



شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر عدم تقارن اسکلتی در بلدرچین ژاپنی

سعید سهرابی^{۱*}، علی اسماعیلی زاده^۲، محمدرضا محمدآبادی^۳، حسن مرادیان^۴، احسان نصیری فر^۵، رسول خدابخش زاده^۶

^۱دانشجوی دکتری بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی و عضو انجمن پژوهشگران جوان، دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۲استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۳استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۴دانشجوی دکتری بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۵دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۶دانش آموخته کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۳

چکیده

عدم تقارن که نشان‌دهنده استرس ژنتیکی یا محیطی در موجودات است، می‌تواند در ناپایداری تکاملی حیوانات نقش داشته باشد. ثابت شده است که این عدم تقارن می‌تواند عامل رشد کندتر، باروری کمتر و بقای محدودتر موجودات باشد. مطالعه حاضر به منظور شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر این عدم تقارن در استخوان متاتارسوس بلدرچین ژاپنی صورت گرفت. بدین منظور از یک طرح سه نسلی F2 حاصل از تلاقی متقابل دوسویه متفاوت بلدرچین ژاپنی (تخم‌گذار یا سفید و گوشتی یا وحشی) و تشکیل نسل دوم استفاده گردید. با تلاقی ۳۴ پرنده از نسل دوم با یکدیگر، ۴۲۲ پرنده نسل سوم ایجاد شد. رکوردهای فنوتیپی مربوط به وزن و طول استخوان‌های مربوط به ۴۰۳ پرنده ثبت شدند. ۴۱۴ قطعه از پرندگان هر سه نسل (۳۸۳ قطعه از نسل سوم) برای هشت نشانگر ریزماهواره تعیین ژنوتیپ شدند. داده‌های حاصل با استفاده از روش نقشه‌یابی درون فاصله‌ای آنالیز شده و QTL مربوط به ۱۲ صفت شناسایی شد. در این تحقیق، شش جایگاه ژنی در فواصل ۵۹، ۷۰، ۱۳۴، ۱۵۶، ۱۶۴ و ۱۸۴ سانتی مورگان روی کروموزوم شماره یک شناسایی شد. واریانس ناشی از جایگاه‌های شناسایی شده، ۰/۳۷ تا ۵/۲۹ درصد از واریانس فنوتیپی صفات موردنظر را شامل می‌شد.

واژه‌های کلیدی: عدم تقارن، بلدرچین ژاپنی، جایگاه‌های ژنی مؤثر بر صفات کمی.

طبقه‌بندی کرد. عدم تقارن جهت دار به حالتی اطلاق می‌شود که در اعضای متقارن بدن، توسعه و نمو در یک سمت بیشتر از سمت دیگر باشد. در این نوع عدم تقارن، معمولاً تمایل به عدم تقارن فقط در یک جهت بدن دیده می‌شود مانند محل قرارگیری قلب در پستانداران (Van Valen, 1962). در حالت ضد تقارن، برهم‌کنش منفی بین میزان توسعه و نمو یک خصوصیت در دو سمت بدن وجود دارد. در این نوع عدم تقارن، برخلاف حالت قبل، سمتی که دارای رشد و نمو بیشتر است، در افراد مختلف متفاوت است. مثال بارز این نوع عدم تقارن، چپ دست یا راست دست بودن در انسان است (Van Valen, 1962). نوع سوم یا عدم تقارن نوسانگر، یک شاخص مناسب و توصیه شده برای ناپایداری تکاملی^۴ حیوانات است (Palmer and Strobeck, 1992)، که به‌عنوان یک معیار معتبر و قابل‌اعتماد از استرس ژنتیکی و محیطی (Clarke et al., 1986; Leary and Allendorf, 1989; Parsons, 1990; Parsons, 1992) و همچنین آسایش و سازگاری فردی حیوان در طول نمو (Clarke, 1995; Jones, 1987; Moller, 1999; Tuytens, 2003) در نظر گرفته می‌شود. بررسی عوامل ایجادکننده ناپایداری تکاملی در جانوران نشان می‌دهد که مجموعه‌ای از عوامل محیطی (مانند شرایط اقلیمی، تغذیه‌ای، بیماری و...) و ژنتیکی (مانند هم‌خونی، دورگ‌گیری، جهش‌های جدید و...)

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن ۵ قبل از میلاد تا تقریباً قرن ۷ میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریا‌های سیاه و مدیترانه گسترده بود. در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان‌شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (Mohammadabadi et al., 2010). بر اساس تحقیقات West and Zhou استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ قبل از میلاد و ۱۰۰۰ قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ قبل از میلاد (Mohammadabadi et al., 2010). عدم تقارن دوطرفه^۱ عبارت از انحراف اعضای متقارن الطرفین بدن یک موجود زنده از تقارن کامل است. می‌توان این انحراف را به عدم تقارن جهت‌دار^۲، ضد تقارن^۳ و عدم تقارن نوسانگر^۴

1 Bilateral Asymmetry

2 Directional Asymmetry

3 Anti-asymmetry

4 Fluctuating Asymmetry

5 Developmental Instability

تعیین‌کننده بیان صفات اقتصادی مهم در گیاهان و جانوران یکی از اهداف مهم مطالعات ژنتیکی در طی چند سال اخیر بوده است. تاکنون صفات متنوعی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که محدوده وسیعی از فنوتیپ‌های بیماری در انسان تا صفات تولیدی در حیوانات اهلی را شامل می‌شوند. بیشتر این ژن‌ها به‌واسطه تنوع وسیع در بیان ژن‌های موجود در جایگاه‌های مؤثر بر صفات کمی^۱ شناخته می‌شوند. بسیاری از این جایگاه‌ها تاکنون مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته و مکانیسم‌های درگیر در بیان تعدادی از آن‌ها شناخته شده است (Esmailizadeh *et al.*, 2012; Jabbari *et al.*, 2014; Minvielle *et al.*, 2005). در بین طیور، تاکنون عدم تقارن فقط در اجزای بدن مرغ در چندین مطالعه مورد آزمایش قرار گرفته و ارتباط آن با سایر صفات و آسایش پرنده و همچنین عوامل ژنتیکی و محیطی مؤثر بر آن بررسی شده است (Campo *et al.*, 2006; Moller *et al.*, 1995; Naas *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2015; Siegel *et al.*, 1997). از سوی دیگر، تا به حال در هیچ‌کدام از مطالعات صورت گرفته، شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر این خصوصیات مورد توجه واقع نشده است. بلدرچین ژاپنی یکی از پرنده‌گانی است که به دلیل جثه کوچک، سن بلوغ پایین و فواصل نسلی کوتاه در بسیاری از مطالعات به‌عنوان یک مدل مناسب برای طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد

می‌تواند این ناپایداری را ایجاد کند (Palmer and Strobeck, 1986).

میزان عدم تقارن در خصوصیات ریخت‌شناختی دوطرفه، می‌تواند منعکس‌کننده پاسخ موجود زنده به عوامل تنش‌زای ژنتیکی و محیطی و اثرات متقابل بین آن‌ها باشد (Campo *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2006). این نوع عدم تقارن با توزیع نرمال تفاوت‌های بین اندام‌های نیمه چپ و راست بدن با میانگین صفر شناخته شده و به‌صورت قدرمطلق اختلاف بین یک صفت در سمت چپ و راست بدن یک حیوان متقارن اندازه‌گیری می‌شود (Palmer, 1994; Palmer and Strobeck, 1986; Palmer and Strobeck, 1992; Polak and Trivers, 1994; Swaddle *et al.*, 1994; Van Valen, 1962). ناپایداری تکاملی می‌تواند اطلاعات قابل‌اعتمادی در خصوص توانایی افراد و جمعیت‌ها برای تطابق بهتر با محیط اطراف با در نظر گرفتن سابقه ژنتیکی آن‌ها ارائه دهد. با بررسی‌های انجام شده در خصوص ارتباط بین عدم تقارن و خصوصیات مربوط به سازگاری زیستی حیوانات مشخص شده است که حیوانات دارای تقارن، رشد سریع‌تر، باروری بالاتر و بقای بهتری دارند و ضریب همبستگی بین عدم تقارن و رشد، باروری و بقا منفی است (به ترتیب ۰/۱۵-، ۰/۳۵- و ۰/۲۵-) (Moller *et al.*, 1995).

در طی دهه‌های اخیر، مطالعات زیادی برای درک بهتر مکانیسم‌های دخیل در صفات مرکب انجام گرفته است. علاوه بر این، شناسایی ژن‌های

1 Quantitative trait loci

مواد و روش‌ها

تعداد هشت پرندۀ نر و هشت پرندۀ ماده به‌عنوان نسل والد (P) به تعداد مساوی از دو سویه سفید (S) و وحشی (W) انتخاب و تلاقی دوطرفه بین آن‌ها (نر سفید × ماده وحشی و نر وحشی × ماده سفید) انجام شد. برای تولید نسل F₁، هر پرندۀ نر در نسل P با یک پرندۀ ماده تلاقی داده شد و تخم‌ها پس از جمع‌آوری روزانه و ثبت شماره پلاک مادر بر روی آن، به مدت هفت روز تا تکمیل جمع‌آوری تخم در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد نگهداری شدند. جهت انجام جوجه‌کشی، تخم‌ها به دستگاه ستر منتقل شده و در پایان روز پانزدهم به دستگاه هچر انتقال داده شدند. در زمان تولد به پای جوجه‌ها پلاک متصل شده و در ده‌روزگی این پلاک از پا جدا شده و پلاک‌هایی با همان شماره به بال‌های پرندۀ متصل شد. جیره غذایی پرندگان در هر سه نسل یکسان و دارای ۲۴ درصد پروتئین و ۲۹۰۰ کیلوکالری انرژی بود. غذا و آب به‌صورت اختیاری در دسترس پرندگان قرار داشت. تعداد ۳۴ پرندۀ از بین پرندگان نسل اول (F₁) شامل ۱۷ نتاج (SW) حاصل از تلاقی نر سفید × ماده وحشی (۱۴ پرندۀ ماده و سه پرندۀ نر) و ۱۷ نتاج (WS) حاصل از تلاقی نر وحشی × ماده سفید (هشت پرندۀ ماده و شش پرندۀ نر) برای تولید نسل دوم (F₂) انتخاب شدند. به‌منظور ایجاد اطمینان از بارور بودن تخم پرندگان، هر پرندۀ نر با سه پرندۀ ماده (به‌صورت چرخشی و هر سه روز یک‌بار با یکی از پرندگان ماده) تلاقی

(Wakasugi and Kondo, 1973; Wilson *et al.*, 1961). انجمن بین‌المللی ژنتیک حیوانی^۱ ریزماهواره‌ها را به عنوان بهترین نشانگر جهت تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های حیوانی معرفی کرده است (Mohammadifar and Mohammadabadi, 2011). بر اساس بررسی‌های ثبت شده توسط FAO، ۶۶ درصد کل مطالعات تعیین فاصله ژنتیکی با استفاده از ریزماهواره‌ها انجام گرفته است و ۷۰ درصد پژوهشگران ریزماهواره‌ها را انتخاب کرده‌اند (Mohammadifar and Mohammadabadi, 2011). شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر برخی از صفات بلدرچین ژاپنی از جمله صفات مربوط به رشد (Esmailizadeh *et al.*, 2012; Jabbari *et al.*, 2014) برخی صفات رفتاری و تولید تخم (Minvielle *et al.*, 2005)، ژنتیک (Sohrabi *et al.*, 2012; Jabbari *et al.*, 2014; Moradian *et al.*, 2014) و همچنین خصوصیات مرتبط با لاشه در چند مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به اینکه کروموزوم شماره یک بزرگ‌ترین کروموزوم بلدرچین است (Kayang *et al.*, 2004)، مطالعه حاضر با هدف شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر خصوصیات مرتبط با عدم تقارن در استخوان تارسومتاتارسوس روی کروموزوم شماره یک بلدرچین ژاپنی صورت گرفت.

¹ International society for animal genetics

(Siegel, 2015). کشتار پرندگان با قطع گردن ۴۱۴ پرنده از هر سه نسل انجام گرفت و در هنگام کشتار، از هر کدام از پرندگان هر سه نسل خون‌گیری شده و استخراج DNA از خون هر فرد با استفاده از روش استخراج نمکی انجام شد (Iranpur and Esmailzadeh, 2011). هر کدام از افراد هر سه نسل برای هشت نشانگر ریزماهواره موجود روی کروموزوم شماره یک بلدرچین (Kayang *et al.*, 2002; Kayang *et al.*, 2004) با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تعیین ژنوتیپ شدند. مشخصات آغازگرهای مربوط به این نشانگرها در جدول ۱ آمده است. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با غلظت‌های نهایی مواد به این شرح انجام شد: ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، پنج پیکومول مخلوط جفت آغازگر اختصاصی، ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl (با ۸ pH=)، ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو و یک واحد آنزیم Taq پلیمرز. محصولات این واکنش به‌منظور تفکیک باندها و مشخص شدن آلل مربوطه روی ژل پلی اکریل آمید هشت درصد بارگذاری شدند و با استفاده از جریان ۱۵۰ ولت در مدت سه ساعت عمل تفکیک قطعات DNA صورت گرفت. جهت آشکارسازی باندها از روش رنگ‌آمیزی نیترا نقره استفاده شد (Han *et al.*, 2008). شکل ۱، چند باند مربوط به دو نشانگر GUJ0055 و GUJ0056 و نحوه تعیین ژنوتیپ‌های مربوطه را نشان می‌دهد.

داده شد. از تلاقی نرهای SW با ماده‌های WS تعداد ۱۵۳ (۶۴ ماده و ۸۹ نر) پرنده F_2 (SWWS) و از تلاقی نرهای WS با ماده‌های SW تعداد ۲۳۰ (۹۶ ماده و ۱۳۴ نر) پرنده F_2 (WSSW) در طی پنج هیچ متوالی تولید شدند (درمجموع ۳۸۳ قطعه پرنده). به دلیل اهمیت پا در حفظ تعادل ظاهری و کمک به پرنده در برخورد با سایر پرندگان، تغذیه و موفقیت در تولیدمثل، اندازه‌گیری‌های فنوتیپی روی استخوان متاتارسوس^۱ پرندگان نسل سوم (F_2) انجام گرفت. برای اندازه‌گیری طول و وزن استخوان متاتارسوس، ابتدا تمامی قسمت‌های عضله از استخوان جدا و با استفاده از کولیس دیجیتال، طول استخوان (برحسب میلی‌متر) و به کمک ترازویی با دقت ۰/۰۱ وزن استخوان (برحسب گرم) اندازه‌گیری و ثبت گردید. اختلاف بین طول، قطر و وزن استخوان متاتارسوس راست و چپ بعنوان عدم تقارن نوسانگر و همچنین نسبت این عدم تقارن به متوسط دو مقدار به دست آمده چپ و راست بعنوان عدم تقارن نسبی محاسبه و به عنوان ورودی فنوتیپی برای نقشه یابی در نظر گرفته شد. نحوه محاسبه عدم تقارن نسبی در معادله زیر آمده است:

$$\text{Relative Asymmetry} = ((L-)/(L+R/2)) \times 100$$

که در اینجا، L مقدار اندازه‌گیری شده مربوط به متاتارسوس چپ و R مقدار اندازه‌گیری شده مربوط به متاتارسوس راست است (Tu and

1 Metatarsus

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مربوط به نشانگرهای مورد بررسی در این پژوهش.

Table 1- Summary of general characteristics of the microsatellites markers on Japanese quail chromosome 1 used in this study.

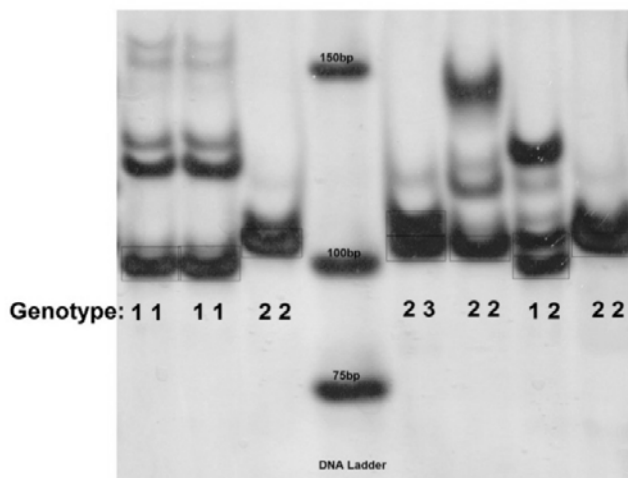
تعداد آلل های شناسایی شده	دمای اتصال ^B (درجه سانتی گراد)	توالی آغازگر Primer sequence		موقعیت ^A (سانتی مورگان) Position (cM)	نام نشانگر Marker name
		پرو Reverse	پیشرو Forward		
3	55	5'-GCATACTGCAATATACCT GA-3'	5'-TTGACATACTTGGATTAGAGA -3'	0	GUJ0055
2	43	5'-AAACTACCGATGTAAGTA AG-3'	5'-ATGAGATATATAAGGAACCC- 3'	19	GUJ0052
2	55	5'-AACGCATACAACCTGACTG GG-3'	5'-GGATAGCATTTCAGTCACGG- 3'	57	GUJ0048
2	55	5'-ACCAAACCCGAGATCCGA CA-3'	5'-AGCGTTCGCGTTCCTCTTTC- 3'	91	GUJ0013
2	55	5'-GTTACATCCATCCTGCCTC A-3'	5'-CTCTTGAGCCTACCAGTCTG-3'	122	GUJ0056
2	55	5'-GCATAACTGAACTACCAC GC-3'	5'-GCATCAGTTCCATCAGCTAG- 3'	172	GUJ0098
2	54	5'-TAGGAGAGGTCACGATTT GC-3'	5'-ATCTTAACTCGCCCAGCCTT-3'	197	GUJ0068
3	55	5'-GCCTTCAGAGTGGGAAAT- 3'	5'-TCTCACAGAAACAGCTCC-3'	206	GUJ0090

^Aموقعیت نشانگر روی کروموزوم برحسب سانتی مورگان بر اساس نقشه پیوستگی بلدرچین (Kayang *et al.*, 2002)

^Bدمای اتصال

^A Marker position on chromosome based on Japanese quail sex averaged linkage map (Kayang *et al.* 2004).

^BTA, annealing temperature (°C).



شکل ۱- نمونه ای از ژل پلی اکریل آمید و نحوه تعیین ژنوتیپ نشانگر.

Figure 1- banding pattern of SSR markers on polyacrylamide gel.

Q (ایمپرینتینگ)، P_{ik} ، احتمال شرطی اینکه هم پرندۀ k هتروزیگوت باشد و هم آلل سویه وحشی را از والد پدری دریافت نماید. همچنین اثرات متقابل هج و جنس با اثر افزایشی QTL در دو مدل دیگر برآورد شد. برای شناسایی جایگاه‌های ژنی مرتبط با صفات مورد بررسی در این پژوهش، فایل‌های فنوتیپی و ژنوتیپی (به ترتیب حاصل از نتایج رکوردهای فنوتیپی و آلل‌های نشانگرها) و همچنین فایل نقشه نشانگرها روی کروموزوم شماره یک و فواصل بین آنها به وسیله نرم‌افزار GridQTL، که به صورت آنلاین قابل دسترس است مورد آنالیز قرار گرفتند.

به منظور شناسایی جایگاه‌های مرتبط با صفات مورد نظر و مشخص کردن اثرات افزایشی، غلبه یا ایمپرینتینگ^۱ از سه مدل آماری یک، دو و سه استفاده شد:

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

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

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

که در این مدل‌ها، Y_{ijk} ، مشاهده مربوط به i امین هج، j امین جنسیت و k امین پرندۀ، μ ، میانگین جمعیت، H_i ، اثر هج که دارای پنج تکرار می‌باشد، S_j ، اثر جنس پرندۀ که دارای دو سطح (نر و ماده) می‌باشد، a، اثر افزایشی QTL، P_{ak} ، احتمال شرطی دریافت آلل سویه وحشی توسط پرندۀ k، d، اثر غلبه ژنی QTL، P_{dk} ، احتمال شرطی هتروزیگوت بودن پرندۀ k؛ i، اثر منشأ والدی آلل

¹ Imprinting

نتایج و بحث

خلاصه‌ای از مشخصات آمار توصیفی صفات موردبررسی در این مطالعه شامل تعداد، میانگین، حداقل، حداکثر و انحراف معیار در جدول ۲ آمده است. در مجموع تعداد شش جایگاه مؤثر بر صفات موردبررسی در این پژوهش شناسایی شد. در جدول ۳ موقعیت هرکدام از شش جایگاه شناسایی شده روی کروموزوم شماره یک برحسب سانتی مورگان (cM)، بالاترین آماره F حاصل از برازش مدل موردنظر، شاخص LOD، نزدیک‌ترین نشانگر به QTL شناسایی شده و درصد واریانس هریک از جایگاه‌ها برحسب اثرات افزایشی، غلبه و ایمپریتینگ آمده است.

منظور از واریانس QTL، بخشی از واریانس فنوتیپی یک صفت خاص در جمعیت F2 است که به وسیله QTL موردنظر بیان می‌شود. به عبارت دیگر، مشارکت جایگاه مؤثر بر یک صفت خاص در واریانس فنوتیپی کل صفت را نشان می‌دهد (Jabbari et al., 2014).

درصد واریانس صفات بین افراد نسل F2 که به وسیله QTL های شناسایی شده بیان می‌شود (V_{QTL}) از فرمول شماره چهار محاسبه شد:

$$V_{QTL} = 100 \times (RMS - FMS) / RMS \quad (4)$$

که در اینجا، RMS میانگین مربعات باقیمانده از مدل کاهش یافته است که اثر QTL موردنظر از

آن حذف شده است و FMS میانگین مربعات باقیمانده از مدل کامل است که شامل اثر QTL مورد نظر است.

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، با توجه به اینکه جایگاه‌های شناسایی شده مؤثر بر صفات قطر متاتارسوس راست و قطر متاتارسوس چپ تقریباً در فاصله نزدیک به یکدیگر قرار گرفته‌اند، می‌توان چنین برداشت کرد که احتمالاً در این فاصله ژن‌ها و جایگاه‌های مشترکی وجود دارند که بر هر دو صفت موردنظر تأثیر می‌گذارند. با توجه به ماهیت این دو صفت، چنین مشاهده‌ای قابل انتظار بود. چراکه در هر دو صفت، قطر استخوان اندازه‌گیری شده است.

چنین تفسیری را می‌توان در خصوص صفات وزن متاتارسوس راست، وزن متاتارسوس چپ و عدم تقارن وزن متاتارسوس که در فاصله تقریباً نزدیک به یکدیگر قرار دارند نیز ارائه کرد. با برازش مدل شماره (۱) که در آن فقط اثرات افزایشی در نظر گرفته شده بود، فقط QTL مؤثر بر صفت عدم تقارن وزن متاتارسوس شناسایی شد. این می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که QTL شناسایی شده تنها دارای اثرات افزایشی بر صفت موردنظر می‌باشد. منظور از اثرات افزایشی، تفاوت دو ژنوتیپ هموزایگوت (QQ و qq) در تأثیرگذاری بر فنوتیپ موردنظر است.

جدول ۲- آمار توصیفی صفات مورد بررسی در این پژوهش.

Table 2- Summary statistics for the Japanese quail F2 birds data.

ضریب تغییرات Coefficient of variation	انحراف معیار Standard Deviation	حداکثر Maximum	حداقل Minimum	میانگین Mean	تعداد Number	صفت Trait
0.19	0.05	0.61	0.13	0.29	403	وزن متاتارسوس راست (گرم) Right metatarsus weight (gr)
0.16	0.05	0.50	0.19	0.29	401	وزن متاتارسوس چپ (گرم) Left metatarsus weight (gr)
22.37	0.04	0.19	-0.34	0	401	عدم تقارن وزن متاتارسوس (گرم) Metatarsus weight asymmetry (gr)
0.04	1.34	39.21	25.13	31.39	403	طول متاتارسوس راست (میلی متر) Right metatarsus length (mm)
0.10	2.97	34.00	3.42	30.91	402	طول متاتارسوس چپ (میلی متر) Left metatarsus length (mm)
5.75	2.77	4.95	-۲۷/۳۱	-0.48	402	عدم تقارن طول متاتارسوس (میلی متر) Metatarsus length asymmetry (mm)
0.08	0.19	3.06	1.64	2.48	403	قطر متاتارسوس راست (میلی متر) Right metatarsus diameter (mm)
0.08	0.19	2.94	1.52	2.47	403	قطر متاتارسوس چپ (میلی متر) Left metatarsus diameter (mm)
18.71	0.13	0.71	-۰/۵۳	-0.01	403	عدم تقارن قطر متاتارسوس (میلی متر) Metatarsus diameter asymmetry (mm)
52.03	11.89	84.44	-۸۲/۹۳	-0.23	401	عدم تقارن نسبی وزن (گرم) Weight relative asymmetry (gr)
7.05	15.67	17.87	-۱۵۹/۱۳	-2.22	402	عدم تقارن نسبی طول (میلی متر) Length relative asymmetry (mm)
19.67	5.19	28.69	-۲۰/۱۱	-0.26	403	عدم تقارن نسبی قطر (میلی متر) Diameter relative asymmetry (mm)

دو صفت یادشده، سهم واریانس غلبه QTL موردنظر در واریانس فنوتیپی کل بیشتر از واریانس افزایشی بود.

برازش مدل شماره (۲) که اثرات افزایشی و غلبه به صورت توأم در آن گنجانده شده بود، QTL مؤثر بر صفات قطر متاتارسوس راست و قطر متاتارسوس چپ را شناسایی کرد که در هر

جدول ۳- موقعیت و مشخصات جایگاه‌های شناسایی شده در مطالعه حاضر.

Table 3- Position and properties of QTL detected in the present study.

ایمپرینتینگ Imprinting	درصد واریانس QTL QTL variance %		نزدیک‌تر بن نشانگر Adjacent marker	شاخص LOD LOD score	آماره B _F F statistic	موقعیت (سانتی‌مور گان) ^A Position (cM)	صفت Trait
	غلبه Dominance	افزایشی Additive					
--	4.92	2.19	GUJ0048	5.569	4.4 ^{**}	59	قطر متاتارسوس راست Right metatarsus diameter
--	4.56	0.39	GUJ0048	5.256	4.14 ^{**}	70	قطر متاتارسوس چپ Left metatarsus diameter
3.82	0.37	0.94	GUJ0098	5.859	2.3 [*]	184	وزن متاتارسوس راست Right metatarsus weight
3.81	2.20	0.88	GUJ0098	6.491	2.04 [*]	164	وزن متاتارسوس چپ Left metatarsus weight
--	--	1.77	GUJ0098	1.943	4.53 [*]	156	عدم تقارن وزن متاتارسوس Metatarsus weight asymmetry
5.29	3.50	3.86	GUJ0056	7.813	2.47 ^{**}	134	عدم تقارن طول متاتارسوس Metatarsus length asymmetry

^A موقعیت جایگاه‌های شناسایی شده بر اساس فاصله از نشانگر اول (GUJ0055) بیان شده است.

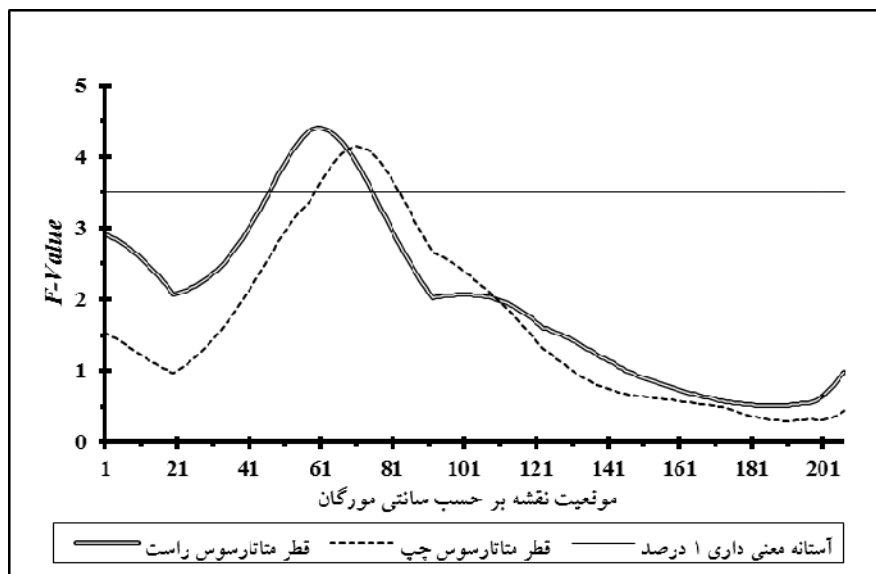
^B : * = P < 0.05 و ** = P < 0.01

^A Position of detected QTL are based on their distance to the first marker (GUJ0055) on the chromosome.

^B * = P < 0.05, ** = P < 0.01

نشان‌دهنده مشارکت اثرات افزایشی، غلبه و ایمپرینتینگ در شناسایی QTL موردنظر می‌باشد که در این بین، واریانس ناشی از وارد کردن اثرات ایمپرینتینگ به مدل، اختلاف قابل توجهی با واریانس‌های ناشی از اثرات افزایشی و غلبه دارد. موقعیت نسبی جایگاه‌های شناسایی شده در شکل‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ آمده است.

انحراف میانگین ژنوتیپ‌های هتروزایگوت (qQ و Qq) از میانگین دو هموزایگوت (QQ و qq) اثر غلبه را برآورد می‌کند. حاصل برازش مدل شماره (۳)، شناسایی QTL دارای اثرات ایمپرینتینگ پدری مرتبط با صفات وزن متاتارسوس راست، وزن متاتارسوس چپ و عدم تقارن طول استخوان متاتارسوس بود. این



شکل ۲- موقعیت جایگاه‌های شناسایی شده مربوط به صفات قطر متاتارسوس چپ و قطر متاتارسوس راست.

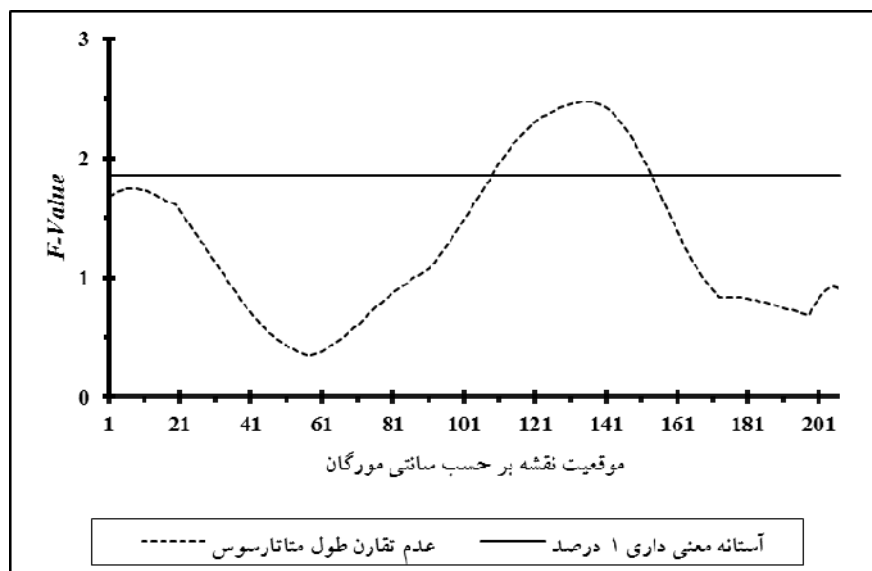
Figure 2- Positions of detected QTL correspond to left and right metatarsus diameter.

جنین جوجه در مرحله لایه زایی و نورولا هستند (Yost, 1995).

بنابراین، می‌توان گفت عدم تقارن در صفات دوطرفه (صفات متقارن الطرفین) می‌تواند نشان‌دهنده استرس‌های درونی (ژنتیکی) و بیرونی (محیطی) باشد. در مطالعات انجام شده در بسیاری از گونه‌های جانداران نشان داده شده است که عدم تقارن در صفات دوطرفه می‌تواند به‌عنوان یک ابزار برای مطالعه تکامل، زیست‌شناسی محافظتی^۱ و اصلاح دام به کار رود (Jones, 1987; Moller *et al.*, 1995; Palmer, 1996; Palmer and Strobeck, 1986; Parsons, 1990; Van Valen, 1962).

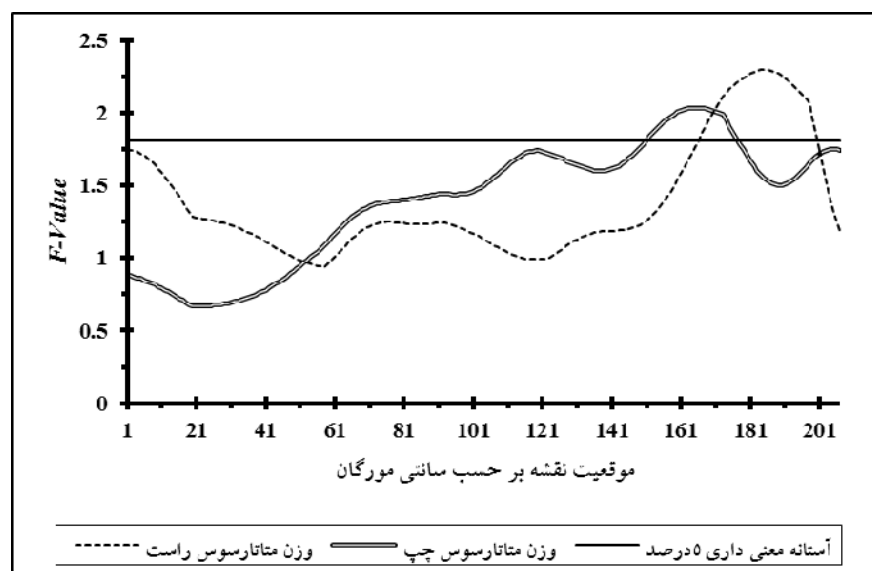
از آنجاکه اثرات ایمپریتینگ از اختلاف دو ژنوتیپ هتروزیگوت (Qq و qq) ناشی می‌شود، شناسایی و برآورد این اثرات تنها در طرح‌های نقشه یابی F2 امکان‌پذیر است. زیرا در طرح F2 (مانند پژوهش حاضر)، امکان ایجاد تلاقی‌های متقابل در جمعیت والدین و تفرق جایگاه‌هایی با اثرات ایمپریتینگ وجود دارد. ایمپریتینگ فرآیندی است که در آن، بیان یک ژن وابسته به جنسیت والدینی است که ژن موردنظر از آن‌ها به ارث رسیده است. در بلدرچین ژاپنی، در یک پژوهش، QTL دارای اثرات ایمپریتینگ برای صفات مرتبط با وزن‌های هیچ تا چهار هفتگی و میانگین افزایش وزن روزانه شناسایی شد (Jabbari *et al.*, 2014). مشخص شده است که عوامل ژنتیکی، مسئول عدم تقارن در اندام‌های

¹ Conservative Biology



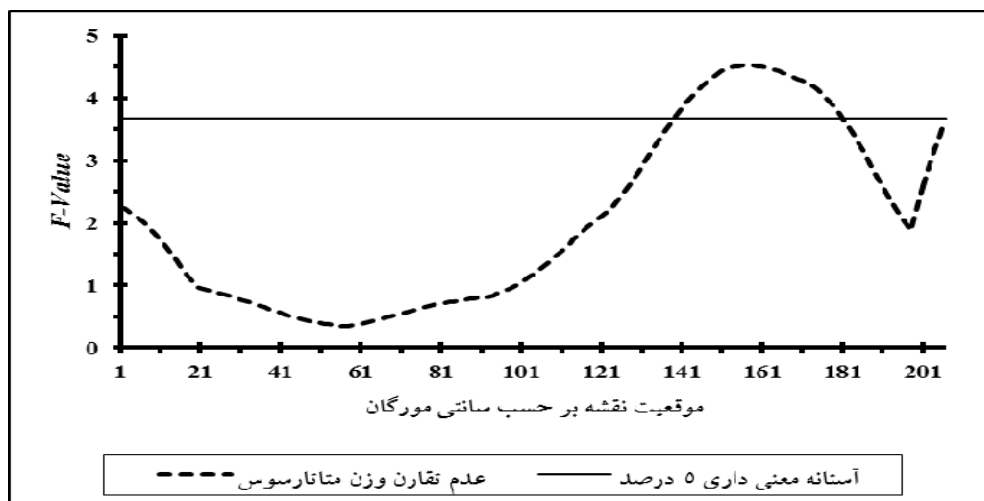
شکل ۳- موقعیت جایگاه‌های شناسایی شده مربوط به صفت عدم تقارن طول متاتارسوس.

Figure 3- Position of detected QTL correspond to metatarsus length asymmetry.



شکل ۴- موقعیت جایگاه‌های شناسایی شده مربوط به صفات وزن متاتارسوس راست و وزن متاتارسوس چپ.

Figure 4- Positions of detected QTL correspond to left and right metatarsus weight.



شکل ۵- موقعیت جایگاه‌های شناسایی شده مربوط به صفت عدم تقارن وزن متاتارسوس.

Figure 5- Position of detected QTL correspond to metatarsus weight asymmetry.

نتیجه گیری

به دلیل وجود ارتباط بین خصوصیات عدم تقارن و ناپایداری تکاملی که می‌تواند بر شایستگی زیستی حیوان تأثیرگذار باشد، بررسی دقیق‌تر این جایگاه‌ها و شناسایی سایر جایگاه‌های احتمالی مؤثر بر این صفات می‌تواند برای تعیین معیارهای مناسب برای انتخاب در طیور مفید باشد. همچنین، بررسی جایگاه‌های مؤثر بر خصوصیات مرتبط با تنش در این پرنده و مقایسه این جایگاه‌ها با جایگاه‌های شناسایی شده در مطالعه حاضر می‌تواند تایید کننده تأثیر تنش بر عدم تقارن در این پرنده باشد.

عوامل استرس‌زای محیطی در طیور در چندین پژوهش مورد بررسی قرار گرفته است (Freeman, 1985; Siegel, 1995; Zulkifli and Siegel, 1995). در مقایسه، اطلاعات اندکی درباره عوامل استرس‌زای ژنتیکی مانند جهش‌های عمده، انتخاب، هم‌خونی و عدم تعادل کروموزومی وجود دارد. علاوه بر این، از آنجاکه تاکنون جایگاه‌های ژنی مؤثر بر عدم تقارن اسکلتی در طیور مورد بررسی و شناسایی قرار نگرفته است، امکان مقایسه این کار با سایر پژوهش‌ها از نظر موقعیت صفات شناسایی شده و همچنین اثرات این جایگاه‌ها، وجود ندارد.

منابع

- Campo JL, Gil MG, Da vila SG, Munoz I (2006). Genetic and phenotypic correlation between fluctuating asymmetry and two measurements of fear and stress in chickens. *Applied Animal Behavior Science* 102: 53–64.
- Clarke GM (1995). Relationships between developmental stability and fitness: Application for conservation biology. *Conservation Biology* 9: 18–24.

- Clarke GM, Brand GW, Whitten MJ (1986). Fluctuating asymmetry: a technique for measuring developmental stress caused by inbreeding. *Australian Journal of Biological Sciences* 39: 145–154.
- Esmailzadeh AK, Baghizadeh A, Ahmadizadeh M (2012). Genetic mapping of quantitative trait loci affecting body weight on chromosome 1 in a commercial strain of Japanese quail. *Animal Production Science* 52: 64-68.
- Freeman BM (1985). Stress and the domestic fowl: Physiological fact or fantasy? *World's Poultry Science Journal* 41: 45–50.
- Han YC, Teng CZ, Hu ZL, Song YC (2008). An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 29(6): 1355-8.
- Iranpur M V, Esmailzadeh K A (2011). Rapid extraction of high quality DNA from whole blood stored at 4°C for long period. Available at <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Rapid-Extraction-of-High-Quality-DNA-from-Whole-Blood-Stored-at-4-C-for-Long-Period-4175.html>.
- Jabbari Ori R, Esmailzadeh 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.
- Jones JS (1987). An asymmetrical view of fitness. *Nature* 325: 298–299.
- Kayang BB, Inoue-Murayama M, Hoshi T, Matsuo K, Takahashi H, Minezawa M, Mizutani M, Ito S (2002). Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl. *Genetics Selection Evolution* 34: 233-253.
- Kayang BB, Vignal A, Inoue-Murayama M, Miwa M, Monvoisin JL, Ito S, Minvielle F (2004). A first generation microsatellite linkage map of the Japanese quail. *Animal Genetic* 35:195-200.
- Leary RF, Allendorf FW (1989). Fluctuating asymmetry as an indicator of stress. Implications for conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 4: 214–217.
- 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.
- Mohammadabadi MR, Nikbakhti M, Mirzaee HR, Shandi A, Saghi DA, Romanov MN, Moiseyeva IG (2010). Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian journal of genetics* 46: 505-509.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011). Application of microsatellite markers for a study of Kermani sheep genome. *Iranian journal of Animal Science* 42(4): 337-344 (In Persian).
- Moller AP, Sanotra GS, Veslergaard KS (1995). Developmental Stability in Relation to Population Density and Breed of Chickens *Gallus gallus*. *Poultry Science* 74:1761-1771.
- Moller AP (1997). Developmental stability and fitness: a review. *The American Naturalist* 149: 916–932.
- Moller AP (1999). Developmental stability is related to fitness. *The American Naturalist* 153:556–560.
- Moradian H, Esmailzadeh AK, Sohrabi SS, Nasirifar E, Askari N, Mohammadabadi MR, Baghizadeh A (2014). Genetic analysis of an F2 intercross between two strains of Japanese quail provided evidence for quantitative trait loci affecting carcass composition and internal organs. *Molecular Biology Reports* 41: 4455-4462
- Nääs IA, Sonoda LT, Romanini CEB, Morello GM, Neves HAF, Baracho MS, Souza SRLS, Menezes AG, Mollo NM, Moura DJ, Almeida PI (2008). Morphological Asymmetry and Broiler Welfare. *Brazilian Journal of Poultry Science* 10(4): 209-213.
- Palmer AR (1996). Waltzing with asymmetry. *Bioscience* 46: 518–532.

- Palmer AR (1994). Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: Markow, T.A. (Ed.), *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands, pp. 335–364.
- Palmer AR, Strobeck C (1986). Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 391–421.
- Palmer AR, Strobeck C (1992). Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zool. Fennica* 191: 57–72.
- Parsons PA (1990). Fluctuating asymmetry. An epigenetic measure of stress. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 65: 131–145.
- Parsons PA (1992). Fluctuating asymmetry. A biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity* 68: 361–364.
- Polak M, Trivers R (1994). The science of symmetry in biology. *Trends in Ecology & Evolution* 9: 122–124.
- Siegel HS (1995). Stress, strains and resistance. *British Poultry Science* 36:3–22.
- Sohrabi SS, Esmailzadeh 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: 1012–1018.
- Swaddle JP, Witter MS, Cuthill IC (1994). The analysis of fluctuating asymmetry. *Animal Behavior* 48: 986–989.
- Tu Y, Siegel PB (2015). Asymmetries in Chickens from Lines Selected and Relaxed for High or Low Antibody Titers to Sheep Red Blood Cells. *Asian Australian Journal of Animal Science* 28(3): 323–327.
- Tuytens FAM (2003). Measures of developmental instability as integrated, a posteriori indicators of farm animal welfare: a review. *Animal Welfare* 12: 535–540.
- Van Valen L (1962). A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16:125–142.
- Wakasugi N, Kondo K (1973). Breeding methods for maintenance of mutant genes and establishment of strains in the Japanese quail. *Experimental Animals* 22(Suppl.): 151–159.
- Wilson WO, Abbott UK, Abplanalp H (1961). Evaluation of Coturnix (Japanese quail) as pilot animal for poultry. *Poultry Science* 40: 651–7.
- Yang A, Dunnington EA, Siegel PB (1997). Developmental Stability in Stocks of White Leghorn Chickens. *Poultry Science* 76: 1632–1636.
- Yost HJ (1995). Vertebrate left-right development. *Cell* 82: 689–692.
- Zulkifli I, Siegel PB (1995). Is there a positive side to stress? *World's Poultry Science Journal* 51: 63–76.

Mapping quantitative trait loci affecting skeletal asymmetry in Japanese quail (*Coturnix japonica*)

Sohrabi S.S.^{1*}, Esmailizadeh A.K.², Mohammadabadi M.R.³, Moradian H.⁴, Nasirifar E.⁵,
Khodabakhshzadeh R.⁶

¹Ph.D student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran and the member of Young Researchers Society, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

²Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

³Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Phone

⁴Ph.D student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

⁵Ph.D student, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

⁶MSc graduate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Asymmetry is an indicator of genetic and environmental stressors in organisms and plays an important role in developmental instability. It is suggested that symmetrical individuals do generally have faster growth, higher fecundity, and better survival. To identify Quantitative trait loci affecting some asymmetric traits in Japanese quail, a three-generation resource population was developed by using two distinct Japanese quail strains, wild and white. Eight pairs of white (S) and wild (W) birds were crossed reciprocally and 34 F1 birds were produced. The F1 birds were intercrossed to generate 422 F2 offspring. All of the animals from three generations (453 birds) were genotyped for eight microsatellite markers on chromosome 1. Bone length measured by a digital caliper and bone weighed with an accuracy of 0.1 g. QTL analysis was conducted applying the line-cross model and the least-squares interval mapping approach. Among 12 examined traits, 6 QTL were identified in 59, 70, 134, 156, 164, and 184 cM on chromosome 1. Variance of detected QTL was ranged from 0.37 to 5.29%.

Key words: *Asymmetry, Japanese quail, Quantitative Trait Loci.*

* Corresponding Author: Sohrabi S.

Tel: 989132402164

Email: saeedsohrabi@agr.uk.ac.ir