

تجزیه جایگاه‌های صفت کمی (QTL) مؤثر بر صفات رشد بر روی کروموزوم ۱۸ در گوسفند نژاد لری - بختیاری

وحید ایران پور مبارکه^۱، علی اسماعیل‌زاده کشکوئیه^۲ و ابراهیم اسدی خشویی^{۳*}
۱، ۳، دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد
۲، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان
(تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۵ - تاریخ تصویب: ۸۹/۱۱/۲۰)

چکیده

این تحقیق با هدف تأیید تفرق QTL مؤثر بر صفات رشد در بخش انتهایی کروموزوم ۱۸ در گوسفند نژاد لری - بختیاری انجام شد. جمعیت مورد بررسی شامل ۱۶۲ حیوان مربوط به ۵ خانواده ناتنی پدری بود. داده‌های فنوتیپی شامل اندازه‌گیری‌های وزن تولد، وزن یک‌ماهگی، وزن شیرگیری، وزن شش‌ماهگی، دور سینه در شش‌ماهگی، طول بدن در شش‌ماهگی، ارتفاع جدوگاه در شش‌ماهگی، وزن نه‌ماهگی و وزن دوازده‌ماهگی بودند. ۵ والد نر و نتاج آنها برای نشانگرهای ریزماهواره‌ای در یک ناحیه مشخص از کروموزوم ۱۸ تعیین ژنوتیپ شدند. آنالیز ناحیه کروموزومی مرتبط با صفات کمی (QTL) به روش مکان‌یابی درون فاصله‌ای مبتنی بر رگرسیون و یک مدل تک QTL انجام گردید. بر اساس آنالیزهای انفرادی خانواده‌ها، QTL‌های مرتبط با وزن تولد (در موقعیت ۱۱۷cM)، وزن یک‌ماهگی (در موقعیت ۱۱۶cM) و وزن شیرگیری (در موقعیت ۱۱۸cM) بین نشانگرهای CSSM18 و TMR1، در خانواده اول شناسایی گردیدند ($P < 0/01$). در خانواده پنجم نیز QTL‌های مرتبط با دور سینه در شش‌ماهگی (در موقعیت ۱۱۴cM) ($P < 0/01$) و ارتفاع جدوگاه در شش‌ماهگی (در موقعیت ۱۱۳cM) ($P < 0/05$) بین نشانگرهای CSSM18 و TMR1 شناسایی شدند. با انجام آنالیز به صورت همزمان بر روی دو خانواده اول و پنجم، یک QTL مرتبط با صفات وزن یک‌ماهگی ($P < 0/01$)، وزن شیرگیری ($P < 0/05$) و دور سینه در شش‌ماهگی ($P < 0/01$) به ترتیب در موقعیت‌های ۱۱۳cM، ۱۱۸cM و ۱۱۸cM بین نشانگرهای CSSM18 و TMR1، شناسایی شد. آنالیز توام کلیه خانواده‌ها، حاکی از ارتباط معنی‌دار QTL پیشنهادی برای وزن شش‌ماهگی در موقعیت ۱۰۶cM ($P < 0/05$) و در نزدیکی نشانگر CSSM18 نیز بود. با توجه به آن که ژن کارول بر روی کروموزوم ۱۸ و در نزدیکی نشانگر CSSM18 قرار دارد، این ژن یک کاندیدای قوی برای اثرات مشاهده شده QTL بر صفات رشد در این نژاد است.

واژه‌های کلیدی: آنالیز QTL، گوسفند لری - بختیاری، نشانگرهای ریزماهواره، خانواده ناتنی.

مقدمه

تاکنون وزن شیرگیری و وزن ۶ ماهگی به عنوان مهمترین معیارهای انتخاب در این نژاد به کار گرفته شده است (Asadi-Khoshoei et al., 1999)، اما فرآیند انتخاب اغلب در این نژاد فقط بر مبنای اطلاعات

از میان نژادهای گوسفند بومی ایران گوسفند لری - بختیاری، سنگین وزن‌ترین آنها می‌باشد. در این نژاد، رشد به عنوان مهمترین صفت اقتصادی مطرح است و

بر مبنای تفاوت‌های افراد در سطح DNA آنها استفاده نمود. این تحقیق با هدف تأیید تفرق QTL مؤثر بر صفات رشد در بخش انتهایی کروموزوم ۱۸ در گوسفند نژاد لری- بختیاری انجام شد (شکل ۲).

مواد و روش‌ها

حیوانات و داده‌های فنوتیپی

با توجه به آن‌که طرح آزمایشی مورد استفاده، یک طرح ناتنی پدری بود، تعداد پنج خانواده ناتنی پدری مجموعاً شامل ۱۶۲ حیوان از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند لری- بختیاری واقع در ۱۵ کیلومتری شهرکرد انتخاب گردیدند. داده‌های فنوتیپی شامل اندازه‌گیری‌های وزن تولد (BWT)، وزن یک‌ماهگی (W1)، وزن شیرگیری (WWT)، وزن شش‌ماهگی (W6)، دور سینه در شش‌ماهگی (GI6)، طول بدن در شش‌ماهگی (LG6)، ارتفاع جدوگاه در شش‌ماهگی (HT6)، وزن نه‌ماهگی (W9) و وزن دوازده‌ماهگی (W12) بودند (جدول ۱).

استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ

از تمامی پنج والد نر و نتاجشان از طریق رگ گردن و به‌وسیله لوله‌های خلاء حاوی EDTA خون‌گیری به‌عمل آمد. نمونه‌های خون بلافاصله روی یخ برده شده و به آزمایشگاه انتقال یافتند. استخراج DNA از خون کامل با استفاده از یک روش استخراج نمکی تغییر یافته (Iranpur et al., 2010) انجام گردید.

از آنجایی‌که در تحقیقات پیشین بر روی نژادهای خارجی، مشخص شده است که کروموزوم ۱۸ گوسفند حاوی ژن هیپرتروفی ماهیچه‌ای (Freking (Callipyge) (Freking et al., 2002) و همچنین جایگاه ژنی ماهیچه‌واری کارول (Carwell) (Nicoll et al., 1998) می‌باشد، لذا بخشی از این کروموزوم برای مطالعه نواحی کروموزومی مؤثر بر رشد در گوسفند ایرانی نژاد لری- بختیاری انتخاب گردید. تعداد ۳ نشانگر ریزماهوره بر اساس نقشه ژنتیکی نشانگرهای ریزماهوره‌ای گوسفند (Maddox & Cockett, 2007) انتخاب گردیدند (جدول ۲). ریزماهوره‌های انتخاب شده با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و با برنامه دمایی Touch Down تکثیر یافتند. واکنش‌ها تحت شرایط زیر انجام

فنوتیپی و بدون داشتن تفاوت‌های ژنتیکی افراد در سطح DNA آنها صورت گرفته است. هزینه زیاد یا مشکل بودن رکوردبرداری برای برخی از صفات اقتصادی، عامل محدودکننده در بهبود ژنتیکی آنها با استفاده از روشهای سنتی اصلاح‌نژاد که فقط از داده‌های فنوتیپی برای ارزیابی ژنتیکی حیوانات استفاده می‌کنند، می‌باشد. صفات مرتبط با رشد دارای ماهیت کمی بوده و به نظر می‌رسد که بوسیله چندین ژن، که هر کدام اثرات افزایشی نسبتاً کوچکی روی فنوتیپ دارند کنترل می‌شوند (Falconer & Mackay, 1996).

فن‌آوری‌های مولکولی به شکل نشانگرهایی که تفاوت افراد را در سطح DNA آنها نشان می‌دهند، می‌توانند نقش مهمی در بهبود ژنتیکی صفات دارای مکانیسم توارثی پیچیده از طریق انتخاب به کمک نشانگر یا ژن داشته باشند (Esmailzadeh et al., 2007). تاکنون چندین مطالعه در زمینه شناسایی جایگاه‌های صفت کمی (Quantitative trait loci, QTL) در جمعیت گوسفندان نژادهای مختلف جهان صورت گرفته است. در یک تحقیق مشخص شده که جابه‌جایی تک نوکلئوتید در یک ناحیه ژنتیکی کوچک نزدیک تلومر کروموزوم ۱۸ گوسفند، حامل جهش ایجادکننده فنوتیپ هیپرتروفی ماهیچه‌ای در گوسفند است (Freking et al., 1999; 2002). از طرفی QTL مؤثر بر وزن ۸ هفتگی و وزن ۲۰ هفتگی در یک جمعیت گوسفند نژاد سافولک بر روی کروموزوم ۱۸ گزارش شده است (Walling et al., 2004). همچنین، نقشه QTL برای نرخ رشد و وزن بدن در گوسفند به‌کمک ۲۰۰ نشانگر ریزماهوره و با استفاده از یک خانواده با ۵۱۰ نتاج حاصل از تلاقی برگشتی آواسی- مریوس موجود است (Raadsma et al., 2009). در تحقیقی دیگر، موقعیت ژن‌های مرتبط با صفات رشد (وزن‌های نه‌ماهگی و دوازده‌ماهگی) روی کروموزوم ۱۸ در بخش انتهایی کروموزوم، بین نشانگرهای CSSM018 و TMR1 تعیین شده‌اند (Margawati et al., 2009). با این وجود، در زمینه شناسایی QTL مؤثر بر رشد گوسفندان بومی ایران هیچ گزارشی در دسترس نیست. در صورت شناسایی جایگاه‌های ژنی مرتبط با صفات کمی (QTL)، می‌توان از روش‌های نوین انتخاب ژنتیکی

شدند: واسرشته‌سازی اولیه (۵ دقیقه با دمای ۹۴°C) و سپس ۳۷ چرخه شامل مراحل واسرشته‌سازی (۱ دقیقه با دمای ۹۴°C)، اتصال آغازگر به رشته الگو (۱ دقیقه با دمای ۵۶°C) و بسط توسط پلیمرز (۲ دقیقه با دمای ۷۲°C) و در نهایت مرحله بسط نهایی (۱۰ دقیقه با دمای ۷۲°C). لازم به ذکر است که ۷ چرخه اولیه، با شروع از دمای ۶۳°C و کاهش دما تا رسیدن به دمای ۵۶°C انجام گردید.

شدند: واسرشته‌سازی اولیه (۵ دقیقه با دمای ۹۴°C) و سپس ۳۷ چرخه شامل مراحل واسرشته‌سازی (۱ دقیقه با دمای ۹۴°C)، اتصال آغازگر به رشته الگو (۱ دقیقه با دمای ۵۶°C) و بسط توسط پلیمرز (۲ دقیقه با دمای ۷۲°C) و در نهایت مرحله بسط نهایی (۱۰ دقیقه با دمای ۷۲°C). لازم به ذکر است که ۷ چرخه اولیه، با شروع از دمای ۶۳°C و کاهش دما تا رسیدن به دمای ۵۶°C انجام گردید.

جدول ۱- تعداد نتاج، میانگین خام (انحراف معیار فنوتیپی) صفات مورد مطالعه به تفکیک خانواده ناتنی

صفت	خانواده ناتنی					
	۱	۲	۳	۴	۵	کل
BWT	۵/۲۴ (۰/۷۷)	۴/۹۳ (۰/۹۵)	۵/۰۶ (۰/۷۱)	۵/۰۹ (۰/۷۸)	۴/۷۵ (۰/۹۹)	۵/۰۱ (۰/۸۴)
W1	۱۳/۲۹ (۲/۷۹)	۱۱/۹۹ (۳/۱۰)	۱۲/۵۸ (۱/۹۲)	۱۳/۱۰ (۲/۹۰)	۱۲/۳۲ (۲/۷۷)	۱۲/۶۶ (۲/۷۰)
WWT	۳۰/۴۲ (۶/۳۵)	۲۸/۵۰ (۵/۰۹)	۲۹/۰۵ (۴/۷۵)	۳۰/۶۰ (۵/۶۳)	۲۸/۲۴ (۵/۱۶)	۲۹/۳۶ (۵/۴۰)
W6	۴۳/۰۴ (۹/۵۸)	۴۰/۸۱ (۹/۹۱)	۴۰/۵۵ (۹/۴۷)	۴۱/۳۸ (۹/۱۸)	۴۱/۶۴ (۱۰/۸۸)	۴۱/۴۸ (۹/۸۰)
GI6	۷۸/۳۲ (۶/۷۴)	۶۵/۳۴ (۶/۶۶)	۷۹/۷۲ (۴/۹۹)	۷۸/۰۶ (۶/۲۰)	۷۷/۰۳ (۷/۲۰)	۷۵/۶۹ (۶/۳۶)
LG6	۶۶/۳۵ (۴/۷۳)	۶۵/۴۴ (۷/۲۸)	۶۲/۸۸ (۳/۶۲)	۶۴/۸۸ (۵/۱۳)	۶۳/۸۱ (۴/۸۷)	۶۴/۶۷ (۵/۱۳)
HT6	۶۶/۹۴ (۴/۶۸)	۶۶/۹۱ (۴/۱۶)	۶۶/۶۶ (۴/۵۶)	۶۵/۳۱ (۴/۹۰)	۶۴/۳۴ (۵/۰۱)	۶۸/۰۳ (۴/۶۶)
W9	۵۲/۰۴ (۶/۹۵)	۵۳/۶۹ (۹/۹۷)	۵۲/۴۲ (۷/۴۱)	۵۲/۵۰ (۵/۸۷)	۵۱/۳۸ (۸/۸۲)	۵۲/۴۱ (۷/۸۰)
W12	۵۶/۱۱ (۱۰/۰۸)	۵۸/۲۵ (۱۱/۰۴)	۵۶/۴۲ (۱۰/۸۱)	۵۵/۲۱ (۹/۴۷)	۵۲/۸۸ (۱۲/۵۰)	۵۵/۷۷ (۱۰/۷۸)
تعداد نتاج	۳۳	۳۱	۳۱	۳۱	۳۱	۱۵۷

BWT: وزن تولد، W1: وزن یک‌ماهگی، WWT: وزن شیرگیری، W6: وزن شش‌ماهگی، GI6: دور سینه در شش‌ماهگی، LG6: طول بدن در شش‌ماهگی، HT6: ارتفاع جدوگاه در شش‌ماهگی، W9: وزن نه‌ماهگی و W12: وزن دوازده‌ماهگی.

جدول ۲- مشخصات کلی آغازگرهای ریزماهورهای به کار رفته در تحقیق

نام آغازگر	دامنه اندازه آلی (bp)*	موقعیت آغازگر (cM)	متوسط دمای ذوب (°C)
MCMA26	۱۸۸-۲۱۲	۹۵/۶	۵۹/۱
CSSM18	۱۱۶-۱۳۴	۱۰۵/۵	۶۳/۰
TMR1	۱۲۴-۱۲۸	۱۱۸/۷	۶۳/۵

* Base pair (جفت باز)

رگرسیون برای آنالیز QTL استفاده گردید (Knott et al., 1996). با توجه به اینکه اثرات ثابت متفاوتی صفات مختلف را تحت تاثیر قرار می‌دادند، برای صفات مختلف مدل‌های متفاوتی از لحاظ نوع اثرات ثابت منظور شد. برای مثال، مدل آماری زیر (رابطه ۱) برای تحلیل داده‌های وزن تولد استفاده شد:

$$Y_{ijklmn} = \mu_i + \beta Ewt + G_j + BY_k + DA_l + BT_m + a_i x_{in} + e_{ijklmn} \quad (1)$$

در این مدل آماری Y_{ijklmn} رکورد وزن تولد حیوان n مربوط به والد i ، μ_i میانگین وزن تولد در خانواده i ، βEwt رگرسیون وزن تولد روی وزن میش، G_j اثر جنس بره، BY_k اثر سال تولد، DA_l اثر سن مادر، BT_m اثر تیپ تولد (دو قلو یا تک قلو)، a_i (ضریب رگرسیون) اثر جایگزینی آلی QTL در داخل خانواده i ، x_{in} احتمال اینکه حیوان n آلی ۱ را از والد i دریافت کرده است.

بر اساس مدل آماری فوق، درون هر خانواده ناتنی یک QTL در فواصل ۱cM در طول ناحیه کروموزومی مورد بررسی، برازش گردید. نقطه‌ای از ناحیه مورد بررسی که دارای حداکثر آماره F بود به عنوان

واکنش‌های PCR با استفاده از ۱۵۰ng از DNA الگو در حجم نهایی ۲۰μl مخلوط واکنش شامل ۰/۳۲۵μM از هر آغازگر، ۲۰۰μM از dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates)، با غلظت ۱/۵mM (بافر ۱x) و یک واحد (۱U) از آنزیم Taq DNA polymerase انجام یافتند. محصولات PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶٪ واسرشته‌ساز، الکتروفورز شدند و باندها به‌وسیله رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، قابل مشاهده گشتند.

آنالیز داده‌ها

پس از تعیین آل‌های به‌ارث رسیده از طریق والد نر (شکل ۱)، از روش نقشه‌یابی درون‌فاصله‌ای مبتنی بر

اول به ترتیب در فواصل ۱۱۷، ۱۱۶ و ۱۱۸ سانتی‌مورگان و برای صفات دور سینه در شش‌ماهگی (GI6) ($P < 0.01$) و ارتفاع بدن (جدوگاه) در شش‌ماهگی (HT6) ($P < 0.05$) در خانواده پنجم به ترتیب در فواصل ۱۱۴ و ۱۱۳ سانتی‌مورگان، معنی‌دار شدند. نزدیک‌ترین نشانگر به این QTLها، نشانگر TMR1 بود (جدول ۳). در این مرحله، QTL در خانواده‌های دیگر معنی‌دار نبود. در مرحله دوم، تجزیه به‌طور توأم دو خانواده اول و پنجم که دارای QTL معنی‌دار بودند، صورت گرفت که بر اساس نتایج آزمون تبدیل، وجود QTL برای صفات وزن یک‌ماهگی (W1)، دور سینه در شش‌ماهگی (GI6) ($P < 0.01$)، و وزن شیرگیری (WWT) ($P < 0.05$) به ترتیب در فواصل ۱۱۳، ۱۱۸ و ۱۱۸ سانتی‌مورگان معنی‌دار بود. در این حالت نیز نزدیک‌ترین نشانگر به موقعیت QTLهای مذکور، نشانگر TMR1 بود (جدول ۴).

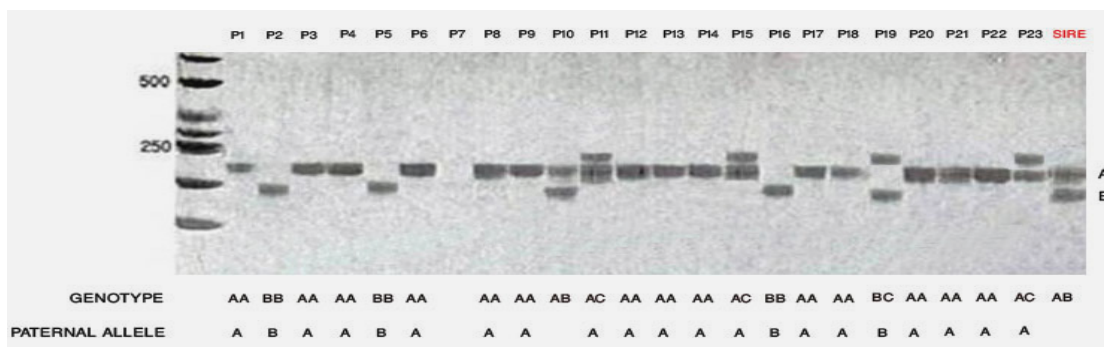
در مرحله آخر، یک تجزیه نهایی بر روی کلیه خانواده‌ها به‌منظور تخمین دقیق‌تر موقعیت QTLها بر روی کروموزوم ۱۸ انجام گردید. نتایج حاکی از معنی‌دار بودن وجود QTL برای چهار صفت وزن یک‌ماهگی (W1)، وزن شیرگیری (WWT)، وزن شش‌ماهگی (W6) ($P < 0.05$) و دورسینه در شش‌ماهگی (GI6) ($P < 0.01$) به ترتیب در فواصل ۱۱۳، ۱۱۸، ۱۰۶ و ۱۱۸ سانتی‌مورگان بر روی کروموزوم ۱۸ بود. در این حالت، صفت وزن شش‌ماهگی با نشانگر CSSM18 و سایر صفات با نشانگر TMR1 پیوستگی نشان دادند (جدول ۵).

محتمل‌ترین موقعیت QTL در نظر گرفته شد. برای تعیین معنی‌دار بودن QTL نیاز به تعیین آستانه‌های معنی‌دار کروموزومی (Chromosome wide threshold) در سطوح ۵٪ و ۱٪ بود که با استفاده از روش تبدیل (Permutation test) محاسبه شدند (Doerge & Churchill, 1996). مقادیر به‌دست آمده از آنالیز تعداد ده هزار سری داده، برای ایجاد یک توزیع تجربی از آماره آزمون تحت فرض صفر مبنی بر عدم وجود QTL، رتبه‌بندی شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار آنالیز GridQTL (Seaton et al., 2006) صورت گرفت.

نتایج و بحث

در مرحله اول، پنج والد نر برای نشانگرهای مورد استفاده تعیین ژنوتیپ شدند. با توجه به ماهیت طرح آزمایشی، از والد‌های ماده خون‌گیری به‌عمل نیامده بود، لذا این والدین برای نشانگرهای فوق تعیین ژنوتیپ نشدند. از میان ۳ نشانگری که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲)، نرهای اول، دوم، چهارم و پنجم برای MCMA26، نرهای اول، دوم، سوم و چهارم برای CSSM18 و نرهای اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم برای TMR1، هتروزیگوت بودند، لذا تمامی نتایج مربوط به این نرها، برای این نشانگرها تعیین ژنوتیپ شدند. نحوه تعیین ژنوتیپ برای نشانگر CSSM18 در والد نر ۲ در شکل ۱ آورده شده است.

در حالتی که هر خانواده به‌صورت مجزا مورد تجزیه قرار گرفت، QTL برای صفات وزن تولد (BWT)، وزن یک‌ماهگی (W1) و وزن شیرگیری (WWT) در خانواده



شکل ۱- نحوه ردیابی آلل به ارث رسیده از والد نر ۲ برای نشانگر CSSM18. P1 تا P23 نتایج شماره ۱ تا ۲۳ از این والد نر هستند که برای این نشانگر هتروزیگوت است. نتایج دریافت کننده آلل A برای این نشانگر دارای کد "۱" و نتایج دریافت کننده آلل B دارای کد "۲" می‌باشند. نتایج هتروزیگوت (مشابه والد نر)، فاقد اطلاعات مفید می‌باشند.

جدول ۳- خلاصه نتایج تجزیه QTL در خانواده‌های اول و پنجم (به تفکیک) روی کروموزوم ۱۸

صفت	موقعیت (cM)	خانواده	اثرات QTL پدری (S.E.)	اثرات QTL ^a	آماره F	نشانه ^b	میانگین (S.E.) ^c
BWT	۱۱۷	۱	-۱/۰۲ (۰/۳۰) Kg	-۲۱/۳	۱۱/۶۸**	TMR1	۴/۸۰ (۰/۸۵)
W1	۱۱۶	۱	-۵/۰۶ (۰/۹۱) Kg	-۳۸/۶	۳۰/۵۶**	TMR1	۱۳/۱۰ (۲/۵۵)
WWT	۱۱۸	۱	-۸/۲۴ (۱/۹۶) Kg	-۳۲/۴	۱۷/۶۲**	TMR1	۲۵/۴۳ (۵/۷۸)
GI6	۱۱۴	۵	۱۰/۹۳ (۲/۶۴) cm	۱۶/۶	۱۷/۰۹**	TMR1	۶۶/۰۱ (۷/۱۱)
HT6	۱۱۳	۵	۵/۵۶ (۱/۹۱) cm	۹/۴	۸/۴۷*	TMR1	۵۹/۱۶ (۴/۸۳)

a اثر QTL به صورت درصدی از میانگین صفت، b نزدیک‌ترین نشانه به QTL‌های معنی‌دار شده، c میانگین تصحیح شده برای اثرات ثابت، * و ** به ترتیب سطح معنی‌داری ۵ و ۱ درصد برای QTL مورد نظر.

جدول ۴- خلاصه نتایج تجزیه توأم QTL در خانواده‌های اول و پنجم روی کروموزوم ۱۸

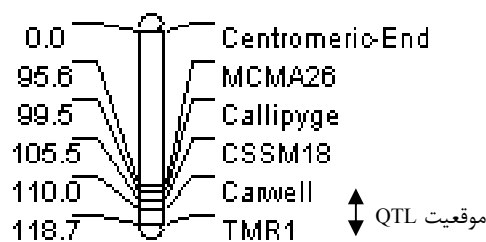
صفت	موقعیت (cM)	خانواده	اثرات QTL پدری (S.E.)	اثرات QTL ^a	آماره F	نشانه ^b	میانگین (S.E.) ^c
W1	۱۱۳	۱	-۳/۹۰ (۱/۰۳) Kg	-۲۵/۴	۸/۱۶**	TMR1	۱۵/۳۷ (۲/۰۶)
W1	۱۱۳	۵	۱/۷۲ (۱/۱۷) Kg	۱۱/۲	۸/۱۶**	TMR1	۱۵/۳۷ (۲/۰۶)
WWT	۱۱۸	۱	-۶/۰۰ (۱/۸۷) Kg	-۱۷/۸	۵/۴۳*	TMR1	۳۳/۶۵ (۴/۳۴)
WWT	۱۱۸	۵	۲/۲۶ (۲/۲۰) Kg	۶/۷	۵/۴۳*	TMR1	۳۳/۶۵ (۴/۳۴)
GI6	۱۱۸	۱	-۲/۸۴ (۲/۱۱) cm	-۴/۰	۸/۳۰**	TMR1	۷۰/۸۴ (۴/۷۴)
GI6	۱۱۸	۵	۹/۶۷ (۲/۴۶) cm	۱۳/۷	۸/۳۰**	TMR1	۷۰/۸۴ (۴/۷۴)

a اثر QTL به صورت درصدی از میانگین صفت، b نزدیک‌ترین نشانه به QTL‌های معنی‌دار شده، c میانگین تصحیح شده برای اثرات ثابت، * و ** به ترتیب سطح معنی‌داری ۵ و ۱ درصد برای QTL مورد نظر.

جدول ۵- خلاصه نتایج تجزیه توأم پنج خانواده روی کروموزوم ۱۸

صفت	موقعیت (cM)	خانواده	اثرات QTL پدری (S.E.)	اثرات QTL ^a	آماره F	نشانه ^b	میانگین (S.E.) ^c
W1	۱۱۳	۱	-۳/۴۸ (۱/۰۰) Kg	-۲۱/۳	۳/۲*	TMR1	۱۶/۳۵ (۰/۷۱)
W1	۱۱۳	۲	۰/۷۳ (۱/۲۱) Kg	۴/۴	۳/۲*	TMR1	۱۵/۳۷ (۲/۰۶)
W1	۱۱۳	۳	-۰/۴۴ (۱/۱۰) Kg	-۲/۷	۳/۲*	TMR1	۳۳/۶۵ (۴/۳۴)
W1	۱۱۳	۴	۱/۴۷ (۱/۱۲) Kg	۹/۰	۳/۲*	TMR1	۳۳/۶۵ (۴/۳۴)
W1	۱۱۳	۵	۱/۷۰ (۱/۲۰) Kg	۱۰/۴	۳/۲*	TMR1	۷۰/۸۴ (۴/۷۴)
WWT	۱۱۸	۱	-۵/۷۱ (۱/۶۱) Kg	-۹۶/۳	۳/۰۹*	TMR1	۵/۹۳ (۰/۲۱)
WWT	۱۱۸	۲	۰/۳۲ (۲/۱۴) Kg	۵/۴	۳/۰۹*	TMR1	۵/۹۳ (۰/۲۱)
WWT	۱۱۸	۳	-۱/۷۸ (۱/۸۴) Kg	-۳۰/۰	۳/۰۹*	TMR1	۵/۹۳ (۰/۲۱)
WWT	۱۱۸	۴	۱/۸۲ (۱/۹۶) Kg	۳۰/۷	۳/۰۹*	TMR1	۵/۹۳ (۰/۲۱)
WWT	۱۱۸	۵	۲/۳۸ (۱/۹۸) Kg	۴۰/۱	۳/۰۹*	TMR1	۵/۹۳ (۰/۲۱)
W6	۱۰۶	۱	-۳/۱۴ (۳/۱۶) Kg	-۶/۷	۲/۹۱*	CSSM18	۴۷/۰۷ (۲/۲۶)
W6	۱۰۶	۲	-۴/۹۶ (۲/۸۱) Kg	-۱۰/۵	۲/۹۱*	CSSM18	۴۷/۰۷ (۲/۲۶)
W6	۱۰۶	۳	-۵/۶۳ (۲/۹۳) Kg	-۱۲/۰	۲/۹۱*	CSSM18	۴۷/۰۷ (۲/۲۶)
W6	۱۰۶	۴	-۰/۹۳ (۳/۰۴) Kg	-۲/۰	۲/۹۱*	CSSM18	۴۷/۰۷ (۲/۲۶)
W6	۱۰۶	۵	۱۰/۶۶ (۳/۹۶) Kg	۲۲/۶	۲/۹۱*	CSSM18	۴۷/۰۷ (۲/۲۶)
GI6	۱۱۸	۱	-۲/۷۶ (۲/۰۱) cm	-۳/۴	۴/۲۸**	TMR1	۸۱/۳۴ (۱/۵۰)
GI6	۱۱۸	۲	۳/۲۸ (۲/۶۷) cm	۴/۰	۴/۲۸**	TMR1	۸۱/۳۴ (۱/۵۰)
GI6	۱۱۸	۳	-۱/۲۲ (۲/۳۰) cm	-۱/۵	۴/۲۸**	TMR1	۸۱/۳۴ (۱/۵۰)
GI6	۱۱۸	۴	۲/۳۷ (۲/۴۵) cm	۳/۰	۴/۲۸**	TMR1	۸۱/۳۴ (۱/۵۰)
GI6	۱۱۸	۵	۱۰/۲۲ (۲/۴۷) cm	۱۲/۶	۴/۲۸**	TMR1	۸۱/۳۴ (۱/۵۰)

a اثر QTL به صورت درصدی از میانگین صفت، b نزدیک‌ترین نشانه به QTL‌های معنی‌دار شده، c میانگین تصحیح شده برای اثرات ثابت، * و ** به ترتیب سطح معنی‌داری ۵ و ۱ درصد برای QTL مورد نظر.



شکل ۲- نقشه پیوستگی کروموزوم ۱۸ گوسفند با در نظر گرفتن موقعیت نسبی نشانگرهای مورد مطالعه (Maddox & Cockett, 2007). QTL شناسایی شده برای صفات مختلف رشد در گوسفند نژاد لری-بختیاری و ژن های Carwell و Callipyge

(al., 2006). همچنین، موقعیت ژن های مرتبط با صفات رشد (وزن های نه ماهگی و دوازده ماهگی) روی کروموزوم ۱۸ در بخش انتهایی کروموزوم، بین نشانگرهای CSSM18 و TMR1 پیشنهاد شده است (Margawati et al., 2009).

با وجود آنکه پیشنهاد ژن های کاندیدا بر اساس نتایج این تحقیق به دلیل فاصله اطمینان نسبتاً زیاد برآورد موقعیت QTL، چندان قابل اعتماد نمی باشد، اما به هر حال کروموزوم ۱۸ گوسفند، حاوی ژن هیپرتروفی ماهیچه ای (Freking et al., 2002) و همچنین جایگاه ژنی کارول در ناحیه ۲ تا ۶ سانتی مورگان تلومریک (telomeric) نشانگر CSSM18 (Nicoll et al., 1998) می باشد که به موقعیت QTL به دست آمده در این تحقیق نزدیک است (شکل ۲). ژن کالیپیج با صفات تولید گوشت در نژاد دورست (Dorset) در ارتباط است (Cockett et al., 1996). به علاوه، ژن کارول بر روی تکامل ماهیچه دنده (Muscle Rib Eye) در نژاد دورست پل استرالیایی (Australian Poll Dorset) مؤثر است (Banks, 1997). همچنین، ژن کارول در گوسفند در بخش انتهایی کروموزوم ۱۸ نزدیک ژن کالیپیج قرار دارد (McEwan et al., 1998). البته در این فاصله کروموزومی مورد بررسی تعداد زیادی ژن قرار دارند و در نواحی مختلف هر ژن به احتمال زیاد تعداد زیادی جابه جایی تک نوکلئوتیدی (SNPs) وجود خواهد داشت. بررسی تک تک این ژن ها و جهش های مربوط به آنها از طریق توالی یابی هزینه زیادی خواهد داشت. لذا بهتر است این تحقیق ادامه یابد و پس از نقشه یابی دقیق تر (Fine mapping) و کاهش فاصله اطمینان موقعیت QTL در این ناحیه از کروموزوم ۱۸ به لیست کوتاه تری

در مجموع سه مرحله تجزیه صورت گرفته، QTL های مرتبط با صفات W6, WWT, W1, BWT، HT6 و GI6 بر روی کروموزوم ۱۸ یافت شد. صفت GI6 دارای بالاترین اثر معنی دار با اثر جایگزینی آلی برابر با ۱۰/۲۲ سانتی متر در مجموع ۵ خانواده مورد بررسی بود. محتمل ترین موقعیت QTL ها در هر سه مرحله آنالیز تقریباً ثابت بود.

با توجه به فواصل بسیار نزدیک QTL های شناسایی شده برای صفات مورد مطالعه و نیز با توجه به اینکه صفات مورد مطالعه در این تحقیق با یکدیگر همبستگی بالایی دارند و همگی صفات مربوط به رشد می باشند، می توان نتیجه گرفت که احتمالاً این ناحیه از ژنوم (فاصله ۱۰۶ تا ۱۱۸ سانتی مورگان از کروموزوم ۱۸) با رشد در مراحل مختلف زندگی در گوسفند نژاد لری-بختیاری مرتبط می باشد. در تحقیقات پیشین بر روی کروموزوم ۱۸ گوسفند، QTL های مرتبط با رشد و صفات لاشه شناسایی شده اند (Walling et al., 2004; Hadjipavlou & Bishop, 2008; Margawati et al., 2009). در تحقیقی بر روی گوسفند نژاد بلک فیس (Blackface)، یک QTL در رابطه با نرخ رشد بین سنین ۸ تا ۱۲ هفتگی بر روی کروموزوم ۱۸ یافت شد (Hadjipavlou & Bishop, 2008). در تحقیقی دیگر، یک QTL مؤثر بر عمق ماهیچه و وزن زنده در ۸ هفتگی در فاصله ۸۷ سانتی مورگان بر روی کروموزوم ۱۸ و مرتبط با نشانگر CSSM18 در یک جمعیت گوسفند نژاد تکسل (Texel) شناسایی شد (Walling et al., 2004). همچنین، یک QTL برای وزن یک سالگی در موقعیت ۱۰۴ سانتی مورگان بر روی کروموزوم ۱۸ در گوسفند نژاد مریوس یافت شده است (Margawati et

از آنجایی که این تحقیق در داخل یک نژاد (نه یک جمعیت آمیخته حاصل از تلاقی نژادها) انجام شده است، لذا در صورت تایید نتایج این تحقیق در تعدادی از گله‌های دیگر از این نژاد، ممکن است بتوان از نتایج این تحقیق در برنامه‌های اصلاح نژاد گوسفند لری-بختیاری با روش انتخاب به کمک نشانگر با هدف افزایش پیشرفت ژنتیکی برای صفات رشد استفاده نمود. ولی با توجه به تعداد کم نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق و همچنین تعداد نسبتاً کم نتایج و خانواده‌های ناتنی مورد آزمایش، نتایج به دست آمده در این تحقیق دارای خطای نسبی می‌باشند، لذا پیشنهاد می‌گردد که در تحقیق‌های آتی، با تعداد بیشتری نشانگر و نیز جامعه آماری بزرگتری از افراد، نتایج مورد بررسی و تأیید قرار گیرند. اگرچه در این تحقیق، روش سنتی چند مرحله‌ای برای تحلیل مولکولی صفات کمی مورد استفاده قرار گرفت، اما با توجه به پیشرفت‌های جدید در فن‌آوری DNA به خصوص ایجاد نقشه‌های ژنتیکی متراکم مبتنی بر چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (Single-nucleotide polymorphisms, SNPs) و تکنیک‌های آماری دقیق‌تر مانند روش‌های مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی (Linkage Disequilibrium, LD)، امکان تحلیل دقیق‌تر صفات کمی و توسعه آزمون‌های مختلف ژنتیکی مرتبط با صفات کمی پیچیده، به وجود آمده است. مزیت مهم روش LD این است که نیاز به طرح آزمایشی از پیش تعیین شده نداشته و مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی موجود در جمعیت بوده و می‌توان از حیواناتی که بطور معمول در برنامه‌های اصلاح نژادی تعیین فنوتیپ می‌شوند، استفاده نمود (Van der werf et al., 2007). لذا پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات آینده از این اطلاعات و روش‌ها در نقشه‌یابی QTL استفاده گردد. این مطالعه همچنین پیشنهاد می‌کند در شرایط کمبود امکانات آزمایشی و محدودیت بودجه که امکان بررسی کامل ژنومی وجود ندارد، مطالعه نواحی ژنومی مرتبط با صفاتی که مشابه با صفات مورد مطالعه ما می‌باشند و قبلاً گزارش شده‌اند، راهکار کارآمدی برای بررسی تفرق QTL است.

نتیجه‌گیری کلی

تحقیق حاضر بیانگر احتمال وجود یک QTL یا QTLهایی در موقعیت ۱۰۶ تا ۱۱۸ سانتی مورگانی بر

از ژن‌های کاندیدا دست یافت و سپس توالی ژن‌های کاندیدا برای بررسی جهش‌های احتمالی و ارتباط آنها با صفات مطالعه شود.

میزان اثر QTL برای صفات مختلف بین ۱۲/۶ تا ۹۶/۳ واحد درصد میانگین و یا ۱/۲ تا ۴/۷ واحد انحراف معیار فنوتیپی قرار داشت که با توجه به اندازه نمونه نسبتاً کوچک در این آزمایش، احتمال می‌رود که اندازه اثر QTL بیشتر از میزان واقعی برآورد شده باشد. نتایج شبیه‌سازی داده‌ها نشان داده است که وقتی تعداد نتایج کم باشد، اندازه اثر QTL بیش از مقدار واقعی، برآورد می‌شود (Esmailizadeh et al., 2008). نکته دیگر آن است که QTL در تمامی خانواده‌ها تفرق نشان نداد که این موضوع بیانگر ماهیت جوامع دامی است که متفاوت از جمعیت‌های خالص می‌باشند.

میزان اطلاعات چندشکلی (Information Content, IC) در نقاط مختلف کروموزوم ۱۸ در این تحقیق بین ۰/۱۳ و ۰/۷۲ به دست آمد. در واقع IC میزان چندشکلی محاسبه شده بر اساس اطلاعات ژنوتیپی نشانگرها در فاصله ژنومی بین نشانگرها است که بر اساس احتمالات ژنوتیپی با توجه به ژنوتیپ نشانگرهای مجاور و فاصله ژنتیکی بین آنها برای هر ۱ سانتی‌مورگان از ناحیه کروموزومی مورد مطالعه محاسبه شده است. از آنجایی که اغلب مقدار IC بین نشانگرها، کمتر از مقدار IC در نقطه‌ای است که نشانگر در آنجا قرار دارد (Weller, 2001)، بنابراین کاهش میزان IC می‌تواند ناشی از فقدان نشانگرهای دارای اطلاعات مفید در یک یا چند خانواده باشد که در این صورت ژنوتیپ احتمالی نشانگر با توجه به ژنوتیپ نشانگرهایی که در فاصله دورتری قرار دارند (Knott et al., 1998)، استنباط شده است. عواملی همچون تعداد افراد فاقد ژنوتیپ و عدم تساوی تفرق آلل‌های مختلف نشانگر می‌توانند بر IC تاثیر بگذارد (Esmailizadeh et al., 2008). البته تعداد اندک نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق دلیل اصلی پایین بودن متوسط میزان اطلاعات چندشکلی در فاصله کروموزومی مورد بررسی است. اخیراً در تحقیقی دیگر (Bolormaa et al., 2010) شبیه تحقیق حاضر نیز فقط از سه نشانگر در محدوده ژن کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) روی کروموزوم ۲۳ بز در استرالیا برای بررسی تفرق QTL استفاده شده است.

گوسفند لری- بختیاری انجام گردید. از کلیه کارکنان ایستگاه به‌ویژه مدیریت محترم این مرکز آقای مهندس صالحی، همچنین آقای مهندس غلامحسینی و آقای ربیعی، و کارشناس محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد سرکار خانم مهندس توکلی و آقای مهندس سرخه و سایر عزیزانی که در این زمینه کمک‌رسان بوده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

روی کروموزوم ۱۸ با اثرات معنی‌دار بر صفات مختلف رشد در گوسفند نژاد لری بختیاری است. در صورت مکان یابی دقیق‌تر این QTL یا QTLها، امکان استفاده از آنها در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر در این نژاد وجود دارد.

سپاسگزاری

این تحقیق با همکاری ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد

REFERENCES

- Asadi-Khoshoei, E., Miraei-Ashtiani, S. R., Torkamanzahi, A., Rahimi, S. H. & Vaez Torshizi, R. (1999). The evaluation of Kleiber Ratio as a selection criterion for Ram selection in Lori-Bakhtiari sheep breed. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 30(4), 649-655. (In Farsi).
- Banks, R. (1997). The meat elite project: establishment and achievements of an elite meat sheep nucleus. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, Dubo, NSW, Australia, 12, 596-601.
- Cockett, N. E., Jackson, S. P., Snowden, G. D., Shay, T. L., Berghmans, S., Beever, J. E., Carpenter, C. & Georges, M. (1996). Polar overdominance at the callipyge locus in sheep. *Science*, 273, 236-238.
- Doerge, R. W. & Churchill, G. A. (1996). Permutation test for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics*, 142, 285-294.
- Esmailizadeh, K. A., Fooladi, M. H. & Mohammad Abadi, M. R. (2007). Molecular dissection of beef tenderness using DNA technology, In: *Proceedings of 5th Iranian National Congress on Biotechnology* 24-26 Nov. Tehran, Iran. (In Farsi).
- Esmailizadeh, K. A., Mohammad Abadi, M. R. & Asadi Foozi, M. (2008). Mapping quantitative trait loci in livestock using simple linear regression. *Iranian Journal of Animal Sciences*, 39(1), 83-93. (In Farsi).
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. (4th ed.). United Kingdom: Addison Wesley Longman, Harlow, Essex.
- Freking, B. A., Keele, J. W., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Nielsen, M. K. & Leymaster, K. A. (1999). Evaluation of the ovine callipyge locus: III. genotypic effects on meat quality traits. *Journal of Animal Science*, 77, 2336-2344.
- Freking, B. A., Murphy, S. K., Wylie, A. A., Rhodes, S. J., Keele, J. W., Leymaster, K. A., Jirtle, R. L. & Smith, T. P. L. (2002). Identification of the single base change causing the Callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar overdominance in mammals. *Genome Research*, 12, 1496-1506.
- Hadjipavlou, G. & Bishop, S. C. (2008). Age-dependent quantitative trait loci affecting growth traits in Scottish Blackface sheep. *Animal Genetics*, 40, 165-175.
- Iranpur, M. V., Esmailizadeh, K. A., Horriat, R., Asadi, K. E., Shiran, B., Sorkheh, K. & Farhadi, M. (2010). Rapid extraction of high quality DNA from whole blood stored at 4°C for long period. *PROTOCOL ONLINE*, Retrieved May 02, 2010 from [http:// protocol-online.org/](http://protocol-online.org/)
- Knott, S. A., Elsen, J. M. & Haley, C. S. (1996). Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 93, 71-80.
- Knott, S. A., Marklund, L., Haley, C. S., Andersson, K., Davies, W., Ellegren, H., Fredholm, M., Hansson, I., Hoyheim, B., Lundstrom, K., Moller, M. & Andersson, L. (1998). Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. *Genetics*, 149, 1069-1080.
- Maddox, J. F. & Cockett, N. E. (2007). An update on sheep and goat linkage maps and other genomic resources. *Small Ruminant Research*, 70, 4-20.
- Margawati, E. T., Raadsma, H. W., Martojo, H., Subandriyo, S. & Muladno, M. (2006). Quantitative trait loci (QTL) analysis for production traits of birth weight and weight 360 days in backcross sheep. *Journal of Biosciences*, 13, No1.
- Margawati, E. T., Fullard, K. J., Raadsma, H. W., Subandriyo, S. & Indriawati, K. (2009). Identification of quantitative trait loci for growth traits on chromosome 18 backcross populations of Indonesian thin tail (ITT) sheep. *Journal of Biotechnology Research*, Vol. 2, No. 2.
- McEwan, J. C., Gerard, E. M., Jopson, N. B., Nicoll, G. B., Greer, G. J., Dodds, K. G., Bain, W. E.,

- Burkin, H. R., Lor, E. A. & Broad, T. E. (1998). Localization of a QTL for rib-eye muscling on OAR18. *Animal Genetics*, 19 (Suppl. 1), 66.
18. Nicoll, G. B., Burkin, H. R., Broad, T. E., Jopson, N. B., Greer, G. J., Bain, W. E., Wright, C. S., Dodds, K. G., Fennessy, P. F. & McEwan, J. C. (1998). Genetic linkage of microsatellite markers to the Carwell locus for rib-eye muscling in sheep, In: *Proceedings of 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Armidale, Australia, 26: 529-532.
19. Raadsma, H. W., Thomson, P. C., Zenger, K. R., Lam, M. K., Jonas, E., Cavanagh, C., Jones, M., Attard, G., Palmer, D. & Nicholas, F. W. (2009). Mapping quantitative trait loci (QTL) in sheep. I. A new male framework linkage map and QTL for growth rate and body weight. *Genetics Selection Evolution*, 22, 41-45.
20. Seaton, G., Hernandez, J., Grunchec, J.A., White, I., Allen, J., De Koning, D. J., 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, 2006. Belo Horizonte, Brazil.
21. Van der werf, J. H. J., Marshall, K. & Sanghong, L. (2007). Methods and experimental designs for detection of QTL in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 70, 21-31.
22. Walling, G. A., Visscher, P. M., Willson, A. D., McTeir, B. L., Simm, G. & Bishop, S. C. (2004). Mapping of quantitative trait loci for growth and carcass traits in commercial sheep populations. *Journal of Animal Science*, 82, 2234-2245.
23. Weller, J. I. (2001). *Quantitative trait loci analysis in animals*, (pp.287). London: CABI Publishing.