



کاوش ژنومی نشانه‌های انتخاب در گاوهای بومی نژاد سرابی و تالشی ایران

سید ماکان موسوی کاشانی^۱، قدرت رحیمی میانجی^۲ و حسین مرادی شهرابک^۳

۱- ۲- دانشجوی دکتری و استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، (نویسنده مسوول: hmoradis@ut.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۱۷

چکیده

هدف این مطالعه پیدا کردن نشانه‌های انتخاب در گاوهای بومی سرابی و تالشی بود، تعداد ۲۹۶ راس گاو از دو نژاد سرابی و تالشی نمونه‌برداری و تعیین ژنوتایپ با ریزآرایه ۴۰k شرکت ایلومینا انجام شد. تعداد ۴۳ دام به دلیل عدم کسب شاخص نرخ حیوانات ژنوتیپ شده (ACR) برابر با ۰/۰۹ حذف شدند. تعداد نشانگرها بعد از گذراندن فیلتر حداقل فراوانی آلی (MAF) برابر با ۰/۰۱ و تعادل هاردی واینبرگ (برابر^{-۱} ۱۰) به ۲۸۷۸۲ نشانگر رسید. جهت بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و خرده ساختار جمعیتی از آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) استفاده شد. برای شناسایی نشانه‌های انتخاب در جمعیت خالص سرابی و تالشی شناسایی شده با PCA، آماره تنا محاسبه شد. جهت کاهش آریب مقادیر تنای محاسبه شده با روش میانگین‌گیری نشانگرهای مجاور، گراف منهن توسط نرم‌افزار Haploview بدست آمد که کروموزوم‌های ۲، ۵، ۶، ۷، ۱۰، ۲۲، ۲۵، ۲۷ دارای نشانه انتخاب بودند. برای جستجوی نشانه‌های انتخاب در هر دو جمعیت از آماره هموزیگوسیتی توسعه داده شده (EHH) و میزان شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته برای هر کروموزوم از نرم‌افزار R استفاده شد بررسی شد. برای مطالعه بیشتر جایگاه‌هایی که نشانه‌های انتخاب را نشان دادند وب سایت‌های بیوانفورماتیکی مورد جستجو قرار گرفت. در کروموزوم ۲ ژن EIF4G3 شناسایی شد. این ژن در انتقال RNA از هسته به سیتوپلاسم نقش اساسی در بیان ژن دارد. در کروموزوم ۶ ژن ANK2 شناسایی شد که پلی پپتید آنکیرین B را رمز می‌کند و در تمام بافت‌ها بیان می‌شوند. در کروموزوم ۷ ژن ARHGAP26 شناسایی که به‌عنوان ژن سرکوب گر تومور گزارش شده است. در کروموزوم ۱۰ ژن کدکننده پروتیین SYNJ2BP شناسایی شد که متوقف کننده سیگنالینگ اکتیوین می‌باشد. در کروموزوم ۲۲ ژن کدکننده پروتیین FAM3D که در مسیر بیوشیمیایی تنظیم سیتو اسکلتون اکتیوین فعالیت دارد شناسایی شد. این ژن بیشتر در جفت بیان شده و بر عملکردهای بیولوژیکی مانند مهاجرت و عملکرد لکوسیت، تنظیم درجه حرارت، بقای سلول و تمایز خون‌سازی نقش دارد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز مؤلفه‌های اصلی، آماره تنا، آماره هموزیگوسیتی هاپلوتایپ توسعه یافته

مقدمه

آگاهی از منشا نژاد و تاریخچه تکامل جهت پیش‌بینی ترکیب ژنی حمل شده توسط هر نژاد ممکن است در آینده برای توصیف صفات مختلف مثل مقاومت به بیماری، استرس و آداپته شدن به محیط‌های مختلف مهم باشد (۲). طی فرآیند اهلی شدن دام‌ها در اثر عوامل ژنتیکی مختلف مانند انتخاب مصنوعی، رانش ژنتیکی، جهش و به‌خاطر تغییرات ایجاد شده بر اثر این عوامل و به‌علت استفاده تعداد کمی از نژادها برای تولید بالاتر باعث کاهش تنوع ژنتیکی دام‌های اهلی شده که باعث بروز نگرانی جهانی شده است (۱۶). به‌نظر می‌رسد بهترین راه برای محافظت از نژادهای بومی به‌منظور حفظ تنوع ژنتیکی، نگهداری حیوان در محل زندگی خود است چراکه هزینه محافظت از ذخایر ژنتیکی بالا بوده و امکان حفظ همه ذخایر ژنتیکی در آزمایشگاه‌ها و موسسات تحقیقاتی ممکن نیست (۲۶). مطالعه ژن‌های مؤثر بر صفات به دو صورت قابل بررسی هستند یکی از طریق مطالعه فنوتیپ که به ژنوتیپ و ژن مربوطه منتهی می‌شود و دوم روشی که از ژنوم به فنوتیپ می‌رسد. طبق تئوری خنثی، بخش عمده‌ای از تنوع ژنتیکی موجود در درون گونه‌ها بوسیله رانش تصادفی آلل‌های چند شکل که از نظر انتخابی خنثی هستند به وجود می‌آید. انتخاب خنثی به انتخابی گفته می‌شود که هیچ تأثیری بر شایستگی ژنتیکی افراد نداشته باشد. در این شرایط واریانت‌های جدید برای افزایش فراوانی در جمعیت نیاز به مدت زمان طولانی‌تری خواهند داشت که در طی این زمان

به دلیل وقوع نوترکیبی در اطراف این جایگاه، عدم تعادل لینکازی (LD) بوجود آمده در اطراف این جایگاه به تدریج شکسته و از بوجود آمدن یک هاپلوتایپ ویژه در جمعیت ممانعت به‌عمل می‌آید. آلل‌های متداولی که بدین طریق در سطح ژنوم ایجاد شده‌اند و قابل تشخیص هستند عموماً قدیمی بوده و عدم تعادل لینکازی بوجود آمده در اطراف این آلل دامنه کوتاهی دارد (۳۳). سطوح بالای تمایز جمعیت می‌تواند بیانگر وقوع انتخاب مثبت روی یک آلل مفید در یک یا چندین جمعیت باشد. در مقابل، سطوح پایین تر نشان‌دهنده وجود انتخاب متعادل‌کننده است که منجر به حفظ نسبت خاصی از آلل‌ها در تمام جمعیت می‌شود. در صورتی که جهش بوجود آمده در سطح ژنوم باعث افزایش شایستگی افراد در جامعه شود، انتخاب طبیعی باعث می‌شود تا افرادی که دارای شایستگی بیشتری هستند، در تشکیل نسل بعد مشارکت بیشتری داشته باشند (۱۳،۳). به دنبال افزایش فراوانی آلل‌های مفید، فراوانی آلل‌های موجود در جایگاه‌های خنثی یا نسبتاً خنثی که به این جایگاه‌ها متصل هستند، نیز افزایش می‌یابد. به این پدیده انتقال همراه می‌گویند. به کاهش یا حذف تنوع در جایگاه‌های مجاور یک جهش (آلل جهش یافته) سودمند در طی انتخاب طبیعی، جاروب انتخاب گفته می‌شود. علاوه بر این، در پدیده‌ی انتقال همراه، عدم تعادل لینکازی می‌تواند در اثر ایستزای ناشی از ترکیب دو یا چند جایگاه مجاور هم ایجاد شود. بزرگی عدم تعادل لینکازی بستگی به شدت انتخاب و فاصله نسلی گونه مورد مطالعه دارد.

واینبرگ^۶ ۱۰ عبور داده شد در کل ۰/۹۸ ژنوتیپ‌ها در جمعیت باقی ماند که از کل ۳۰۱۰۶ اسنیپ تعداد ۲۸۷۸۲ اسنیپ برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از تعداد ۲۹۶ حیوان تعداد ۴۳ حیوان به علت فیلتر ACR^۷ حذف شده و تعداد ۲۵۳ حیوان باقی ماند. قبل از آنالیز مولفه‌های اصلی برای تمایز ژنتیکی جمعیت آلل‌های تعیین ژنوتیپ نشده توسط نرم‌افزار Beagle (۶) ایمپوت شده، سپس توسط نرم‌افزار R آنالیز مولفه‌های اصلی انجام شد. مولفه‌های اصلی در این بخش بر اساس ماتریس خویشاوندی بدست آمد. خویشاوندی در این بررسی بر اساس فرمول پارسیل و همکاران (۲۵) تعیین شد. این خویشاوندی در واقع خویشاوندی ژنومی آکایا IBD^۸ در سطح ژنوم است. سپس معکوس ماتریس خویشاوندی به‌عنوان ماتریس فاصله (0/5-f) برای تعیین مولفه‌های اصلی استفاده می‌گردد. این بخش در محیط R و توسط پکیج adegenet صورت گرفت. تعیین هاپلوتایپ‌های جمعیت بوسیله نرم‌افزار fastphase (۲۶) مورد بررسی قرار گرفت و هاپلوتایپ‌های هر کروموزم جداگانه بدست آمد. جهت بررسی الگوی ژنومی انتخاب مثبت در جمعیت‌های گاوهای سرابی و تالشی، ارزش‌های تسا برای هر مارکر SNP به روش برآوردگر ناریب تسا، (۳۳) در محیط R محاسبه گردید. جهت شناسایی بهتر نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم به جای در نظر گرفتن ارزش عددی هر SNP از میانگین‌گیری ارزش‌های عددی SNP‌های مجاور به روش CW (۳۷) با طول ۳۰۰ کیلو جفت باز استفاده شد و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانه‌های مجاور دارای مقدار بالا ی، بودند، به‌عنوان، نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند. سپس توسط نرم‌افزار haploview (۵) گراف منهن بدست آمد. از آماره هموزیگوسیتی هاپلوتایپ توسعه یافته (EHH) که یک آماره مبتنی بر LD است، جهت شناسایی مناطقی ژنومی تحت انتخاب مورد استفاده قرار گرفت. در این روش مناطقی ژنومی تحت انتخاب بوسیله آلل‌های با EHH و فراوانی بالا قابل تشخیص می‌باشند. برای انجام آنالیز EHH از بسته نرم‌افزاری rehh (۱۴) در محیط R استفاده شد. پس از آنالیز EHH برای بررسی ژن‌های گزارش شده در مناطق کروموزمی تحت انتخاب از پایگاه اطلاعاتی Biomart Ensemble جهت گزارش ژن‌ها و از پایگاه اطلاعاتی david و KeGG برای بررسی مسیر بیوشیمیایی و آنتالوژی ژن‌های گزارش شده استفاده گردید.

نتایج و بحث

تمایز ژنتیکی جمعیت

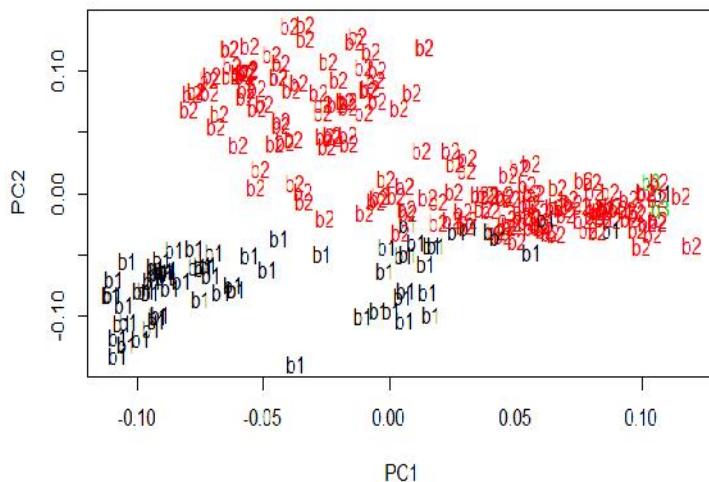
همان‌طور که در شکل‌های ۱ و ۲ دیده می‌شود دام‌ها به چهار دسته سرابی خالص، تالشی خالص و آمیخته این دو نژاد تفکیک شده‌اند. تعداد ۴۵ رأس گاوتالشی خالص، ۲۹ رأس گاو آمیخته تالشی × هلشتاین، ۵۵ رأس گاو سرابی خالص و ۱۲۴ رأس گاو آمیخته سرابی × هلشتاین گروه‌بندی شده و در ادامه نشانه‌های انتخاب برای گاوهای بومی سرابی خالص و تالشی خالص مورد بررسی قرار گرفت.

اما به‌طور کلی به‌دلیل اینکه در حواشی ناحیه مورد انتخاب اتفاق می‌افتد اثر غالبی بر متوسط عدم تعادل لینکاژی ژنوم ندارد (۹). ارزیابی ساختار جامعه برای ۸ نژاد گاو با نمونه‌گیری از گونه‌های *Bos indicus* و *Bos taurus* با استفاده از پنل‌های SNP برای کل ژنوم، ۲۶۴۱ تفاوت تک نوکلئوتیدی اتوزومی در نژادهای مختلف ژنوتایپ شد که ساختار جامعه با استفاده از مدل پیوستگی در برنامه STRUCTURE مورد بررسی قرار گرفت و از برآوردهای F_{ST} برای نمایان کردن رابطه بین این نژادها استفاده گردید (۲۱). هولسینگر و ویر (۱۶) در مطالعه‌ای مروری به بررسی تفاوت آماره‌های ژنتیکی در بین جوامع مختلف پرداختند. در این بررسی نشان داده شد که آماره F_{ST} دیدگاهی مهم در زمینه فرایندهای تکاملی فراهم می‌آورد که ساختار تنوع ژنتیکی درون و در بین جوامع را تحت تاثیر قرار می‌دهد. کیجاز و همکاران (۱۷) به آنالیز تنوع و پراکنش ۷۴ نژاد مختلف گوسفند در سراسر جهان با استفاده از نشانگرهای متراکم SNP و یافتن نشانه‌های انتخاب پرداختند. آنها نشان دادند که نشانه‌های انتخاب قدرتمندی در پاسخ به انتخاب برای عدم شاخداری مشاهده می‌شود. مخبر و همکاران (۱۹) در پویا ژنومی نشانه‌های انتخاب در گاو میش خوزستانی و ایرانی به وسیله آرایه ژنومیک گاو میش ۹۰k تعیین ژنوتایپ و از آماره ناریب تسا و استفاده از آنالیز PCA^۹ جهت تفکیک جمعیت، بعد از انطباق مناطق ژنومی انتخاب شده با مناطق متناظر در گاو ۶۴ ژن و ۱۷ QTL شناسایی کردند. این QTL‌ها با صفات مهم اقتصادی، راندمان تبدیل غذایی، وزن بدن، چربی زیر پوستی، تیپ، تردی گوشت، ترکیبات شیر، اتصالات پستانی و گوساله‌زایی آسان ارتباط داشتند. جهت شناسایی ذخایر ژنتیکی گاوهای بومی کشور و تلاش برای حفظ منابع ژنتیکی ضروری است تا در قدم اول ساختار ژنتیکی دام‌ها شناسایی و اطلاعات حاصل برای مطالعات و تحقیقات بعدی مورد استفاده قرار گیرد. لذا هدف از این مطالعه پیدا کردن ردیای انتخاب در طول سالیان مختلف بر روی گاو سرابی و تالشی خالص است.

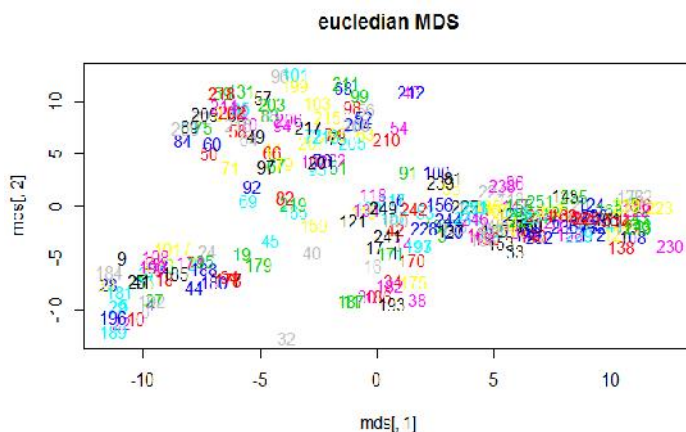
مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و استخراج DNA

در این مطالعه نمونه‌گیری از استان آذربایجان شرقی، شهر سراب، ایستگاه اصلاح نژادی گاو سرابی به تعداد ۲۱۱ رأس گاو و استان گیلان، شهر فومن، ایستگاه اصلاح نژادی گاو تالشی به تعداد ۹۶ رأس حیوان انجام گرفت. از تمام حیوانات صفات بیومتری اندازه‌گیری و سپس خون‌گیری به عمل آمد. در این مطالعه از روش فنل و کلروفرم برای استخراج DNA استفاده شد. سپس برای تعیین کیفیت و کمیت نمونه DNA‌ها از دو روش ژل آگارز و نانودراپ استفاده شد. نمونه‌های مورد مطالعه برای تعیین ژنوتایپ به شرکت geneseek ارسال گشت که با استفاده از ریزآرایه ۴۰k ژنوتایپ انجام شد. نمونه‌ها برای بررسی نشانه‌های انتخاب توسط نرم‌افزار plink (۲۱) از فیلترهای فراوانی آلی نادر با سطح ۰/۰۵، حداقل فراوانی آلی ۰/۰۱ و تعادل هاردی



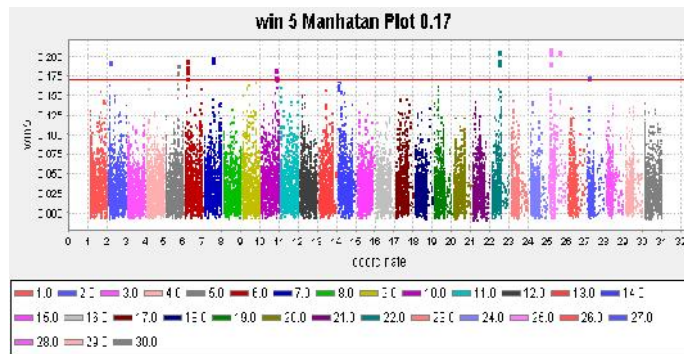
شکل ۱- آنالیز مولفه‌های اصلی برای نژاد سرابی و تالشی جهت تفکیک نژادها در نرم‌افزار R
Figure 1. Principal Component Analysis for Sarabi and Taleshi breed to classification breeds on R software



شکل ۲- آنالیز مولفه‌های اصلی برای نژاد سرابی و تالشی توسط نرم‌افزار R جهت مشخص نمودن شماره دام
Figure 2. Principal Component Analysis for Sarabi and Taleshi on R software to specify animal number

برای مشخص کردن این که کدام یک از SNP دارای بیشترین مقدار حاصل از محاسبه آماره تتا بوده و همچنین نحوه همراهی SNP‌های مجاور برای پیدا کردن کروموزم‌های تحت انتخاب در نرم‌افزار هاپلوویو انجام و انتخاب سخت گیرانه برای SNP‌های عبور کرده از حد آستانه اعمال گردید. گراف منهن (شکل ۳) نشان داد کروموزم‌های (ستون‌های عمودی) ۲، ۵، ۶، ۷، ۱۰، ۲۲، ۲۵، ۲۷، تحت انتخاب بودند.

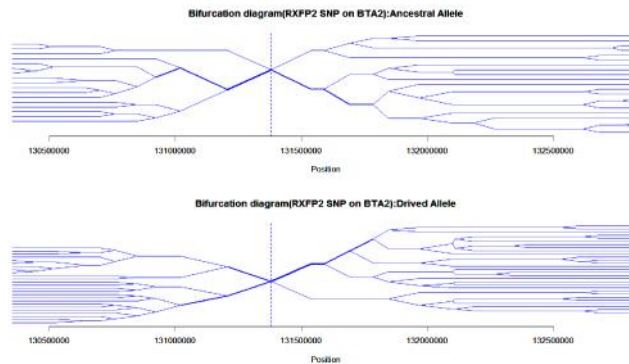
نژادها به دو دسته گاو سرابی (b2) و گاو تالشی (b1) تفکیک شدند (شکل ۱). در قسمت چپ شکل ۱ در قسمت انتهایی گاوهای تالشی خالص (b1)، در قسمت چپ شکل ۱ در قسمت بالایی گاوهای سرابی خالص و در قسمت میانه به سمت راست گاوهای سرابی و تالشی آمیخته تفکیک گردیدند که در شکل ۲ برای مشخص کردن نام دام‌ها و جداسازی از آمیخته‌ها دام‌ها براساس شماره ترتیبی در فایل ژنوتیپی برای انجام آنالیزهای بعدی مشخص شدند.
بررسی نشانه‌های انتخاب برای گاو تالشی خالص و گاو سرابی خالص



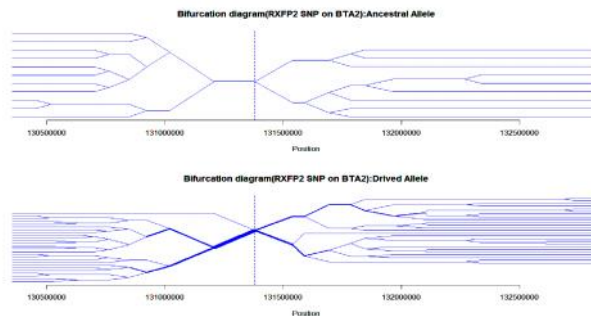
شکل ۳- گراف منهتن برای نشانه‌های انتخاب گاو سرابی و تالشی خالص
Figure 3. Manhattan graph for signature selection in pure Sarabi and Taleshi

بالای LD از چندین ژن کاندیدا با استفاده از روش EHH مورد بررسی قرار دادند. مشابه همین مطالعه در گاو توسط قنبری و همکاران (۲۷) و پان و همکاران (۲۲) انجام شده است. آماره EHH شکستگی LD در اطراف منطقه ژنومی کاندید انتخاب را با ارزیابی خصوصیات هاپلوتیپی در داخل یک جمعیت مورد بررسی قرار می‌دهد.

بررسی LD مناطق ژنومی انتخاب شده با استفاده از آماره EHH برای جمعیت تالشی و سرابی خالص
جهت انجام آنالیز EHH نیاز به فازهای هاپلوتیپی هر کروموزم می‌باشد ابتدا کروموزم‌ها تفکیک و سپس در برنامه fastphase فازبندی هاپلوتیپی انجام و آنالیز EHH انجام شد. ثابتی و همکاران (۲۵) رد پای ژنتیکی انتخاب مثبت اخیر در انسان‌ها را توسط آنالیز هاپلوتیپ‌ها با طول



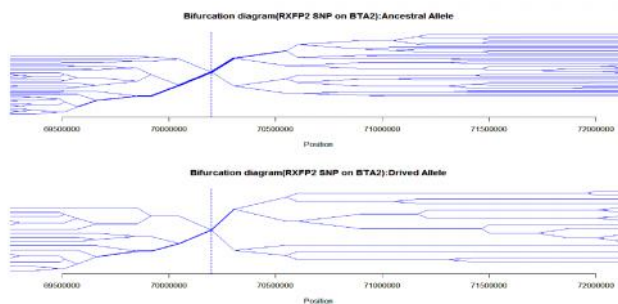
شکل ۴- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزم ۲ برای گاو تالشی
Figure 4. LD degradation for ancestral and derived allele at chromosome 2 for Taleshi cow



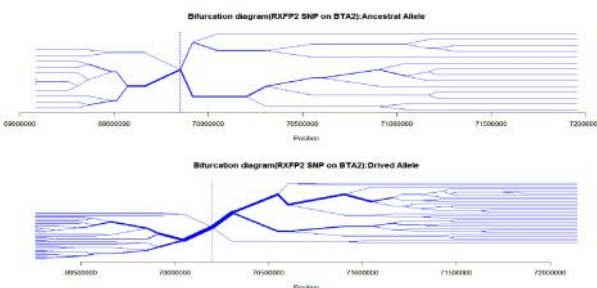
شکل ۵- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزم ۲ برای گاو سرابی
Figure 5. LD degradation for ancestral and derived allele at chromosome 2 for Sarabi cow

T جهش پیدا کرد همان‌طور که در شکل ۴ و ۵ نتایج حاصل از اماره EHH مشاهده می‌گردد شکستگی LD در این دو نژاد نسبتاً "مانند هم بوده و نشان می‌دهد برای هر دو نژاد انتخاب برای آلل T صورت گرفته است.

تفاوت انتخاب در کروموزوم ۲ در هر دو نژاد به نفع آلل جهش یافته بود. فراوانی آللی جهش یافته در گاو سرابی برابر ۰/۹۹۱ و فراوانی آللی جهش یافته برای گاو تالشی برابر ۰/۷۳ و فراوانی آللی اجدادی در کروموزوم ۲ برابر ۰/۸۹ و آلل C به



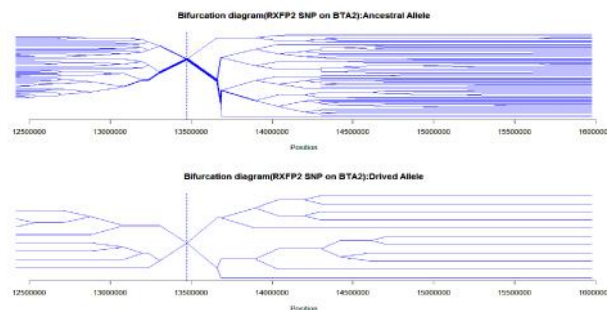
شکل ۶- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۵ برای نژاد تالشی
Figure 6. LD breakeage for ancestral and mutant allele on chromosome 5 for Taleshi breed



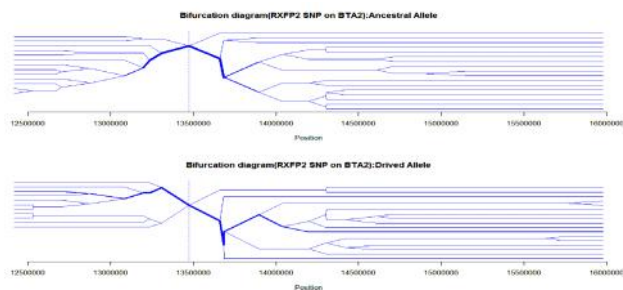
شکل ۷- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۵ برای نژاد سرابی
Figure 7. LD breakeage for ancestral and mutant allele on chromosome 5 for Sarabi breed

است که نشان‌دهنده انتخاب برای آلل A می‌باشد. در شکل ۷ شکستگی LD برای آلل جهش یافته بیشتر از آلل اجدادی بود. شکل ۷ نشان‌دهنده انتخاب برای آلل G در نژاد سرابی می‌باشد.

تفاوت انتخاب در کروموزوم ۵ در نژاد تالشی به نفع آلل اجدادی با فراوانی برابر ۰/۶۴ و در نژاد سرابی تفاوت انتخاب به نفع آلل جهش یافته با فراوانی برابر ۰/۹۹ می‌باشد. آلل اجدادی G به A تبدیل شده است. در شکل ۶ شکستگی LD در نژاد تالشی برای آلل اجدادی بیشتر از آلل جهش یافته



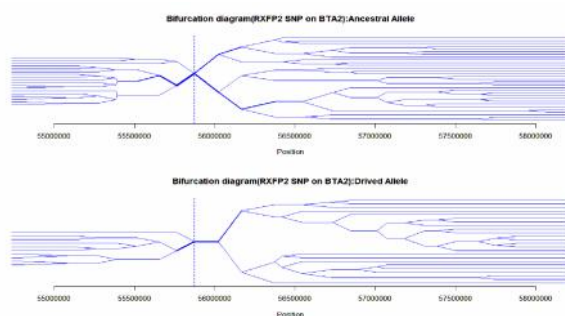
شکل ۸- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۶ برای نژاد تالشی
Figure 8. LD breakeage for ancestral and mutant allele on chromosome 6 for Taleshi breed



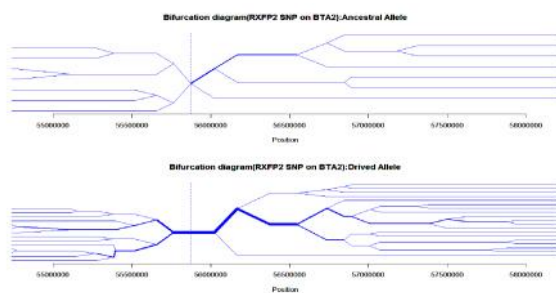
شکل ۹- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۶ برای نژاد سرابی
Figure 9. LD breake for ancestral and mutant allele on chromosome 6 for Sarabi breed

تفاوت انتخاب در کروموزوم ۶ در هر دو نژاد گاو تالشی و سرابی به نفع آلل اجدادی می‌باشد. فراوانی آللی اجدادی در گاو تالشی برابر ۰/۸۴ و در گاو سرابی برابر ۰/۵۳ می‌باشد. در اثر انتخاب صورت گرفته آلل اجدادی G به A جهش یافته

است. شکستگی LD در شکل ۸ و ۹ نشان‌دهنده انتخاب بالا برای این جایگاه در این دو نژاد از دام مورد مطالعه به نفع آلل G می‌باشد.



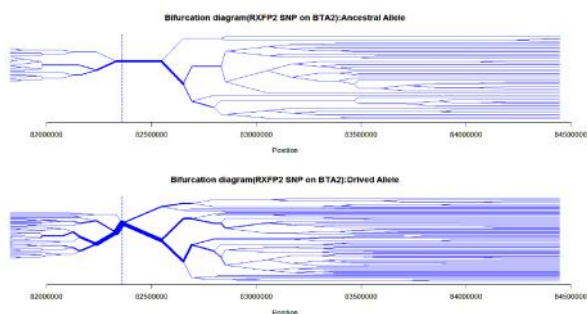
شکل ۱۰- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۷ برای نژاد تالشی
Figure 10. LD breake for ancestral and mutant allele on chromosome 7 for Taleshi breed



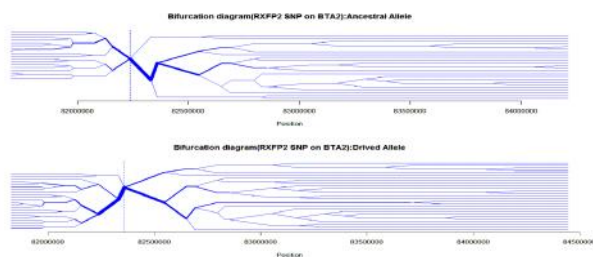
شکل ۱۱- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۷ برای نژاد سرابی
Figure 11. LD breake for ancestral and mutant allele on chromosome 7 for Sarabi breed

تفاوت انتخاب برای کروموزوم ۷ در نژاد تالشی به نفع آلل اجدادی با فراوانی برابر ۰/۶۴ می‌باشد. در گاو سرابی تفاوت انتخاب به نفع آلل جهش یافته بوده که فراوانی آن برابر ۰/۲۸ است. در این مطالعه آلل اجدادی A به G جهش یافته است

که در گاو تالشی انتخاب برای آلل A و در گاو سرابی انتخاب برای آلل G صورت گرفته است. شکستگی LD در شکل ۱۰ برای آلل اجدادی بالا بوده و در شکل ۱۱ شکستگی برای آلل جهش یافته بالا می‌باشد.



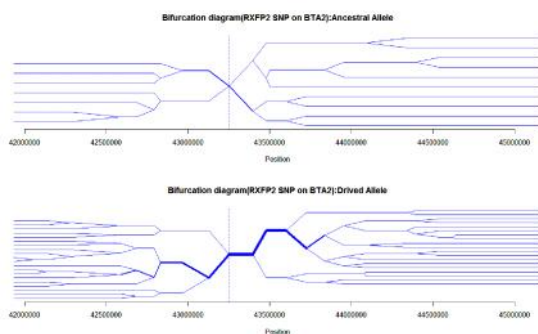
شکل ۱۲- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۱۰ برای نژاد تالشی
Figure 12. LD breakege for ancestral and mutant allele on chromosome 10 for Taleshi breed



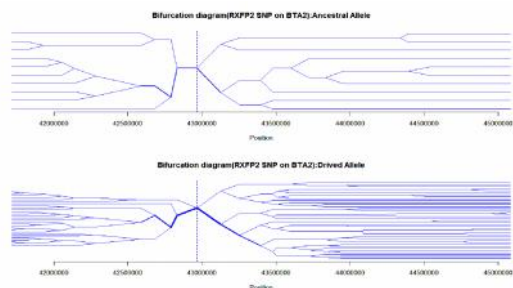
شکل ۱۳- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۱۰ برای نژاد سرابی
Figure 13. LD breakege for ancestral and mutant allele on chromosome 10 for Sarabi breed

۰/۹۷ می‌باشد. آلل اجدادی T به C جهش یافته است. شکستگی LD برای هر دو نژاد در آلل جهش یافته زیادتز از آلل اجدادی می‌باشد و نشان‌دهنده انتخاب برای آلل C برای هر دو نژاد می‌باشد.

تفاوت انتخاب برای کروموزوم ۱۰ در شکل‌های ۱۲ و ۱۳ نشان می‌دهد که تفاوت انتخاب در نژاد تالشی به نفع آلل جهش یافته بوده و فراوانی آن برابر ۰/۷۲ می‌باشد. در گاو سرابی تفاوت انتخاب به نفع آلل جهش یافته و با فراوانی

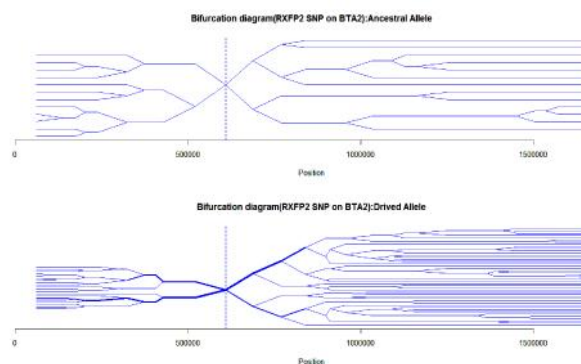


شکل ۱۴- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۲۲ برای نژاد سرابی
Figure 14. LD breakege for ancestral and mutant allele on chromosome 22 for Sarabi breed

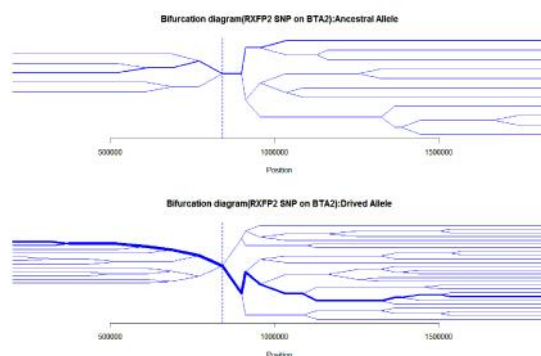


شکل ۱۵- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۲۲ برای نژاد تالشی
Figure 15. LD breakeage for ancestral and mutant allele on chromosome 22 for Taleshi breed

تفاوت انتخاب برای کروموزوم ۲۲ در نژاد سرابی به نفع آلل جهش یافته که فراوانی آن برابر با ۰/۶۶ بود. اما در نژاد تالشی تفاوت انتخاب به نفع آلل اجدادی با فراوانی ۰/۷ بود. شکستگی LD شکل ۱۴ در نژاد سرابی برای آلل جهش یافته بیشتر است که انتخاب برای باز T را نشان می‌دهد. شکستگی LD (شکل ۱۵) در نژاد تالشی به نفع آلل اجدادی است که نشان‌دهنده انتخاب آلل C برای جمعیت تالشی است در کروموزوم ۲۲ آلل اجدادی C به T جهش یافته است.



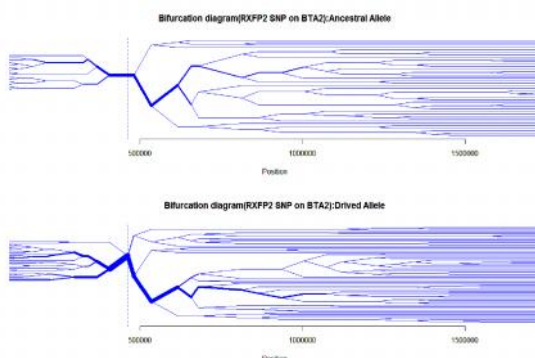
شکل ۱۶- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۲۵ برای نژاد تالشی
Figure 16. LD breakeage for ancestral and mutant allele on chromosome 25 for Taleshi breed



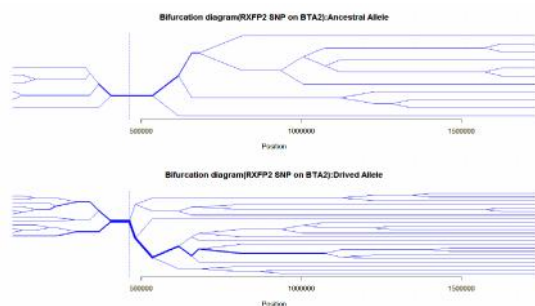
شکل ۱۷- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزوم ۲۵ برای نژاد سرابی
Figure 17. LD breakeage for ancestral and mutant allele on chromosome 25 for Sarabi breed

تفاوت انتخاب در کروموزوم ۲۵ در نژاد تالشی به نفع آلل جهش یافته می‌باشد. فراوانی آلل جهش یافته برابر ۰/۹۴ بود و در این نژاد آلل اجدادی A به G جهش یافته است. تفاوت انتخاب در نژاد سرابی به نفع آلل جهش یافته با فراوانی ۰/۹۸ می‌باشد که نشان‌دهنده انتخاب آلل G برای این منطقه از کروموزوم در این نژاد است. شکستگی LD در شکل ۱۶ برای گاو تالشی نشان‌دهنده انتخاب برای آلل اجدادی است. شکل ۱۷ نشان‌دهنده شکستگی LD برای هر دو آلل است و به نظر می‌رسد این شکستگی برای آلل جهش یافته بیشتر باشد.

کروموزوم در این نژاد است. شکستگی LD در شکل ۱۶ برای گاو تالشی نشان‌دهنده انتخاب برای آلل اجدادی است. شکل ۱۷ نشان‌دهنده شکستگی LD برای هر دو آلل است و به نظر می‌رسد این شکستگی برای آلل جهش یافته بیشتر باشد.



شکل ۱۸- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزم ۲۷ در نژاد تالشی
Figure 18. LD breakeage for ancestral and mutant allele on chromosome 27 for Taleshi breed



شکل ۱۹- شکستگی LD برای آلل اجدادی و جهش یافته در کروموزم ۲۷ در نژاد سرابی
Figure 19. LD breakeage for ancestral and mutant allele on chromosome 27 for Sarabi breed

همکاران (۱۰) در مطالعه بیان ژن غدد پستانی روی دو دسته گاوهای پرتولید و کم تولید هلشتاین با چربی و پروتئین شیر زیاد و کم و با میزان بیان RNA در غدد پستانی ژن‌های تأثیر گذار از جمله EIF4G3 شناسایی که این ژن با شبکه ژنی از جمله SAA3، HEATR7B2، C4BPA، TRIB3، SESN2، CHAC1، HSPD1، SLC25 A38، BMX، VEGFA، CDH16، RPL23A، ATF3، ZC3H14، PTHLH، ARID1B، CDKN1A، EIF4G3، FCAMR، DNER، HIST1H2AC، M-SAA32، DDT3 و P4HA2 در ارتباط می‌باشد. در کروموزم ۵ باموقعیت ۱۹۹۴۳-۷۰۱۹۹۷۴۳ ژنی در روی ژنوم گاو گزارش نشده است. در کروموزم ۶ در موقعیت (۱۳۴۷۵۴۱۲-۱۳۴۷۵۴۱۲) ژن با شماره شناسایی ENSBTAG0000002392 شناسایی شد که نام دیگر این ژن در پایگاه ANK2 NCBI می‌باشد که از نوع ژن‌های کد کننده پروتئین است. آنکارین‌ها پروتئین‌های ساختاری برای تشکیل ساختار بنیادی سیتو اسکلتون و از خانواده پروتئین‌هایی که اتصال پروتئین‌های غشایی جدایی ناپذیر به سایتو اسکلتون اکتین-اسپکترین تحتانی هستند که در عضله، شبکه بسیار پیچیده از ارتباطات بین تارچه و همچنین ارتباط بین تارچه و سارکوسما شبکه سارکوپلاسمی را تشکیل می‌دهد (۱۲، ۲۰، ۳۲). در انسان سه ژن آنکیرین ANK₁، ANK₂، ANK₃ پلی پپتیدهایی را رمز می‌کنند که آنکیرین R، آنکیرین B و آنکیرین G نامیده می‌شود. آنکیرین B و G در بیشتر بافت‌ها بیان می‌شوند در

تفاوت انتخاب در کروموزم ۲۷ در گاو تالشی به نفع آلل جهش یافته می‌باشد. فراوانی آلل جهش یافته برابر ۰/۸ و آلل اجدادی G به A جهش یافته است. تفاوت انتخاب در گاو سرابی به نفع آلل جهش یافته می‌باشد. فراوانی آلل جهش یافته برابر با ۰/۹۸ است که نشان‌دهنده انتخاب به نفع آلل G برای هر دو نژاد بوده است همان‌طور که در شکل‌های ۱۸ و ۱۹ مشاهده می‌شود شکستگی LD برای هر دو نژاد برای آلل اجدادی بالا است و نشان می‌دهد که این منطقه تحت تأثیر انتخاب بالا قرار گرفته است. نتایج بررسی LD نشانه انتخاب وقتی از آنالیز تفکیک جمعیتی استفاده نمی‌شد و بعد از آنالیز جهت بررسی خرده ساختارهای جمعیت متفاوت است چرا که قبل از تفکیک جمعیت کروموزم‌های ۱، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۲۶ مورد انتخاب واقع شده بودند ولی بعد از آنالیز تفکیک جمعیتی کروموزم‌های ۲، ۵، ۶، ۷، ۱۰، ۲۵، ۲۷ مورد انتخاب واقع شدند که حاکی از آن است حتما جهت بررسی نشانه‌های انتخاب می‌بایست خرده ساختارهای جمعیتی مورد بررسی قرار گیرد تا از اریب حاصل از لایه‌بندی جمعیت‌ها جلوگیری شود.

شناسایی ژن‌های مرتبط با مناطق ژنومی تحت انتخاب در جمعیت گاو تالشی و سرابی

در منطقه کروموزمی ۲ با استفاده از پایگاه اطلاعاتی BIOMART ENSEMBLE با استفاده از (Ensemble Gene 87 در موقعیت (۱۳۲۱۸۴۱۰۰-۱۳۲۱۸۳۸۹۹) ژن EIF4G3 شناسایی شد. ژن EIF4G3 در انتقال RNA از هسته به سیتو پلاسم نقش اساسی در بیان ژن دارد. کویی و

است. دو پروتئین D114 و اکتیوین II به عنوان گیرنده‌ها در مسیر این سیگنال می‌باشند و مسئول آشکارسازی وظایف می‌باشند. و همچنین طبق آزمایش آدام و همکاران (۱) SYNJ2BP برشکاف (gap) اکتیوین اثر داشت. بیان این ژن باعث فسفر یلاسیون پروتئین اکتیوین، SMAD2 و SMAD3 شده که در نهایت با این کار، SYNJ2BP سیگنالینگ اکتیوین را متوقف می‌نماید. در کروموزم ۲۲ و در موقعیت ۴۳۲۵۲۱۱۸ – ۴۳۲۵۲۹۱۸ ژن FAM3D که در کد کردن پروتئین نقش دارد شناسایی شد. ژن FAM3D در مسیر بیوشیمیایی تنظیم سیتو اسکلتون اکتین فعالیت دارد. FAM3A، FAM3B، FAM3C، FAM3D جزء ژن‌های خانواده شبه سیتوکین می‌باشند که FAM3B به شدت در پانکراس FAM3D در جفت و FAM3A، FAM3C تقریباً در تمام بافت‌ها بیان می‌شوند. سیتوکین‌ها اثرات عمیقی بر عملکردهای بیولوژیکی متنوع مانند مهاجرت و عملکرد لکوسیت، تمایز خونسازی، تنظیم درجه حرارت، پاسخ‌های فاز حاد و بقای سلول دارند.

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد ژن‌های شناسایی شده در مناطق مورد انتخاب در ارتباط با ماندگاری، تولید ترکیبات شیر، مکانیسم ایمنی در بیماری‌های مالاریا، پریون، بویایی، بینایی، سیستم عصبی مرکزی، ژن‌های سرکوب‌گر تومور و رنگ پوست نقش دارند. تثبیت آلل‌های مفید گواهی بر انتخاب اخیر مثبت در جمعیت گاو سرابی و تالشی می‌باشد و همچنین بررسی ژن‌های تحت انتخاب در دو نژاد نشان داد انتخاب خنثی بیشتر در جهت ماندگاری دام‌های مورد مطالعه در محیط در حال رخ دادن می‌باشد.

حالی که آنکرین R یک الگو بیان محدود را نمایش می‌دهد. اسکاتلند و همکاران (۲۷) گزارش کردند که در موش‌های فاقد آنکرین B بطور آشکار نقص قابل توجهی در سیستم عصبی مرکزی از جمله انحطاط دستگاه آکسون بلند دارند و روز بعد زایمان می‌میرند. آنکرین B نقش مهمی برای عملکرد فیزیولوژی طبیعی عروق قلبی دارد کاهش بیان ژن آنکرین و جهش به‌طور بالقوه باعث آریتمی‌های قلبی کشنده می‌شوند. مطالعات کانها و همکاران (۹) نشان داد که ژن آنکرین با صفات کیفی گوشت و به ویژه چربی عضلانی و تردی گوشت در ارتباط می‌باشد. در کروموزم ۷ در موقعیت (۵۵۸۷۱۹۸۶-۵۵۸۷۱۷۸۶) با اسمبل umd3.1 ژن GRAF شناسایی شد که به عنوان یک ژن کد کننده پروتئین که نام پروتئین آن 2 protein Rho-activating می‌باشد. GRAF به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور هست که متصل با آدیژن کیناز مرکزی هست (۲۸). پروتئین این ژن در بافت‌های مختلف بیان می‌شود (۷). حذف ژن GARF در برخی موارد موجب کم خونی میلوئید حاد (AML) و کم خونی میلوئید مزمن (CML) می‌شود. در موقعیت ۸۲۳۶۰۵۴۸ – ۸۲۳۶۰۳۴۸ کروموزم ۱۰ یک ژن به نام SYNJ2BP از نوع ژن کد کننده پروتئین شناسایی شد. برای این ژن در پایگاه اطلاعاتی KeGG مسیر بیوشیمیایی مشاهده نشد. این ژن پروتئین باند کننده سیناپتوتین ۲ را کد می‌کند آنژیو جنسیز وابسته به چندین مراحل سلولی شامل مهاجرت سلول‌های اندو قلیایی، تکثیر و چسبندگی می‌باشد. آنروجنسیز با اثر منفی رو مپ کیناز سیگنالینگ باعث کاهش فسفر یلاسیون ERK پروتئین‌ها می‌شود (SYNJ2BP) هم به صورت این ویترو و این ویو فعالیت دارد و وظیفه آن اجرای آنژیو جنسیز

منابع

- Adam. M.G., C. Berger. A. Feldner. W.J. Yang. J. Wüsthube-Lausch. S.F. Herberich. M. Pinder. S. Gesierich, H.P. Hammes, H.G. Augustin, and A. Fischer. 2013. Synaptojanin-2 Binding Protein Stabilizes the Notch Ligands DLL1 and DLL4 and Inhibits Sprouting Angiogenesis Novelty and Significance. *Circulation research*, 113: 1206-1218.
- Aminafshar, M., C. Amirinia and R. Vaez-Torshizi. 2008. Genetic diversity in buffalo population of Guilan using microsatellite markers. *Journal Animal and Veterinary Advance*, 7: 1499-1515.
- Andersson, L. and M. Georges. 2004. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 5: 202-212.
- Ardlie, K.G., L. Kruglyak and M. Seielstad. 2002. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*. 3: 299-309.
- Barrett. J.C., B. Frv. J.D.M.J. Maller and M.J. Dalv. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21: 263-265.
- Browning, B. L. 2014. Homepage of software: BEAGLE v.4, URL <http://faculty.washington.edu/browning/beagle/beagle.html>.
- Borkhardt, A., S. Bojesen, O.A. Haas, U. Fuchs, D. Bartelheimer, I.F. Loncarevic, R.M. Bohle, J. Harbott, R.U. Reppjaeger and S. Viehmann. 2000. The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t (5; 11) (q31; q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 9168-9173.
- Brian, L. and B. Rowning. 2011. BEAGLE 3.3.2. Department of Medicine, Division of Medical Genetics, University of Washington.
- Cunha, S.R., S. Le Scouarnec, J.J. Schott and P.J. Mohler. 2008. Exon organization and novel alternative splicing of the human ANK2 gene: implications for cardiac function and human cardiac disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 45: 724-734.
- Cui, X., Y. Hou, S. Yang, Y. Xie, S. Zhang, Y. Zhang, Q. Zhang, X. Lu, G.E. Liu and D. Sun. 2014. Transcriptional profiling of mammary gland in Holstein cows with extremely different milk protein and fat percentage using RNA sequencing. *BMC genomics*, 15: 1.

11. Fan, B., Z. Du, D.M. Gorbach and F. RM. 2010. Development and Application of High-density SNP Arrays in Genomic Studies of Domestic Animals. *Asian-Australia journal Animal Science*, 2: 833-847.
12. Gagelin, C., B. Constantin, C. Deprette, M.A. Ludosky, M. Recouvreur, J. Cartaud, C. Cognard, G. Raymond and E. Kordeli. 2002. Identification of AnkG107, a muscle-specific ankyrin-G isoform. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 12978-12987.
13. Giacomoni, E.H., G.P. Fernandez-Stolz and T.R.O. Freitas. 2008. Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers. *Genetic. Molecular. Research*, 7: 261-270.
14. Gautier, M. and R. Vitalis. 2012. Rehh: An R package to detect footprints of selection in genome-wide SNP data from haplotype structure. *Bioinformatics*, 28: 1176-1177.
15. Gross, A., A. Tönjes, P. Kovacs, Peter Kovacs, Krishna R Veeramah, Peter Ahnert, Nab R Roshyara, Christian Gieger, Ina-Maria Rueckert, John Novembre, Michael Stumvoll, Markus Scholz. 2011. Population-genetic comparisons of the Sorbian isolate population in Germany with the German KORA population using genome-wide SNP arrays. *BMC Genetics*, 12: 67.72.
16. Holsinger, K.E. and B.S. Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nature reviews. Genetics*, 10: 639-650.
17. Kijas, J.W., J.A. Lenstra, B. Hayes, Simon Boitard, Laercio R. Porto Neto, Magali San Cristobal, Bertrand Servin, Russell McCulloch, Vicki Whan, Kimberly Gietzen, Samuel Paiva, William Barendse, Elena Ciani, Herman Raadsma, John McEwan, Brian Dalrymple, other members of the International Sheep Genomics Consortium. 2012. Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. *PLoS Biologics*, 10: 12-58.
18. McKav. S.D., R.D. Schnabel. B.M. Murdoch. L.K. Matukumalli. J. Aerts. W. Connieters. D. Crews. F.D. Neto. C.A. Gill. C. Gao and H. Mannen. 2008. An assessment of population structure in eight breeds of cattle using a whole genome SNP panel. *Bmc Genetics*, 9: 37-42.
19. Mokhber, M., M. Moradi Shahrebabak, M. Sadeghi, H. Moradi Shahrebabak and G. Williams. 2015. Genomics explore of selection signature in buffalo signs of Khuzestan and Mazandaran. *Journal of Iran Animal Science*, 46: 119-131 (In Persian).
20. Nelson, W.J. and E. Lazarides. 1984. Goblin (ankyrin) in striated muscle: identification of the potential membrane receptor for erythroid spectrin in muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 3292-3296.
21. Nei, M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations, *Proc. Nature. Academic. Science*, 70: 3321-3323.
22. Pan, D., S. Zhang, J. Jiang, L. Jiang, Q. Zhang and J. Liu. 2013. Genome-wide detection of selective signature in Chinese Holstein. *PLoS ONE*, 8:e60440. doi: 10.1371/journal.pone, 40-44.
23. Porter, N.C., W.G. Resneck, A. O'Neill, D.B. Van Rossum, M.R. Stone and R.J. Bloch. 2005. Association of small ankyrin 1 with the sarcoplasmic reticulum. *Molecular membrane biology*, 22: 421-432.
24. Pritchard, J.K. and M. Przeworski. 2001. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *American Journal of Human genetics*, 69: 1-14.
25. Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, M.A.R. Ferreira, D. Bender, J. Maller, P. Sklar, P.I.W. de Bakker, M.J. Daly and P.C. Sham. 2007. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*, 81: 559-575.
26. Price, A.L., N.J. Patterson, R.M. Plenge, M.E. Weinblatt, N.A. Shadick and D. Reich. 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 38: 904-909.
27. Qanbari, S., J. Pimentel ECG, G. Tetens, P. Thaller Lichtner and AR. Sharifi. 2010. A genome-wide scan for signatures of recent selection in Holstein cattle. *Animal Genetics*, 41: 377-89.
28. Qian, Z., J. Qian, J. Lin, D.M. Yao, Q. Chen, R.B. Ji, Y. Li, G.F. Xiao and J.Y. Li. 2010. GTPase regulator associated with the focal adhesion kinase (GRAF) transcript was down-regulated in patients with myeloid malignancies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29: 1pp.
29. Sabeti, P.C., D.E. Reich, J.M. Higgins, H.Z.P. Levine, D.J. Richter, S.F. Schaffner, S.B. Gabriel, J.V. Planko, N.J. Patterson and G.J. McDonald. 2002. Detecting recent positive selection in the human genome from Haplotype structure. *Nature*. 419: 832-837.
30. Scheet, P. and M. Stehens. 2006. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *The American Journal of Human Genetics*, 78: 629-644.
31. Scotland, P., D. Zhou, H. Benveniste and V. Bennett. 1998. Nervous system defects of AnkyrinB (-/-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kD AnkyrinB in premyelinated axons. *The Journal of cell biology*, 143: 1305-1315.
32. Tuvia, S., M. Buhusi, L. Davis, M. Reedy and V. Bennett. 1999. Ankyrin-B is required for intracellular sorting of structurally diverse Ca²⁺ homeostasis proteins. *The Journal of cell biology*, 147: 995-1008.
33. Weir. B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *International Journal of Evolutionary Biology*, 38: 1358-1370.

Genome-Wide Scan for Selection Signatures in Iranian Sarabi and Taleshi Indigenous Breed

Seyed Makan Mosavi Kashani¹, Ghodrat Rahimi Mianji² and Hossein Moradi Shahrabak³

1 and 2- Ph.D. Student Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Science and Natural Resources University

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Tehran
(Corresponding author: hmoradis@ut.as.ir)

Received: January 17, 2017 Accepted: May 7, 2017

Abstract

The aim of this study was to find the footprint of selection in native Sarabi and Taleshi cattle breeds 296 cattle from two breeds were sampled and genotyped. by 40 k microarray of illumine company. 43 animals were removed because their ACR was below 0.09. Markers were filtered with minor allele frequency (MAF) equal 0.01 and Hardy-Weinberg equilibrium test (10^{-6}). After filtering, 28782 markers remained. To study the genetic structure of population and sub-population principal component analysis (PCA) was used. To identify selective signals for Sarabi and Taleshi pure population theta parameter was calculated. To reduce error theta values was averaged with near marker and Manhattans graph were obtained by haploview software. Chromosomes 2, 5, 6, 7, 10, 22, 25 and 27 had selection signatures. To searching for selection signatures in both population, extended haplotype homozygosity statistics (EHH) was calculated using R software. In addition, for each chromosome LD erosion rate for ancestral and mutant alleles were calculated. To study of positions that showed signature selection, bioinformatics web site were searched. EIF4G3 gene was identified on chromosome 2. This gene have fundamental role in transferring RNA from nucleus to the cytoplasm and gene expression. ANK2 gene was identified on chromosome 6 which encodes polypeptide ankirin B expressed in all tissues. On chromosome 7 the gene ARHGAP26 was found which is a tumor suppressor genes. On chromosome 10, a gene identified that encodes protein SYNJ2BP that suppress activating protein. On chromosome 22, FAM3D protein coding gene detected that plays a role in cyto skeleton actin biochemical pathway. This gene is expressed in the placenta and plays a role in biological functions such as migration and function of leukocyte, temperature regulation, cell survival and hematopoiesis differentiation.

Keywords: Extended Haplotype Homozygosity, Principal Component Analysis, Selection Signature, Statistics Theta