



تولیات دامی

دوره ۱۹ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۶

صفحه‌های ۴۵-۳۳

پویش ژنومی سندرم آسیت در نسل F2 حاصل از تلاقی مرغ بومی آذربایجان غربی و لاین گوشتی آرین

حسین عمرانی^۱، رسول واعظ ترشیزی^{۲*}، علی‌اکبر مسعودی^۳، علیرضا احسانی^۳

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران

۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران

۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۱۲

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲

چکیده

سندرم آسیت بیماری متابولیکی پرهزینه‌ای است که به دلیل انتخاب شدید برای سرعت رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی در طیور اتفاق می‌افتد. این سندرم یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در صنعت جوجه گوشتی است و عامل خسارات قابل توجه اقتصادی و کاهش آسایش حیوان است. در این تحقیق به منظور یافتن ژن و نواحی ژنومی مؤثر بر سندرم آسیت، مطالعه پویش کل ژنوم (GWAS) با استفاده از یک تراشه SNP 60k ژنوم مرغ در ۱۰۱ پرنده نسل F2 حاصل تلاقی دوطرفه مرغ بومی آذربایجان غربی و سویه گوشتی آرین انجام شد. از روش آماری بهترین پیش‌بینی نا اریب خطی (GBLUP) جهت بررسی ارتباط SNP ها با صفات مرتبط با آسیت استفاده شد. بر روی کروموزوم هفت چندین SNP برای صفت نسبت بطن راست به کل بطن به عنوان شاخص آسیت، به سطح احتمال پیشنهادی ($10^{-5} \times 8/253$) رسیدند. دو SNP پیشنهادی در داخل ژن CCDC141 و OSBPL6 واقع شدند که بیشتر به عنوان ژن‌های مؤثر بر نارسائی‌های قلبی در انسان گزارش شده بودند. این ناحیه ژنومی (۱۴۶۰۲۷۲۳-۱۲۷۴۵۵۶۱) بر روی کروموزوم هفت شامل ژن‌های متعددی است که در انسان بر روی هایپرتروفی عضله قلب، ضربان قلب و بیماری‌های قلبی تأثیر دارند. انتخاب برای مقاومت به آسیت در جوجه‌های گوشتی با استفاده از این یافته‌ها، باعث تسریع در پیشرفت ژنتیکی خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: بطن، پویش ژنومی، جوجه، ژن کانیدیا، سندرم آسیت

مقدمه

روش انتخاب مرسوم بر اساس ارزش‌های فنوتیپی جوجه‌های گوشتی، سرعت رشد و تولید گوشت را در چند دهه گذشته به‌طور قابل توجهی افزایش داده است. با این وجود به دلیل همبستگی منفی بین صفات تولیدی و صفات شایستگی، امروزه متخصصین اصلاح نژاد طیور، به دلیل مشکل بودن انتخاب ژنتیکی برای بهبود همزمان صفات تولیدی و صفات شایستگی، با چالش‌های جدیدی مواجه هستند، بنابراین انتخاب به کمک ژن و نواحی ژنومی مؤثر بر صفات تولیدی برای افزایش بازده انتخاب و بهبود عملکرد تولیدی مورد توجه قرار گرفته است.

در جوجه‌های گوشتی بهبود سرعت رشد بدن و عضلات از طریق انتخاب ژنتیکی با افزایش سرعت رشد اندام‌های احشایی همزمان نشده و توانایی پرنده به تغییرات دما کاهش یافته است [۹]. این امر باعث بروز بیماری‌هایی، از جمله سندرم آسیت شده است. سندرم آسیت یا "افزایش فشار ششی" در جوجه‌های گوشتی با رشد سریع اتفاق افتاده و ناشی از کمبود اکسیژن متابولیکی هست. به دلیل افزایش نیاز به انرژی هنگام رشد سریع و به‌خصوص در شرایط سرما، جوجه‌های گوشتی در رساندن اکسیژن کافی به گلوبول‌های قرمز خون که برای سوخت‌وساز متابولیسمی مورد نیاز است مشکل دارند. در نتیجه به علت هایپرتروفی بطن راست، قلب ضعیف می‌شود و ممکن است پرنده تلف شود. همچنین مرگ‌ومیر بالا در اثر آسیت به‌طور اجتناب‌ناپذیری می‌تواند مربوط به استفاده از جیره‌های پرانرژی باشد [۱۱]. در واقع بروز این بیماری به دلیل عدم توازن بین احتیاجات اکسیژن و توانایی سیستم قلبی عروقی در تأمین اکسیژن رخ می‌دهد. قلب، کبد و شش‌ها اندام‌های اساسی درگیر در این بیماری می‌باشند [۱۷]. پرنده‌ها به‌منظور تأمین اکسیژن مورد نیاز خود هماتوکریت خون را افزایش می‌دهند. تحقیقات نشان داده است میزان

هماتوکریت در یک تا دو هفته قبل از مرگ افزایش معنی‌داری می‌یابد [۲۵]. در گزارش‌های دیگر تفاوت معنی‌داری در میزان هماتوکریت جهت پیش‌بینی آسیت مشاهده نشده است [۲۴]. شاخص قلبی آسیت که به‌صورت نسبت بطن راست به کل بطن تعریف می‌شود به‌عنوان نشانگر قابل اطمینان آسیت ارائه شده است [۵ و ۲۰]. پرکاری بطن راست، مقاومت شش‌ها و افزایش فشارخون سرخرگ ششی باعث می‌شود که بطن راست به‌تدریج بزرگ شود و خون بیشتری در آن نگه داشته شود. در آزمایش‌های متعدد شاخص نسبت بطن راست به کل بطن در پرندگان مبتلا به سندرم آسیت نسبت به پرندگان سالم به‌طور معنی‌داری بالاتر بوده است [۹ و ۲۰]. مطالعات این نسبت را ۰/۲۵ تا ۰/۴ [۴] تا ۰/۲۸ گزارش نمودند [۲۰].

مطالعات متعددی به‌منظور یافتن ژن و نواحی ژنومی مؤثر بر آسیت انجام شده است. در تحقیقی که به‌منظور یافتن QTL های مؤثر بر صفات آسیت در نژاد پلیموت‌راک انجام شده است، سه QTL بر روی کروموزوم‌های دو، چهار و شش یافت شد [۲۲]. در مطالعه دیگری که از پویش ژنومی در نژاد پلیموت‌راک سفید در قالب طرح آمیزشی سه نسلی برای شناسایی جایگاه‌های ژنومی مرتبط با آسیت استفاده شد، تعداد ۶۷ جایگاه معنی‌دار مرتبط با صفت نسبت وزن بطن راست به کل بطن بر روی ۱۸ کروموزوم مرغ شناسایی شد [۴]. مطالعات نشان داده است طراحی یک جامعه F_2 به‌منظور انجام پویش ژنومی در مقایسه با یک جامعه تصادفی باعث کاهش نرخ کشف اشتباه کاذب و افزایش دقت نقشه‌یابی می‌شود [۱۴]. هدف از این تحقیق، یافتن نواحی ژنومی مؤثر بر بیماری آسیت در نسل F_2 حاصل از تلاقی دوطرفه خط B سویه گوشتی آرین و مرغ بومی آذربایجان غربی بود.

مواد و روش‌ها

با توجه با اینکه والدین انتخابی باید از نظر بسیاری از صفات مورد نظر اختلاف فنوتیپی داشته باشند، خط B سویه گوشتی آرین (حساس به آسیت) و مرغ بومی آذربایجان غربی (مقاوم به آسیت) انتخاب شدند. پرنده‌های والد از مرکز لاین بابل کنار و ایستگاه مرغ بومی آذربایجان تهیه و به دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. پرورش نسل والدین در قفس‌های انفرادی صورت گرفت و به دلیل سنگینی خروس آرین از تلقیح مصنوعی برای تولید تخم‌های نطفه‌دار استفاده شد. نسل اول (F₁) جوجه‌ها از آمیزش دو خروس با هشت مرغ به صورت دوطرفه (یک خروس به ازای چهار مرغ) ایجاد شد. برای ایجاد این نسل، ابتدا اسپرم هر خروس استحصال و به نسبت یک به پنج با شیر کم چرب رقیق شد. عمل تلقیح مصنوعی سه روز در هفته به مدت سه ماه انجام شد. پس از تلقیح مصنوعی، تخم‌های نطفه‌دار جمع‌آوری و وزن تخم‌مرغ‌ها و شماره مرغ مربوطه ثبت شد. به منظور تشخیص هویت و ثبت شجره جوجه‌های هیچ شده، تخم‌مرغ‌ها پس از تعیین نطفه‌داری، در داخل کیسه‌های توری قرار داده شد و سپس به دستگاه جوجه کشی منتقل شدند. در مجموع تعداد ۱۱۰ جوجه آمیخته در نسل اول تولید شدند. تمامی جوجه‌ها با استفاده از شماره پلاک زیر بال شماره‌گذاری شدند و پس از ثبت رکورد به سالن پرورش منتقل و تا پایان دوره در گروه‌هایی ۲۰ تایی در آشیانه‌هایی با دان خوری ناودانی و آب‌خوری سیفونی، روی بستر پرورش داده شدند. با مشاهده اولین تخم‌گذاری در هفته ۲۰ تعداد ۳۲ مرغ و شش خروس انتخاب و به سالن تولید منتقل شدند. در این سالن شش خانواده بر روی بستر در شش آشیانه جداگانه مجهز به تله تخم‌گذاری پرورش داده شد. آمیزش‌ها در این نسل به صورت جفت‌گیری طبیعی انجام گرفت. برای ایجاد نسل F₂ از دو

هیچ در مجموع ۱۱۲ پرنده تولید شد. جوجه‌های هیچ شده به سالن دیگری که دارای قفس‌های انفرادی مجهز به آب‌خوری نیپل و دان خوری انفرادی بود منتقل شدند. در طول این مدت پرندگان هیچ‌گونه واکنشی دریافت نمودند و در جیره آنها نیز آنتی‌بیوتیک استفاده نشد. این پرنده‌ها با سه جیره آغازین، رشد و پایانی به مدت ۱۲ هفته پرورش تغذیه و سپس کشتار شدند. ارزش هماتوکریت خون در هفته ۱۲ پرورش (یک روز قبل از کشتار) و نسبت بطن راست به کل بطن (RV/TV) اندازه‌گیری شد. در این مطالعه پرندگانی که نسبت بطن راست به کل بطن آنها بالاتر از ۰/۲۸ بود به عنوان پرنده آسیتی (بیمار=case) و در پرندگانی که این نسبت پائینتر از ۰/۲۳ بود به عنوان سالم (control) انتخاب شدند و از این نظر به پرندگان دو کد یک و دو تخصیص داده شد. بنابراین ۱۱ پرنده از ۱۱۲ پرنده تعیین ژنوتیپ شده که نسبت بطن راست به کل بطن در آنها بین ۰/۲۸ و ۰/۲۳ قرار گرفت از تجزیه نهائی حذف شدند و ۱۰۱ پرنده باقی ماند.

برای تعیین ژنوتیپ پرندگان، ابتدا نمونه‌های خون از افراد نسل F₂ تهیه و DNA ژنومی از نمونه‌های خون کامل به روش بهینه شده و تغییر یافته نمکی استخراج شد. نمونه‌های DNA با غلظت ۳۰۰ نانوگرم رقیق‌سازی و سپس لئوفیلیزه شدند و جهت تعیین ژنوتیپ با یک تراشه تجاری ژنوم مرغ (Illumina 60k SNP Beadchip) Chicken، به دانشگاه Aarhus دانمارک ارسال شد. این آرایه امکان تعیین ژنوتیپ همزمان حدود ۵۴۳۴۰ جایگاه تک نوکلئوتیدی را فراهم نمود. برای اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از ژنوتیپ در تجزیه و تحلیل نهائی مراحل مختلف کنترل کیفیت بر روی داده‌های اولیه به کمک نرم‌افزار PLINK 1.07 [۲۱] انجام شد. برخی از نشانگرها به دلیل انحراف از تعادل هاردی واینبرگ با P-value کمتر از ۱۰^{-۶}، فراوانی آلی نادر (MAF) کمتر از یک درصد و

رابطه (۱)

$$Y_{ijklmn} = \mu_i + C1_j + S_k + B_l + G_m + U_n + e_{ijklmn}$$

Y_{ijklmn} ارزش‌های فنوتیپی، μ_i میانگین جامعه، $C1_j$

سطح اول آزمون MDS، S_k اثر ثابت جنس، B_l اثر دو

نوبت جوجه‌کشی، G_m اثر ژنوتیپ SNP ها، U_n اثرات

تصادفی پلی ژنیک و e_{ijklmn} اثرات باقیمانده می‌باشد.

ساختار واریانس کوواریانس اثرات پلی ژنیک به صورت

$U_n \sim N(0, G\delta^2_a)$ می‌باشد که G ماتریس روابط

خویشاوندی ژنومی است [۳۲]. به منظور برآورد حد آستانه

P-value از سطح معنی‌داری پنج درصد بنفرونی استفاده

شد. ابتدا SNP های مستقل و بلوکهای لینکاژی بر اساس

SNP های اتوزومی و r^2 به میزان ۰/۴ برآورد گردید [۶،

۳۷]. در مجموع تعداد ۱۲۱۱۷ SNP مستقل و بلوک

لینکاژی بدست آمد. حد آستانه معنی‌داری P-value در

سطح پنج درصد بنفرونی $(0/05 / 12117) \times 10^{-6}$ ۴/۱۲۶

و سطح پیشنهادی $(1 / 12117) \times 10^{-5}$ ۸/۲۵۳ محاسبه

شد. نمودار سطح معنی‌داری در سطح ژنوم با استفاده از

گراف منهن تن توسط بسته qqman نرم افزار R 3.2.2

ترسیم گردید [۲۹]. الگو عدم تعادل پیوستگی نیز به

کمک نرم افزار Haploview v4.1 ترسیم گردید [۲].

نتایج و بحث

آماره‌های توصیفی رکوردهای فنوتیپی در جوجه‌های

نسل F_2 در جدول ۱ ارائه گردیده است.

ژنوتیپ از دست‌رفته بیشتر از پنج درصد، از داده‌ها حذف

شدند. به دلیل عدم استفاده از SNP های کروموزوم‌های

۳۱ تا ۳۸ در طراحی ریزآرایه مورد استفاده، تنها از

SNP های که مربوط به ۲۹ جفت کروموزوم (۲۸ جفت

کروموزوم غیرجنسی و یک جفت کروموزوم جنسی) و دو

گروه لینکاژی (LGE22 و LGE64) قرار داشتند، استفاده

شد. به منظور تصحیح اثر لایه‌بندی جمعیت (Population

Stratification)، آزمون سنجش چند بعدی (

Multidimensional scaling Analysis) MDS بر اساس

ماتریس همبستگی IBS (Identity-by-state matrix) در

نسل F_2 به کمک نرم‌افزارهای PLINK 1.07 و R3.2.2

انجام شد. ابتدا تعداد SNP های مستقل محاسبه گردید.

بدین منظور پالایش SNP های ۳۰ کروموزوم اتوزومی با

اندازه پنجره ۲۵ SNP، گام‌های پنج SNP و آستانه r^2 به

میزان ۰/۲ انجام و ماتریس IBS بر اساس این تعداد SNP

مستقل بدست آمد. در نهایت آزمون سنجش چند بعدی

(MDS) بر اساس ماتریس IBS محاسبه شد [۲۶، ۳۶].

به منظور بررسی ارتباط ژنوتیپ SNP ها با صفات

هماتوکریت و نسبت بطن راست به کل بطن (آسیت=case

و سالم = control) از مدل (۱) GBLUP و نرم‌افزار آنالیز

پویش ژنومی صفات پیچیده (GCTA) استفاده شد [۳۵].

اولین سطح نتیجه آزمون MDS به‌عنوان کووریت، اثر

جنس و نوبت جوجه‌کشی به‌عنوان اثر ثابت وارد مدل

(رابطه ۱) شد.

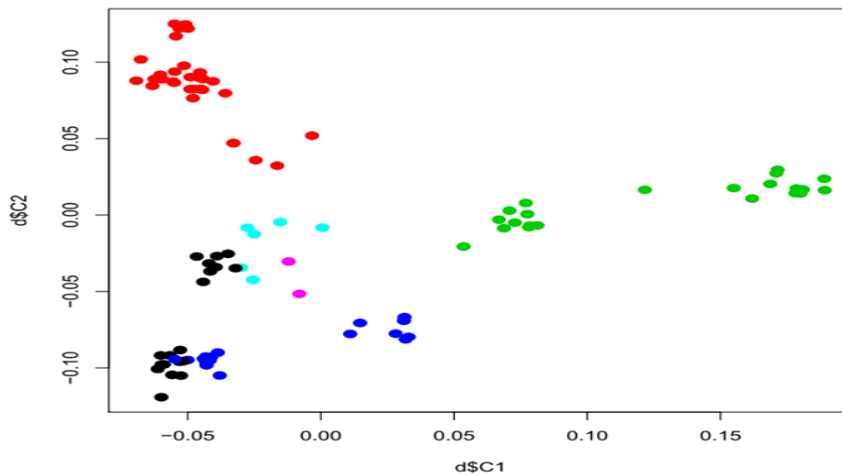
جدول ۱. آماره‌های توصیفی رکوردهای فنوتیپی در نسل F_2

ضریب تغییرات	حداکثر	حداقل	انحراف معیار	میانگین	صفت
۱۴/۲۲	۴۴	۲۰	۴/۴۶۵	۳۱/۳۹۸	هماتوکریت
۲۲/۴۲	۰/۳۱۳	۰/۱۱۳	۰/۰۴۵	۰/۲۰۲	نسبت بطن راست به کل بطن

پویش ژنومی سندرم آسیت در نسل F2 حاصل از تلاقی مرغ بومی آذربایجان غربی و لاین گوشتی آرین

جدول ۲. خصوصیات تراشه نشانگری استفاده شده در جوجه‌های نسل F2

۵۴۳۴۰	تعداد کل نشانگر قبل از کنترل کیفیت
۶۹۸۴	تعداد SNP ها با فراوانی آلل نادر کمتر از ۰/۰۱
۳۵۸	تعداد SNP ها با نرخ ژنوتیپ گم شده بیشتر از ۰/۰۵
۰	تعداد SNP ها خارج از تعادل هاردی-واینبرگ
۲۸۴۲	تعداد SNP ها واقع شده بر روی کروموزوم Z
۴۷۰۶۰	تعداد SNP ها بعد از کنترل کیفیت
۰	تعداد افراد با نرخ ژنوتیپ از دست رفته بیشتر از ۰/۰۵



شکل ۱. تعیین ساختار جمعیت با آزمون سنجش چندبعدی (MDS). خانواده‌های ناتنی بارنگ‌های مشابه نشان داده شده اند

افراد هر خانواده ناتنی تا حدودی در داخل کلاسترهای مجزائی قرار گرفته‌اند.

طرح بیمار-شاهد از دیگر طرح‌های پویش ژنومی آسان‌تر است اما مهم‌ترین مشکل این طرح بحث لایه‌بندی جمعیتی است که ارزیابی در شناسائی تنوع ژنتیکی واقعی صفت مورد مطالعه (بیماری) که میزانی از تفاوت‌های ژنتیکی معنی‌دار بین گروه‌ها را نشان می‌دهد. ساختار جمعیتی و خویشاوندی می‌تواند نتایج یک مطالعه پویش ژنومی را با مشکل مواجه نماید. در نظر گرفتن آزمون سنجش چندبعدی رایج‌ترین روش در مد نظر قرار دادن لایه‌بندی

از مجموع ۵۴۳۴۰ SNP بکار رفته در تحقیق حاضر، تعداد ۴۷۰۶۰ SNP توانستند مراحل مختلف کنترل کیفیت را بگذرانند. خصوصیات تراشه نشانگری استفاده شده در جدول ۲ نشان داده شده است. همبستگی هماتوکریت با نسبت بطن راست به کل بطن ۰/۳۱ بود. محققین زیادی عدم ارتباط بین هماتوکریت و آسیت را گزارش کرده‌اند و نشان دادند هماتوکریت معیار مناسبی برای پیش‌بینی آسیت نمی‌باشد [۲۴،۳۱].

آنالیز سنجش چندبعدی با ۵۰۰۱ SNP مستقل از ۲۸ کروموزوم اتوزومی و دو گروه لینکاژی با $r^2=0/2$ انجام شد. دو سطح اول آزمون MDS (شکل ۱) نشان داد که

برای نسبت بطن راست به کل بطن (شاخص آسیت) معنی دار نشد. فقط اثر تعدادی از SNP ها بالاتر از سطح پیشنهادی $10^{-5} \times 8/253$ قرار گرفتند. برای صفت هماتوکریت اثر هیچ یک از SNP ها در سطح پنج درصد بنفرونی و سطح احتمال پیشنهادی معنی دار نشد لذا از ارائه گراف منهتن صرف نظر شده است.

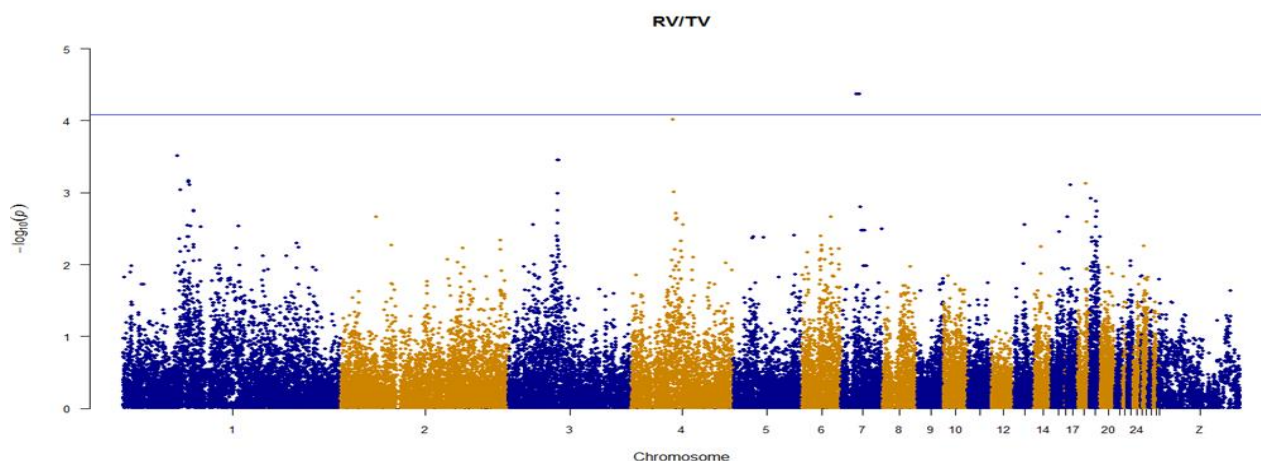
جمعیتی و خویشاوندی است که باعث کاهش نتایج مثبت کاذب می گردد. تحقیقات متعدد نشان داده است با انجام این آزمون افراد یک خانواده با همدیگر در یک کلاستر قرار می گیرند [۲۶].

با توجه به جدول ۳ و گراف منهتن ترسیم شده (شکل ۲) اثر هیچ یک از SNP ها در سطح پنج درصد بنفرونی

جدول ۳. جایگاه های با بیشترین p-value برای صفت نسبت بطن راست به کل بطن

کروموزوم	نام SNP	نوع آلل	موقعیت †	موقعیت ††	ژن مربوطه	فاصله ژن نسبت به SNP	P-value	$-\log_{10}(p)$
۷	Gga_rs15850655	C/T	۱۶۱۹۶۸۴۲	۱۴۶۰۲۷۲۳	CCDC141	داخل ژن	$4/29 \times 10^{-5}$	*۴/۳۷
۷	Gga_rs14610572	A/G	۱۶۵۴۴۳۲۶	۱۴۹۴۶۸۹۷	OSBPL6	داخل ژن	$4/29 \times 10^{-5}$	*۴/۳۷
۷	Gga_rs14609249	C/T	۱۴۳۲۴۶۰۳	۱۲۷۴۵۵۶۱	ICOS	۱۳۰ کیلوباز پایین دست	$4/29 \times 10^{-5}$	*۴/۳۷
۴	Gga_rs14453031	A/G	۳۸۴۶۴۸۰۰	۳۶۶۹۸۰۴۹	OPN4-1	داخل ژن	$9/61 \times 10^{-5}$	۴/۰۲
۱	Gga_rs13651675	C/T	۴۹۶۹۹۸۸۶	۴۷۶۸۵۴۲۱	CNOT4	داخل ژن	۰/۰۰۰۳۱	۳/۵۱

* جایگاه های یافت شده در سطح پیشنهادی. † موقعیت جایگاه ها بر اساس نقشه 2 Gallus gallus. †† موقعیت جایگاه ها بر اساس نقشه 4 Gallus gallus



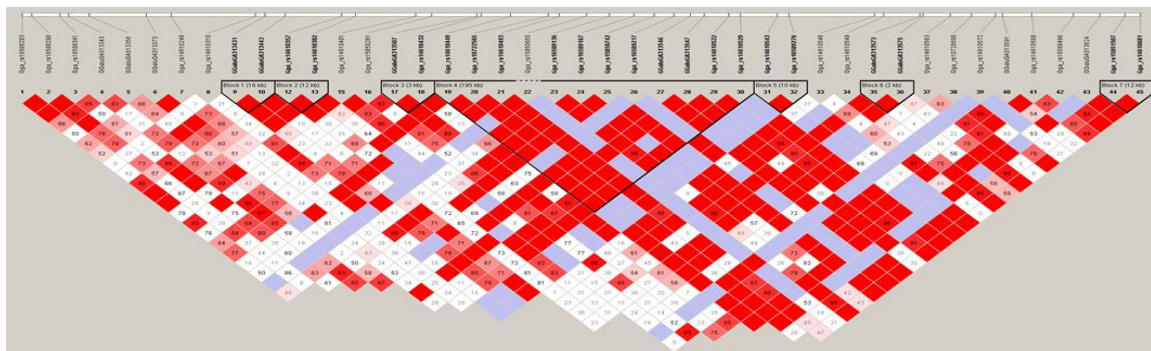
شکل ۲. گراف منهتن برای صفت نسبت بطن راست به کل بطن. در این پلات بر روی محور X موقعیت SNP ها بر روی کروموزوم های مختلف و محور Y ارزش منفی لگاریتم p-value های تصحیح نشده نمایش داده شده است. SNP هایی که دارای ارزشی بین ۴/۰۸۳ و ۵/۳۸۴ هستند جزو نشانگرهای پیشنهادی و ارزش های بالاتر از ۵/۳۸۴ نشانگرهای معنی دار در این صفت می باشند.

پویش ژنومی سندرم آسیت در نسل F2 حاصل از تلاقی مرغ بومی آذربایجان غربی و لاین گوشتی آرین

به منظور پویش ژنومی در ۱۸۱۱۷۱ فرد مبتلا به بیماری‌های قلبی در انسان به کمک آنالیز متا انجام گرفت، اثر جایگاه ژنی CCDC141 بر روی کروموزوم دو در موقعیت ۱۴۵۸۳۳۱۱-۱۴۶۴۰۹۱۳ بر روی ضربان قلب بسیار معنی دار بود [۱۰]. از طرفی در طیور بیشترین بیان این ژن در قلب دیده می‌شود که می‌تواند با عملکرد آن در این بافت مطابقت داشته باشد [۱۸].

آنالیز لینکاژ با تعریف گابریل نشان داد (شکل ۳) که عدم تعادل پیوستگی (LD) قوی بر روی کروموزوم هفت در اطراف ژن CCDC141 وجود دارد. این LD در یک فاصله ۱۹۵ کیلوبازی در دو طرف جایگاه CCDC141 تشکیل یک بلوک هاپلوئیدی را داده است. چندین بلوک دیگر در اطراف این بلوک وجود دارد. جایگاه‌های ژنی اطراف CCDC141 ژن‌هایی هستند که بر رشد و نمو قلب، تنظیم ضربان قلب و بیماری‌های قلبی تأثیر زیادی دارند.

اگرچه عملکرد ژن‌های مؤثر بر آسیت به خوبی مشخص نشده است؛ اما عوامل ژنتیکی مؤثر بر رشد و نمو، تنظیم قلب و شش‌ها از عوامل مؤثر بر آسیت می‌باشند [۲۲]. نتایج آنالیز پویش ژنومی برای صفت نسبت بطن راست به کل بطن (شاخص آسیت) سه جایگاه تک نوکلئوتیدی Gga_rs15850655، Gga_rs14609249 و Gga_rs14610572 را بر روی کروموزوم هفت در سطح احتمال پیشنهادی نشان داد. جایگاه Gga_rs15850655 در داخل ژن CCDC141 قرار دارد. این ژن در ساماندهی فیلامنت‌های اکتین، در فعالیت آنزیم فسفوریله کننده زنجیره سبک میوزین و در فعالیت آنزیم کیناز وابسته به پروتئین کالمودلین نقش اساسی دارد. این پروتئین یکی از مکانیسم‌های مولکولی است که ضربان سلول‌های قلبی را با کنترل حرکت سدیم در خارج از سلول‌ها تنظیم می‌کند و با یون کلسیم نیز در ارتباط است (۳۰). در تحقیقی که



شکل ۳. الگو عدم تعادل پیوستگی در جمعیت F2 حاصل از تلاقی مرغ بومی و لاین آرین در کروموزوم هفت در یک فاصله ۱۹۵ کیلوبازی در دو طرف جایگاه CCDC141.

قلب است. این ژن نقش کلیدی در خاصیت کشسانی^۱ عضلات قلب و مکانیسم فرانک- استارلینگ قلب دارد [۳۴ و ۶]. این ژن دارای دو ایزوفرم (N2B) و (N2BA)

ژن TTN در قسمت پایین دست، چسبیده به ژن CCDC141 در موقعیت ۱۴۶۴۵۹۳۳-۱۴۸۸۵۶۲۳ واقع شده است. در انسان ژن TTN مسئول هایپرتروفی عضله

¹ elasticity

معنی داری دارد [۳]. جایگاه Gga_rs14610572 در داخل ژن OSBPL (oxysterol binding protein-like-6 receptor) قرار دارد. این ژن مسئول تولید پروتئینی است که در نقل و انتقال لیپیدها و متابولیسم آنها نقش دارد. نقش این ژن در بیماری‌های قلبی و عروقی نیز تأیید شده است [۱۹].

جایگاه تک نوکلئوتیدی Gga_rs14609249 در موقعیت ۱۲۷۴۵۵۶۱ روی کروموزوم هفت بین دو ژن PARD3B و ICOS قرار گرفته است. در تحقیقی که به منظور یافتن نواحی ژنومی مؤثر بر ترکیبات بدن در نسل F₂ حاصل از تلاقی پلیموت‌راک سفید و یک نژاد بومی (Silkies Fowl) انجام شد، یک QTL روی کروموزوم هفت در منطقه‌ای بین ۱۲۹۸۰۲۳۲ - ۷۶۹۹۹۶۷ جفت بازی برای رشد و نمو قلب یافت شد [۷]. جایگاه Gga_rs14609249 در ICOS کاملاً منطبق بر این QTL می‌باشد. جایگاه ژنی ICOS در فاصله ۱۳۰ کیلو بازی پایین دست این SNP و داخل این QTL قرار دارد. نقش این ژن در هایپرتروفی و نارسائیهای قلبی در انسان مشخص شده است [۱۵].

در تحقیقی از پویش کل ژنوم در نژاد پلیموت‌راک سفید در قالب طرح آمیزشی سه نسلی برای شناسایی جایگاه‌های ژنومی مرتبط با آسیت استفاده گردید، تعداد ۸۹۱ پرنده نسل F₂ تعیین ژنوتیپ گردید و از اطلاعات فنوتیپی ۸۱۵۸ پرنده نسل F₃ استفاده شد. اطلاعات فنوتیپی در نسل سوم شامل وزن بدن (هر دو هفته یک‌بار) و نسبت وزن بدن راست به کل بدن بود. از تعداد ۱۹۳۱۴ SNP برای پویش کل ژنوم مرغ استفاده شد. بر اساس نتایج این تحقیق جایگاه Gga_rs13738250 بر روی کروموزوم هفت در موقعیت ۱۶۱۶۴۳۹۸ برای نسبت وزن بدن راست به کل بدن (شاخص آسیت) معنی‌دار گردید [۴]. در تحقیق دیگری که به منظور یافتن QTL های مؤثر بر صفات آسیت در نژاد پلیموت‌راک انجام شد، سه QTL بر روی کروموزوم‌های دو، چهار و شش یافت شد [۲۲]. جایگاه

است که در طرف چپ و راست قلب و دهلیز و بطن قلب به شکل متفاوتی بیان می‌گردد. موتاسیونهای این ژن باعث بزرگ شدن و اتساع سلول‌های عضلات قلب می‌گردد [۱۳] و [۸]. Titin بزرگ‌ترین پروتئین در پستانداران است که در عضلات اسکلتی و قلبی بیان می‌شود. ایزوفرم‌های متفاوت این پروتئین از ۲۹۷۰ تا ۳۹۰۰ دالتون وزن دارند. این پروتئین توسط ژن TTN که دارای ۳۶۳ اگزون است تولید می‌شود. جهش‌های متعددی برای این ژن گزارش شده است، از جمله جهش در موقعیت ۷۴۰ باعث تبدیل اسید آمینه آرژنین به لوسین و در موقعیت ۳۷۹۹ باعث تبدیل سرین به تیروزین عامل اصلی هایپرتروفی عضله قلب است [۱۲ و ۲۳]. این ژن در مسیرهای بیولوژی چون شکل‌دهی و تشکیل بافت قلب، توسعه و رشد فیبرهای عضلانی، انقباض عضلات قلبی و هایپرتروفی قلب نقش اساسی دارد [۳۰]. تحقیقات متعدد نشان داده موتاسیونهای ژن TTN باعث بیماری ارثی کاردیومیوپاتی بطن راست آریتموژن (Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy) و کاردیومیوپاتی در انسان می‌شود این بیماری در انسان نوعی اختلال ساختاری و عملکردی بطن راست است که منجر به تاکی کاردی بطنی می‌گردد علائم بالینی از تپش قلب تا مرگ ناگهانی متغیر بوده و تشخیص بیماری در مراحل اولیه بسیار سخت است [۲۷ و ۲۸]. این بیماری ارثی در انسان که باعث هایپرتروفی بطن راست و افزایش ضربان قلب می‌شود بسیار شبیه آسیت در طیور می‌باشد. انجام تجزیه و تحلیل مسیرهای بیولوژی به کمک سایت KEGG برای این ژن نشان داد که ژن TTN در مسیر هایپرتروفی عضله قلب نقش اساسی دارد.

ژن ZNF385B دیگر ژنی است که در قسمت بالادست ژن CCDC141 در فاصله ۱۰۰ کیلو بازی قرار گرفته است. مطالعات پویش ژنومی در انسان به کمک یک تراشه ژنی ۳۳۸۳۲۸ SNP نشان داد این ژن بر روی سکنه قلبی اثر

کنترل می‌گردد. ژن CCDC141 باعث افزایش ضربان قلب و ژن TTN باعث افزایش تنش و حجم ضربه‌ای قلب می‌شوند. این دو ژن عامل اصلی افزایش برون دهی قلب می‌باشند.

آنچه مسلم است نواحی ژنومی ۱/۸ سانتی مورگانی یافت شده بر روی کروموزوم هفت شامل ژن‌های متعددی از جمله ژن‌های OSBPL6, TTN, CCDC141 و ... می‌باشند که در مکانیسم فرانک استارلینگ و تنظیم فعالیت‌های قلب مؤثرند. این جایگاه‌ها جهت مقابله با کمبود اکسیژن با افزایش حجم ضربه‌ای قلب، تعداد ضربان قلب و هایپرتروفی بطن راست عمل می‌کنند. نتایج این تحقیق نقش اساسی قلب در پمپ خون کافی به سمت شش‌ها را که عامل اصلی و کلیدی در بروز آسیت عنوان گردیده است را تأیید می‌کند. از طرفی بیماری آسیت یک عارضه پلی ژنیک است که تحت تاثیر اثرات متقابل ژنتیک و محیط می‌باشد و یافتن یک جایگاه ژنی که سهم زیادی از واریانس ژنتیکی را توجیه کند بسیار بعید است. در این تحقیق اغلب ژنها و جایگاه‌های یافت شده در طیور جدید هستند و هیچ گونه تحقیقی بر روی ارتباط این ژنها و آسیت در طیور انجام نشده است. از طرفی تعداد نمونه‌های بیشتر می‌تواند باعث افزایش قدرت آماری و شناسایی سایر ژن‌های کاندیدا شود. از این یافته‌ها می‌توان در تسریع برنامه‌های اصلاح نژادی جهت مقاومت به آسیت در سویه‌های تجاری و گوشتی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نگارندگان مقاله از یوست یونسن در دانشگاه آرھوس دانمارک برای فراهم نمودن هزینه تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها قدردانی می‌کنند. همچنین، از شرکت کاب و نترس برای در اختیار قرار دادن تراشه چند شکلی تک نوکلئوتیدی k60 نیز تشکر می‌شود.

تک نوکلئوتیدی Gga_rs14453031 در موقعیت ۳۶۶۹۸۰۴۹ مربوط به ژن OPN4-1 در فاصله ۱۰ کیلوبازی از QTL مربوط به کروموزوم چهار قرار دارد. این QTL در ناحیه بین جایگاه MCW0085 و LEI0122 واقع است و در موقعیت ۳۲ و ۵۰ مگا بازی قرار دارد. تعداد زیادی ژن در این ناحیه وجود دارد که با رشد و نمو قلب و شش‌ها مرتبط هستند. این ژن‌ها شامل EDNRA, VEGFC, BMP2K, BMP3, NKX6-1 و IGFBP7 می‌باشند [۲۲]. در انسان بیماری فشار بالای ششی از لحاظ فیزیولوژی و ژنتیکی بسیار شبیه این بیماری در طیور است. مطالعات متعدد در انسان نشان داده است این بیماری تحت تاثیر موتاسیون در ژن BMPR2 است [۳۳]. این ژن در مرغ بر روی کروموزوم هفت و در فاصله ۱/۲ سانتی مورگان از جایگاه Gga_rs14609249 قرار دارد.

سندرم آسیت در طیور بر اساس قانون فرانک استارلینگ عمل می‌کند. هیپوکسی حاصل از افزایش متابولیسم، اولین و مهم‌ترین عامل توسعه این بیماری در جوجه‌ها است. قلب اولین قسمتی است که به نیاز شدید حیوان به اکسیژن پاسخ می‌دهد و بر اساس این قانون باعث افزایش مقدار جریان خون از قلب به سمت شش‌ها می‌گردد. به تناسب آن ضربان قلب نیز افزایش می‌یابد، بنابراین در جوجه‌های مبتلا به آسیت حجم ضربه‌ای و تعداد ضربان قلب بیشتر می‌شود. به دلیل قابلیت انقباض و انبساط کمتر سیستم دستگاه تنفسی پرندگان نسبت به پستانداران در هنگام تنفس، با افزایش مقاومت مویرگ‌های ششی بعد از افزایش برون ده قلب، افزایش فشار مضاعفی در بطن راست اتفاق می‌افتد که باعث هایپرتروفی بطن راست می‌گردد بطن راست سپس در معرض حجم بار اضافی و عدم تعادل فشار همودینامیکی حاصله آسیت را به وجود می‌آورد [۱]. در این مکانیسم تعداد ضربان قلب و حجم ضربه‌ای قلب به کمک ژن‌های CCDC141 و TTN

منابع

1. Baghbanzadeh, A and Decuyper E (2008) Ascites syndrome in broilers: physiological and nutritional perspectives. *Avian Pathology* 2: 117-126.
2. Barrett JC, Fry B, Maller J and Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21 (2):263-5
3. Bradley A, Eric V, Stacy M, Ludmila P, Pui-Yan K, Jeffrey O and Zian T (2011) GWAS for discovery and replication of genetic loci associated with sudden cardiac arrest in patients with coronary artery disease. *BMC Cardiovascular Disorders* 11:29-39
4. Closter AM, Elferink, MG, Van As P, Crooijmans RPMA, Groenen MAM and Bovenhuis H (2010) Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci that Influence Ascites In broilers. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. www.kongressband.de
5. Daneshyar MH, Kermanshahi H and Golian A (2009) Changes of biochemical parameters and enzyme activities in broiler chickens with cold-induced ascites. *Poultry Science* 88:106-110.
6. Fukuda N and Granzier HL (2005) Titin/connectin-based modulation of the Frank-Starling mechanism of the heart. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 26: 319-323.
7. Gao Y, Du ZQ, Wei WH, Yu XJ, Deng XM, Feng CG, Fei J, Feng JD, Li N and Hu XX (2009) Mapping quantitative trait loci regulating chicken body composition traits. *Animal genetics* 40(6):952-954.
8. Gerull B, Gramlich M, Atherton J, McNabb M, Trombitás K, Sasse-Klaassen S, et al. (2002) Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nature genetics* 30: 201-204.
9. Havenstein GB, Ferket PR and Qureshi MA (2003) Growth, livability and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* 82:1500-1508.
10. Den Hoed M, Eijgelsheim M, Esko T, Brundel B J J M, Peal D S, Evans D M, et al. (2013) Identification of heart rate-associated loci and their effects on cardiac conduction and rhythm disorders. *Nature genetic* 45 (6):621-631.
11. Ipek A and Sahan U (2006) Effects of cold stress on broiler performance and ascites susceptibility. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 19: 734-738.
12. Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi H, Koga Y, Arimura T, Koyanagi T, Takahashi M, Hohda S, Ueda K, Nouchi T, Hiroe M, Marumo F, Imaizumi T, Yasunami M, Kimura A (2002) Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291:385-393.
13. Kruger M and Linke WA (2009) Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46: 490-498.
14. Ledur MC, Navarro N and Perez-Enciso M (2009) Large-scale SNP genotyping incrosses between outbred lines: how useful is it?. *Heredity* 105: 173-182.
15. Liu W, Feng W, Wang F, Li W, Zhou B, Gao C, Li Y, Kong Y, Ma M and Fu S (2008) Adenovirus-mediated ICOSIg gene transfer alleviates cardiac remodeling in experimental autoimmune myocarditis. *Immunology and Cell Biology* 86: 659-665.

16. Liu R, Sun Y, Zhao G, Wang G, Wu H, Zheng M, Liu L and Wen J (2015) Identification of loci and genes for growth traits from a genome-wide association study in a slow- \times fast-growing broiler chicken cross. *Genes and Genomic* 37(10): 829–836
17. Malan DD, Scheele CW, Buyse J, Kwakernaak C, Siebrits F K, Van Der Klis JD and Decuypere E (2003) Metabolic rate and its relationship with ascites in chicken genotypes. *British Poultry Science* 44:309-315.
18. NCBI Resource Coordinators (2013). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information". *Nucleic Acids Research* 41 (Database issue): D8–D20. [Online]. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>.
19. Nsengimana J, Samani NJ, Hall AS, Balmforth AJ, Anthony JB, Massimo M, et al (2007) Enhanced linkage of a locus on chromosome 2 to premature coronary artery disease in the absence of hypercholesterolemia. *European Journal of Human Genetics* 15: 313–319.
20. Pakdel A, Van Arendonk JA, Vereijken AL and Bovenhuis H (2002) Direct and maternal genetic effects for ascites-related traits in broilers. *Poultry Science* 81, 1273-1279
21. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, et al. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics* 81: 559–575.
22. Rabie TSK.M, Crooijmans RPMA, Bovenhuis H, Vereijken ALJ, Veenendaal T, Poel JJ, Pakdel A. and Groenen MAM (2005) Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility in chicken to develop pulmonary hypertension syndrome. *Animal Genetic* 36: 468-476.
23. Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A (1999) Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262:411–417.
24. Scheele C, Van Der Klis WJD, Kwakernaak C, Buys N and Decuypere E (2003) Haematological characteristics predicting susceptibility for ascites High carbon dioxide tensions in juvenile chickens. *British Poultry Science* 44:476 – 483.
25. Shlosberg A, Bellaiche M, Zeitlin G, YaAcobi M and Ca-haner M (1996) Hematocrit values and mortality from ascites in cold-stressed broilers from parents selected by hematocrit. *Poultry Science* 75:1–5.
26. Sun Y, Liu R, Zhao G, Zheng M, Sun Y, Yu X, Li P and Wen J (2014) Genome-wide linkage analysis and association study identifies loci for polydactyly in chickens. *G3(4)* 1167-1172.
27. Taylor M, Sinagra G, (2011) Genetic Variation in Titin in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy–Overlap Syndromes. *Circulation* 124:876-885.
28. Toro C, Olive M, Dalakas MC, Sivakumar K., Bilbao JM, Tyndel F, Vidal N, Farrero E, Sambuughin N and Goldfarb LG (2013) Exome sequencing identifies titin mutations causing hereditary myopathy with early respiratory failure (HMERF) in families of diverse ethnic origins. *BMC Neurology* 13: 29-33.
29. Turner S (2014) Package qqman: Q-Q and manhattan plots for GWAS data.
30. UniProt: a hub for protein information (2015) *Nucleic Acids Research* 43: D204-D212. [Online]. Available at <http://www.uniprot.org/> (First published online: October 27, 2014) doi: 10.1093/nar/gku989.

31. Van As P, Elferink MG, Closter AM, Vereijken A, Bovenhuis H, Crooijmans R, Decuypere E and Groenen MA (2010) The use of blood gas parameters to predict ascites susceptibility in juvenile broilers. *Poultry Science* 89:1684-91.
32. VanRaden FR (2008) Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of dairy science* 91: 4414-23.
33. Wei M, Han B, Liu F, Wang L and Sun J (2012) A Novel Mutation in BMPR2 in Patients with Congenital Heart Disease and Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of Clinical and Experimental Cardiology* 3:181-185.
34. Wu Y, Labeit S, Lewinter MM and Granzier H (2002) Titin: an endosarcomeric protein that modulates myocardial stiffness in DCM. *Journal of Cardiac Failure* 8: S276-286
35. Yang J, Lee SH, Goddard ME and Visscher PM (2011) GCTA: a tool for Genome wide Complex Analysis. *American Journal of Human Genetic.* 88(1): 76-82.
36. Zhang GX, Fan QC, Zhang JY, Wang WH, Xue Q and Wang YJ (2015) Genome-wide association study of growth traits in the Jinghai Yellow chicken. *Genetic and Molecular Research* 14 (4):15331-15338
37. Zhang T, Fan QC, Wang JY, Zhang GX, GU YP and Tang Y (2015) Genome-wide association study of meat quality traits in chicken. *Genetics and Molecular Research* 14(3): 10452-10460.



Journal of
Animal Production

(College of Abouraihan – University of Tehran)

Vol. 19 ■ No. 1 ■ Spring 2017

Genome wide association study for Ascites Syndrome in F₂ crosses of Azerbaijan native fowls and Arian broiler line

Hossein Emrani¹, Rasoul Vaez Torshizi^{2}, Aliakbar Masoudi³, Alireza Ehsani³*

1. Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: March 12, 2016

Accepted: May 1, 2016

Abstract

Ascites Syndrome is a costly metabolic disorder that has been linked to intense selection on growth rate and low feed conversion ratio in broilers. This Syndrome has become one of the most frequent causes of mortality within the broiler industry and leads to substantial economic losses and reduced animal welfare. To identify genes and genomic regions associated with Ascites Syndrome, genome wide association study was performed by the chicken 60K SNP panel on 101 birds from a F₂ chicken population derived from the reciprocal cross between Arian broiler Line and Azerbaijan native fowls. Genomic best linear unbiased prediction procedure was used to calculate associations between each SNP and ascite related traits. Several SNPs for the ratio of right ventricular to total ventricular, an indicator for Ascites syndrome, reached the suggestive threshold (8.25×10^{-5}) on chromosome 7. Two SNPs detected within CCDC141 and OSBPL6 genes were previously reported for human heart disorder. There are a large number of genes in this region (12745561-14602723) on chicken chromosome 7 that are related to hypertrophic cardiomyopathy, heart rate and human heart disorder. Selection for ascites resistance in broiler chicken using these findings could accelerate the genetic progress.

Keywords: Ascites Syndrome, Candidate gene, Chicken, GWAS, Ventricular.