دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی بر روی ترانسکریپتوم گاو نژادخالص سیستانی و آمیخته سیستانی با گاوهای هلشتاین، سیمنتال و مونت بیلیارد

رسول فرزانه دیزج[۱]، مهدی امین افشار[۲]، سعید اسماعیل خانیان[۳]، ناصر امام جمعه کاشان[۴] و محمد حسین بنابازی[۵]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- دانشیار، بخش پژوهش‌های بیو تکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران،
(نویسنده مسوول: esmaeilkhanian@yahoo.com)
۴- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۵- استادیار، بخش پژوهش های بیو تکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۳۱
صفحه: ۱۴۹ تا ۱۵۷

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: آمیخته‌گری بین گاوهای بوس ایندیکوس با بوس تائوروس در منطقه سیستان ایران طی سال‌های اخیر و از طریق استفاده از اسپرم مایع، اسپرم منجمد و یا گاو نر خارجی انجام شده است. در خصوص اثرات برنامه‌های آمیخته‌گری در گاو سیستانی مطالعات اندکی در ایران وجود دارد. پژوهش حاضر، به منظور شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) مبتنی بر داده‌های RNA-Seq در گاوهای نژاد خالص سیستانی و آمیخته‌های آن با سه نژاد گاوهای خارجی هلشتاین، سیمنتال و مونت بیلیارد انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، از داده‌های RNA-Seq مربوط به گاو نژاد خالص سیستانی، آمیخته سیستانی و هلشتاین، آمیخته سیستانی و مونت بیلیارد و آمیخته سیستانی و سیمنتال استفاده شد. به این منظور، در ابتدا از سیاهرگ دمی گاوهای نژاد خالص و آمیخته آن با هلشتاین، سیمنتال و مونت بیلیارد (۴ تیمار و برای هر تیمار دو تکرار بیولوژیکی) در شرایط یکسان محیطی، تغذیه‌ای و مدیریتی واقع در مرکز اصلاح نژاد گاو سیستانی شهر زابل خونگیری شد.

یافته‌ها: آنالیز شناساییSNP بر روی ترانسکریپتوم با استفاده از بسته نرم‌افزاری SAMtools انجام شد که به ترتیب منجر به شناسایی ۱۵۲۴۹۶، ۱۷۷۰۴۲، ۱۳۴۲۸۵ و ۱۶۳۳۶۲ جایگاه SNP در گاوهای نژاد خالص سیستانی و آمیخته‌های آن با سه نژاد گاوهای خارجی هلشتاین، سیمنتال و مونت بیلیارد شد. در این مطالعه، ارتباط مستقیمی بین تعداد SNPهای شناسایی شده و طول کروموزوم‌ها وجود نداشت. همچنین ۱۲ نوع SNP شناسایی شد که چهار نوع جایگزینی نوکلئوتیدی عملکردی و هشت نوع جایگزینی نوکلئوتیدی غیرعملکردی بودند. متداولترین SNPهای شناخته شده، از نوع جایگزینی نوکلئوتیدی عملکردی بودند که در نژادخالص سیستانی ۷۱/۸۴ درصد، در آمیخته سیستانی و هلشتاین ۷۲/۶۵ درصد، در آمیخته سیستانی و سیمنتال ۷۲/۶۰ درصد و در آمیخته سیستانی و مونت بیلیارد ۷۱/۹۴ درصد وجود داشت.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج این مطالعه تایید نمود که فناوری RNA-Seq روشی موثر، اقتصادی و کارآمد برای شناسایی جایگاه‌هایSNP است و دلیل اختلاف تعداد SNPهای شناسایی شده در این مطالعه و مطالعات مذکور احتمالاً ناشی از تفاوت گونه‌ها، نژادها، نوع بافت مورد ارزیابی و سایر عوامل و فاکتورهای موثر در ارزیابی RNA-Seq نظیر تعداد نمونه‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آمیخته‌گری، ترانسکریپتوم، جایگزینی نوکلئوتیدی، شناسایی SNP، RNA-Seq

مقدمه

آمیخته‌گری روشی است برای افزایش بهره‌وری و اصلاح نژاد حیوانات که تاثیر بسزایی در بهبود گونه‌ها دارد (۸). این رویکرد، روش متداولی برای بهرمندی از تفاوت‌های ژنتیکی و قابلیت ترکیب‌پذیری عام و خاص ژن‌ها در نژادهای مختلف با هدف بهبود ظرفیت‌های موجود با ترکیب ساختار ژنوم نژادهای غیربومی است (۱۰). آمیخته‌گری بین گاوهای بوس ایندیکوس با بوس تائوروس در منطقه سیستان ایران طی سال‌های اخیر و از طریق استفاده از اسپرم مایع، اسپرم منجمد و یا گاو نر خارجی انجام شده است. آمیخته‌گری نژادهای بومی با نژادهای خارجی با هدف افزایش تولید انجام می‌گیرد (۶). در خصوص اثرات برنامه‌های آمیخته‌گری در گاو سیستانی مطالعات اندکی در ایران وجود دارد. گاو سیستانی نژادی است که دارای کوهان می‌باشد که این ویژگی بیانگر تعلق آن به گونه‌ی بوس ایندیکوس است. از خصوصیات این نژاد، مقاومت به بیماری‌ها، نداشتن سخت زایی، قانع بودن و سازگاری با غذا، قابلیت تطابق با محیط زیست جدید، قدرت شنا و تغذیه در دریاچه هامون، مقاومت به تنش حراراتی و تغییرات آب و هوایی می‌باشد. این نژاد با ظرفیت افزایش وزن تا ۱۲۰۰ گرم در روز را با ضریب تبدیل ۸ دارا می‌باشد (۱۰). تغییر اقلیم در منطقه و خشکسالی متمادی ایران باعث خشک شدن دریاچه هامون و متوقف شدن رشد نی گردیده است و منابع تغذیه با خوراک رایگان گاوهای سیستانی از بین رفته است (۱). در نتیجه پرورش این دام با تامین خوراک کنسانتره برای دامدار اقتصادی نمی‌باشد. لذا، در چند سال اخیر تعداد زیادی از دامداران منطقه سیستان انگیزه‌ای برای نگهداری و پرورش نژاد خالص سیستانی ندارند و گرایش به آمیخته‌گری با اسپرم گاوهای هلشتاین، سیمنتال و مونت بیلیارد به منظور افزایش بهره‌وری در منطقه وجود داشته است. با کاهش جمعیت نژاد سیستانی به کمتر از ده هزار راس، نگرانی‌هایی در خصوص احتمال بالای نابودی این نژاد ارزشمند بوجود آمده است (۱). بنابراین جهت شناسایی پتانسیل‌های نژاد خالص سیستانی و حفظ آن در منطقه نیاز به اجرای برنامه‌های کوتاه، میان و بلند مدت می‌باشد. چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) یکی از ابزارهای موثر در اصلاح نژاد دام می‌باشد. مطالعات پویش کل ژنوم یکی از روش‌های اصلی در به‌نژادی دام است که بر مبنای تعیین ژنوتیپ تعداد بسیار زیادی از این تنوع‌های ژنتیکی است. با توجه به اینکه

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.14.0]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.149]

ترانسکریپتوم صرفا حاصل رونویسی بخش‌هایی از ژنوم می‌باشد که کدکننده بوده و در انتها به فرآورده‌ای پروتئینی ترجمه و بیان می‌شود، ممکن است چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی موجود در این بخش‌ها برای تخمین ارزش‌های اصلاحی ژنومی کارآمدتر باشد (۱۲). ترانسکریپتوم به شناخت دقیق‌تر مکانسیم‌های مرتبط بین ژنوتیپ و فنوتیپ کمک می‌نماید. ضمناً ترانسکریپتوم صحت و دقت پیش‌بینی‌های ژنومی را که از موثرترین ابزارهای ارزیابی و انتخاب در اصلاح نژاد می‌باشد، افزایش داده و پیشرفت ژنتیکی را تسریع می‌بخشد. همچنین به کار نبردن حجم بالایی از داده‌های منتج از تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی (NGS) و خصوصاً داده‌های ترانسکریپتومی در اصلاح نژاد حیوانات، منتهی به نادیده گرفتن منبع جدیدی از داده‌های دقیق و با کیفیت است (۱۴).

عمومیت ترانسکریپتوم به میزانی است که پژوهشگران بر این باورند که می‌توان به جای ژن از ترانسکریپت، یعنی بخشی از RNA که از روی DNA کد می‌شود را به عنوان واحد اصلی ژنوم و اساسی توارث در نظر گرفت (۲۰،۷). داده‌های ترانسکریپتومی به شکل‌های متفاوتی ایجاد می‌شوند که نسخه نهایی آنها نتیجه توالی‌یابی RNA (RNA-Seq) می‌باشند. که این داده‌ها به صورت کمی و با یک معیار عددی دقیق‌تر از سایر روش‌ها بدست می‌آیند (۲۰،۱۴). در پژوهشی با استفاده از فناوری RNA-Seq بر روی ترانسکریپتوم گاوهای هلشتاین آمریکا تعداد ۵۰۱۸۳ جایگاه و در گاوهای کلیستانی پاکستان تعداد ۱۳۷۹۵۴ جایگاه چندشکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شد (۱۸).

در پژوهشی که بر روی داده‌های ترانسکریپتوم بافت خون و عضله ۶ اسب تاروبرد قبل و پس از انجام مسابقه، تعداد ۱۸۳۹۷۳ چندشکلی تک نوکلئوتیدی کشف شد که ۹۰/۳۱ درصد در مقایسه با ۱/۱ میلیون چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی موجود در پایگاه داده‌های مربوط به اسب جدید بودند (۱۳).

در پژوهشی مبتنی بر توالی‌یابی ترانسکریپتوم بر روی پوست بز کشمیری چین با هدف شناسایی SNP، در مجموع تعداد ۵۶۲۳۱ چند شکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شد که در بین ۱۰۰۵۷ ژن توزیع شده بودند. نتایج این پژوهش تایید نمود که بکارگیری فناوری RNA-Seq روشی موثر و سریع برای کشف تعداد زیادی جایگاه SNP می‌باشد (۱۹).

در پژوهشی دیگر با هدف توجیه واریانس ژنتیکی صفت باقیمانده مصرف خوراک با چندشکلی تک نوکلئوتیدی کشف شده بر روی ترانسکریپتوم گاو هلشتاین، در مجموع ۵۳۴۷۸ جایگاه SNP بر روی ترانسکریپتوم گاو هلشتاین آمریکا شناسایی شد که تعداد ۴۲۰۸۲ عدد جایگاه SNP این فهرست شناسایی شده، در پروژه ژنوم گاو نر وجود داشت. با توجه به تشابه ۸۰ درصدی جایگاه‌های چندشکلی تک نوکلئوتیدی این پژوهش و پروژه ۱۰۰۰ ژنوم گاو نر، صحت و دقت رویه شناسایی SNP مبتنی بر داده‌های ترانسکریپتوم با بکارگیری فناوری RNA-Seq تایید شد (۲).

جایگزینی نوکلئوتیدی عملکردی که در آن یک نوکلئوتید از نوع پورین به پورین دیگر (A↔G) یا یک نوکلئوتید از نوع پریمیدین به پریمیدین دیگر (T↔C) تغییر می‌یابد یک جهش نقطه‌ای است. در صورتیکه جایگزینی نوکلئوتیدی غیرعملکردی منجر به جهش از نوکلئوتید نوع پورین به نوع پریمیدین یا برعکس (A↔T, A↔C, G↔T, G↔C) می‌گردد. در صورتیکه جهش‌ها به شکل تصادفی رخ بدهند، نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی عملکردی و غیرعملکردی می‌بایست یک به دو باشد. طی پژوهشی که بر روی ترانسکریپتوم گاوهای هلشتاین و کلیستانی انجام شده است نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی عملکردی (Ts[1]) به جایگزینی غیرعملکردی (Tv[2]) برای چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در نژاد هلشتاین برابر ۲/۳ و در نژاد کلیستانی ۲/۴ بود (۱۸). هدف از مطالعه حاضر، شناسایی چند شکلی تک نوکلئوتیدی موجود بر روی ترانسکریپتوم گاو نژاد خالص سیستانی و آمیخته آن با سه نژاد هلشتاین، سیمنتال و مونت بیلیارد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از داده‌های RNA-Seq مربوط به گاو نژاد خالص سیستانی، آمیخته سیستانی و هلشتاین، آمیخته سیستانی و مونت بیلیارد و آمیخته سیستانی و سیمنتال استفاده شد. به این منظور، در ابتدا از سیاهرگ دمی گاوهای نژاد خالص و آمیخته آن با هلشتاین، سیمنتال و مونت بیلیارد (۴ تیمار و برای هر تیمار دو تکرار بیولوژیکی) در شرایط یکسان محیطی، تغذیه‌ای و مدیریتی واقع در مرکز اصلاح نژاد گاو سیستانی شهر زابل خونگیری شد. داده‌های RNA با بکارگیری کیت RNAEsay تولیده شده توسط شرکت کیاژن (کیاژن، والنسیا، کالیفرنیا، آمریکا) براساس دستورالعمل‌ها استخراج شدند. به منظور تولید کتابخانه cDNA و توالی‌یابی، نمونه‌ها به شرکت BGI چین (شنزن، چین) ارسال شدند. پس از اخذ داده‌های تولید شده، آماده‌سازی، تجزیه و تحلیل داده‌ها بر روی سیستم عامل لینوکس انجام شد. تبدیل فرمت داده‌ها از sra به فرمت fastq با استفاده از دستور fastq_dump از نرم افزار sratoolkit نسخه 2.5.4-1 انجام شد (۹). کنترل کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار fastQC (v0.11.3) انجام شد. برای حذف آداپتورها و حذف یا ویرایش (کوتاه نمودن) خوانش‌های بی‌کیفیت از نرم‌افزار Trimmomatic 0.33 استفاده شد (۳). فهرست آداپتورهای بکار رفته در هنگام انجام توالی‌یابی و تشکیل کتابخانه‌های مورد نیاز و با توجه به دستگاه مورد استفاده برای توالی‌یابی به صورت پیش فرض در برنامه قرار داده شد (TruSeq2-PE.fa) و حداقل طول خوانش مورد قبول پس از ویرایش ۱۲۵bp در نظر گرفته شد. همردیفی خوانش‌های کوتاه بر روی ژنوم مرجع (Release 94) با استفاده از نرم‌افزار Tophat2 که از Bowtie2 به عنوان همردیف کننده استفاده می‌کند، انجام شد. شناسایی SNPها به وسیله بسته SAMtools (v.01.19) انجام شد (۱۱).

1- Transition
2- Transversion

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.14.0]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.149]

نتایج و بحث

کنترل کیفیت و آماده‌سازی داده‌های RNA-Seq

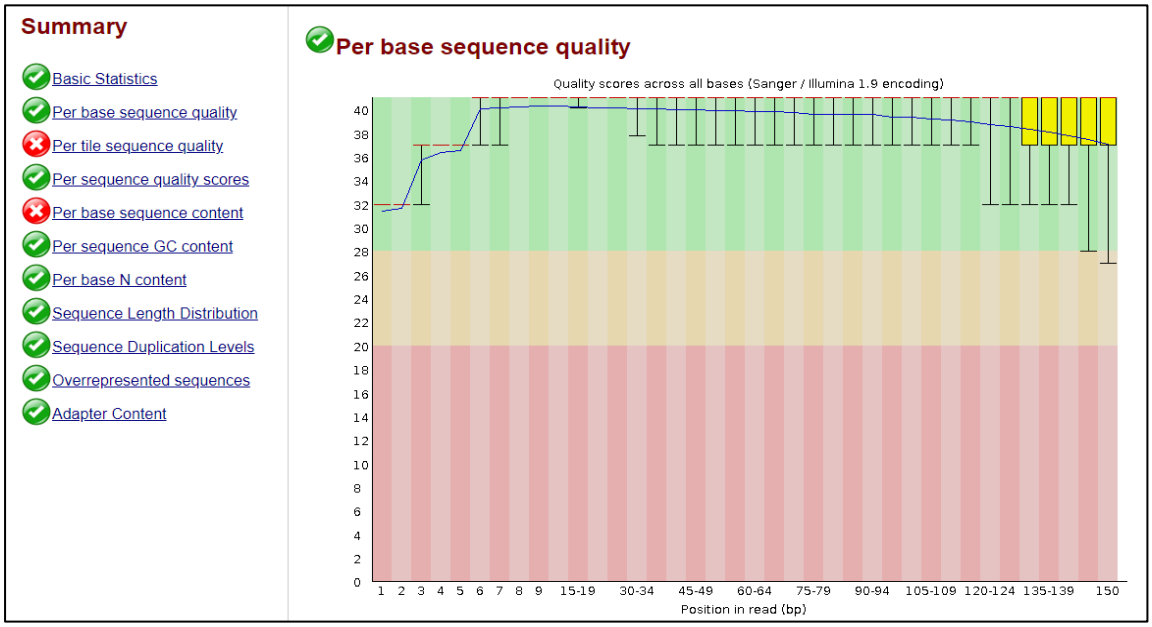
با توجه به کیفیت مناسب داده‌ها، با حذف آداپتور و نیز حذف و یا ویرایش نوکلئوتیدهای بی‌کیفیت از خوانش‌ها، ویرایش داده‌ها انجام شد. برای ویرایش، آستانه حداقل طول نهایی ۱۲۵ جفت باز برای خوانش‌ها تنظیم گردید. تعداد خوانش‌های حذف شده برای نمونه‌ها پس از ویرایش داده‌ها تقریبا برابر و در مقایسه با تعداد کل خوانش‌ها چشمگیر نبود.

از۵۵۱۳۴۸۸۴ خوانش پیش رو و ۶۶۰۱۶۲۹۲ خوانش پس رو ویرایش شده برای نمونه شماره یک و دو نژاد خالص سیستانی به‌ترتیب ۷۴/۶۰ درصد و ۷۳/۱۵ درصد خوانش‌ها درستی مکان‌یابی شدند. بیش از پنج درصد خوانش‌ها دارای همردیفی چندگانه بودند و با چندین مکان همردیف گردیدند. از این تعداد بیش از ۲۱ هزار خوانش با بیش از بیست مکان ژنومی همردیف گردیدند (شکل ۱).

از ۶۰۱۹۸۵۹۸ خوانش پیش رو و ۷۷۹۳۵۳۶۸ خوانش پس رو ویرایش شده برای نمونه شماره یک و دو آمیخته سیستانی و هلشتاین به‌ترتیب ۷۶/۴۵ درصد و ۷۷/۵۰ درصد خوانش‌ها بدرستی مکان‌یابی شدند. بیش از شش درصد خوانش‌ها دارای همردیفی چندگانه بودند و با چندین مکان همردیف گردیدند. از این تعداد بیش از ۲۲ هزار خوانش با بیش از بیست مکان ژنومی همردیف گردیدند (شکل ۲).

از ۷۲۴۵۳۳۹۶ خوانش پیش رو و ۷۸۶۰۴۶۶۴ خوانش پس رو ویرایش شده برای نمونه شماره یک و دو آمیخته سیستانی و مونت بیلیارد بترتیب ۷۹/۰۵ درصد و ۸۰/۳۰ درصد خوانش‌ها بدرستی مکان‌یابی شدند. بیش از سه درصد خوانش‌ها دارای همردیفی چندگانه بودند و با چندین مکان همردیف گردیدند. از این تعداد بیش از ۷۴ هزار خوانش با بیش از بیست مکان ژنومی همردیف گردیدند (شکل ۳).

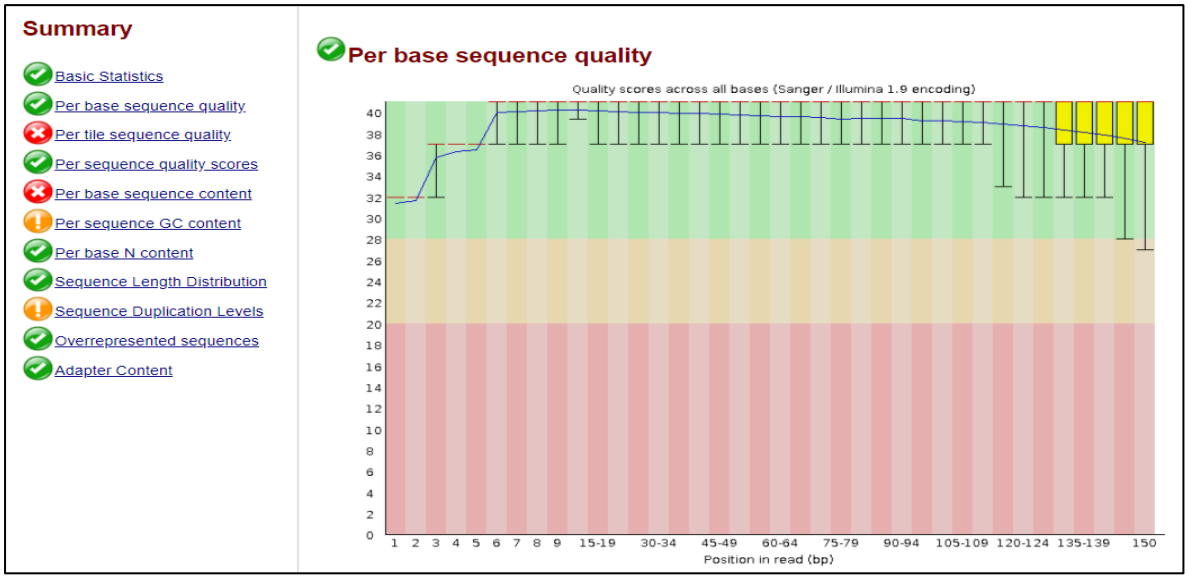
از ۸۷۹۱۸۶۱۴ خوانش پیش رو و ۹۷۶۳۰۵۹۶ خوانش پس رو ویرایش شده برای نمونه شماره یک و دو آمیخته سیستانی و سیمنتال به‌ترتیب ۸۱/۳۵ درصد و ۸۲/۶۵ درصد خوانش‌ها بدرستی مکان‌یابی شدند. بیش از سه درصد خوانش‌ها دارای همردیفی چندگانه بودند و با چندین مکان همردیف گردیدند. از این تعداد بیش از ۸۹ هزار خوانش با بیش از بیست مکان ژنومی همردیف گردیدند (شکل ۴).



شکل ۱- خلاصه نتایج آزمون‌های ده‌گانه سنجش کیفیت و آزمون کیفیت انفرادی نوکلئوتیدهای خوانش‌های پیش رو برای نژاد سیستانی خالص

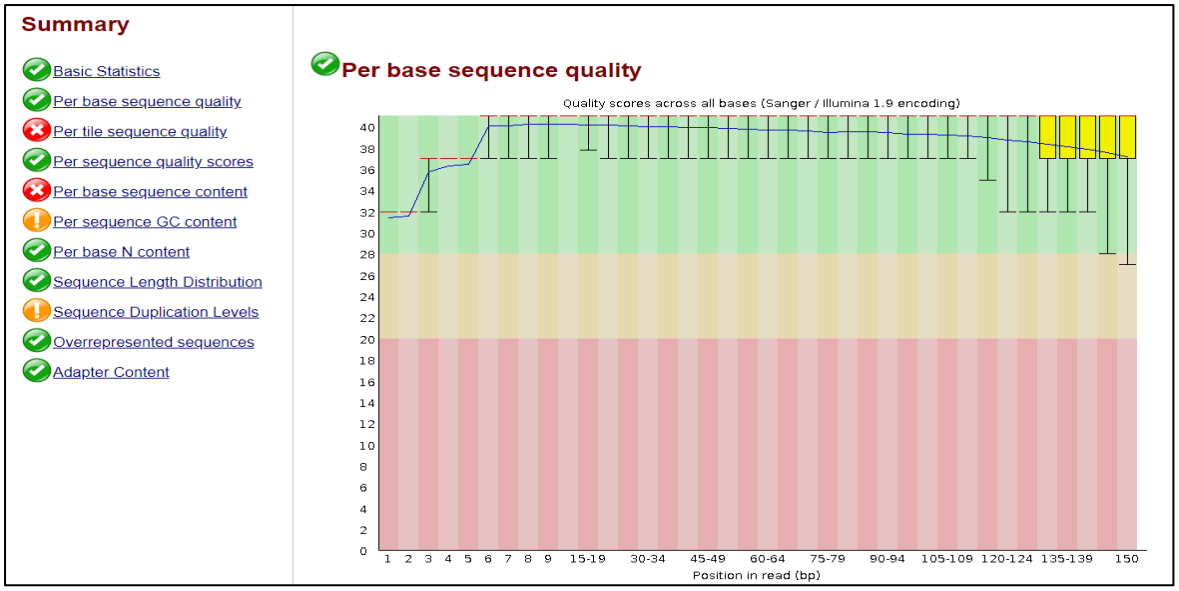
Figure 1. Summary of the results of ten quality-control tests and individual quality tests of the nucleotide of the forward readings for the pure Sistani breed

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.14.0]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.149]



شکل ۲- خلاصه نتایج آزمون‌های ده گانه سنجش کیفیت و آزمون کیفیت انفرادی نوکلئوتیدهای خوانش‌های پیش رو برای آمیخته‌ی سیستانی و هلشتاین

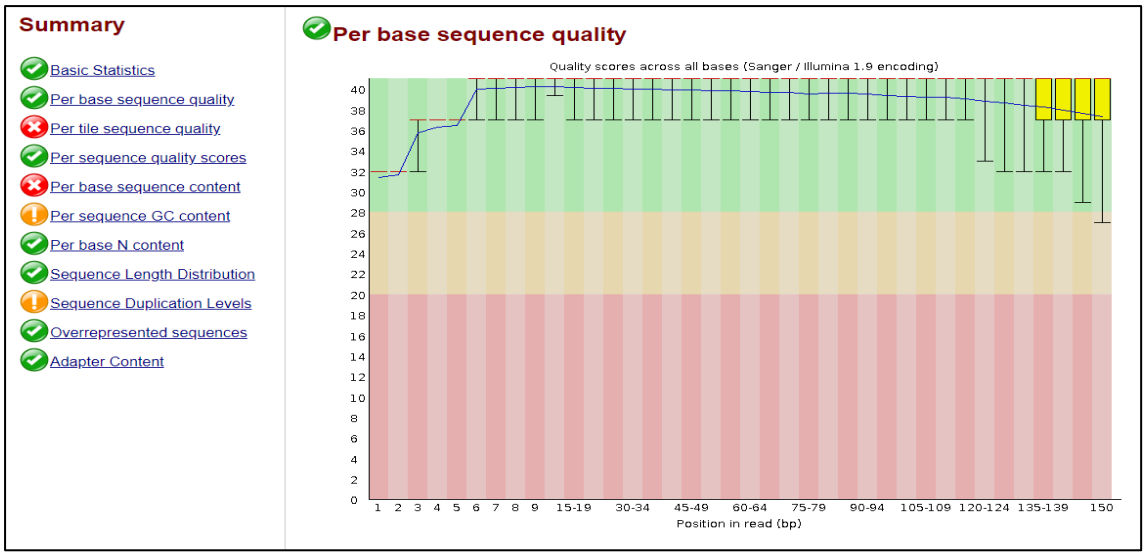
Figure 2. Summary of the results of ten quality-control tests and individual quality tests of the nucleotide of the forward readings for cross-breeding of Sistani and Holstein



شکل ۳- خلاصه نتایج آزمون‌های ده گانه سنجش کیفیت و آزمون کیفیت انفرادی نوکلئوتیدهای خوانش‌های پیش رو برای آمیخته‌ی سیستانی و مونت بیلیارد

Figure 3. Summary of the results of ten quality-control tests and individual quality tests of the nucleotide of the forward readings for cross-breeding of Sistani and Monte Billiard

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.14.0]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.149]



شکل ۴- خلاصه نتایج آزمونهای ده گانه سنجش کیفیت و آزمون کیفیت انفرادی نوکلئوتیدهای خوانش‌های پیش رو برای آمیخته‌ی سیستانی و سیمنتال

Figure 4. Summary of the results of ten quality-control tests and individual quality tests of the nucleotide of the forward readings for cross-breeding of Sistani and Simmental

شناسایی SNPها

بعد از کنترل کیفیت و چند مرحله فیلتر نمودن بر روی ترانسکریپتوم نمونه‌های نژاد خالص سیستانی، آمیخته‌های سیستانی و هلشتاین، سیستانی و مونت بیلیارد و سیستانی و سیمنتال، به‌ترتیب ۱۵۲۴۹۶، ۱۷۷۰۴۲، ۱۶۳۳۶۲ و ۱۳۴۲۸۵ چندشکلی تک نوکلئوتیدی یافت شد.

تعداد چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی کشف شده برای آمیخته سیستانی و هلشتاین و آمیخته سیستانی و مونت بیلیارد بیشتر از چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی کشف شده در آمیخته سیستانی و سیمنتال و نژاد سیستانی خالص می‌باشد. این امر احتمالا بواسطه این است که آمیخته‌گری نژاد سیستانی با نژادهای هلشتاین و مونت بیلیارد باعث افزایش چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی شده است. برای همردیفی در برنامه tophat2 تنظیمات سخت گیرانه اعمال گردید. هدف از در نظر گرفتن این تنظیمات این بود که به علت عدم انطباق بین نوکلئوتیدهای واقع بر ترانسکریپتوم هر تیمار و ژنوم مرجع، همردیفی انجام نشود. در نتیجه، در فرآیند کشف چندشکلی تک نوکلئوتیدی، تمامی این عدم انطباق‌ها به عنوان چندشکلی تک نوکلئوتیدی در نظر گرفته نخواهند شد. ضمناً، اجرای تنظیمات اعمال شده سبب پایین آمدن نسبی درصد همردیفی و مکان یابی نیز گردید (جدول ۱). با بررسی نسبت تعداد چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی به طول کروموزوم‌ها مشخص شد ارتباط معنی‌داری بین تعداد چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی کشف شده و طول کروموزوم‌ها وجود ندارد. برای نمونه در آمیخته سیستانی و هلشتاین، کروموزوم شماره بیست و پنج که کوتاهترین کروموزوم است و ۴۲۹۰۴۱۷۰ جفت باز طول دارد تعداد قابل توجهی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (۴۵۰۵) دارد. در شرایطی که کروموزوم شماره ۱ با طول ۱۵۸۳۳۷۰۶۷ جفت باز که طولانی‌ترین کروموزوم در ژنوم گاو است و تقریبا سه برابر کروموزوم بیست و پنج طول دارد، تعداد ۵۶۷۸ جایگاه چندشکلی تک نوکلئوتیدی را دارا می‌باشد. نتایج بالا بیانگر این است که در نهایت رونویسی از تمام طول ژنوم با یک گستردگی یکسان و با پوششی سراسری صورت نمی‌گیرد. به بیانی دیگر، ممکن است تعدادی از نقاط حامل ژن‌های کاندیدای بیشتر و یا ژن‌هایی هستند که برای نمونه‌های مورد بررسی از اهمیت بیشتری برخوردار بوده است. در این نمونه‌ها رونویسی در آن مناطق با عمق و شدت بیشتری صورت گرفته و در نهایت این مناطق سهم بیشتری از کل ترانسکریپتوم اسمبل شده را دارا می‌باشند. بنابراین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی موجود در این نقاط دارای بیشترین فراوانی بوده‌اند، لذا بعد از فیلتر همچنان در لیست باقی مانده‌اند. آنالیز دقیق‌تر نقاط رونویسی شده و پوشش ترانسکریپتومی این نقاط ممکن است شناخت بیشتری از بیان ژن‌ها و تنظیم آن در نمونه‌های مورد بررسی افزایش دهد.

در پژوهشی با رویکرد شناسایی چند شکلی تک نوکلئوتیدی در ترانسکریپتوم هفت نمونه شیر حاصل از توالی یابی cDNA گاوهای هلشتاین و نقاط کدکننده ژن‌های بیان شده در طی شیردهی با استفاده از فناوری RNA-seq تعداد ۳۳۰۰۰ جایگاه چند شکلی تک نوکلئوتیدی کشف شد. در گام اول، آنالیز کشف چند شکلی تک نوکلئوتیدی، تعداد ۱۰۰۷۳۴ جایگاه SNP شناسایی شد که به علت همردیفی توالی‌ها نژاد هلشتاین بر روی ژنوم مرجع گاو هرفورد بود. این پژوهشگران نتایج این تحقیق را بیانگر این مطلب دانستند که بررسی ترانسکریپتوم با بهره‌گیری از فناوری RNA-Seq روشی کارآمد و مقرون به صرفه برای شناسایی و فراخوانی چند شکلی تک نوکلئوتیدی می‌باشد (۴).

در پژوهشی با هدف فراخوانی چند شکلی تک نوکلئوتیدی با استفاده از فناوری RNA-Seq بر روی دو جمعیت گوسفند تعداد ۴۰۴۸۱ و ۳۸۸۵۱ جایگاه چند شکلی تک نوکلئوتیدی

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.14.0]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.149]

کشف گردید که تعداد ۵۹۱۳۹ جایگاه شناسایی شده در ۲ جمعیت متفاوت بودند، که این تفاوتها در این پژوهش با سایر پژوهش‌ها ممکن است به دلیل گونه‌های متفاوت، نوع بافت و سایر عوامل موثر در بکارگیری فناوری RNA-Seq، نظیر تعداد نمونه‌ها باشد (۲۱)

شناسایی چند شکلی تک نوکلئوتیدی با استفاده از فناوری RNA-Seq در عضله Longissimus thoracic سه گوساله نر لیموزین انجام گردید، که منجر به کشف ۳۴۳۷۶ چند شکلی تک نوکلئوتیدی گردید. که حدوداً ۵۵ درصد چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در نواحی کدکننده بودند و حدوداً ۲۲ درصد منتج به تغییر یک اسیدآمینه شد. با در نظر گرفتن تنظیمات سختگیرانه، ۸۴۰۷ جایگاه چندشکلی تک نوکلئوتیدی مختلف با دامنه اطمینان بالا، که ۱۸ درصد از آنها چندشکلی تک نوکلئوتیدی کدکننده ناهمگن بودند، کشف گردیدند. در مجموع داده‌های RNA-Seq و مجموعه چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی کدکننده شناسایی شده در این پژوهش، منابع ژنومی موجود برای گاو و به خصوص برای گاو گوشتی را بهبود بخشید. همچنین، تفاوتهای زیادی در ژن‌های بیان شده در Longissimus thoracis لیموزین، بویژه به شکل تعداد بسیار زیادی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی رمزگر ناهمگن، وجود داشتند که احتمالاً می‌توانند جهت بررسی سازوکارهای عامل تغییر پذیری ژنتیکی صفات مرتبط با میزان کیفیت گوشت مثمر ثمر باشند (۵).

بررسی ترانسکریپتوم دو بافت کبد و کلیه در پنج نژاد بز با هدف کشف تعداد زیادی چند شکلی تک نوکلئوتیدی مربوط با صفت انجام شد. پژوهشگران این تحقیق پیشنهاد نمودند با بررسی نوع و ماهیت ۶۸۵۹۷ و ۷۲۰۴۷ جایگاه چند شکلی تک نوکلئوتیدی کشف شده، به‌ترتیب در کبد و کلیه، چند شکلی تک نوکلئوتیدی‌های کشف شده در این پژوهش می‌تواند مرجعی جهت مطالعات پویش کل ژنوم در بز و نیز به‌منظور طراحی آرایه‌های چند شکلی تک نوکلئوتیدی با تراکم بالا برای این گونه مورد استفاده قرار گیرند (۱۷).

در پژوهشی به‌منظور کشف و فراخوانی چند شکلی تک نوکلئوتیدی بر روی توالی ژن‌های متفاوت بیان شده بین دو جمعیت گاو هلشتاین و کلیستانی به‌ترتیب ۵۳۷۴۸ و ۱۴۵۴۴۳ مورد SNP بر روی ترانسکریپتوم شناسایی شد. که تعداد ۲۴ مورد SNP در هلشتاین و ۱۴۵ مورد در کلیستانی بر روی توالی ۲۳ ژن از مجموع ۴۱ ژن متفاوت بیان شده قرار داشتند (۱۶).

جدول ۱- تعداد چند شکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شده به تفکیک هر کروموزوم

Table 1. Number of single nucleotide polymorphisms identified separately for each chromosome

کروموزوم	طول کروموزوم (جفت باز)	SNPهای کشف شده در نژاد خالص سیستانی	SNPهای کشف شده در آمیخته سیستانی و هلشتاین	SNPهای کشف شده در آمیخته سیستانی و مونت بیلیارد	SNPهای کشف شده در آمیخته سیستانی و سیمنتال
۱	۱۵۸۳۳۷۰۶۷	۷۳۷۳	۵۶۷۸	۶۶۲۸	۵۵۱۴
۲	۱۳۷۰۶۰۴۲۴	۶۹۳۸	۵۹۰۰	۶۱۵۷	۵۹۶۱
۳	۱۲۱۴۳۰۴۰۵	۷۲۳۵	۶۰۲۴	۶۹۴۰	۷۰۷۴
۴	۱۲۰۸۲۹۶۹۹	۵۷۱۳	۵۶۶۱	۴۹۸۳	۴۲۰۹
۵	۱۲۱۱۹۱۴۲۴	۶۷۱۲	۸۶۰۵	۷۹۵۵	۶۵۱۲
۶	۱۱۹۴۵۸۷۳۶	۴۷۴۸	۴۷۹۶	۴۵۱۷	۴۰۹۸
۷	۱۱۲۶۳۸۶۵۹	۷۳۲۷	۸۹۴۴	۹۰۸۲	۶۶۴۹
۸	۱۱۳۳۸۴۸۳۶	۵۸۸۲	۵۶۷۴	۴۶۷۹	۳۶۷۰
۹	۱۰۵۷۰۸۲۵۰	۴۲۱۹	۳۶۲۶	۳۳۵۱	۲۴۷۶
۱۰	۱۰۴۳۰۵۰۱۶	۵۶۷۳	۴۹۰۱	۴۸۷۲	۴۶۵۵
۱۱	۱۰۷۳۱۰۷۶۳	۶۸۰۶	۷۳۲۹	۸۲۶۴	۷۲۱۱
۱۲	۹۱۱۶۳۱۲۵	۳۶۲۵	۳۳۳۵	۳۴۳۷	۳۲۰۵
۱۳	۸۴۲۴۰۳۵۰	۵۷۹۶	۶۰۴۲	۶۴۳۰	۵۳۷۴
۱۴	۸۴۶۴۸۳۹۰	۳۹۳۱	۳۳۳۲	۳۸۶۵	۳۲۳۰
۱۵	۸۵۲۹۶۶۷۶	۴۸۰۲	۴۳۱۴	۴۵۲۷	۳۹۱۹
۱۶	۸۱۷۲۴۶۸۷	۴۵۳۵	۴۷۵۱	۴۴۲۰	۴۲۸۹
۱۷	۷۵۱۵۸۵۹۶	۴۶۲۴	۴۹۷۳	۵۸۴۸	۴۸۲۸
۱۸	۶۶۰۰۴۰۲۳	۵۹۷۶	۷۵۲۶	۸۹۷۳	۶۴۱۱
۱۹	۶۴۰۵۷۴۵۷	۵۶۶۲	۸۲۰۳	۹۳۸۷	۷۶۴۱
۲۰	۷۲۰۴۲۶۵۵	۲۹۹۴	۲۳۰۵	۲۵۵۶	۱۴۷۲
۲۱	۷۱۵۹۹۰۹۶	۴۲۷۳	۵۰۱۷	۵۸۸۳	۴۰۳۳
۲۲	۶۱۴۳۵۸۷۴	۴۳۵۸	۴۹۶۲	۵۸۷۳	۳۹۳۱
۲۳	۵۲۵۳۰۰۶۲	۴۱۲۲	۴۶۸۹	۴۵۸۸	۵۰۳۳
۲۴	۶۲۷۱۴۹۳۰	۲۹۰۶	۲۲۹۸	۲۷۲۸	۲۲۰۳
۲۵	۴۲۹۰۴۱۷۰	۴۷۰۰	۴۵۰۵	۶۵۹۱	۵۱۳۲
۲۶	۵۱۶۸۱۴۶۴	۲۸۸۷	۲۶۰۷	۳۲۸۳	۲۶۸۳
۲۷	۴۵۴۰۷۹۰۲	۲۰۵۹	۱۸۰۸	۲۴۰۸	۱۶۳۹
۲۸	۴۶۳۱۲۵۴۶	۲۵۴۳	۲۲۰۸	۲۸۴۰	۲۱۶۳
۲۹	۵۱۵۰۵۲۲۴	۳۶۷۸	۴۵۲۶	۵۰۶۴	۴۱۹۵
باقی ژنوم	۱۵۸۳۳۹۷۹۳	۱۰۳۹۹	۳۲۴۹۹	۷۲۳۳	۴۸۷۶
مجموع	۲۶۷۰۴۲۲۲۹۹	۱۵۲۴۹۶	۱۷۷۰۴۲	۱۶۳۳۶۲	۱۳۴۲۸۵

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.14.0]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.149]

جدول ۲- انواع چندشکلی تک نوکلئوتیدی

Table 2. Types of single nucleotide polymorphs

انواع SNP	نژاد سیستانی خالص		آمیخته سیستانی و هلشتاین		آمیخته سیستانی-مونت بیلیارد		آمیخته سیستانی- سیمنتال	
	تعداد SNP	درصد	تعداد SNP	درصد	تعداد SNP	درصد	تعداد SNP	درصد
A/C	۲۷۲	۳/۲۶	۳۹۹	۳/۳۵	۵۸۵	۳/۵۰	۴۴۹	۳/۳۹
C/A	۳۵۳	۴/۲۴	۴۵۹	۳/۸۴	۷۰۹	۴/۲۴	۴۹۱	۳/۷۱
A/T	۲۰۹	۲/۵۰	۲۲۴	۱/۸۷	۲۸۱	۱/۶۸	۲۶۲	۱/۹۷
T/A	۲۳۳	۲/۷۹	۶۱۶	۵/۱۷	۳۰۹	۱/۸۴	۲۵۱	۱/۸۹
C/G	۳۵۸	۴/۳۰	۵۶۱	۴/۷۵	۸۲۰	۴/۹۶	۶۱۰	۴/۶۱
G/C	۳۱۶	۳/۷۹	۵۵۴	۴/۶۴	۸۰۳	۴/۸۱	۵۸۹	۴/۴۵
G/T	۳۱۹	۳/۸۴	۴۷	۰/۴	۶۳۵	۳/۸۱	۴۹۵	۳/۷۴
T/G	۲۸۵	۳/۴۴	۳۸۷	۳/۲۴	۵۳۷	۳/۲۲	۴۸۱	۳/۶۴
C/T	۱۷۵۵	۲۱/۱۳	۲۴۶۶	۲۰/۷۰	۳۳۴۰	۲۰/۰۲	۲۴۵۸	۱۸/۶۲
T/C	۱۲۵۴	۱۵/۳۰	۱۸۱۲	۱۵/۲۲	۲۶۸۰	۱۶/۰۷	۲۲۹۱	۱۷/۳۶
A/G	۱۲۵۸	۱۵/۱۵	۱۹۳۱	۱۶/۲۱	۲۶۰۰	۱۵/۵۹	۲۲۴۴	۱۷/۱۷
G/A	۱۶۸۲	۲۰/۲۶	۲۴۴۴	۲۰/۵۲	۳۳۶۷	۲۰/۲۶	۲۵۶۶	۱۹/۴۵
مجموع	۸۲۹۵	۱۰۰	۱۱۹۰۰	۱۰۰	۱۶۶۶۶	۱۰۰	۱۳۱۸۷	۱۰۰

نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی عملکردی Ts به جایگزینی غیرعملکردی Tv برای نژاد سیستانی خالص و آمیخته سیستانی مونت بیلیارد برابر ۲/۵۶، در آمیخته سیستانی و سیمنتال ۲/۶۴ و در آمیخته سیستانی و هلشتاین ۲/۶۵ بود (جدول ۲). این نتایج با نتایج پژوهش ورکوهی و همکاران (۱۸) بر روی ترانسکریپتوم گاوهای هلشتاین آمریکا و کلیستانی پاکستان تطبیق دارد. امکان اینکه جایگزینی نوکلئوتیدی غیرعملکردی Tv نسبت به جایگزینی نوکلئوتیدی عملکردی Ts، توالی اسید آمینه پروتئین را تغییر دهد بیشتر است. هر دو مدل جایگزینی می‌تواند باعث تغییر اسیدآمینه شوند. در حالیکه تفاوت‌های بیوشیمیایی محصولات پروتئینی مرتبط با آنها برای جایگزینی نوکلئوتیدی غیرعملکردی بیشتر است. با توجه به اینکه جایگزینی نوکلئوتیدی غیرعملکردی سبب تغییرات گسترده در شکل رشته DNA است، اثر بیشتری بر روی چگونگی اتصال فاکتورهای رونویسی و در نهایت بیان ژن دارد. هر چند تفاوت‌های دیده شده کوچک هستند اما این مشاهدات یک ویژگی جدید بنیادی را در تغییرات تنظیمی نشان می‌دهند. انحرافات ایجاد شده در نسبت Ts/Tv نشان دهنده انتخاب تکاملی ژن است.

در مجموع نتایج این مطالعه تایید نمود که فناوری RNA-Seq روشی موثر، اقتصادی و کارآمد برای شناسایی جایگاه‌هایSNP است و دلیل اختلاف تعداد SNPهای شناسایی شده در این مطالعه و مطالعات مذکور احتمالاً ناشی از تفاوت گونه‌ها، نژادها، نوع بافت مورد ارزیابی، و سایر عوامل و فاکتورهای موثر در ارزیابی RNA-Seq نظیر تعداد نمونه‌ها می‌باشد. تفاوت بیان بین دو آلل در یک موقعیت تک نوکلئوتیدی، احتمالا بخش زیادی از واریانس بین نژاد سیستانی خالص و آمیخته‌های آن با نژادهای نر خارجی (هلشتاین، سیمنتال و مونت بیلیارد) را توجیه می‌کند و زمینه ساز تفاوت‌های فنوتیپی شده است.

تشکر و قدردانی

از موسسه تحقیقات علوم دامی کشور که ما را در دسترسی به داده‌های مورد نیاز این پژوهش کمک نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Asghari, E.B., Gh. Dshab, M.H. Banabazi and M. Rokouei. 2021. Analasis of Genetic Differences in Genes Associated With Immune Response Among Purebred and Crossbreed Sistani and Montebeliarde Cow Population Using RNA-Seq Data. Research on Animal Production, 12(31): 134-145 (In Persian).
2. Banabazi, M.H., A. Nejati, J.I. Imumotin, M. Gaderi and S.R. Miraei. 2017. Genetic Variance explanation of Residual Feed Intake((RFI) by SNPs discovered on transcriptome of Holstein cows. Animal Science Journal, 114: 169-182 (In Persian).
3. Bolger, A.M., M. Lohse and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, Bioiformatics, 30(15): 2114-2120.
4. Canovas, A., G. Rincon, A. Islas-Trejo, S. Wickramasinghe and J. Medrano. 2010. SNP discovery in the bovine milk transcriptome using RNA-Seq technology. mammalian Genome, 21: 592-598.
5. Djari, A., D. Esquerre, B. Weiss, F. Martins, L. Koufariotis, Y.P. Chen, S. Bolormaa and B. Hayes. 2014. Regulatory and coding genome regions are enriched for trait associated variants in dairy and beef cattle. BMC Genomics, 15: 436.
6. Ehsaninia, J., M. Moradi, S.S.H. Haffezian and M.B. Sayad. 2011. Crossbreeding effects on milk fat yields performance of Iran population local cattle. Animal Sciences Journal, 91: 27-33 (In Persian).
7. Flintoft, L. 2008. Transcriptomics: Digging deep with RNA-Seq. Nature Reviews Genetics, 9(8): 568-568.
8. Gorbani, A. and M. Behpai. 2020. Association of GDF9 Gene Polymorphism with Sperm Quality and Quantity traits in Iranian Holstein Bulls. Research Animal Production, 11(27): 95-100 (In Persian).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.14.0]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.149]

9. https://github.com/ncbi/sra-tools.
10. Kamalzadeh, A., M. Rajabbaigy and A. Kiasat. 2008. Livestock production systems and trends in livestock industry in Iran. Journal of Agriculture and Social Sciences, 4: 183-188.
11. Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtool. Bioinformatics, 25(16): 2078-2079.
12. Meuwissen, T. and M. Goddard. 2010. Accurate prediction of genetic values forcomplex traits by whole-genome resequencing. Genetics, 185: 623-631.
13. Park, K.D., J. Park, J. Ko, J. Kim, B. Kim and H.S.K. Ahn et al. 2012. Whole transcriptome analyses of six thoroughbred horses before and after exercise using RNA-Seq. BMC Genomics, 13: 437.
14. Pennisi, E. 2012. ENCODE Project Writes Eulogy for Junk DNA. Science, 337(6099): 1159-1161.
15. Pitt, D., N. Sevane, E.L. Nicolazzi, D.E. MacHugh, S.D.E. Park, L. Colli, R. Martinez, M.W. Bruford and P. Orozco-terWengel. 2019. Domestication of cattle: two or three events? Evolutionary Applications, 12(1): 123-136. doi: 10.1111/eva.12674.
16. Salimpour, M. and M.H. Banabazi. 2021. The Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) discovery and calling on genes differentially expressed between Holstein (Bos taurus) and Cholistani(Bos indicus) cattle populations. Animal Science Journal, 130: 203-2014 (In Persian).
17. Sharma, U., P. Banerjee, J. Joshi and R.K. Vijh. 2012. Identification of SNPs in Goats (Capra hircus) using RNA-Seq Analysis. International Journal of Animal and Veterinary Advances, 4: 904-914.
18. Varkoohi, SH., M.H. Banabazy and M. Ghsemi-shib. 2021. Allele specific Expression (ASE) analysis between Bos Taurus indicus cows using RNA-Seq data at SNP level and gene level. Cellular and Molecular Biology, 93(3). E20191453.
19. Wang, L., Y. Zhang, M. Zhao, R. Wang, R. Su and J. Li. 2015. SNP Discovery from Transcriptome of Cashmere Goat Skin. Asian-Australasian Journal of Animal Acencesi, 28(9): 1235-1243.
20. Wang, Z., M. Gerstein and M. Snyder. 2009. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics, 10: 57-63.11.
21. Zhang, C., G. Wang, J. Wang, Z. Ji, Z. Liu, X. Pi and C. Chen. 2013. Characterization and Comparative Analyses of Muscle Transcriptomes in Dorper and Small-Tailed Han Sheep Using RNA-Seq Technique. PLoS ONE, 8: e72686.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.14.0]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.149]

The Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) Discovery on Transcriptome of Pure Sistani and Cross-Breeding of Sistani and Holstein, Simmental and Monte Billiard Bulls

Rasoul Farzaneh Dizaj[1], Mehdi Amin-Afshar[2], Saeid EsmaeilKhanian[3], Nasser Emamjomeh-Kashan[4] and Mohammad Hossein Banabazi[5]

1- PhD Student, Department of Animal Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Biotechnology Research, Animal Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran, (Corresponding author: esmaeilkhanian@yahoo.com)
4- Professor, Department of Animal Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5- Assistant Professor, Department of Biotechnology Research, Animal Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
Received: 9 August, 2021 Accepted: 22 September, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: Breeding between Indus cows and Taurus cows in the Sistan region of Iran has been done in recent years through the use of liquid sperm, frozen sperm, or foreign bulls. There are few studies in Iran on the effects of interbreeding programs on Sistani cattle. The present study was performed to identify mononucleotide polymorphisms (SNPs) based on RNA-Seq data in purebred Sistani cows and its crosses with three foreign breeds of Holstein, Simmental, and MonteBilliarde cows.

Material and Methods: In this study, RNA-Seq data were used for pure Sistani, Sistani and Holstein, Sistani and Montebeliarde, Sistani and Simmental cattle. For this purpose, first of the tail vein of purebred cattle mixed with Holstein, Simmental, and MonteBilliarde. (4 treatments and for each treatment two biological replications) in the same environmental, nutritional, and managerial conditions located in the breeding center of Sistani cattle in Zabol. blood was drawn.

Results: SNP discovery analysis was performed on transcriptome using SAMtools software package, which led to the discovery of 152496, 177042, 134285, and 163362 SNPs in pure Sistani breeds and its crosses with three foreign breeds of Holstein, Simmental, and Montebeliarde bulls. In this study, there was no direct relationship between the number of SNPs identified and the length of chromosomes. Also, 12 types of SNPs were identified, of which four types were transition and eight types were transversion. The most common known SNPs were transition which was 71.84% in pure Sistani, 72.65% in Sistani and Holstein, 72.60% in Sistani and Simmental, and 71.94% in Sistani and MonteBilliarde.

Conclusion: Overall, the results of this study confirmed that RNA-Seq technology is an effective, economical, and efficient method for identifying SNP loci. Factors influencing RNA-Seq evaluation are such as the number of samples.

Keywords: Cross-breeding, Nucleotide transition, RNA-Seq, Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) discovery, Transcriptome

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.35.14.0]
[DOI: 10.52547/rap.13.35.149]