

## نقشه یابی جایگاههای ژنی موثر بر وزن زنده و اندازه بدن در گوسفند لری-بختیاری با استفاده از طرح نانتی پدری و معرفی نشانگرهای زیستی مرتبط با سرعت رشد

ابراهیم اسدی خشویی<sup>۱</sup>، رویا حریت<sup>۲</sup>، سعداله هوشمند<sup>۳</sup>، علی اسمعیلی زاده کشکویی<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup> استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

<sup>۲</sup> دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

<sup>۳</sup> استاد گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

<sup>۴</sup> استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۷

### چکیده

هدف از انجام این پژوهش، نقشه یابی جایگاههای ژنی موثر بر وزن زنده و اندازه بدن و شناسایی نشانگرهای زیستی مهم مرتبط با سرعت رشد در گوسفند نژاد لری بختیاری بود. آنالیز نواحی ژنومی موثر بر صفات کمی مورد بررسی (QTL) در یک جمعیت گوسفند نژاد لری بختیاری با استفاده از تحلیل پیوستگی به روش مکان یابی درون فاصله ای مبتنی بر رگرسیون انجام گردید. جمعیت مورد بررسی شامل ۱۶۲ حیوان مربوط به ۵ خانواده نانتی پدری بود. داده های فنوتیپی شامل اندازه گیری های وزن تولد (BW)، وزن یک ماهگی (W1)، وزن شیرگیری (WW)، وزن شش ماهگی (W6)، دور سینه در شش ماهگی (HG6)، طول بدن در شش ماهگی (BL6)، ارتفاع جدوگاه در شش ماهگی (HT6)، وزن نه ماهگی (W9) و وزن دوازده ماهگی (W12) بودند. ۵ والد نر و نتاج آنها برای شش نشانگر ریزماهوره تعیین ژنوتیپ شدند. داده ها در دو مرحله، آنالیز هر خانواده به صورت انفرادی و آنالیز توأم تمام خانواده ها به کمک یک مدل تک QTL تجزیه و تحلیل شدند. براساس آنالیزهای انفرادی خانواده ها، QTL مرتبط با صفت وزن یک ماهگی (روی کروموزوم شماره ۱ در موقعیت ۲۱۰/۶ سانتی مورگان) در نزدیکی پرایمر INRA011 در خانواده دوم شناسایی گردید. در خانواده ی سوم نیز QTL های مرتبط با صفات وزن یک ماهگی و وزن شیرگیری به ترتیب در موقعیت های ۲۵۲/۶ و ۲۲۳/۶ سانتی مورگان در نزدیکی نشانگرهای LSCV105 و MCM137 شناسایی شدند. همچنین در خانواده چهارم نیز یک QTL موثر بر صفت وزن یک ماهگی در موقعیت ۲۵۴/۶ سانتی مورگان در نزدیکی نشانگر LSCV105 شناسایی شد. با انجام آنالیز به صورت همزمان بر روی تمام خانواده ها یک QTL مرتبط با صفت وزن یک ماهگی در موقعیت ۲۵۴/۶ سانتی مورگان در نزدیکی نشانگر LSCV105 شناسایی شد. با توجه به آن که ژن های ترانسفرین و PIT1 بر روی کروموزوم ۱ قرار دارند این دو ژن کاندیداهای قوی برای اثرات مشاهده شده ی QTL برای صفات رشد در این نژاد هستند.

**کلمات کلیدی:** صفات رشد، گوسفند، خانواده ی نانتی، نشانگرهای ریزماهوره، QTL.

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 می‌باشد که فقط از داده‌های فنوتیپی برای ارزیابی ژنتیکی حیوانات استفاده می‌کنند. 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 and 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 (Esmailizadeh et al, 2008). از طرفی استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد به طور مهیجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع می‌کند (Mousavizadeh et al., 2009; Javanmard et al., 2008) و مطالعه ساختار ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی لازم و ضروری است (Khodabakhshzadeh et al., 2016a). در حال حاضر، تولید گوشت مهمترین دلیل پرورش گوسفند در ایران است و تولیدات دیگر مانند پشم، شیر و پوست در درجات بعدی اهمیت قرار دارند (Mohammadabadi and Sattai Mokhtari, )

بالغ بر ۲۶ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده‌اند (Mohammadabadi and Sattai Mokhtari, ) 2013; Zamani et al., 2015; Khodabakhshzadeh et al., 2016b). در حال حاضر، تولید گوشت مهمترین دلیل پرورش گوسفند در ایران است و تولیدات دیگر مانند پشم، شیر و پوست در درجات بعدی اهمیت قرار دارند (Mohammadabadi and Sattai Mokhtari, ) 2013; Zamani et al., 2015; Khodabakhshzadeh et al., 2016b). هم اکنون نیز نرخ رشد بالای جمعیت در کشور اهمیت تولید و عرضه گوشت قرمز را دو چندان کرده است، همچنین به دلیل پائین بودن بازده تولید، به کارگیری حیواناتی با ظرفیت ژنتیکی بالا در افزایش تولیدات دامی اهمیت به سزایی دارد. عوامل بسیاری در بهبود تولید دام‌ها مؤثر است که شامل تغذیه، مدیریت، بهداشت و توان ژنتیکی دام‌ها می‌باشد. از میان تمام عوامل مؤثر بر بهبود تولید، توان ژنتیکی دام تنها عاملی است که علاوه بر نسل جاری در نسل‌های بعد هم بر تولید تاثیر دارد. گوسفند لری - بختیاری یکی از سنگین وزن‌ترین نژادهای گوسفند بومی ایران می‌باشد. در این نژاد، رشد به عنوان مهمترین صفت اقتصادی مطرح است و وزن شیرگیری و وزن ۶ ماهگی به عنوان مهمترین معیارهای انتخاب در این نژاد به کار گرفته شده است (Asadi-khoshoei 1999). اما فرآیند انتخاب اغلب در این نژاد فقط بر مبنای اطلاعات

QTL مؤثر بر سرعت رشد از تولد تا ۴۳ هفتگی، ۴۳ هفتگی تا ۵۶ هفتگی و ۵۶ هفتگی تا ۸۳ هفتگی به ترتیب در موقعیت‌های ۱۱۸، ۳۵۷ و ۳۵۷ سانتی مورگان روی کروموزوم یک به ترتیب در نزدیکی نشانگرهای BM4129 و BMS1789 شناسایی کردند (Raadsma, 2009). از آنجایی که در پژوهش‌های پیشین بر روی نژادهای خارجی، مشخص شده است که کروموزوم ۱ گوسفند حاوی ژن‌های ترانسفرین و PIT1 است (Kmiec, 1999)، لذا این کروموزوم برای مطالعه‌ی صفات مؤثر بر رشد در گوسفند ایرانی نژاد لری-بختیاری انتخاب گردید. با این وجود، در زمینه شناسایی QTL مؤثر بر رشد گوسفندان بومی ایران گزارش‌های زیادی در دسترس نیست. در صورت شناسایی جایگاه‌های ژنی مرتبط با صفات کمی، می‌توان از روش‌های نوین انتخاب ژنتیکی بر مبنای تفاوت‌های افراد در سطح DNA آنها استفاده نمود. لذا هدف اصلی این پژوهش، بررسی ارتباط نشانگرهای مولکولی (ریزماهواره) موجود در کروموزوم شماره ۱ با وزن تولد و برخی صفات بعد از تولد در گوسفند نژاد لری بختیاری بود.

#### مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی مورد استفاده در پژوهش کنونی، یک طرح ناتنی پدری بود. بدین منظور، تعداد پنج خانواده ناتنی پدری مجموعاً شامل ۱۶۲ حیوان از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند لری-بختیاری واقع در ۱۵ کیلومتری شهرکرد

(2013). به طور کلی در بیشتر کشورهای جهان هدف از اصلاح نژاد گوسفند سودآوری از طریق بهبود یک یا چند صفت اقتصادی در جامعه است (Soufy *et al.*, 2009). این بهبود می‌تواند از طریق انتخاب گوسفندان برتر به عنوان والدین نسل آینده بر اساس شایستگی ژنتیکی آنها برای صفات مورد نظر صورت گیرد (Khodabakhshzadeh *et al.*, 2015a; Khodabakhshzadeh *et al.*, 2016a). همگام با افزایش پیشرفت‌های ژنتیکی، حفظ تنوع ژنتیکی یک جمعیت برای اطمینان از پاسخ به انتخاب بلند مدت، یک وظیفه مهم برنامه‌های اصلاح نژادی است (Khodabakhshzadeh *et al.*, 2015a). برنامه‌های اصلاح نژادی بیشتر در جهت بهبود وضعیت تولیدی حیوانات اهلی عمل می‌کنند که توفیق این برنامه‌ها به مقدار تنوع ژنتیکی موجود در گله‌ها بستگی دارد (Khodabakhshzadeh *et al.*, 2015a).

در پژوهشی، نقشه‌یابی QTL برای نرخ رشد و وزن بدن از زمان تولد تا ۹۸ هفتگی در گوسفندان یک خانواده با ۵۱۰ نتاج حاصل از تلاقی برگشتی آواسی × مریوس انجام و ۵۴ QTL مؤثر بر صفت رشد و وزن بدن در سنین مختلف روی کل ژنوم گوسفند شناسایی شده اند (Raadsma *et al.*, 2009). دو QTL مؤثر بر وزن بدن در ۴۳ هفتگی و ۸۳ هفتگی به ترتیب در موقعیت‌های ۱۱۷ و ۳۵۷ سانتی مورگان روی کروموزوم ۱ به ترتیب در نزدیکی نشانگرهای BM4129 و BMS1789 شناسایی شده اند، همچنین در این بررسی سه

انتخاب گردیدند. داده‌های فنوتیپی شامل اندازه-گیری‌های وزن تولد (BW)، وزن یک ماهگی (W1)، وزن شیرگیری (WW)، وزن شش ماهگی (W6)، دور سینه در شش ماهگی (HG6)، طول بدن در شش ماهگی (BL6)، ارتفاع جدوگاه در شش ماهگی (HT6)، وزن نه ماهگی (W9) و وزن دوازده ماهگی (W12) بودند. تعداد نتاج، میانگین و انحراف معیار فنوتیپی صفات مورد بررسی به تفکیک خانواده‌های ناتنی در جدول ۱ ارائه شده-اند.

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

**Table 1- Traits mean (phenotypic standard deviation) and number of progeny per half-sib family.**

کل Total	خانواده ناتنی half-sib family					صفت trait
	5	4	3	2	1	
5.01(0.84)	4.75(0.99)	5.09(0.78)	5.06(0.71)	4.93(0.95)	5.24(0.77)	BW (kg)
12.66(2.7)	12.32(2.77)	13.1(2.9)	12.58(1.92)	11.99(3.1)	13.29(2.79)	W1 (kg)
29.36(5.4)	28.24(5.16)	30.6(5.63)	29.05(4.75)	28.5(5.09)	30.42(6.35)	WW (kg)
41.48(9.8)	41.64(10.88)	41.38(9.18)	40.55(9.47)	40.81(9.91)	43.04(9.58)	W6 (kg)
75.69(6.36)	77.03(7.2)	78.06(6.2)	79.72(4.99)	65.34(6.66)	78.32(6.74)	HG6 (cm)
64.67(5.13)	63.81(4.87)	64.88(5.13)	62.88(3.62)	65.44(7.28)	66.35(4.73)	BL6 (cm)
68.03(4.66)	64.34(5.01)	65.31(4.9)	66.66(4.56)	76.91(4.16)	66.94(4.68)	HT6 (cm)
52.41(7.8)	51.38(8.82)	52.5(5.87)	52.42(7.41)	53.69(9.97)	52.04(6.95)	W9 (kg)
55.77(10.78)	52.88(12.5)	55.21(9.47)	56.42(10.81)	58.25(11.04)	56.11(10.08)	W12 (kg)
157	31	31	31	31	33	تعداد نتاج

BW: وزن تولد، W1: وزن یک ماهگی، WW: وزن شیرگیری، W6: وزن شش ماهگی، HG6: دور سینه در شش ماهگی، BL6: طول بدن در شش ماهگی، HT6: ارتفاع جدوگاه در شش ماهگی W9: وزن نه ماهگی و W12: وزن دوازده ماهگی.

BW: Birth weight, W1: Live body weight at one month of age, WW: Weaning weight, W6: Live body weight at six months of age, HG6: Heart girth circumference at six months of age, BL6: Body length at 6 months of age, HT6: Wither height at six months of age, W9: Live body weight at 9 months of age, W12: Live body weight at 12 months of age.

روش استخراج نمکی<sup>۱</sup> تغییر یافته انجام گردید. براساس نقشه ژنتیکی نشانگرهای ریزماهورهای<sup>۲</sup> گوسفند (<http://rubens.its.unimelb.edu.au/%7E> Ejillm/jill.htm)، ۶ نشانگر ریزماهوره انتخاب گردیدند (جدول ۲).

از تمامی پنج والد نر و نتاجشان از طریق رگ گردن و به وسیله لوله‌های خلاء حاوی EDTA خون‌گیری به عمل آمد. نمونه‌های خون بلافاصله روی یخ برده شد و به آزمایشگاه انتقال یافتند. استخراج DNA از خون کامل با استفاده از یک

جدول ۲- مشخصات کلی نشانگرهای ریزماهورهای به کار گرفته در پژوهش کنونی.

Table 2- Characteristics of the microsatellites markers used in this study.

ردیف نشانگر	نام نشانگر	اندازه‌ی مورد انتظار (bp)*	موقعیت نشانگر** (cM)	متوسط تعداد باز دو آغازگر (F&R)	متوسط دمای ذوب (°C)
Marker row	Marker name	Expected size (bp)*	Marker location (cM)	Average number of primers base pairs (F & R)	Average melting temperature (°C)
P1	INRA011	203-239	200.6	24	64.4
P2	MCM137	63-111	221.7	23	60.7
P3	MCM130	131-159	244.5	21	61.1
P4	LSCV105	228-278	254	24	56.9
P5	MAF4	260-288	279.5	22	62.1
P6	DIK5034	173	304.5	20	58.3

\*Base pair (جفت باز)، \*\*موقعیت نشانگر روی کروموزوم شماره ۱ گوسفند.

۳ اجزاء مخلوط واکنش، مقدار و غلظت نهایی آنها در واکنش ارائه شده است.

ریزماهورهای انتخاب شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شدند. در جدول

جدول ۳- تکثیر DNA در مخلوط واکنش PCR.

**Table 3- DNA amplification in 20 microliter volume of the PCR reaction.**

مواد واکنش	غلظت	مقدار	غلظت نهایی در واکنش
Reaction reagents	Concentration	Amount	Final concentration in reacion
PCR Buffer	10X	2 $\mu$ l	1X
DNTPs	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Primer mix	5 $\mu$ M	1.3 $\mu$ l	0.32 $\mu$ M
Taq DNA polymerase	5 U/ $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l
Mgcl2	5 $\mu$ M	0.6 $\mu$ l	1.5 $\mu$ M
ddH <sub>2</sub> O	-	11.85	-
DNA	16.6 ng	3 $\mu$ l	50 ng

در مرحله اول، پنج والد نر برای هر ۶ نشانگر 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 ۶ نشانگری که کار رفته در این پژوهش نشانگر DIK5034 هیچ تکثیری نداد و پنج نشانگر دیگر یعنی INRA011، MCM137، MCM130، LSCV105، MAF4 تکثیر شدند که از این میان نرهای اول و چهارم روی نشانگر ۱، نرهای اول، دوم، سوم و پنجم روی نشانگر ۲، نرهای سوم و چهارم روی نشانگر ۳، نرهای اول، دوم، سوم و چهارم روی نشانگر ۴ و نرهای اول، دوم، سوم و چهارم روی نشانگر ۶ هتروزیگوت بودند. سپس تمامی نتایج مربوط، برای این نشانگرها تعیین ژنوتیپ شدند.

مراحل واسرشته‌سازی اولیه، واسرشته‌سازی، اتصال آغازگر به رشته‌ی الگو و بسط توسط پلی‌مراس و همچنین تعداد چرخه‌های به کار رفته در آزمایش که در یک دستگاه ترموسایکلر اپندورف و با برنامه‌ی TouchDown انجام شدند، در جدول ۴ آمده است. مزیت استفاده از روش Touch Down این است که به دلیل آن که دمای اتصال پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش با یکدیگر متفاوت بودند، از یک دامنه‌ی دمای اتصال پرایمر به رشته الگو استفاده گردید. این کار تا حدودی از ایجاد نوارهای غیراختصاصی می‌کاهد، این نوارها در چرخه‌های عادی PCR باعث بروز مشکلاتی در امتیازبندی می‌شوند (Don et al, 1991). محصولات PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶٪ واسرشته‌ساز، الکتروفورز شدند و باندها با رنگ-آمیزی با نیترات نقره، قابل مشاهده شدند.

جدول ۴- برنامه‌ی Touch Down برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR).

Table 4-Touch Down program for polymerase chain reaction (PCR).

تعداد چرخه Number of cycles	دما Temperature	مدت زمان مرحله (دقیقه) Time (minute)	نام مرحله Cycle step
-	94 °C	5	واسرشته‌سازی اولیه Initial denaturation
7	94 °C	1	واسرشته‌سازی Denaturation
	56 °C -62 °C	1	اتصال آغازگر به رشته‌ی الگو Annealing to the DNA template
	72 °C	2	بسط توسط پلیمرز Extension by polymerase
30	94 °C	1	واسرشته‌سازی Denaturation
	56 °C	1	اتصال آغازگر به رشته‌ی الگو Annealing to the DNA template
	72 °C	2	بسط توسط پلیمرز Extension by polymerase
-	72 °C	10	بسط نهایی Final extension
-	4 °C	-	نگهداری Storage

در این پژوهش، جنسیت، سال تولد، سن مادر و تیپ تولد به عنوان اثرات ثابت در نظر گرفته شدند. اثرات ثابت مدل آماری برای تصحیح صفات فنوتیپی شامل جنسیت، سال تولد، سن مادر و تیپ تولد مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین، صفت وزن میش هنگام زایش به‌عنوان متغیر کمکی در نظر گرفته شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آنالیز GridQTL و در دو مرحله صورت گرفت (Seaton *et al*, 2006). در ابتدا هر یک از خانواده‌ها به صورت مجزا مورد آنالیز قرار گرفتند و در

این کار برای تشکیل فایل ژنوتیپی الزامی بود. برای تشخیص QTL در یک طرح خانواده ناتنی باید QTL حداقل در یکی از خانواده‌ها تفرق حاصل نماید. از ۵ خانواده‌ای انتخاب شده QTL در هر ۵ خانواده تفرق پیدا کرد. بطور کلی برای اینکه یک والد اطلاعات مفیدی برای آنالیز QTL فراهم نماید باید هم در جایگاه QTL و هم در جایگاه نشانگر هتروزیگوت باشد (Esmailizadeh *et al*, 2008).



موقعیت های ۲۵۲/۶ و ۲۲۳/۶ سانتی مورگان و در خانواده‌ی چهارم، QTL معنی دار ( $P < 0.01$ ) مرتبط با وزن یک ماهگی (W1) در موقعیت ۲۵۴/۶ سانتی مورگان شناسایی شدند. نزدیک‌ترین نشانگرها به این QTL صفات فوق به ترتیب نشانگرهای INRA011، MCM137 و LSCV105 بودند. در بین QTL های شناسایی شده مربوط به W1 در خانواده چهارم و صفت WW در خانواده سوم به ترتیب با اثرات ۲۵ و ۲۴ بیشترین سهم از میانگین این صفات در خانواده های ذکر شده را پوشش داده اند. از طرف دیگر QTL شناسایی شده WW در خانواده ۳ و W1 در خانواده ۲ به ترتیب با ۶/۷۱ و ۵/۴۸ بیشترین اثر را به خود اختصاص دادند.

در مرحله‌ی آخر، یک آنالیز نهایی (جدول ۶) بر روی تمامی خانواده‌ها به منظور تخمین دقیق-تر موقعیت QTL بر روی کروموزوم ۱ انجام گردید. به منظور برآورد دقیق تر موقعیت QTL روی کروموزوم ۱ در جمعیت مورد بررسی، آنالیز همزمان روی داده های حاصل از تمام خانواده ها انجام گردید. نتایج حاکی از مکان‌یابی QTL برای صفت وزن یک ماهگی (W1) در فاصله موثر صفت مورد بررسی ۲۵۴/۶ سانتی مورگان در سطح ( $P < 0.05$ ) بود (جدول ۶ و شکل ۱) که با نشانگر LSCV105 پیوستگی دارد.

مرحله‌ی بعد برای دقت بیشتر، آنالیز بر روی کلیه‌ی خانواده‌ها (پنج خانواده) انجام گردید. پس از استنباط هاپلوتیپ‌های به ارث رسیده از طریق والد نر، از روش نقشه‌یابی درون فاصله‌ای مبتنی بر رگرسیون ساده برای آنالیز QTL استفاده گردید (Knott *et al*, 1996). درون هر خانواده‌ی ناتنی، وجود QTL در فواصل ۱cM در طول کروموزوم، برازش گردید و آستانه‌های معنی‌دار کروموزومی<sup>۱</sup> در سطوح ۰.۵٪ و ۱٪ با استفاده از روش آزمون تبدیل<sup>۲</sup> محاسبه شدند (Churchill and Doerge, 1996). برای تعیین فاصله اطمینان تقریبی برای موقعیت های QTL شناسایی شده، از یک روش بوت استراپ که نوعی نمونه گیری از جمعیت با جایگزینی است استفاده شد (Visscher *et al*, 1996).

## نتایج و بحث

خلاصه‌ی نتایج آنالیز QTL در حالتی که خانواده های دوم، سوم و چهارم بطور مجزا مورد آنالیز قرار گرفت در جدول ۵ آورده شده است. در خانواده دوم، QTL معنی دار ( $P < 0.05$ ) مربوط به صفت وزن یک ماهگی (W1) در موقعیت ۲۱۰/۶ سانتی مورگان، در خانواده سوم، QTL معنی دار ( $P < 0.05$ ) مربوط به صفات وزن یک ماهگی (W1)، و وزن شیرگیری (WW) به ترتیب در

<sup>2</sup> Permutation Test

<sup>1</sup> Chromosome wide threshold



جدول ۵- خلاصه‌ی نتایج آنالیز QTL در خانواده‌های دوم، سوم و چهارم (به تفکیک) روی کروموزوم شماره ۱ گوسفند لری بختیاری.

Table 5- Summary of QTL analysis results for families 2, 3 and 4 on chromosome 1 of Lori-Bakhtiari sheep.

صفت	موقعیت (cM)	فاصله‌ی اطمینان <sup>a</sup>	خانواده	های پدری (S.E)	اثرات QTL <sup>b</sup>	آماره F	نشانگر <sup>c</sup>
Trait	Location (cM)	Confidence interval	Family	QTL Sire allele effect (S.E.) (kg)	QTL effects <sup>b</sup>	F statistics	Marker <sup>c</sup>
W1	210.6	-	2	5.48(1.87)	11.2	8.56*	INRA011
W1	252.6	-285.6	3	2.43(0.77)	14	9.79*	LSCV105
WW	223.6	-	3	6.71(2.28)	24	8.62*	MCM137
W1	254.6	214.6-274.6	4	4.49(1.12)	25	19.27**	LSCV105

<sup>a</sup>فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪ برای موقعیت QTL براساس آزمون بوت استراپ بر حسب سانتی‌مورگان، <sup>b</sup>اثر QTL به صورت درصدی از میانگین صفت، نزدیک‌ترین نشانگر به QTL، \* و \*\* به ترتیب اثر معنی‌دار QTL در سطح ۵ و ۱ درصد در سطح کروموزوم.

<sup>a</sup>Confidence interval (cM) of the QTL location based on bootstrap resampling, <sup>b</sup>QTL effect as percentage of the trait mean, <sup>c</sup> closest marker to the QTL location, \*, \*\* significance of QTL effect at chromosome-wide 5 and 1% levels.

وزن یک ماهگی (W1) در جمعیت گوسفند نژاد لری بختیاری بر روی کروموزوم ۱ یافت شد. محتمل‌ترین موقعیت QTL در هر دو مرحله‌ی آنالیز تقریباً ثابت بود که در هر مرحله فواصل اطمینان متفاوتی به دست آمده است. نتایج مرحله‌ی آخر آنالیز که شامل کلیه‌ی خانواده‌ها بود، قابلیت اعتماد بیشتری دارد.

این اثری بین ۵/۷۸٪ (در خانواده ۱) تا ۱۵/۳٪ (در خانواده ۵) از این صفت را پوشش می‌دهد. با انجام آنالیز انفرادی روی خانواده‌ها، QTL مرتبط با صفات W1 و WW بر روی کروموزوم ۱ یافت شد ولی با انجام آنالیز کامل خانواده‌ها (به طور توأم) اثر QTL برای صفت WW معنی دارنشده و در مجموع در هر دو مرحله آنالیز صورت گرفته، یک QTL مرتبط با صفت

جدول ۶- خلاصه‌ی نتایج آنالیز QTL روی کلیه‌ی خانواده‌های مورد مطالعه.

Table 5- Summary of QTL analysis results for all of the studied families.

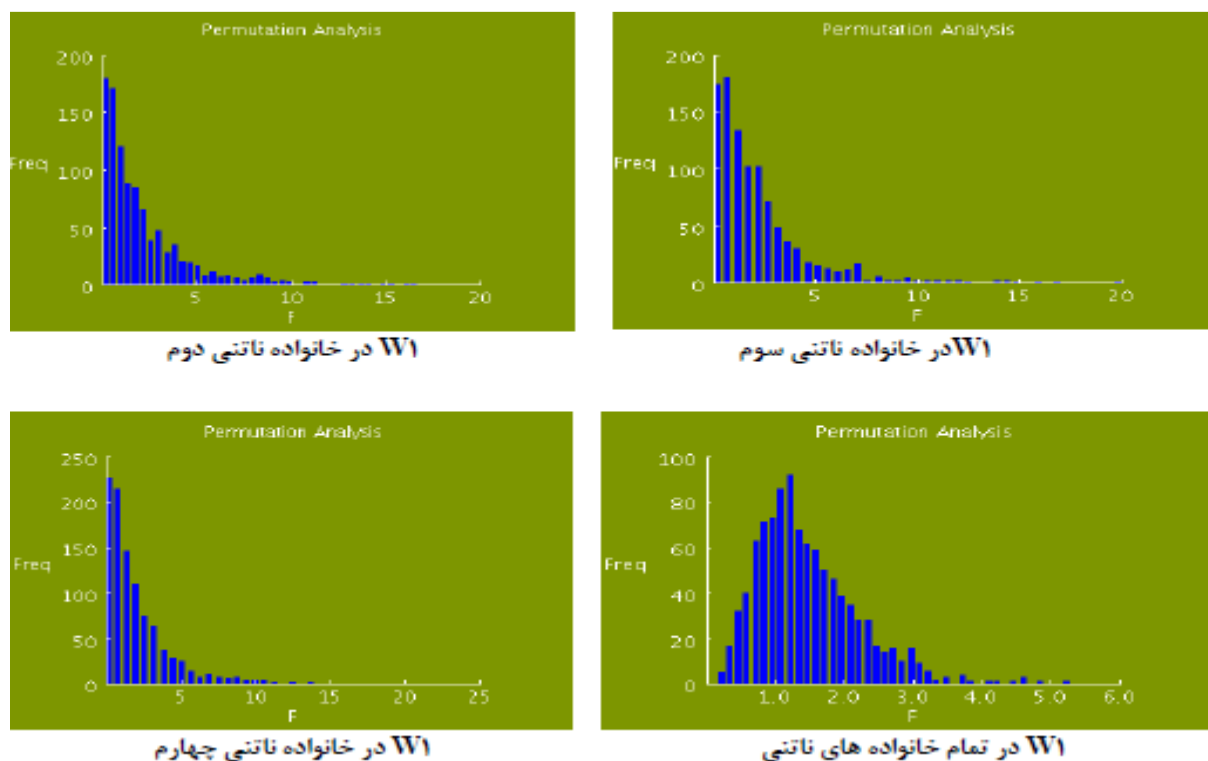
نشانهگر <sup>c</sup>	آماره F	اثرات QTL <sup>b</sup>	اثر QTL های پدری (S.E.)	خانواده	فاصله‌ی اطمینان <sup>a</sup>	موقعیت (cM)	صفت
Marker <sup>c</sup>	F statistics	QTL effects <sup>b</sup>	QTL Sire allele effect (S.E.) (kg)	family	Confidence interval	Location (cM)	Trait
LSCV105	2.99*	5.78	0.97(1.18)Kg	1	200.6-263.6	254.6	W1
LSCV105	2.99*	6.97	1.17(1.03)Kg	2	200.6-263.6	254.6	W1
LSCV105	2.99*	6.97	1.17(1.81)Kg	3	200.6-263.6	254.6	W1
LSCV105	2.99*	7.33	1.23(4.23)Kg	4	200.6-263.6	254.6	W1
LSCV105	2.99*	15.3	2.58(1.91)Kg	5	200.6-263.6	254.6	W1

<sup>a</sup>فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪ برای موقعیت QTL براساس آزمون بوت استراپ بر حسب سانتی‌مورگان، <sup>b</sup>اثر QTL به صورت درصدی از میانگین صفت، نزدیک‌ترین نشانگر به QTL، \* و \*\* به ترتیب اثر معنی‌دار QTL در سطح ۵ و ۱ درصد در سطح کروموزوم.

<sup>a</sup>Confidence interval (cM) of the QTL location based on bootstrap resampling, <sup>b</sup> QTL effect as percentage of the trait mean, <sup>c</sup> closest marker to the QTL location, \*, \*\* significance of QTL effect at chromosome-wide 5 and 1% levels.

را روی کروموزوم های ۱، ۳ و ۶ در گوسفند کرمانی شناسایی کرد. نتایج پژوهش Kmiec (1999) نشان داد که ژن ترانسفرین روی کروموزوم ۱ روی صفت رشد تأثیرگذار بوده است. در پژوهش دیگری با استفاده از یک جمعیت گوسفند مربوط به دو نژاد سافولک و تکسل، ارتباط بخش‌هایی از ژنوم گوسفند را با صفات رشد و لاشه مورد بررسی قرار داده و تعدادی QTL مؤثر بر این صفات شناسایی شده است.

با توجه به اینکه صفات مورد مطالعه در این تحقیق با یکدیگر همبستگی بالایی دارند و همگی صفات مربوط به رشد می‌باشند، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً ژن یا ژن‌هایی در این ناحیه از ژنوم قرار دارند که با رشد در مراحل مختلف زندگی در گوسفند نژاد لری بختیاری مرتبط می‌باشند. در پژوهش‌های پیشین بر روی کروموزوم ۱ گوسفند، QTL مرتبط با رشد و صفات لاشه شناسایی شده‌اند. در پژوهشی Esmailizadeh (2010) QTL معنی‌دار مؤثر بر صفت وزن تولد



شکل ۱- نتایج آزمون تبدیل در سطوح ۵٪ و ۱٪ برای صفت W1 در آنالیز انفرادی بر روی خانواده‌های دوم، سوم، چهارم و به صورت توأم در تمام خانواده‌ها.

**Figure 1-** Permutation test results for the individual (2, 3 and 4 families) and across families' analyses on 5% and 1% significant levels obtained for W1.

نشانه‌گرهای BM4129 و BMS1789 و سه QTL مؤثر بر سرعت رشد از تولد تا ۴۳ هفتگی، ۴۳ هفتگی تا ۵۶ هفتگی و ۵۶ هفتگی تا ۸۳ هفتگی به ترتیب در موقعیت‌های ۱۱۸، ۳۵۷ و ۳۵۷ سانتی مورگان روی کروموزوم یک به ترتیب در نزدیکی نشانه‌گرهای BM4129 و BMS1789 شناسایی شده است. QTL شناسایی شده برای وزن یک ماهگی نژاد لری-بختیاری در پژوهش حاضر در دامنه این QTL های گزارش شده قرار داشت (جدول ۶).

در این مطالعه QTL های مؤثر بر صفت رشد بر روی کروموزوم های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۱، ۱۸ و ۲۰ قرار داشتند که در نژاد سافولک تعداد QTL مؤثر بر صفات عمق ماهیچه، عمق ماهیچه تصحیح شده برای وزن زنده و وزن بدن در ۲۰ هفتگی به ترتیب در موقعیت‌های ۲۲۶، ۲۲۳ و ۳۰۶ سانتی مورگان روی کروموزوم ۱ شناسایی شده اند. در مطالعه (Raadsma *et al*, 2009) دو QTL مؤثر روی وزن بدن در ۴۳ هفتگی و ۸۳ هفتگی به ترتیب در موقعیت‌های ۱۱۷ و ۳۵۷ سانتی مورگان روی کروموزوم ۱ و در نزدیکی

تشکیل جمعیت نقشه یابی استفاده می شود، چون آمیخته های حاصل از نژادهای مورد استفاده در نسل والدین برای تعیین ژنوتیپ به کار می روند، امکان ردیابی QTL شناسایی شده و انتساب آن به یکی از نژادهای مورد استفاده وجود ندارد اما در طرح هایی که از یک نژاد استفاده می شود با اطمینان می توان از QTL شناسایی شده در جهت اهداف اصلاحی در نژاد مورد نظر استفاده کرد.

اگرچه در این پژوهش، روش آنالیز پیوستگی برای تحلیل مولکولی صفات کمی مورد استفاده قرار گرفت، اما با توجه به پیشرفت های جدید در فن آوری DNA بخصوص ایجاد نقشه ژنتیکی متراکم مبتنی بر چندشکلی های تک نوکلئوتیدی<sup>۱</sup> و تکنیک های آماری جدید مانند روش های مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی<sup>۲</sup>، امکان تحلیل دقیق تر صفات کمی و توسعه آزمون های مختلف ژنتیکی مرتبط با صفات کمی دارای مکانیسم توارثی پیچیده، بوجود آمده است. مزیت مهم روش LD این است که نیاز به طرح آزمایشی از پیش تعیین شده نداشته و مبتنی بر عدم تعادل موجود در جمعیت بوده و می توان از حیواناتی که بطور معمول در برنامه های اصلاح نژادی تعیین فنوتیپ می شوند، استفاده نمود. لذا پیشنهاد می شود که در پژوهش های آینده از این فن آوری ها برای نقشه یابی QTL در نژاد لری بختیاری استفاده گردد.

نتایج این پژوهش نشان داد که QTL شناسایی شده در تمامی خانواده ها تفرق حاصل نمی کرد که این موضوع بیانگر ماهیت جوامع دامی است که متفاوت از جمعیت های خالص می باشند. نتایج این پژوهش حاکی از عدم تفرق QTL های شناسایی شده در تمامی خانواده های مورد بررسی است (جدول ۵) که با توجه با ماهیت ناخالص بودن جمعیت های دامی، این موضوع قابل توجیه است. چرا که برخلاف جمعیت های خالص (مانند لاین های گیاهی خالص شده)، در جمعیت های ناخالص امکان عدم تفرق QTL ها در برخی از خانواده ها وجود دارد. علاوه براین، کاهش میزان اطلاعات مفید نشانگرها<sup>۱</sup> (IC) می تواند 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 ی دورتری قرار دارند، استنباط شده است. عواملی همچون تعداد افراد فاقد ژنوتیپ و عدم تساوی تفرق آلل های مختلف نشانگر می توانند بر IC تأثیر بگذارد (Esmailizadeh et al, 2008). از آنجا که این پژوهش در داخل یک نژاد (نه یک جمعیت آمیخته حاصل از تلاقی نژادها) انجام شده است، لذا نتایج این پژوهش می تواند در برنامه های اصلاح نژادی گوسفند لری بختیاری به کار گرفته شوند که مزیت آن افزایش پیشرفت ژنتیکی خواهد بود. زمانی که از تلاقی بین نژادهای مختلف برای

<sup>1</sup> Information Content

۱- SNPs

۲-Linkage Disequilibrium (LD)

## منابع

- Asadi-Khoshoei E (1999). Estimation of genetic and environmental parameters and production traits in sheep to determine the appropriate selection criterion Lori-Bakhtiari. Ph.D Thesis. Faculty of Agriculture, TarbiatModarres University, Tehran (In Farsi).
- Cockett NE, Jackson SP, Snowden GD, Shay TL, Berghmans S, Beaver JE, Carpenter C, Georges M (1996). Polar over dominance at the callipyge locus in sheep. *Science* 273: 236-238.
- Doerge RW, Churchill GA (1996). Permutation test for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142: 285-294.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Mattick JS (1991). Touch down PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19: 4008.
- Esmailzadeh A, Mohammadabadi MR, Asadi-Fozy (2008). Mapping genomic regions controlling quantitative traits in domestic animals using simple regression. *Iranian Journal of Animal Science* 39: 93-83 (In Farsi).
- Esmailzadeh, AK (2010). A partial genome scan to identify quantitative trait loci affecting birthweight in Kermani sheep. *Small ruminant research* 94: 73-78.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996). *Introduction to Quantitative genetics*. Ed. Longman, 4 Ed. Chap. 21.
- Freking BA, Murphy SK, Wylie AA, Rhodes SJ, Keele JW, Leymaster KA, Jirtle RL, Smith TPL (2002). Identification of the single base change causing the Callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar over dominance in mammals. *Genome Research* 12: 1496-1506.
- Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmansh A, Asadzadeh N (2008). Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics* 44: 495-497.
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh Koshkoieh A, Moradi-Shahrehabak H, Ansari Namin S (2015a). Study of mutations available in first-half exon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep born from crossing of Romanov rams with Kermani ewes. *Iranian Journal of Animal Science Research* 6: 395-403 (In Farsi).
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Moradi H, Esmailzadeh AK, Ansari NS (2015b). Identify of G→A point mutation at positions 477 and 721 in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Modern Genetics* 10: 261-268 (In Farsi).
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Moradi-Shahrehabak H, Esmailzadeh Koshkoieh A (2016a). Identification of available mutations in the first-half (from 5' end) of exon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep from crossing of Romanov and Lori-Bakhtiari breeds. *Animal Production Research* 4: 15-26 (In Farsi).
- Khodabakhshzadeh R., Mohammadabadi MR, Esmailzadeh Koshkoieh A, Moradi-Shahrehabak H, Bordbar F, Ansari Namin S (2016b). Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 19: 281-289.

- Kniec M (1999). Transferrin Polymorphism versus Growth Rate in Lambs, Polish Long-wool Sheep. II. Analysis of relation between transferrin polymorphism of lamb blood serum versus growth rate of lambs up to age of 5 months. *Archiv Fur Tierzucht*, 42: 469-480.
- Knott SA, Elsen JM, Haley CS (1996). Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 71-80.
- McRae AF, Bishop SC, Walling GA, Wilson AD, Visscher PM (2005). Mapping of multiple quantitative trait loci for growth and carcass traits in a complex commercial sheep pedigree. *Animal Science*, 80: 135-141.
- Mohammadabadi MR, Sattayimokhtari R (2013). Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in kermani sheep. *Slovak Journal of Animal Science* 46: 45-51.
- Mousavizadeh A, Mohammadabadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi, Esmailizadeh AK (2009). Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology* 7: 51-53.
- Raadsma HW, Thomson PC, Zenger KR, Lam MK, Jonas E, Cavanagh C, Jones M, Attard G, Palmer D, and Nicholas FW (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.
- Seaton G, Hernandez J, Grunchev JA, White I, Allen J, De Koning DJ, Knott S (2006, August). GridQTL: a grid portal for QTL mapping of compute intensive datasets. In *Proceedings of the 8th world congress on genetics applied to livestock production (Vol. 2006, p. 27)*. Belo Horizonte Brazil.
- Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N, Dayani O (2009). Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. *Animal Science Reserches* 19: 81-89 (In Farsi).
- Visscher PM, Thompson R, Haley CS (1996). Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics*, 143: 1013-1020.
- Walling GA, Visscher PM, Willson AD, McTeir BL, Simm G, Bishop SC (2004). Mapping of quantitative trait loci for growth and carcass traits in commercial sheep populations. *Journal of Animal Science*, 82: 2234-2245.
- Weller JI (2001). *Quantitative trait loci analysis in animals*. CABI Publishing, London.
- Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Research* 132: 123-127.

**Mapping loci affecting live weight and body size in Lori-Bakhtiari sheep using paternal half-sib design and identification of biomarkers linked to growth rate**Asadi-khoshoei E.<sup>1</sup>, Horiat R.<sup>2</sup>, Houshmand S.<sup>3</sup>, Esmailizadeh A.<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor, Department of animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

<sup>2</sup> Graduate M. Sc. degree, Department of animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

<sup>3</sup> Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

<sup>4</sup> Professor, Department of animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

**Abstract**

The aim of this study was to map loci affecting live weight and body size in Lori-Bakhtiari sheep and identification of biomarkers linked to growth rate in sheep. Quantitative trait loci (QTL) linkage analysis in a Lori-Bakhtiari sheep population was conducted using the regression-based interval mapping method. The mapping population consisted of 162 animals related to 5 paternal half families. Phenotypic data were measurements of birth weight (BW), weight at one month of age (W1), weaning weight (WW), weight at six months of age (W6), chest circumference (HG6), body length (BL6), wither height at six months of age (HT6), weight at nine months of age (W9) and yearling weight (W12). Five sires and their progeny were genotyped for microsatellite markers in a candidate region on sheep chromosome 1. Data were analyzed in two phases, individual family analysis and combined family's analysis using a single-QTL model. Analysis based on individual families revealed QTL related to W1 (210.6 cM), near INRA011 marker segregating in the second family. In the third family, QTL affecting W1 and WW were identified at 252.6 and 223.6 cM, nearby MCM137 and LSCV105 markers, respectively. In addition, in the fourth family, a QTL underlying W1 was detected at 256.6 cM near LSCV105 marker. Combined analysis of all the families resulted to the identification of a QTL associated with W1 at position 254.6 cM relative to the centromere near the LSCV105 marker. There were two strong candidate genes close to the location of the detected QTL, the transferrin and PIT1 genes, thus these genes may account for the observed QTL effects for growth traits in Lori-Bakhtiari sheep.

**Keywords:** *Growth traits, Sheep, half-sib family, microsatellite markers, QTL.*

\* Corresponding Author: Esmailizadeh, A.

Tel: 09395529730

Email: aliesmaili@uk.ac.ir



