴	۴۶/۹۱±۱/۳۵	۲
۰/۵۴±۰/۰۴	۰/۰۰	۰/۰۰	۶۵/۹۱±۱/۳۱	۳۴/۰۵±۱/۳۲	۳
۰/۳۳±۰/۰۳	۰/۰۱±۰/۰۲	۰/۰۰	۷۶/۵۸±۱/۰۶	۲۳/۳۸±۱/۰۷	۴
۰/۳۳±۰/۰۴	۰/۰۰	۰/۰۱±۰/۰۱	۷۸/۰۴±۱/۱۵	۲۱/۹۴±۱/۱۵	۵
NS	NS	NS	NS	NS	جنس
۰/۶۴±۰/۰۲	۰/۰۳±۰/۰۱	۰/۰۲±۰/۰۱	۶۵/۸۷±۰/۷۱	۳۴/۱۷±۰/۷۲	نر
۰/۶۲±۰/۰۳	۰/۰۰±۰/۰۱	۰/۰۳±۰/۰۱	۶۵/۲۵±۰/۸۵	۳۴/۷۰±۰/۸۵	ماده

ns, *, **, و *** به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال $P < 0.05$, $P < 0.01$ و $P < 0.001$

+ علائم اختصاری صفات در جدول ۱ تعریف شده‌اند.

جدول ۴- میزان اطلاعات مفید (IC) (بر مبنای صفر تا ۱) در نقاط مختلف کروموزوم شماره سه بلدرچین ژاپنی برای آثار افزایشی، غلبه و ایمپریتینگ. بیشترین میزان اطلاعات مربوط به نشانگر GUJ0035 می‌باشد که در موقعیت ۲۷ سانتی مورگانی کروموزوم شماره ۳ بلدرچین ژاپنی قرار دارد.

GUJ0041	GUJ0035	GUJ0099	نشانگر
۳۸	۲۷	۰	موقعیت (CM)
۳۱/۰	۷۶/۰	۲۲/۰	اطلاعات افزایشی
۱۳/۰	۹۹/۰	۱۲/۰	اطلاعات غلبه
۴۰/۰	۹۴/۰	۳۱/۰	اطلاعات ایمپریتینگ
۱۶ (۱۰۰ درصد)	۱۶ (۱۰۰ درصد)	۱۶ (۱۰۰ درصد)	P (%) افراد تعیین ژنوتیپ شده
۳۴ (۱۰۰ درصد)	۳۴ (۱۰۰ درصد)	۳۴ (۱۰۰ درصد)	F1 (%)
۴۱۹ (۱۰۰ درصد)	۴۱۹ (۱۰۰ درصد)	۴۱۹ (۱۰۰ درصد)	F2 (%)
۳	۳	۳	تعداد الل

جدول ۵- نتایج معنی دار حاصل از مدل سازی اثر متقابل QTL و هج

LOD	F	اثر متقابل هج و اثر افزایشی QTL					موقعیت (سانتی مورگان)	صفت ⁺
		هج ۵ a±S.E.	هج ۴ a±S.E.	هج ۳ a±S.E.	هج ۲ a±S.E.	هج ۱ a±S.E.		
۲/۸۷	۲/۶۸*	۰/۰۰۲±۰/۰۴	-۰/۰۲۷±۰/۰۳۷	۰/۰۰۰۲±۰/۰۴۱	۰/۱۴۶±۰/۰۴	۰/۰۰۰۷±۰/۰۳۵	۳۴	MON
۳/۸۴	۳/۶۱**	۰/۰۰۳±۰/۰۶۶	۰/۰۳۰±۰/۰۶	۰/۰۳۵±۰/۰۷۲	۰/۲۸۵±۰/۰۶۸	-۰/۰۰۳±۰/۰۶	۵	EO

* و ** به ترتیب اثر معنی داری QTL در سطح (P < ۰/۰۵) و (P < ۰/۰۱)

+ علائم اختصاری صفات در جدول ۱ تعریف شده اند.

جدول ۶- نتایج معنی داری حاصل از مدل سازی اثر متقابل QTL و جنس

LOD	F	اثر متقابل جنس و اثر افزایشی QTL		موقعیت (سانتی مورگان)	صفت ⁺
		ماده a±S.E.	نر a±S.E.		
۱/۹۹	۴/۶۳*	۰/۰۶۸±۰/۰۶	-۰/۱۳۶±۰/۰۴۸	۳۸	LnHET
۱/۹۹۹	۴/۶۵*	-۰/۰۳۳۱±۰/۰۲۹	۰/۰۶۷۳±۰/۰۲۳	۳۸	LnLYM
۱/۶۹۶	۳/۹۴*	۰/۰۰۱۱±۰/۰۴۶۹	۰/۱۰۳۸±۰/۰۳۶	۷	EO
۱/۸۵۷	۴/۳۲*	۰/۰۵۴۵±۰/۰۶	-۰/۱۳۵۹±۰/۰۴۸	۳۸	HL

* و ** به ترتیب اثر معنی داری QTL در سطح (P < ۰/۰۵) و (P < ۰/۰۱)

+ علائم اختصاری صفات در جدول ۱ تعریف شده اند

جدول ۷- واریانس ناشی از QTL و اثر QTL به واحد انحراف معیار باقی مانده برای صفات معنی دار حاصل از تجزیه مدل سازی اثر متقابل هج و اثر افزایشی QTL

F	اثر QTL به واحد انحراف معیار					درصد واریانس QTL	موقعیت (cM)	صفت ⁺
	هج ۵ a±S.E.	هج ۴ a±S.E.	هج ۳ a±S.E.	هج ۲ a±S.E.	هج ۱ a±S.E.			
۲/۶۸*	۰/۰۱۱±۰/۲۳۳	-۰/۱۵۷±۰/۲۱۶	۰/۰۰۱±۰/۲۳۹	۰/۸۵۳±۰/۲۳۳	۰/۰۰۴±۰/۲۰۴	۰/۳۳۹	۳۴	MON
۳/۶۱**	۰/۰۱۰±۰/۲۴	۰/۱۰۹±۰/۲۱۸	۰/۱۲۷±۰/۲۶۱	۱/۰۳±۰/۲۴۷	-۰/۰۱±۰/۲۱۸	۱/۰۵۷	۵	EO

+ علائم اختصاری صفات در جدول ۱ تعریف شده اند

حداکثر میزان نتاج F2 به ازای هر کدام از والدین نر، در طی ۵ جوجه درآوری متوالی این تعداد افراد ایجاد شد. بنابراین اثر هج به عنوان یک اثر ثابت تاثیر قابل توجهی در شناسایی جایگاه های مورد نظر داشت. جداول ۷ و ۸ نشان می دهند که بیشترین واریانس QTL ایجاد شده در بین صفات مربوط به درصد ائوزینوفیل می باشد. ائوزینوفیل حدود پنج درصد از گلبول سفید خون را تشکیل می دهد و دارای هسته دو لوبه است. تعداد ائوزینوفیل ها در واکنش به بیماری ها در خون افزایش می یابد. مونسیت ها بزرگترین سلول در جریان خون محسوب می شوند و در مراحل اولیه واکنش ایمنی در فاگوسیتوز شرکت دارند (Guyton and

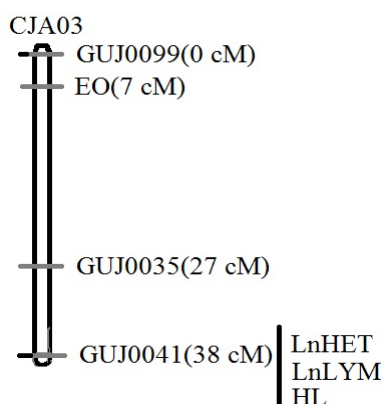
در پژوهش های مختلف می تواند در برآورد اندازه اثر QTL تاثیرگذار باشد. به طور مثال با توجه به کمتر بودن قدرت آماری طرح ناتنی نسبت به طرح F2 احتمالاً میزان واریانس QTL در طرح های ناتنی بیش از میزان واقعی برآورد شود. با توجه به واریانس پایین QTL یافت شده در این تحقیق، احتمالاً QTL های با اثر عمده روی سایر کروموزوم ها وجود دارند که این صفات را تحت تاثیر قرار می دهند. با توجه به جدول ۷، اثر افزایشی QTL - های مربوط به صفات درصد مونسیت و درصد ائوزینوفیل با هج دارای اثر متقابل معنی دار بود. با توجه به اینکه ایجاد تمام جمعیت F2 به طور یکباره و در طی یک هج امکان پذیر نبود، برای تولید

جدول ۸- واریانس ناشی از QTL و اثر QTL به واحد انحراف معیار باقی‌مانده برای صفات معنی‌دار حاصل از تجزیه مدل‌سازی اثر متقابل جنس و اثر افزایشی QTL

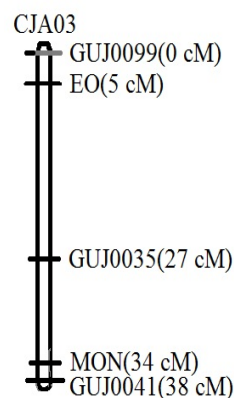
F	اثر QTL به واحد انحراف معیار		درصد واریانس QTL	موقعیت (سانتی مورگان)	صفت ⁺
	ماده a±S.E.	نر a±S.E.			
۴/۸۱*	۰/۱۹±۰/۱۵	-۰/۳۴±۰/۱۲	۰/۲۲	۳۸	HETER
۴/۶۳*	۰/۱۷±۰/۱۵	-۰/۳۴±۰/۱۲	۰/۳۱	۳۸	LnHETER
۴/۷۰*	-۰/۱۹±۰/۱۵	۰/۳۳±۰/۱۲	۰/۲۱	۳۸	LYM
۴/۶۵*	-۰/۱۷±۰/۱۴	۰/۳۴±۰/۱۱	۰/۲۶	۳۸	LnLYM
۳/۹۴*	۰/۰۰۴±۰/۱۷	۰/۳۷±۰/۱۳	۱/۰۵	۷	EO
۴/۳۲*	۰/۱۳±۰/۱۵	-۰/۳۴±۰/۱۲	۰/۳۷	۳۸	HL

* و ** به ترتیب اثر معنی‌داری QTL در سطح (P < ۰/۰۵) و (P < ۰/۰۱)

+ علائم اختصاری صفات در جدول ۱ تعریف شده‌اند



شکل ۴- موقعیت QTL و نشانگرها روی کروموزوم شماره ۳ در مدل‌سازی اثر متقابل QTL و جنس



شکل ۳- موقعیت QTL و نشانگرها روی کروموزوم شماره ۳ در مدل‌سازی اثر متقابل QTL و هج

واقعی از تنش شدید می‌باشد. در تحقیق Maxwell et al. (1993) مشاهده شد هتروفیل‌ها ممکن است در پاسخ به تنش متوسط اما بازوفیل‌ها در شرایط تنش شدید به وجود می‌آیند. در مدل‌سازی اثر متقابل هج و اثر افزایشی QTL، موقعیت شناسایی شده برای صفت درصد ائوزینوفیل در موقعیت ۵ سانتی‌مورگانی و در مدل‌سازی اثر متقابل جنس و اثر افزایشی QTL، در موقعیت ۷ سانتی‌مورگانی بود. بنابراین QTL موثر برای این صفت در ابتدای کروموزوم سه و نزدیک به نشانگر GUJ0099 قرار دارد. برای تمامی صفات درصد هتروفیل، درصد لنفوسیت، نسبت هتروفیل به لنفوسیت در مدل‌سازی اثر متقابل جنس و اثر افزایشی QTL،

بنابراین یافتن جایگاه‌های کنترل‌کننده این سلول‌های خونی و در نهایت شناسایی شبکه ژنی کنترل‌کننده این سلول‌های خونی می‌تواند در کشف دارو و همچنین اصلاح ژنتیکی پرندگان با هدف تولید سویه‌های مقاوم به انواع عوامل تنش‌زا مفید باشد. با توجه به جدول ۸، QTL‌های شناسایی شده برای صفات درصد هتروفیل، درصد لنفوسیت، نسبت هتروفیل به لنفوسیت و درصد ائوزینوفیل با جنس دارای اثر متقابل معنی‌دار بود. در طی تحقیقی که Gross and Siegel (1983) انجام دادند، بیان داشتند که نسبت هتروفیل به لنفوسیت در نرها بیشتر از ماده‌ها است. همچنین مشخص شده که نسبت هتروفیل به لنفوسیت یک شاخص

تیموس است که متاثر از کورتیکوستروئیدها می‌باشد. بنابراین، نسبت هتروفیل به لنفوسیت معرف بهتری برای تغییرات فیزیولوژیکی دراز مدت است (Gross and Siegel 1983) که متاثر از فعالیت بورس فابریسیوس و تیموس می‌باشد. از طرف دیگر در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی، اندازه‌گیری مقاومت به مجموعه عوامل تنش‌زا در دراز مدت اهمیت دارد، لذا نسبت هتروفیل به لنفوسیت معیار مناسب‌تری برای انتخاب ژنتیکی برای مقاومت به تنش به نظر می‌رسد. در طی تحقیقی که (2005) Minvielle et al. به منظور کاوش کل ژنوم بلدرچین انجام دادند، QTL مرتبط با TI را روی کروموزوم شماره‌ی یک شناسایی کردند، اما در تحقیق حاضر برای این خصوصیت روی کروموزوم شماره سه QTL یافت نشد. پیشنهاد می‌شود به منظور شناسایی دقیق تر و تعداد بیشتر QTL دخیل در صفات مورد مطالعه در این تحقیق سایر کروموزوم‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرند.

منابع

- Aslam ML, BasTlaansen, JWM, Crooijmans RPMA, Vereijken A, Megens HJ, Groenen MAM (2011) Whole genome QTL mapping for growth, meat quality and breast meat yield traits in turkey. *BioMed Central Genetics* 12:61.
- Baron EE, Moura AS, Ledur MC, Pinto LF, Boschiero C, Ruy DC, Nones K, Zanella EL, Rosario MF, Burt DW, CouTinho LL (2010) QTL for percentage of carcass and carcass parts in a broiler x layer cross. *Journal of Animal Genetics* 42:117-124.
- Beaumont C, Roussot O, Feve K, Vignoles F, Leroux S, Pitel F, Faure JM, Mills AD, Guemene D, Sellier N, Mignon-Grasteau S, Le Roy P, Vignal A (2005) A genome scan with AFLP markers to detect fearfulness-related QTLs in Japanese quail. *Journal of Animal Genetics* 36: 401-407.
- Campo JL, Davila SG (2002) Estimation of heritability for heterophil:lymphocyte ratio in chickens by restricted maximum likelihood: Effects of age, sex, and crossing. *Journal of Poultry Science* 81:1448-1453.
- Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- Esmailzadeh KA, Mohammad Abadi MR, Asadi Foozi M (2008) Mapping quantitative trait loci in livestock using simple linear regression. *Iranian Journal of Animal Sciences* 39: 83-93. (In Farsi)
- Esmailzadeh AK, Baghizadeh A, Ahmadizadeh M (2012) Genetic mapping of quantitative trait loci affecting bodyweight on chromosome 1 in a commercial strain of Japanese quail. *Animal Product Sciences* 52: 64-68.

جایگاه معنی‌داری در موقعیت ۳۸ سانتی‌مورگانی شناسایی شد. از میان صفات مورد بررسی در این مطالعه برای صفات درصد ائوزینوفیل، درصد مونوسیت، درصد هتروفیل، لگاریتم طبیعی درصد هتروفیل، درصد لنفوسیت، نسبت هتروفیل به لنفوسیت در مدل‌سازی اثر متقابل هج و جنس با اثر افزایشی QTL، جایگاه-هایی روی کروموزوم شماره سه بلدرچین شناسایی شد. استفاده از راهکارهای اصلاح نژادی به منظور توسعه و پرورش پرندگان مقاوم به مجموعه عوامل تنش‌زا، نیازمند تعیین معیار مناسب برای اندازه‌گیری صفت و انتخاب افراد جمعیت بر اساس این معیار می‌باشد. واکنش نسبت به ترس (TI) و نسبت هتروفیل به لنفوسیت (H/L)، به عنوان دو معیار مناسب از پاسخ پرند به تنش هستند که در این پژوهش برای صفت نسبت هتروفیل به لنفوسیت QTL معنی‌داری در موقعیت ۳۸ سانتی‌مورگانی کروموزوم ۳ شناسایی شد. نسبت هتروفیل به لنفوسیت بیانگر تغییر فیزیولوژیکی در اندام‌هایی همچون غدد بورس فابریسیوس و

- Gallup JG, Gordon G (1979) Tonic immobility as a measure of fear in domestic fowl. *Animal Behavior* 27:316-317.
- Gallup JG (1977) Tonic immobility; The role of fear and predation. *The psychological record* 27: 41-61
- Gilmour AR, Gogel BJ, Cullis BR, Thompson R (2006) 'ASReml user guide release 2.0.' (VSN International Ltd: Hemel Hempstead, UK)
- Gross WB, Siegel HS (1983) Evaluation of heterophil/lymphocyte ration as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases* 27:972-977.
- Guyton AC, Hall John E (2011) *Textbook of Medical Physiology* (12 th, ed) 516- 549.
- Harmon BG (1998) Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Science* 77:972-977.
- Jones R, Faure J (1981) The effects of regular handling on fear responses in the Domestic chlk. *Behavioral processes* 6: 135-143.
- Jones RB (1986) The tonic immobility reaction of the domestic fowl: A review. *World's Poultry Science Journal* 42: 82-97.
- Kayang BB, Murayama M, Hoshi T, Matsuo K, Takahashi H, Minezawa M, Mizutani M, Ito S (2001) Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl. *Genetics Selection Evolution* 34: 233-253
- Knott SA, Elsen JM, Haley CS (1996) Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 71-80.

Maxwell MH (1993) Avian blood leucocyte responses to stress. *World's Poultry Science* 49:34-43.

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.

Richard JJ (1998) Physiological management and environmental triggers of the ascites syndrome. *Poultry International* 37:28-33.

Ritchie BW, Harrison JG, Harrison RL (1994) *Avian medicine*. Winger's Publishing Inc., Florida, pp.176-198.

Seaton G, Hernandez J, Grunche JA, White I, Allen J, De Koning DJ, Wei W, Berry D, Haley C, Knott S (2006) Grid QTL: A grid portal for QTL mapping of compute intensive datasets. in: *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, August 13-18. Belo Horizonte, Brazil.

Valance D, Després G, Richard S, Constantin P, Mignon-Grasteau S, Leman S, Boissy A, Faure JM, Leterrier C (2008) Changes in Heart rate variability during a tonic immobility test in quail. *Physiology and Behavior* 93: 512-520.

Weller JI (2001) *Quantitative trait loci analysis in animals*. CABI Publishing London 287.