



مکان یابی جایگاه‌های کنترل کننده صفات ایمنی با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای بر روی کروموزوم 5 در بلدرچین ژاپنی

راحله خانه گیر¹، محمد رکوعی²، هادی فرجی آروق³، علی مقصودی⁴ و غلامرضا داشاب⁵

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشگاه زابل

2- دانشیار اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی و بیوانفورماتیک، دانشگاه زابل، (نویسنده مسؤول: Rokouei@uoz.ac.ir)

3- استادیار ژنتیک و اصلاح دام، پژوهشکده دام های خاص، دانشگاه زابل

4- استادیار اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی و بیوانفورماتیک، دانشگاه زابل

5- دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشگاه زابل

تاریخ دریافت: 1398/8/20 تاریخ پذیرش: 1398/11/19

صفحه: 116 تا 125

چکیده

صفات ایمنی به دلیل ارتباط مستقیمی که با صفات رشد و ارزش اقتصادی پرورش بلدرچین دارند از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند، هدف از این تحقیق، پوشش کروموزوم 5 بلدرچین ژاپنی به منظور تشخیص QTL مؤثر بر صفات ایمنی، با استفاده از یک طرح تلاقی چهار نسلی بود. بدین منظور چهار سویه Tuxedo و Italian Speckled، Wild، A and M Texas بلدرچین ژاپنی دو به دو و رفت و برگشتی تلاقی داده شدند و نسل اول ایجاد گردید. سپس از تلاقی پرندگان هیبرید نسل اول، نسل‌های بعدی شامل دوم، سوم و چهارم ایجاد شدند. داده‌های فنوتیپی شامل صفات مرتبط با ایمنی اکسایبی پرندگان در چالش با SRBC 5 درصد از جمله مقدار ایمونوگلوبولین‌های Y و M، اندازه‌گیری شدند. والدین نسل سوم و چهارم و کل پرندگان حاصل از والدین انتخابی نسل چهارم برای سه نشانگرهای ریزماهورهای واقع بر روی کروموزوم 5 تعیین ژنوتیپ شدند. تجزیه و تحلیل QTL به روش مکان‌یابی درون فاصله‌ای مبتنی بر رگرسیون و با مدل ژنتیکی افزایشی نرم‌افزار GridQTL انجام شد. سه QTL مجاور هم در میانه کروموزوم 5 برای سه ویژگی IgY و IgM، IgT به ترتیب در موقعیت‌های 13/5، 8/9 و 14/7 سانتی‌مورگان در نزدیکی نشانگر GUJ0049 شناسایی گردید. بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که در مجاورت نشانگر GUJ0049 حداقل یک جایگاه ژنی با اثر عمده بر صفات ایمنی وجود دارد و اضافه کردن اطلاعات ژنوتیپ‌های نشانگر مذکور در مدل‌های آماری می‌تواند موجب بهبود صحت پیش‌بینی ارزش‌های اصلاحی صفات ایمنی در بلدرچین گردد.

واژه‌های کلیدی: بلدرچین ژاپنی، صفات ایمنی، بوت استرایپینگ، ایمونوگلوبولین‌ها

مقدمه

رشد و توسعه‌ی روز افزون پرورش طیور به شیوه‌ی متراکم سبب افزایش مصرف مواد افزودنی شیمیایی در جیره‌ی طیور شده است. شروع استفاده از افزودنی‌ها در خوراک طیور به استفاده از آنتی‌بیوتیک در اواخر دهه‌ی 1940 برمی‌گردد (11). با توجه به افزایش مصرف انواع مواد افزودنی در خوراک و افزایش تولیدات فرآورده‌های طیور به راحتی می‌توان حجم و میزان مصرف آنتی‌بیوتیک که تهدید کننده‌ی محیط زیست و سلامت انسان هستند را پیش‌بینی کرد. بر اساس گزارش‌های موجود، افزایش روزافزون ناهنجاری‌های مادرزادی، وقوع بیماری‌های مزمن و افزایش مقاومت میکروبی به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها است. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره‌ی طیور در اتحادیه اروپا از سال 2006 ممنوع شده است (12). گرایش به مصرف غذاهای عاری از مواد شیمیایی یک واقعیت جهانی است و امروزه محصولات ارگانیک جایگاه ویژه‌ای را در سبد غذایی خانوارها به خصوص در کشورهای غربی پیدا کرده است (31). مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دو هفته آخر پرورش جوجه گوشتی در کشورهای مختلف از جمله اروپا ممنوع بوده و سایر کشورها هم مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را محدود کرده‌اند (28). لذا یکی از جنبه‌های پایدار تولید محصولات دامی از جمله طیور گوشتی عاری از باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها، افزایش مقاومت پرندگان در مقابل عوامل عفونی و پاتوژن‌ها می‌باشد، تا نیاز به مصرف آنتی‌بیوتیک کاهش یابد.

اعضاء، سلول‌ها و مولکول‌های عهده‌دار ایمنی را سیستم ایمنی¹ می‌گویند. پاسخ جمعی هماهنگ شده این اجزا را به هنگام مواجهه با مواد بیگانه پاسخ ایمنی² می‌نامند. سیستم ایمنی ذاتی یک استراتژی دفاعی تکاملی قدیمی است که سیستم ایمنی غالب موجود در گیاهان، قارچ‌ها، حشرات و ارگانیزم‌هاست (17). ایمنی ذاتی، نخستین سد دفاعی بدن در برابر هجوم میکروب‌هاست (8). در صورتی که عوامل بیماری‌زا از سد دفاع غیراختصاصی (ایمنی ذاتی) عبور کنند، با دفاع اختصاصی روبه‌رو خواهند شد. در این مکانیسم، علاوه بر ماکروفاژها نوعی از گلبول‌های سفید به نام لنفوسیت‌ها نقش دارند که از سلول‌های بنیادین مغز استخوان (مغز قرمز استخوان) تولید می‌شوند. لنفوسیت‌ها به طور اختصاصی عمل می‌کنند، یعنی یک نوع خاصی از عوامل بیگانه را شناسایی و از بین می‌برند. لنفوسیت‌ها پس از به وجود آمدن نابالغ هستند و برای کسب ویژگی‌های لازم برای شناسایی و مبارزه با میکروب‌ها، باید تکامل یابند. بر اساس محل کسب تکامل، لنفوسیت‌ها را به دو دسته لنفوسیت‌های B و لنفوسیت‌های T تقسیم می‌کنند. لنفوسیت‌های B در مغز استخوان و لنفوسیت‌های T در تیموس تخصص یافته‌اند (1). هر لنفوسیت، با داشتن نوع خاصی گیرنده، آنتی‌ژن خاصی را شناسایی کرده و از بین می‌برد. برخی از لنفوسیت‌ها بین لنف و خون در گردش هستند و برخی دیگر در گره‌های لنفی، طحال، لوزه‌ها و آپاندیس جمع می‌شوند (1).

بر روی سیستم ایمنی پرندگان انجام گرفته است وراثتپذیری ایمنی همورال در دامنه‌ای از 0/08-0/66 گزارش شده است (21,20,4,33,34,37). Martin و همکاران (22) وراثتپذیری عیار آنتی‌بادی بر علیه SRBC را در لاین انتخابی برای کاهش عیار آنتی‌بادی، 0/23 و در لاین انتخابی برای افزایش عیار آنتی‌بادی بر علیه SRBC، وراثتپذیری را 0/25 گزارش کردند. Pinard و همکاران (30) بر مبنای اطلاعات 9 نسل، وراثتپذیری عیار آنتی‌بادی را 0/31 گزارش کردند.

استفاده از روش‌های مبتنی بر تئوری ژنتیک کمی به عنوان روشی رایج برای اصلاح نژاد دام در دهه‌های اخیر، سهم زیادی در بهبود عملکرد بسیاری از صفات مهم اقتصادی، نظیر صفات رشد داشته است، ولی برخی از صفات نظیر صفات ایمنی اندازه‌گیری آنها مشکل و پرهزینه است که این عاملی محدودکننده در بهبود ژنتیکی این صفات با روش‌های رایج محسوب می‌شود (36). ظهور فناوری نشانگرهای مولکولی و پیشرفت آن در سال‌های اخیر ابزار قدرتمندی را برای متخصصان اصلاح نژاد به وجود آورده است. با استفاده از این نشانگرها می‌توان صفات پلی ژنی را که آنالیز آنها با روش‌های کلاسیک اصلاح دام مشکل است، به صورت مستقیم بررسی و ژن‌های این صفات را مکان‌یابی کرد (2). مکان‌یابی جایگاه صفات کمی روشی برای انتخاب ژن‌های مطلوب به دلیل ارتباط آن‌ها با نشانگرهای مولکولی است. تشخیص و تعیین ژن‌های کنترل‌کننده این صفات هم سبب افزایش اطلاعات علمی در زمینه ژن‌ها می‌شود، همچنین، برنامه‌های اصلاح نژادی را از طریق انتخاب بر پایه نشانگرها کارآمدتر می‌کند (40).

در بین پرندگان مورد مطالعه، بیشترین تحقیقات در زمینه نقشه‌یابی QTL برای صفات اقتصادی روی مرغ انجام گرفته و تاکنون تحقیقات اندکی به منظور تعیین QTL‌های بلدرچین انجام شده است. اخیراً نقشه ژنتیکی بلدرچین با ریزماهواره و AFLP راهی را برای مطالعه مقایسه‌ای و کشف QTL برای صفات مختلف فراهم آورده است (18). Kayang و همکاران (18) اولین نسل از نقشه‌های پیوستگی ریزماهواره را در یک جمعیت F2 بلدرچین‌های ژاپنی معرفی کردند که آغاز یک پیشرفت برای دستیابی به نقشه‌های ژنتیکی بیشتر و شناسایی جایگاه‌های صفات کمی در بلدرچین ژاپنی می‌باشد. علی‌رغم تلاش‌های صورت گرفته برای ایجاد نقشه پیوستگی و شناسایی QTL در ژنوم بلدرچین در مقایسه با مرغ، اطلاعات اندکی در خصوص نقشه‌یابی نواحی ژنومی مرتبط با صفات ایمنی در بلدرچین ژاپنی وجود دارد. شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر برخی از صفات بلدرچین ژاپنی از جمله صفات مربوط به رشد هتروفیل هیچ QTL معنی‌داری شناسایی نشد، اما اثر متقابل جنس و اثر افزایشی QTL برای صفات درصد لنفوسیت در موقعیت 38 سانتی‌مورگان، درصد ائوزینوفیل در موقعیت 7 سانتی‌مورگانی و درصد مونوسیت در موقعیت 34 سانتی‌مورگان معنی‌دار گزارش شد (6).

لذا با توجه به حساسیت پرندگان به عوامل میکروبی و افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها که مخاطرات جدی برای سلامت پرنده و انسان محسوب می‌شود و یکی از پایدارترین

مفهوم ایمنی همورال بر اساس تجزیه و تحلیل فعالیت ضد باکتریایی اجزای سرم ساخته شده است که توسط هانس بوخنر (1890) مورد استفاده قرار گرفت و توسعه یافت (23). او معتقد بود که آلسین‌ها یا "مواد محافظتی" که در سرم خون و سایر مایعات بدن وجود دارند قادر به کشتن میکروارگانیسم‌ها هستند.

آنتی‌بادی‌ها به رده‌ای از پروتئین‌های کروی (گلوبولین) به نام گاماگلوبولین یا ایمونوگلوبولین تعلق دارند. آنتی‌بادی، آنتی‌کور، ایمونوگلوبولین و پادتن همگی داری یک مفهوم می‌باشند و شامل مولکول‌های پروتئینی هستند که قادرند به طور اختصاصی به آنتی‌ژن متصل شوند. مهمترین عملکردهای زیستی آنتی‌بادی‌ها شامل خنثی کردن سموم، بی‌حرکت کردن و آگلوتیناسیون میکروارگانیسم‌ها و ذرات آنتی‌ژنی، خنثی‌سازی برخی فعالیت‌های ویروسی، فعال‌سازی کمپلمان سرمی جهت تسهیل انهدام میکروارگانیسم‌ها، از بین بردن برخی عوامل بیگانه و سلول‌های توموری و تسهیل عمل بیگانه‌خواری فاگوسیت‌ها می‌باشند (16). ایمونوگلوبولین‌ها بسته به نوع ساختمان بخش ثابت زنجیره سنگین پنج رده یا پنج ایزوتوپ مختلف را شامل می‌شوند که خواص بیولوژیکی هر گروه، نیمه عمر و توانایی اتصال به آنتی‌ژن در آنها متفاوت است. این پنج رده عبارت است از ایمونوگلوبولین‌های IgD, IgA, IgM, IgG, IgE (1). ایمونوگلوبولین G در پرندگان به دلیل شکل آن به عنوان ایمونوگلوبولین Y (IgY) شناخته می‌شود. طیور بعد از قرار گرفتن در برابر عوامل بیماری‌زا سه دسته آنتی‌بادی تولید خواهند کرد که شامل IgG, IgA و IgE هستند.

ایمونوگلوبولین G، یک آنتی‌بادی حفاظت‌کننده مهم در طیور بوده و توسط اکثر تست‌های سرولوژیک اندازه‌گیری می‌شود و 5 روز بعد از مواجه شدن با عامل بیماری‌زا قابل ردیابی بوده و طی 3 تا 5 هفته به اوج رسیده و متعاقباً به تدریج کاهش می‌یابد.

در آینده بهبود وضعیت ژنتیکی سیستم ایمنی پرندگان با پتانسیل تولید بالا هدف برنامه‌های اصلاحی طیور خواهد بود و آگاهی از پارامترهای ژنتیکی و فتوتیپی صفات سیستم ایمنی پیش‌نیاز برای چنین برنامه‌هایی است (34). در مطالعات به عمل آمده روی سیستم ایمنی مشخص شده که پاسخ‌های سیستم ایمنی طیور و مقاومت در برابر بیماری‌ها، تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی متعددی می‌باشد (13). واریانس ژنتیکی غیرافزایشی و تغییرات محیطی می‌تواند ارزش‌های فتوتیپی مربوط به سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار دهند (4). در مطالعات مختلف که (15,10)، برخی صفات رفتاری و تولید تخم (25) و همچنین خصوصیات مرتبط با لاشه در چندین مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است (26,35)، اما مطالعه‌ای در ارتباط با مکان‌یابی جایگاه‌های ژنی صفات ایمنی در بلدرچین گزارشات اندکی وجود دارد.

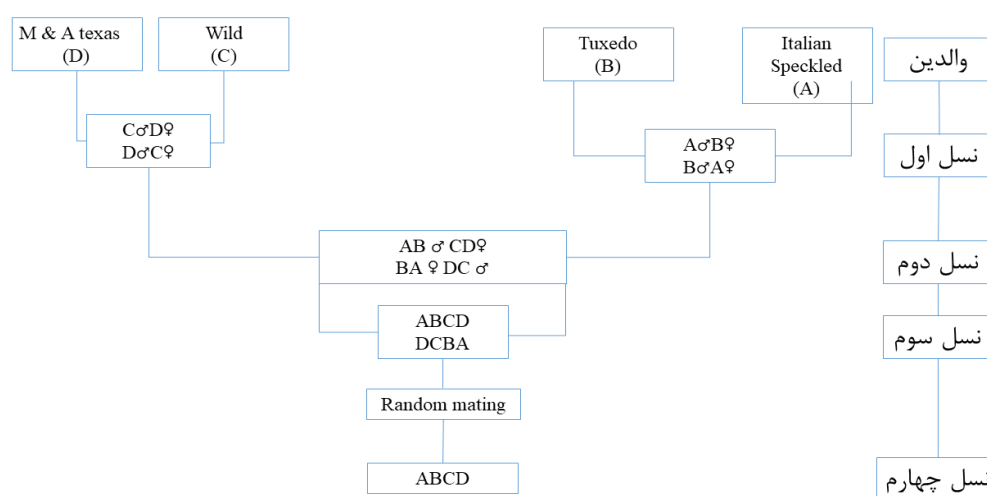
در مطالعه پویس ژنومی کروموزوم شماره 3 بلدرچین ژاپنی با نشانگرهای ریزماهواره‌ای و روش تجزیه نقشه‌یابی درون فاصله‌ای برای صفات درصد هتروفیل، لنفوسیت و نسبت

شد و جهت ایجاد نسل سوم تعداد 10 جفت از آمیخته‌های چهار سویه‌ای به صورت رفت و برگشت $ABCD\sigma \times DCBA\sigma$ و $ABCD\sigma \times DCBA\sigma$ تلاقی داده شده و در نهایت از آمیزش تصادفی تعداد 20 جفت نر و ماده حاصل از نسل سوم برای تولید نسل چهارم استفاده شد و تمام تخم‌های حاصل در طی یک دوره 3 ماهه هچ شدند. بنابراین، جمعیت نقشه‌یابی شامل پرندگان والدین نسل اول (5 جفت)، دوم (10 جفت) و سوم (20 جفت) و تمام نتاج تولید شده نسل چهارم (200 پرنده) بودند. نمونه خون مربوط به تمام این پرندگان جهت استخراج DNA جمع‌آوری از ورید بال در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA یک درصد جمع‌آوری شدند (شکل 1).

راه‌های افزایش مقاومت پرنده از طریق انتخاب ژنتیکی و شناسایی ژن‌های دخیل در ایمنی می‌باشد، هدف از تحقیق حاضر مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با ایمنی اکتسابی در بلدرچین ژاپنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در اجرای پژوهش حاضر از یک جمعیت بلدرچین حاصل از یک طرح چهار نسلی استفاده شد. تعداد پنج جفت پرنده از هر سویه شامل: (A) Italian Speckled، (B) Tuxedo، (C) Wild و (D) M & A texas به صورت جفتی و رفت و برگشتی ($D\sigma \times C\sigma$ ، $C\sigma \times D\sigma$ ، $B\sigma \times A\sigma$ ، $A\sigma \times B\sigma$) با هم تلاقی داده شدند. آمیخته‌های حاصل از تلاقی دو سویه $DC\sigma \times BA\sigma$ و $AB\sigma \times CD\sigma$



شکل 1- طرح شماتیک الگوی چهار نسلی جهت ایجاد جمعیت مورد استفاده در مکان‌یابی صفات ایمنی در بلدرچین ژاپنی
Figure 1. Schematic design of a four-generation pattern of crossbred population for QTL mapping of immunity traits in Japanese quail

بطوری که رقت پلاسما در هر چاهک دو برابر چاهک قبلی بود و برای هر نمونه 12 سری رقت ایجاد گردید و در پایان به تمامی چاهک‌ها مقدار 25 μL سوسپانسیون 0/5 درصد SRBC اضافه شد بعد از گذشت یک ساعت نگهداری در دمای اتاق وضعیت هم‌گلویتیناسیون نمونه‌ها ثبت شد و برای تعیین مقدار ایمونوگلوبولین‌های Y (IgY) و M (IgM) به طور جداگانه از 2-مرکاپتواتانول استفاده شد. تمام مراحل انجام کار مانند مرحله اول بود، فقط با این تفاوت که به جای مخلوط کردن نمونه‌های پلاسما با بافر فسفات، 25 μL از هر نمونه پلاسما با 25 μL از 2-مرکاپتواتانول 0/01 درصد مخلوط شدند. مشاهدات مربوط به میزان ایمونوگلوبولین‌ها به صورت لگاریتم پایه دو رقت‌ها ثبت شدند. با توجه به این که دوازده رقت برای اندازه‌گیری غلظت ایمونوگلوبولین‌ها در نظر گرفته شد، لذا مشاهدات هر خصوصیت در دامنه بین صفر تا 12 قرار خواهد داشت (22).

با توجه به آخرین نقشه پیوستگی نشانگرهای ریزماهواره

از گلبول قرمز گوسفند در این آزمایش به عنوان آنتی‌ژن تحریک‌کننده سیستم ایمنی همورال استفاده گردید. سوسپانسیون 5 درصد گلبول قرمز گوسفند در بافر سالین به میزان 0/2 میلی لیتر در سن 31 و 38 روزگی به عضله سمت راست سینه بلدرچین‌ها تزریق گردید و در سن 45 روزگی از ورید بال همه پرندگان و والدین آن‌ها با استفاده از سرنگ انسولین آغشته به EDTA خون‌گیری شد به کمک روش هم‌گلویتیناسیون میکروتیتر (29) از پلاسما به دست آمده برای تعیین پاسخ‌های ثانویه سیستم ایمنی همورال علیه SRBC استفاده شد. در این روش برای غیرفعال کردن سیستم کمپلمان، اول نمونه‌های پلاسما به مدت 30 دقیقه در دمای 56°C نگهداری شدند. سپس داخل میکروپلت‌های گودۀ U شکل، ابتدا محلول بافر فسفات به میزان 25 μL ریخته شد. در چاهک اول میزان 25 μL از پلاسما به بافر سالین افزوده شد و بعد از هم‌گن شدن بافر فسفات و نمونه پلاسما، در چاهک‌های بعدی یک سری رقت از پلاسما تهیه شد،

شده مربوط به نشانگرهای ریزماهوره هستند از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید 8 درصد استفاده شد. برای شناسایی جایگاههای ژنی مرتبط با رشد، فایل های فنوتیپی و ژنوتیپی و همچنین فایل نقشه نشانگرها بر روی کروموزوم ها و فواصل بین آنها به وسیله نرم افزار آنالین GridQTL (32) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

بلدرچین (18)، پویش ژنومی در بخش هایی از کروموزوم 5 با استفاده از سه نشانگر ریزماهوره ای انجام شد (جدول 1). استخراج DNA از خون کامل با روش نمکی بهینه یافته با دترجنت استفاده شد (24). سپس با بهینه سازی دمای PCR، واکنش PCR برای نشانگرهای مختلف انجام گرفت و برای تفکیک محصولات PCR، که در واقع قطعات DNA تکثیر

جدول 1- مشخصات آغازگرهای مربوط به نشانگرهای ریزماهوره ای واقع بر روی کروموزوم 5 در بلدرچین ژاپنی
Table 1. Characterization of primers related to microsatellite markers located on chromosome 5 in Japanese quail

منبع	پرایمر برگشت	پرایمر رفت	دمای اتصال (سانتی گراد)	موقعیت	نشانگر
18	5'-CGGTAGCATTTCTGACTCCA -3'	5'-GAAGCAGTGACAGCAGAAATG -3'	60/4	0	GUJ0049
	5'-TAGGTGCGAAAATCTCTGAC -3'	5'-GACAAAGTTACAGCTAGGAG -3'	56/3	12	GUJ0059
	5'-CAGAATATAAAGGTCACAGCC -3'	5'-GCATTTCATCAGTACAACC -3'	58/7	21	GUJ0100

عنوان محتمل ترین مکان QTL در نظر گرفته شد. همچنین، برای برآورد دقت نقشه ی QTL (فاصله ی اطمینان برای موقعیت QTL)، از روش بوت استراپ در ده هزار تکرار استفاده شد.

برای تعیین اندازه و تعداد قطعات حاصل از واکنش پلیمرز از نرم افزار Photocap نسخه 12.4 استفاده گردید. محاسبه ساختارهای ژنتیکی و جمعیتی شامل فراوانی آللی و ژنوتیپی، میزان هتروزیگوسیتی از نرم افزار POPGENE (39)، میزان محتوای اطلاعات چندشکلی با نرم افزار PowerMarker 3.25 (19) و تجزیه و تحلیل QTL با نرم افزار آنالین GridQTL (32) انجام گرفت.

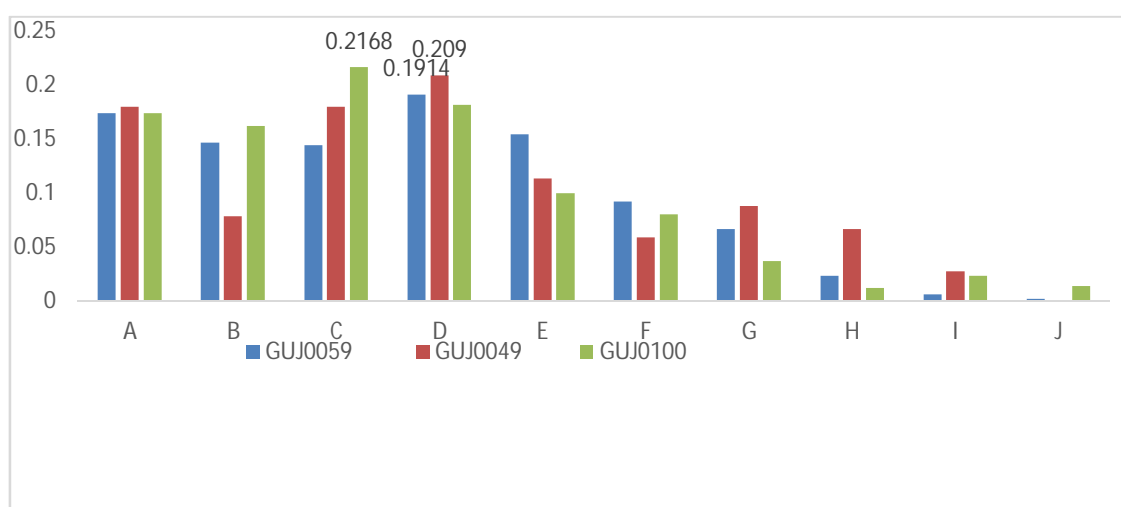
نتایج و بحث

هر سه جایگاه واقع بر روی کروموزوم 5 بلدرچین ژاپنی چندشکل بودند. تعداد آلل های مشاهده شده و فراوانی آنها برای سه جایگاه ریزماهوره ای واقع بر روی کروموزوم 5 در جمعیت آمیخته چهار نسلی حاصل از تلاقی چهار سویه ای بلدرچین ژاپنی در قالب طرح دی آلل جزئی در شکل 2 ارائه شده است.

مدل آماری جهت نقشه یابی ژن ها شامل مدل افزایشی آلل های QTL به شرح ذیل است:

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + S_j + aP_{ak} + e_{ijk}$$

در مدل ها بالا، Y_{ijk} ، مشاهده مربوط به i امین هج، j امین جنسیت و k امین پرند (شامل ایمونوگلوبولین های IgY، IgM و IgT)، μ ، میانگین جمعیت، H_i ، اثر هج (8 سطح)، S_j ، اثر جنس پرند که دارای 2 سطح (نر و ماده) می باشد، a ، اثر افزایشی QTL، P_{ak} ، احتمال شرطی دریافت آلل سویه وحشی توسط پرند k است. روشی که برای آنالیز QTL از آن استفاده شد، روش نقشه یابی درون فاصله ای مبتنی بر رگرسیون است. بر اساس مدل های آماری فوق، یک QTL در فواصل یک سانتی مورگان در طول کروموزوم ها برآزش شد. نقطه ای که دارای حداکثر آماره F باشد، به عنوان محتمل ترین موقعیت QTL در نظر گرفته شد. برای تعیین معنی دار بودن QTL نیاز به تعیین آستانه های معنی دار کروموزومی در سطوح 5 و 1 درصد است که با استفاده از روش تبدیل¹ (7) محاسبه گردید. مقادیر به دست آمده از تجزیه تعداد ده هزار سری داده برای ایجاد یک توزیع تجربی از آماره آزمون تحت فرض صفر مبنی بر عدم وجود QTL، رتبه بندی شدند. نقطه ای که حداکثر آماره F را داشته باشد به



شکل 2- فراوانی آلل‌های مشاهده شده در سه جایگاه ریزماهورهای مورد مطالعه بر روی کروموزوم 5 بلدرچین ژاپنی
Figure 2. Frequency of alleles observed in three microsatellite loci studied on chromosome 5 of Japanese quail

به آلل C بود و آلل‌های A و B فراوانی در دامنه 0/16 تا 0/18 داشتند و سایر آلل‌ها فراوانی کمتری داشتند و آلل‌های G, H, I و J جزء آلل‌های کمیاب هستند. تعداد آلل‌های مشاهده شده و آلل‌های مؤثر در سه جایگاه ریزماهورهای واقع بر روی کروموزوم 5 بلدرچین ژاپنی در جدول 2 ارائه شده است.

بیشترین فراوانی آللی در دو جایگاه GUA0059 و GUA0049 مربوط به آلل D بود، هر چند در جایگاه GUA0059 آلل‌های A, B, C و E فراوانی در دامنه بین 0/14 تا 0/19 داشتند و آلل‌های A و C در جایگاه GUA0049 فراوانی حدود 0/18 داشت، اما سایر آلل‌ها فراوانی کمتری داشتند و آلل‌های با فراوانی کمتر از 5 درصد به عنوان آلل‌های نادر معرفی می‌شوند. در جایگاه GUA0100 بیشترین فراوانی آللی مربوط

جدول 2- تعداد آلل‌های مشاهده شده و مؤثر سه جایگاه ریزماهورهای واقع بر روی کروموزوم 5 در جمعیت آمیخته 4 سویه‌ای بلدرچین ژاپنی
Table 2. Number of observed and effective alleles of the three microsatellite loci located on the chromosome 5 in a crossbred population of four Japanese quail strains

شخص شانون	تعداد آلل مؤثر	تعداد آلل مشاهده شده	اندازه جمعیت	نشانگر
1/99	6/83	10	256	GUA0059
2/05	6/94	9	256	GUA0049
1/99	6/45	10	256	GUA0100
2/01	6/75	9/67	256	میانگین

محتوای اطلاعات چندشکلی سه جایگاه ریزماهورهای واقع بر روی کروموزوم 5 در جمعیت آمیخته بلدرچین ژاپنی در جدول 3 ارائه شده است. محتوای اطلاعات چندشکلی سه نشانگر مورد مطالعه شامل GUA0059، GUA0049 و GUA0100 به ترتیب برابر با 0/835، 0/840 و 0/826 محاسبه شدند که بیانگر تفرق مناسب نشانگرها در جمعیت و مفید بودن در مطالعات پیوستگی ژنتیکی هستند. ابراهیمی و همکاران (9) محتوای اطلاعات چندشکلی واقع بر روی کروموزوم 5 در آمیخته‌های چهار سویه‌ای بلدرچین ژاپنی را برای نشانگرهای GUA0059، GUA0049 و GUA0100 را به ترتیب 0/97، 0/95 و 0/94 گزارش نمودند. ایرانمیش و همکاران (14) محتوای اطلاعات چندشکلی سه نشانگر GUA0059، GUA0049 و GUA0100 را به ترتیب 0/52، 0/62 و 0/24 گزارش نمودند که بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی متعلق به نشانگر GUA0049 بوده که در میانه کروموزوم 5 واقع می‌باشد.

تعداد آلل‌های مشاهده شده در دو جایگاه GUA0059 و GUA0100 برابر با 10 و در جایگاه GUA0049 تعداد آلل برابر با 9 بود. ابراهیمی و همکاران (9) در مطالعه آنالیز پیوستگی آمیخته‌های چهار سویه‌ای بلدرچین ژاپنی برای سه نشانگر GUA0059، GUA0049 و GUA0100 تعداد آلل‌های مشاهده شده را به ترتیب 6، 10 و 8 گزارش نمودند. شاخص شانون تصحیح تعداد آلل‌ها بر اساس اندازه جمعیت می‌باشد که هر چه عدد بزرگ‌تر باشد بیانگر مؤثرتر بودن آن است. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نیز معیار دیگری برای انتخاب بهترین جایگاه در مطالعات پیوستگی ژنتیکی است. PIC بالا نشان‌دهنده چندشکلی بالا و وجود آلل‌های نادر در یک مکان ژنی است که می‌تواند در تمایز مؤثر نمونه‌ها استفاده شود. شاخص PIC نشان دهنده میزان چندشکلی یک آغازگر است که می‌تواند از صفر تا یک متغیر باشد. هر چقدر این عدد بزرگ‌تر باشد، بیانگر وجود تعداد آلل‌های زیاد و فراوانی زیاد چندشکلی برای آن مکان ژنی در جمعیت است (3).

جدول 3- محتوای اطلاعات چندشکلی سه جایگاه ریزماهوره ای واقع بر روی کروموزوم 5 در جمعیت آمیخته 4 سویه‌ای بلدرچین ژاپنی
Table 3. Polymorphism information content of three microsatellite loci located on the chromosome 5 in a crossbred population of four Japanese quail strains

نشانگر	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	محتوای اطلاعات چندشکلی
GUJ0059	0/89	0/85	0/835
GUJ0049	0/92	0/86	0/840
GUJ0100	0/87	0/85	0/826
میانگین	0/89	0/85	0/834

میزان تغییرات در سطح ایمونوگلوبولین‌ها در چالش با SRBC مؤید این مسئله است که حتی اگر انتخاب فنوتیپی در جمعیت انجام گیرد موجب پیشرفت چشمگیر در بهبود ایمنی بلدرچین خواهیم شد. بالا بودن میزان تنوع در خصوصیات ایمنی در مطالعه حاضر به جهت استفاده از تلاقی چهار سویه‌ای بلدرچین ژاپنی می‌باشد که موجب حداکثری میزان تنوع ژنتیکی و متعاقب آن فنوتیپی می‌گردد. میزان ایمونوگلوبولین‌های Y و M نیز به ترتیب در دامنه بین 0-8 و 0-7/5 قرار داشتند که بیانگر دامنه تغییرات وسیع در سطح ایمنی پرندگان در چالش با پاتوژن‌ها هستند.

آمار توصیفی ایمونوگلوبولین‌های سرم خون در آمیخته‌های چهار نسلی بلدرچین ژاپنی در جدول 4 ارائه شده است. اعداد در جدول برای میزان ایمونوگلوبولین‌ها بر مبنای لگاریتم پایه 2 رقت‌ها هستند. میزان ایمونوگلوبولین کل یا T در دامنه بین صفر تا 12 قرار داشت، یعنی از پرندگان بسیار حساس تا پرندگان مقاوم در جمعیت وجود داشتند. میزان تنوع در جمعیت برای ایمونوگلوبولین T برابر با 35/64 محاسبه شد که میزان تنوع نسبتاً بالایی است. البته در مقایسه با میزان تنوع IgY و IgM کمترین بود و بیشترین ضریب تغییرات مربوط به ایمونوگلوبولین M بود که 72/67 بدست آمد. این

جدول 4- خصوصیات توصیفی ایمونوگلوبولین‌های سرم آمیخته‌های 4 سویه‌ای بلدرچین ژاپنی
Table 4. Descriptive Characteristics of immunoglobulins serum of four crossbred Japanese Quail

ایمونوگلوبولین	تعداد نمونه	میانگین (لگاریتم دو رقت‌ها)	حداقل	حداکثر	انحراف معیار	ضریب تغییرات
IgT	200	5/28	0	12	1/88	35/64
IgY	200	3/4	0	8	1/60	47/15
IgM	200	1/89	0	7/5	1/37	72/67

جایگاه‌های کنترل‌کننده صفات ایمنی در جدول 5 ارائه شده است. نتایج تجزیه اثرات افزایشی آلل‌های جایگاه QTL بیانگر سه QTL مرتبط با تنوع در صفات ایمنی شامل IgT، IgY و IgM بودند که در مجاورت هم قرار دارند و ممکن است یک ناحیه ژنی مرتبط با ایمنی در بلدرچین باشد.

اثرات نوبت هج و جنس پرند بر هر سه خصوصیت ایمنی شامل IgT، IgY و IgM معنی‌دار بودند ($P < 0/01$). پرندگان نر سطح ایمنی بالاتر از پرندگان ماده داشتند و جوجه‌های حاصل از هج‌های ابتدایی سطح ایمنی بالاتر نسبت به هج‌های انتهایی نشان دادند. نتایج تجزیه مکان‌یابی

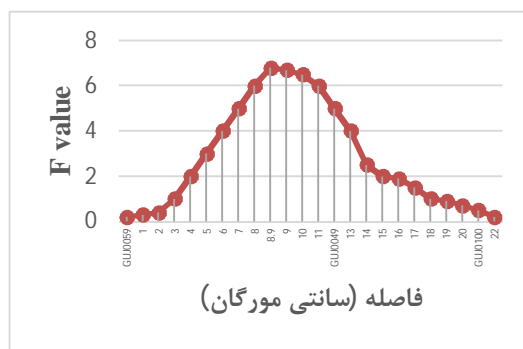
جدول 5- نتایج تجزیه QTL صفات مرتبط با ایمنی اکتسابی در یک طرح سه نسلی حاصل از تلاقی چهار سویه بلدرچین ژاپنی
Table 5. The results of QTL analysis for traits related to acquired immunity in a three-generation design derived from a crossover of four Japanese quail strains

صفت	موقعیت (cM)	F-value chromosome-wide thresholds	Family	اثرات	نزدیک‌ترین نشانگر	95% C.I حدود اعتماد	واریانس (درصد)
IgT	13/5	8/95**	15	3/55	GUJ0059	21-0	8/5
IgY	8/9	6/8**	13	5/32	GUJ0049	21-0	7
IgM	14/7	9/88**	12	4/41	GUJ0100	21-0	12/1

** : Significant at level of 1 % ($P < 0/01$).

بود که مشابه با صفت IgT مثبت بوده و به نظر می‌رسد جایگاه ژنی مهمی بر روی کروموزوم 5 وجود دارد که خصوصیات مرتبط با ایمنی اکتسابی را کنترل می‌نماید.

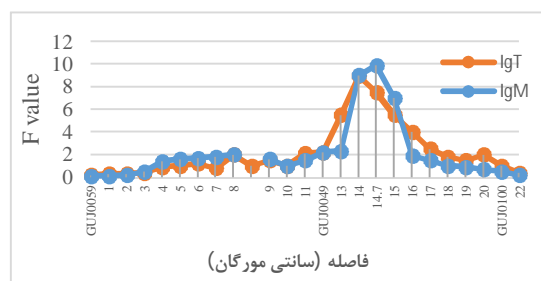
موقعیت مکانی جایگاه QTL مرتبط با صفت IgY در شکل 3 نمایش داده شده است. مکان QTL کنترل‌کننده خصوصیت IgY در موقعیت 8/9 سانتی مورگان واقع بود که قبل از نشانگر GUJ0049 می‌باشد. میزان اثر این جایگاه 5/32 واحد



شکل 3- مکان ژنی (QTL) کنترل‌کننده صفت IgY بر روی کروموزوم 5 بلدرچین ژاپنی
Figure 3. QTL mapping of IgY trait on chromosome 5 of Japanese quail

نمایش داده شده است. QTL شناسایی شده برای صفت مذکور نیز در قسمت میانی کروموزوم 5 و در نزدیکی نشانگر GUJ0049 واقع شده است.

در شکل 4 موقعیت مکانی QTL توصیف‌کننده تنوع در میزان ایمونوگلوبولین IgT نمایش داده شده است که در مجاورت نشانگر GUJ0049 واقع شده است. نتایج تجزیه QTL برای خصوصیت ایمنی IgM در شکل 4



شکل 4- مکان ژنی (QTL) کنترل‌کننده صفت IgM بر روی کروموزوم 5 بلدرچین ژاپنی
Figure 4. QTL mapping of IgM trait on chromosome 5 of Japanese quail

لازمه هر برنامه اصلاحی و پیشرفت ژنتیکی بر وجود تنوع است، بنابراین انتخاب به ویژه انتخاب ژنومی می‌تواند موجب بهبود چشمگیری در میزان مقاومت پرندگان در برابر عوامل پاتوژن باشد. در نهایت تجزیه مکان‌یابی منجر به شناسایی سه مکان ژنی یا QTL در میانه کروموزوم 5 شد، که موجب تغییرات عمده‌ای در میزان ایمونوگلوبولین‌های سرم خون در بین پرندگان شدند. لذا به نظر می‌رسد در قسمت میانی کروموزوم 5 یک یا چند جایگاه ژنی با اثر افزایشی وجود دارد که مسوول ایجاد ایمنی در پرندگان است.

درصد واریانس به واسطه QTL‌های شناسایی شده بر روی کروموزوم 5 برای خصوصیات IgT، IgY و IgM به ترتیب برابر با 8/5، 7 و 12/1 درصد واریانس کل بودند. نشانگرهای واقع بر روی کروموزوم 5 بلدرچین ژاپنی چندشکلی بالا و تفرق مناسب برای صفات مرتبط با ایمنی نشان داد، لذا می‌تواند کاربرد گسترده‌ای در مطالعات پیوستگی و تجزیه QTL داشته باشد. همچنین، خصوصیات ایمنی و مقدار ایمونوگلوبولین‌های سرم خون در چالش با SRBC در بلدرچین ژاپنی تنوع بالایی را نشان داد، لذا با توجه به این که

منابع

1. Abbas, A.K., A.H. Lichtman and S. Pillai. 2014. Basic immunology: functions and disorders of the immune system (Elsevier Health Sciences).
2. Baron, E.E., A.S. Moura, M.C. Ledur, L.F. Pinto, C. Boschiero, D.C. Ruy, K. Nones, E.L. Zanella, M. F. Rosário, D.W. Burt and L.L. Coutinho. 2010. QTL for percentage of carcass and carcass parts in a broiler x layer cross. *Animal Genetics*, 42(2): 117-124.
3. Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic*, 32: 314-331.
4. Bovenhuis, H., H. Bralten, M.G. Nieuwland and H.K. Parmentier. 2002. Genetic parameters for antibody response of chickens to sheep red blood cells based on a selection experiment. *Poultry Science*, 81(3): 309-315.
5. Buchanan, F.C. and T.D. Thue. 1998. Intra-breed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 78: 425-428.

6. Charati, H., A. Esmailizadeh, R. Jabari and A. Ayatollahi Mehrgardi. 2014. Mapping quantitative trait loci affecting leukocytes, body temperature and tonic immobility in Japanese quail. *Novin Genetic*, 9(1): 57-66 (In Persian).
7. Churchill, G.A. and R.W. Doerge. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138: 963-971.
8. Davison, F., B. Kaspers, K.A. Schat and P. Kaiser. 2011. *Avian immunology* (Academic Press).
9. Ebrahimi, K., G.R. Dashab, H. Faraji- Arough, A. Maghsoudi and M. Rokouei. 2019. Genome scan of Japanese quail chromosome 5 for detecting of QTLs of growth traits. *Animal Production Research*, (In press) (Persian) doi: 10.22124/AR.2019.10859.1333
10. Esmailizadeh, A.K., A. Baghizadeh and M. Ahmadizadeh. 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.
11. Frost, A.J. and J.B. Woolcock. 1991. Antibiotics and animal production. In: *Microbiology of Animals and Animal Products*, New York, NY: Elsevier, pp: 181-194.
12. Garcia, V., P.C. Gregori, F. Hernandez, M.D. Megias and J. Madrid. 2007. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 16: 555-562.
13. Gavora, J.S. 1993. Genetic control of disease and disease resistance in poultry. Pages 231-241 in: *Manipulation of Avian Genome*. R.J. Etches and A.M. Verrinder-Gibbins, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
14. Iranmanesh, M., A. Esmailizadeh, M. R. Mohammad abadi and S. Sohrabi. 2017. Identification of quantitative trait loci affecting average daily gain and Kleiber ratio on chromosome 5 in an F2 population of Japanese quail. *Animal Production Research*, 5(4): 12-22 (In Persian).
15. Jabbari, R., A.K. Esmailizadeh, H. Charati, M.R. Mohammadabadi and S.S. Sohrabi. 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.
16. Janeway, C.A. 2001. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 7461-7468.
17. Janeway, C., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik. 2004. *Immunobiology*. Garland Science. New York.
18. Kayang, B., A. Vivnal, M. Inoue-Murayama, M. Miwa, J.L. Monvoisin, S. Ito and F. Minvielle. 2004. A first-generation microsatellite linkage map of the Japanese quail. *Animal genetics*, 35: 195-200.
19. Liu, K. and S.V. Muse. 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21: 2128-2129.
20. Lwelamira, J. and A. Katule. 2004. Genetic determination of immune responses to Newcastle disease virus vaccine in chickens. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 52: 186-197.
21. Lwelamira, J., G.C. Kifaro and P.S. Gwakisa. 2009. Genetic parameters for body weights, egg traits and antibody response against Newcastle Disease Virus (NDV) vaccine among two Tanzania chicken ecotypes. *Tropical Animal Health and Production*, 41(1): 51-59.
22. Martin, A., E.A. Dunnington, W.B. Gross, W.E. Briles, R.W. Briles and P.B. Siegel. 1990. Production traits and alloantigen systems in lines of chickens selected for high or low antibody responses to sheep erythrocytes. *Poultry Science*, 69: 871-878.
23. Metchnikoff, E. 1905. *Immunity in infective diseases* (University Press).
24. Miller, S. A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1998. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 12-15.
25. Minvielle, F., B. Kayang, M. Inoue-Murayama, M. Miwa, A. Vignal, D. Gourichon, A. Neau, J. Monvoisin and S. Ito. 2005. Microsatellite mapping of QTL affecting growth, feed consumption, egg production, tonic immobility and body temperature of Japanese quail. *BMC Genomics*, 6: 87.
26. Moradian, H., A. Esmailizadeh and M. Mohammadabadi. 2015. Microsatellite mapping of quantitative trait loci associated with carcass traits on chromosome 1 in Japanese quail. *Animal Production*, 15(2): 89-99 (In Persian).
27. Navani, N.K., P. Jain, S. Gupta, B.S. Sisodia and S. Kumar. 2002. A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Genetics*, 33(2): 149-154.
28. Nobakht, A., J. Norany and A.R. Safamher. 2011. The effects of different amount of *Mentha pulegium* L. (pennyroyal) on performance, carcass traits, hematological and blood biochemical parameters of broilers. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 3763-3768.
29. Peterson, A.T., J. Soberón and V. Sánchez-Cordero. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science*, 285: 1265-1267.
30. Pinard, M.H., J.A. M. van Arendonk, M.G.B. Nieuwland and A.J. Van Der Zijpp. 1992. Divergent selection for immune responsiveness in chickens: Estimation of realized heritability with an animal model. *Journal of Animal Science*, 70: 2986-2993.

31. Ponte, P. and C. Rosado. 2008. Pasture intake improve the performance and meat sensory attributes of free-range in broilers. *Poultry Science*, 87: 71-79.
32. Seaton, G., J. Hernandez, J.A. Grunche, I. White, J. Allen, D.J. De Koning, W. Wei, D. Berry, C. Haley and S. Knott. 2006. GridQTL: A Grid Portal for QTL Mapping of Compute Intensive Datasets. *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Belo Horizonte, Brazil.
33. Singh, P., S. Kumar, H.N. Singh and D.P. Singh. 2010. Genetics of immunocompetence traits in Aseel native chicken. *Journal of Applied Animal Research*, 37(2): 229-231.
34. Sivaraman, G.K., S. Kumar, V.K. Saxena, N.S. Singh and B.M. Shivakumar. 2005. Genetics of immunocompetent traits in a synthetic broiler dam line. *British Poultry Science*, 46(2): 169-174.
35. Sohrabi, S.S., A.K. Esmailizadeh, A. Baghizadeh, H. Moradian, M.R. Mohammadabadi, N. Askari and E. Nasirifar. 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.
36. Uemoto, Y., S. Sato, S. Odawara, H. Nokata, Y. Oyamada, Y. Taguchi, S. Yanai, O. Sasaki, H. Takahashi, K. Nirasawa and E. Kobayashi. 2009. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting growth and carcass traits in F2 intercross chickens. *Poultry Science*, 88(3): 477-482.
37. Wijga, S., H.K. Parmentier, M.G.B. Nieuwland and H. Bovenhuis. 2009. Genetic parameters for levels of natural antibodies in chicken lines divergently selected for specific antibody response. *Poultry Science*, 88(9): 1805-1810.
38. Yalcin, S., I. Oguz and S. Otles. 1995. Carcass characteristics of quail (*Coturnix Coturnix Japonica*) slaughtered at different ages. *British Poultry Science*, 36: 393-399.
39. Yeh, F.C., R. Yang and T. Boyle. 1999. POPEGENE. Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta. Edmonton.
40. Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11(1): 1-16.

Mapping of Quantitative Trait Loci for Immunity Traits by Microsatellite Markers on chromosome 5 in Japanese Quail

Raheleh Khanegir¹, Mohammad Rokouei², Hadi Faraji Arough³, Ali Maghsoudi⁴ and Gholam Reza Dashab⁵

-
- 1- Graduted M.Sc. Student, of Animal Breeding, Department of Animal Science, University of Zabol
 2- Associate professor of Animal Breeding, Department of Animal Science and Bioinformatics, University of Zabol
 (Corresponding author: rokouei@uoz.ac.ir)
 3- Assistant professor of Animal Breeding and Genetic, Department of Domestic research, University of Zabol
 4- Assistant professor of Animal Breeding, Department of Animal Science and Bioinformatics, University of Zabol
 5- Associate professor of Animal Breeding and Genetic, Department of Animal Science, University of Zabol
 Received: November 11, 2019 Accepted: February 8, 2020
-

Abstract

Immune traits are very important because of their direct relationship with the growth traits and the economic value of quail breeding. The purpose of this study was to investigate the part of the Japanese quail genome in order to detect QTL affecting on immunity traits using a four-generation crossover design. For this purpose, four strains of A and M Texas, Wild, Italian Speckled and Tuxedo Japanese quails were mated as reciprocal crossed for creating the first generation. Then, another generation, including the second, third and fourth generations were created from the crossing of the first generation hybrid birds. Phenotypic data included traits related humoral immunity of birds, including T, M and Y immunoglobulins. The third and fourth generation parents and all birds from the fourth generation parents were genotyped for three microsatellite markers located on the chromosome 5. QTL analysis was performed by interval mapping based on regression with GridQTL software. Three adjacent QTLs in the middle of chromosome 5 for the three IgT, IgM, and IgY were identified at the positions 13.5, 8.9, and 14.7 cm near to marker GUJ0049, respectively. Therefore, the results showed that there was at least one gene with a major effect on immunity traits adjacent to the marker GUJ0049, and adding the information of the mentioned marker genotypes to the statistical models could improve the accuracy of prediction of breeding values for immunity traits in quail.

Keywords: Japanese quail, Immunity traits, Bootstrapping, Immunoglobulins