



"مقاله پژوهشی"

شناسایی نشانه‌های انتخاب بر روی کروموزوم X در شترهای تک‌کوهانه ایرانی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم

رضا خلخالی ایوبیق^۱ و نعمت هدایت^۲

۱- پژوهشگر پسادکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (nhedayat@uma.ac.ir) (نویسنده مسوول)
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران، (نویسنده مسوول)
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۲۵ صفحه: ۱۵۵ تا ۱۶۱

چکیده مسوط

مقدمه و هدف: هرچند برخلاف بسیاری از گونه‌های دامی، انتخاب مصنوعی شدیدی روی شترهای تک‌کوهانه صورت نگرفته است، با این حال آثاری از انتخاب طبیعی و انتخاب توسط انسان را می‌توان به عنوان نشانه‌های انتخاب روی ژنوم شترها جستجو کرد. با پیشرفت تکنولوژی‌های جدید و توسعه ابزارهای بیوانفورماتیکی، شناسایی این نواحی می‌تواند با دقت بالایی انجام شود. هدف این مطالعه شناسایی نشانه‌های انتخاب روی کروموزوم X در شترهای تک‌کوهانه ایرانی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم بود.

مواد و روش‌ها: برای انجام این مطالعه، از داده‌های ژنومی شتر تک‌کوهانه ایرانی به عنوان جمعیت هدف و همچنین هشت نمونه شتر تک‌کوهانه شبه‌جزیره عربستان به عنوان جمعیت مرجع استفاده شد. شناسایی نشانه‌های انتخاب با استفاده از دو روش Fst و XP-EHH صورت پذیرفت. برای انجام این آنالیز، از اندازه پنجره ۵۰ kb و اندازه قدم ۲۵ kb استفاده شد و پنجره‌های ژنومی که دارای نمره بالاتر از ۹۹امین صدک توزیع XP-EHH و ZFst بودند، به عنوان نشانه‌های انتخاب احتمالی در نظر گرفته شدند. از برنامه BEDtools برای استخراج ژن‌های موجود در این نواحی استفاده شد. آنالیز ژن آنولوژی روی ژن‌های مذکور با استفاده از برنامه g:Profiler انجام گرفت.

یافته‌ها: براساس نتایج، به ترتیب ۱۳ و ۲۷ ژن با استفاده از روش Fst و XP-EHH به عنوان ژن‌های تحت انتخاب مثبت روی کروموزوم X شترهای تک‌کوهانه ایرانی شناسایی شدند. نتایج به دست آمده از آنالیز ژن آنولوژی نشان داد که عبارات مرتبط با متابولیسم چربی سهم به‌سزایی در بین عبارات معنی‌دار شده دارند. از جمله ژن‌های مهم شناسایی شده، DGAT2L6 و AWAT2 بودند که در مقاومت شترها به سطح بالای اشعه ماورای بنفش در شرایط بیابانی نقش دارند. همچنین ژن NSDHL که در ساخت کلاسترول دخیل است، احتمالاً به باروری در نرها کمک می‌کند. تنها مسیر KEGG معنادار در این مطالعه مربوط به متابولیسم ویتامین A بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد انتخاب ژن‌های مرتبط با متابولیسم چربی، رفتار و مقاومت به اشعه ماورای بنفش در شترهای تک‌کوهانه ایرانی در راستای تعامل با انسان‌ها و شرایط سخت بیابانی بوده است. بدلیل عدم انجام اصلاح نژاد روی شترها، به نظر می‌رسد شناخت ویژگی‌های ژنومی این حیوانات می‌تواند به عنوان یک پیش‌نیاز در زمینه طراحی استراتژی‌های اصلاح‌نژادی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: انتخاب مثبت، باروری، متابولیسم چربی، کروموزوم جنسی، عادت‌پذیری

مقدمه

شترهای تک‌کوهانه در حدود ۴۰۰۰-۳۰۰۰ سال پیش و به احتمال زیاد در شبه جزیره عربستان اهلی شدند (۱). هرچند این گونه حیوانی مانند دیگر حیوانات اهلی از جمله، گاو، گوسفند و طیور تحت انتخاب‌های مصنوعی شدید قرار نگرفته است، اما با این حال، انتخاب توسط انسانها در کنار انتخاب طبیعی، آثار و نشانه‌های بر روی ژنوم این حیوانات به جای گذاشته است. توسعه تکنولوژی‌هایی مانند توالی‌یابی کل ژنوم در کنار ایجاد ابزارهای بیوانفورماتیکی کارآمد، به محققان این امکان را داده است تا این نشانه‌ها را شناسایی کرده و به بررسی آنها بپردازند. این نشانه‌ها که از آنها با عنوان نشانه‌های انتخاب یاد می‌شود، تا حدود زیادی نشانگر سلیقه انتخابی و مدیریتی در مناطق مختلف جهان و همچنین امضای اقلیم‌های مختلف می‌باشد. از آنجایی که انتخاب، آثار متفاوتی روی کروموزوم‌های اتوزومی و جنسی می‌گذارد، لذا شناسایی نشانه‌های انتخاب در این دو گروه از کروموزوم‌ها به صورت جداگانه صورت می‌پذیرد (۳۰). مطالعات مختلفی به بررسی ژن‌ها و صفات اقتصادی مرتبط با کروموزوم‌های جنسی و اتوزومی پرداخته‌اند، به عنوان مثال مطالعه‌ای روی کروموزوم Z در طیور نشان داد که ژن‌های مرتبط با متابولیسم چربی و چربی شکمی جزء ژن‌های مهمی هستند

که مورد انتخاب مثبت قرار گرفته‌اند (۳۳). همچنین جستجوی نشانه‌های انتخاب بر روی کروموزوم X در گوسفند منجر به شناسایی ژن‌هایی مرتبط با تولیدمثل و سیستم ایمنی شد (۳۷). در مطالعه‌ای که به منظور شناسایی نشانه‌های انتخاب در کروموزوم‌های اتوزومی چند نژاد بز اجرا شد، ژن‌های مرتبط با صفات اقتصادی از جمله رنگ پوشش (IRF4، EXOC2، RALY، KITLG و LDB2) رشد (LDB2) و تولیدمثل (KHDRBS2) شناسایی شدند (۱۱).

تاکنون سه مطالعه در مورد شناسایی نشانه‌های انتخاب در کروموزوم‌های اتوزومی شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه با استفاده از داده‌های ژنومی انجام گرفته است. در سال ۲۰۱۹، مطالعه‌ای روی شترهای تک‌کوهانه سودانی صورت گرفت که برخی از جایگاه‌های تحت انتخاب مثبت در شترهای تک‌کوهانه را نشان داد (۳). نواحی شناسایی شده به عنوان نشانه‌های انتخاب، بیشتر با عادت‌پذیری به مناطق بیابانی، صفات مربوط به شیردهی، هموستازی انرژی و کندروژنز (توسعه غضروفی) در ارتباط بودند. در مطالعه‌ای دیگر (۲۰) روی شترهای دوکوهانه اهلی چینی، از چهار جمعیت شتر چینی برای شناسایی نواحی تحت انتخاب مثبت استفاده شد. به طور کلی سه ژن (THOC2 و XIAP، GRIA3) در تمامی مقایسه‌ها دو جمعیتی، به عنوان ژن‌های تحت انتخاب

بهره گرفته شد. در این برنامه و به منظور حذف آلودگی‌های آداپتوری برخی از نمونه‌ها، گزینه ILLUMINACLIP به خط دستوری برنامه اضافه شد. در نهایت توالی‌هایی که معیارهای فیلتراسیون را گذرانده بودند و طول آنها بالای ۴۰ باز بود، برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. در گام بعدی، داده‌های پیرایش شده با استفاده از الگوریتم mem در نسخه ۷/۱۷ برنامه BWA (۱۹)، در ژنوم مرجع مربوط به شتر تک‌کوهانه (GCF_000803125.2) نگاشته شدند. برنامه Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard>) برای منظم کردن و سپس حذف خوانش‌های دو نسخه شده (Duplicated Reads) فایل‌های BAM تولیدی در مرحله قبل، اجرا شد. در نهایت، از دو رویه "IndelRealigner" و "RealignerTargetCreator" موجود در نسخه ۳/۷ برنامه GATK (۲۳) برای همترازی مجدد در اطراف حذف/درجاها (ایندل) استفاده شد.

شناسایی و پالایش واریانت‌ها

در این مطالعه، از الگوریتم "HaplotypeCaller" برنامه GATK و با استفاده از گزینه "ERC GVCF" به منظور تولید فایل‌های gVCF برای هر یک از نمونه‌های مورد مطالعه استفاده شد. در گام بعدی، با کمک ابزار "GenotypeGVCFs" برنامه GATK، به طور همزمان، شناسایی واریانت‌ها برای هر ۱۴ نمونه شتر مورد مطالعه، صورت گرفته و نهایتاً یک فایل VCF حاوی واریانت‌های خام، ایجاد گردید. در ادامه، SNP‌های شناسایی شده از ایندل‌ها جدا گردیده و با استفاده از برنامه‌های BCFtools، VCFtools و GATK مورد پالایش کیفی قرار گرفتند. برای پالایش کیفی SNP‌های شناسایی شده، از پارامترهایی شامل $MQRankSum < -8$ ، $QD < 2$ ، $FS > 60$ ، $MQ < 40$ ، $cluster-size > 3$ و $ReadPosRankSum < -8$ ، $SOR > 3$ ، $cluster-size > 3$ و $cluster-window-size > 10$ استفاده شد. در نهایت، SNP‌های دو آلی با فراوانی آلل مینور بزرگتر یا مساوی با ۰/۰۵ که حداقل در ۸۰ درصد افراد دارای ژنوتیپ مشخص بودند، حفظ شده و مابقی مورد حذف قرار گرفتند (۱۷). برای ادامه آنالیزها، فقط از SNP‌های موجود در کروموزوم جنسی (کروموزوم X) استفاده شد.

شناسایی نشانه‌های انتخاب

برای شناسایی نشانه‌های انتخاب در کروموزوم X شترهای تک‌کوهانه ایرانی، از دو روش شاخص تمایز جمعیت (Fst) و هموزیگوسیتی هاپلوتایی بسط داده شده جمعیت تلاقی (XP-EHH) با اندازه پنجره ۵۰kb و اندازه قدم ۲۵kb استفاده شد. محاسبه Fst در هر پنجره و نمره XP-EHH برای هر SNP، به ترتیب با استفاده از برنامه‌های VCFtools و نسخه ۲/۰ Selscan (۳۲) انجام گرفت. در مطالعه کنونی، نسخه ۵/۲ برنامه Beagle (۶) برای فازبندی هاپلوتایی با استفاده از گزینه‌های $burnin=5$ و $iterations=20$ اجرا شد. در آنالیز به هر دو روش مذکور، شترهای ایرانی به عنوان جمعیت هدف و شترهای شبه‌جزیره عربستان به عنوان جمعیت مرجع در نظر گرفته شدند. نرمال‌سازی XP-EHH محاسبه شده برای هر SNP با استفاده از برنامه norm موجود

مثبت برای شترهای دوکوهانه چینی شناسایی شدند. ژن GRIA3 یک گیرنده نوروترانسمیتر است که در یادگیری و حافظه تاثیر دارد و احتمالاً به قدرت مسیریابی شترها مربوط باشد. ژن XIAP در پاسخ به آسیب DNA و ایمنی نقش دارد و احتمالاً به شتر برای تحمل شرایط سخت و آسیب‌زای بیابان کمک می‌کند. ژن THOC2 نیز در توسعه و ایجاد سیستم عصبی به ایفای نقش می‌پردازد. مطالعه خلخالی ایوریق و همکاران (۱۳،۱۷) روی شترهای تک و دوکوهانه ایرانی نیز نشان داد که ژن ZNF516 که در مقابله با سرما دخیل است، جزء ژن‌های انتخاب شده در شترهای دوکوهانه ایرانی می‌باشد که احتمالاً به دلیل سبک زندگی عشایر شاهشون (زندگی در مناطق مرتفع اطراف کوه سبلان) به عنوان پرورش‌دهندگان این شترها باشد؛ چرا که این سبک از زندگی کوچ‌نشینی، شترهای دوکوهانه ایرانی را در طی ماه‌های زیادی از سال در معرض دماهای پایین قرار می‌دهد. در شترهای تک‌کوهانه ایرانی نیز ژن‌های مرتبط با متابولیسم انرژی (BDH1)، تولیدمثل (IMMP2L، DLG1) و عملکرد کلیه (FRAS1)، حافظه بلند مدت (GRIA1)، عملکرد کلیه (SLC12A1) و ایمنی (SOCS2، JAK1، NRROS) و SENP1) به عنوان ژن‌های تحت انتخاب مثبت، شناسایی شدند. محققان مطالعه مذکور عنوان کردند که انتخاب ژن مرتبط با حافظه طولانی مدت در شترهای تک‌کوهانه ایرانی می‌تواند به سبک پرورشی این شترها مربوط باشد. از آنجایی که رهاسازی شترها در بیابان‌های مرکزی ایران به عنوان عمده‌ترین سبک پرورشی در این مناطق به شمار می‌رود، لذا انتخاب ژن مرتبط با حافظه می‌تواند به شترها برای یافتن مکان‌های حاوی غذا، منابع آب، جفت‌یابی و بازگشت به خانه کمک کند.

با وجود انجام مطالعات مرتبط با شناسایی نشانه‌های انتخاب در کروموزوم جنسی گونه‌هایی مانند گوسفند (۳۷)، خوک (۲۲)، سگ (۲۹) و طیور (۳۳)، مطالعه‌ای بر روی کروموزوم جنسی در شترهای تک‌کوهانه انجام نشده است. در تحقیق حاضر با استفاده از داده‌های ژنومی چند نمونه شتر تک‌کوهانه ایرانی به عنوان جمعیت هدف و شترهای تک‌کوهانه از شبه‌جزیره عربستان به عنوان جمعیت مرجع، اقدام به شناسایی و بررسی نشانه‌های انتخاب در کروموزوم X در شترهای ایرانی پرداخته شد. همچنین شناسایی ژن‌های موجود در این نواحی و بررسی عملکرد آنها می‌تواند در مطالعه اثر اقلیم و انتخاب مصنوعی بر کروموزوم جنسی شترهای ایرانی موثر باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و نگاشت خوانش‌ها^۱ در ژنوم مرجع

از داده‌های توالی‌یابی شده کل ژنوم مربوط به ۶ نفر شتر تک‌کوهانه ایرانی و ۸ نفر شتر تک‌کوهانه از شبه‌جزیره عربستان استفاده شد. برنامه FastQC (نسخه ۱۱/۹) برای سنجش کیفی داده‌های توالی‌یابی شده مورد استفاده قرار گرفت. سپس برای پیرایش کیفی داده‌ها، از رویه Sliding Windows (5:20) نسخه ۰/۳۹ برنامه Trimmomatic (۴)

سه دسته فرآیندهای زیستی (BP)، جایگاه سلولی (CC) و عملکرد مولکولی (MF) کلاس‌بندی می‌کند. برای شناسایی عبارات معنادار ژن آنتولوژی و مسیرهای KEGG از آستانه p-value تصحیح شده (با استفاده از روش Benjamini-Hochberg) کمتر و مساوی ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج و بحث

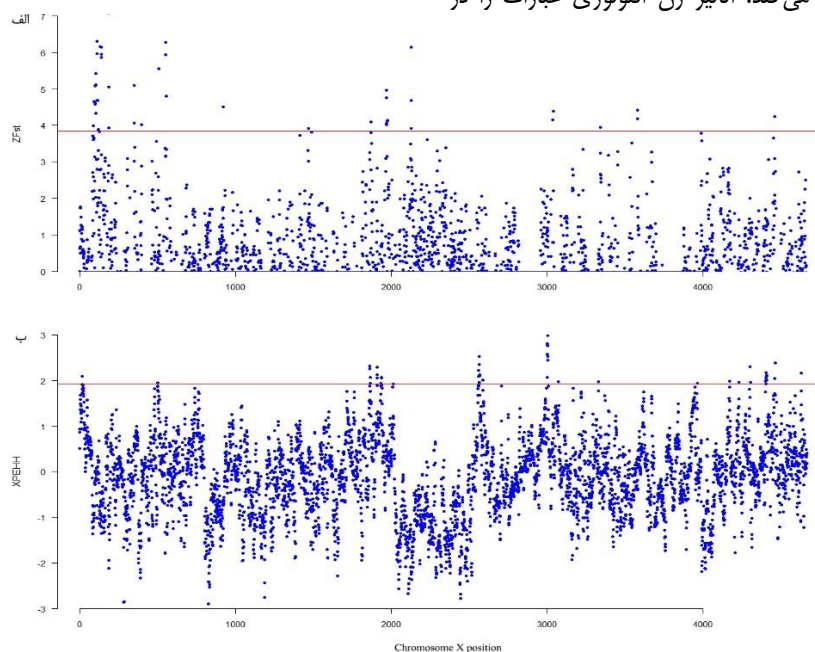
در مطالعه حاضر، تعداد SNPهای شناسایی شده برای کروموزوم X در ۱۴ نمونه شتر بعد از انجام پالایش کیفی روی واریانتهای شناسایی شده، برابر با ۱۰۱۹۷ بود. با توجه به طول کروموزوم X (۱۲۱۴۸۴۸۲۳ باز) در شتر تک‌کوهانه، به ازای هر ۱۲۰۰ نوکلئوتید، یک SNP شناسایی شد. تراکم SNP در کروموزوم X شترهای تک‌کوهانه نسبت به کل ژنوم کمتر بود (۱۶) که احتمالاً می‌تواند به خاطر کوچک‌تر بودن اندازه جمعیت موثر برای کروموزومهای جنسی در مقایسه با کروموزومهای اتوزومی باشد (۸).

نشانه‌های انتخاب در کروموزوم X شترهای تک‌کوهانه ایرانی با استفاده از دو روش Fst و XP-EHH مورد شناسایی قرار گرفت. براساس حد آستانه تعریف شده برای مقادیر ZFst (۳/۸۵) و XP-EHH (۱/۹۳)، در هر دو روش تعداد ۴۷ پنجره ژنومی به عنوان نشانه‌های انتخاب احتمالی شناسایی شدند (شکل ۱).

در بسته Selscan صورت گرفته و سپس میانگین این نمرات در هر پنجره با اندازه ۵۰kb و همپوشانی ۲۵kb محاسبه شد. تبدیل Fstهای محاسبه شده در هر پنجره به ZFst نیز با فرمول $ZFst = (Fst - \mu Fst) / \sigma Fst$ انجام گرفت. در فرمول مذکور، μFst و σFst به ترتیب میانگین و انحراف معیار مقادیر Fst در تمام پنجره‌ها می‌باشند. لازم به ذکر است که پنجره‌های با کمتر از ۴ SNP برای کاهش شناسایی نتایج مثبت کاذب، مورد حذف قرار گرفتند. نهایتاً پنجره‌هایی که نمره ZFst و XP-EHH آنها در ۱ درصد بالایی دامنه اعداد قرار داشتند، به عنوان نشانه‌های احتمالی انتخاب مثبت در شترهای ایرانی انتخاب شدند (۲۸).

حاشیه‌نویسی مناطق تحت انتخاب مثبت و آنالیز ژن آنتولوژی

در مطالعه حاضر از نسخه ۲/۲۷/۱ برنامه BEDtools (۲۹) و فایل GTF (حاوی اطلاعات مربوط به جایگاه و نوع ژن‌ها) مربوط به ژنوم رفرنس، برای حاشیه‌نویسی مناطق شناسایی شده به عنوان نشانه‌های انتخاب در ژنوم شترهای ایرانی و به منظور شناسایی ژن‌های موجود در این نواحی، استفاده شد. پس از شناسایی ژن‌های مذکور، برنامه تحت وب g:Profiler برای آنالیز ژن آنتولوژی و مسیرهای KEGG اجرا شد. آنالیز ژن آنتولوژی، امکان طبقه‌بندی ژن‌ها را در گروه‌های عملکردی فراهم کرده و به ما در درک درست روابط و عملکرد آنها کمک می‌کند. آنالیز ژن آنتولوژی عبارات را در



شکل ۱- نمودار منهن پلات نواحی ژنومی شناسایی شده به عنوان نشانه‌های انتخاب در کروموزوم X در شتر تک‌کوهانه ایرانی با استفاده از روش ZFst (الف) و XP-EHH (ب)؛ خط قرمز نشان‌دهنده حد آستانه معنادار برای هر یک از روش‌ها است

Figure 1. Manhattan plot of identified genomic regions as selection signatures on the X chromosome in Iranian dromedary camel using ZFst (a) and XP-EHH (b) methods; the red line indicates significant threshold for each methods

شناسایی شده توسط دو روش (یک ژن مشترک) منجر به یافتن ۱۷ عبارت ژن آنتولوژی معنادار در دو گروه BP و MF (جدول ۱) و یک مسیر KEGG شد.

نتایج بدست آمده از حاشیه‌نویسی این نواحی (نشانه‌های انتخاب) نشان داد که تعداد ۱۳ و ۲۷ ژن کدکننده پروتئین به ترتیب در نواحی شناسایی شده بوسیله روش‌های ZFst و XP-EHH وجود دارد. انجام آنالیز ژن آنتولوژی روی ۳۹ ژن

جدول ۱- نتایج ژن آنتولوژی روی ژن‌های شناسایی شده به‌عنوان نشانه‌های انتخاب در کروموزوم X شترهای تک‌کوهانه ایرانی
Table 2. Gene ontology results on identified genes as selection signatures on the X chromosome in Iranian dromedary camels

کلاس	عبارت	تعداد ژن	p-value تصحیح شده
BP	GO:0006640	۲	۰/۰۱۶
BP	GO:0046462	۲	۰/۰۱۶
BP	GO:0006639	۳	۰/۰۱۶
BP	GO:0006638	۳	۰/۰۱۶
BP	GO:0006821	۳	۰/۰۱۷
BP	GO:0046463	۲	۰/۰۳۸
BP	GO:0015698	۳	۰/۰۳۸
BP	GO:0046460	۲	۰/۰۳۸
BP	GO:0006820	۴	۰/۰۳۸
MF	GO:0032795	۱	۰/۰۴۲
MF	GO:0016917	۲	۰/۰۴۲
MF	GO:0072545	۱	۰/۰۴۲
MF	GO:0050252	۱	۰/۰۴۲
MF	GO:0004890	۲	۰/۰۴۲
MF	GO:0035643	۱	۰/۰۴۲
MF	GO:0072544	۱	۰/۰۴۲
MF	GO:0016747	۳	۰/۰۴۹

تنها عبارت معنادار مسیر KEEG، در رابطه با متابولیسم رتینول یا ویتامین A بود (Retinol Metabolism). یکی از ژن‌های دخیل در این متابولیسم PNPLA4 بود که توسط هر دو روش XP-EHH و Fst به عنوان ژن تحت انتخاب مثبت برای شترهای تک‌کوهانه ایرانی شناخته شد. این ژن در هیدرولیز تری‌گلیسریدها و متابولیسم ویتامین A دخیل می‌باشد. این ویتامین و مشتقات آن، در بینایی، تنظیم رشد سلول‌های اپیتلیال، رشد بافت استخوانی، عملکرد سیستم ایمنی و فعال کردن ژن‌های سرکوب‌کننده تومور به ایفای نقش می‌پردازند (۱۴). همچنین نتیجه یک مطالعه نشان داد که متابولیسم ویتامین A با بهبود راندمان غذایی در گاوهای گوشتی (۲۶)، گوساله‌های پروراری نژاد جرسی (۳۱) و خوک (۳۶) ارتباط دارد. تاثیر ویتامین A بر راندمان غذا از طریق دخالت این ویتامین در متابولیسم انرژی، اسیدهای چرب و هورمون‌های استروئیدی اعمال می‌شود (۳۶).

یکی از ژن‌های مهم شناسایی شده در مطالعه کنونی، ژن NSDHL بود. نقص عملکرد این ژن باعث بروز سندروم بچه در انسان می‌شود که برای نوزادان پسر کشنده است. این ژن در ساخت کلسترول نقش دارد. از آنجایی که کلسترول یکی از اجزای اصلی هورمون‌های جنسی است، به نظر می‌رسد این ژن در تولید هورمون پروژسترون نقش داشته و همچنین در نرخ بلاستوسیت و باروری در گاو به ایفای نقش می‌پردازد (۷). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که این ژن جز ژن‌های دخیل در تولید استروئیدها بوده و احتمالاً در باروری نرها نیز دارای نقش مهمی است (۳۵). یکی دیگر از ژن‌های مهم در این مطالعه، IGBP1 بود که بر اساس شواهد علمی، در تنظیم فعالیت پروتئین فسفاتاز، فعال کردن سلول‌های B سیستم ایمنی و مرگ سلولی دخیل می‌باشد (۲۵). ژن مذکور که به عنوان یکی از ژن‌های تحت انتخاب در گاوهای شرق آفریقا نیز مورد شناسایی قرار گرفته است، در تنظیم فعالیت سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی نیز به ایفای نقش می‌پردازد (۲). البته انتخاب ژن‌های مرتبط با ایمنی در یک جمعیت به معنای اهمیت کمتر این ژن‌ها در جمعیت مورد مقایسه نیست. به نظر

از نه عبارت BP معنادار شده در این مطالعه، شش عبارت مرتبط با متابولیسم چربی بودند. با توجه به محیط زندگی شترها که در شرایط بیابانی و کم‌غذا می‌باشد، متابولیسم چربی یکی از فرآیندهای بسیار حیاتی در زندگی شترها به شمار می‌رود. معنادار شدن این عبارات در شترهای ایرانی به معنای اهمیت پایین متابولیسم چربی در شترهای شبه‌جزیره عربستان نیست، بلکه به این معنا است که ممکن است لیست متفاوتی از ژن‌های دخیل در متابولیسم چربی در شترهای مناطق مختلف و با توجه به شرایط اقلیمی و تغذیه‌ای، مورد انتخاب مثبت قرار گیرند. دو ژن AWAT2 و DGAT2L6 که در متابولیسم چربی پوست دخیل هستند و در این مطالعه نیز در لیست ژن‌های تحت انتخاب مثبت بودند، جز ژن‌های موثر در تولید سیوم در پوست به شمار می‌روند (۲۱). سیوم ماده‌ای متشکل از لیپیدهایی است که توسط غدد چربی پوست ترشح شده و در حفظ هموستازی پوست، جلوگیری از تبخیر آب از طریق پوست، تنظیم دمای بدن، مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و حفظ در برابر اشعه ماورای بنفش خورشید به ایفای نقش می‌پردازد (۲۴، ۲۷). از جمله عبارات BP معنادار شده مهم در این مطالعه می‌توان به عبارت GABA receptor activity اشاره کرد که شامل دو ژن GABRE و GABRA3 بود. این ژن‌ها جز خانواده گیرنده‌های GABA هستند که در عملکرد مغز و رفتارهایی مانند پاسخ و خاطره ترس دخیل هستند (۱۲). آزمایشی روی رفتار پاسخ ژنی به استرس در طیور اهلی (لگهورن سفید) و وحشی (قرمز جنگلی) نشان داد که ژن‌های خانواده GABA جز ژن‌هایی هستند که دستخوش تغییرات بیانی شده‌اند که این یافته بیانگر نقش این ژن‌ها در پاسخ به استرس می‌باشد (۱۰). شواهدی وجود دارد که این ژن‌ها در رفتارهای پرخاشگرانه و آرام گاوها نیز دخیل بوده و در طی اهلی شدن دچار تغییراتی شده‌اند، به طوریکه سطح پایین بیان این ژن‌ها در گاوهای نژاد لیدیا با رفتار پرخاشگرانه آنها دارای همبستگی می‌باشد (۹). احتمالاً این ژن‌ها در رفتارها و تعامل شترها با انسان دخیل هستند، هرچند برای اثبات این ادعا نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

ژن‌ها در جهت عادت‌پذیری به شرایط نامساعد بیابانی و همچنین تعامل با انسان بوده است. هرچند به نظر می‌رسد اثبات این ادعا به مطالعات با تعداد بیشتر نمونه و همچنین استفاده از سطوح دیگری از داده‌های امیکس (از جمله داده‌های RNA-Seq) نیاز دارد. از آنجایی که برنامه‌های اصلاح نژادی خاصی در شترهای ایرانی و غیرایرانی به مرحله اجرا نرسیده، لذا شناخت ویژگی‌های ژنومی شترها می‌تواند به عنوان یک گام ارزشمند در زمینه طراحی استراتژی‌های اصلاح‌نژادی در نظر گرفته شود. در واقع، فهم مکانیسم انتخاب، پس‌زمینه فرآیندهای آدپته شدن به محیط و همچنین شناسایی ژن‌های مهم در این رابطه، می‌تواند به ترسیم خط‌مشی اصلاح‌نژاد شترها در آینده نزدیک کمک کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوریان کشور (INSF) به جهت حمایت از این پروژه (به شماره: ۹۹۰۲۳۲۹۷) کمال تشکر را دارند.

می‌رسد انتخاب ژن‌های مرتبط با ایمنی متفاوت در جمعیت‌های مختلف، در اثر عواملی بیماری‌زای گوناگونی باشد که در نقاط مختلف جهان وجود دارند و منجر به انتخاب مثبت ژن‌های خاصی شده‌اند (۱۸). ژن‌های مرتبط با فعالیت سیستم ایمنی به عنوان نشانه‌های انتخاب، روی گونه‌هایی دیگر مانند گوسفندان (۵) و گاوهای ایرانی (۱۵) نیز مشاهده شده است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که ژن‌های دخیل در متابولیسم چربی جزء ژن‌های با انتخاب مثبت در کروموزوم X شترهای تک‌کوهانه ایرانی می‌باشند. از آنجایی که ژن‌های مرتبط با چربی برای تمام شترهای تک‌کوهانه اهمیت دارد، لذا به نظر می‌رسد، انواع مختلفی از این ژن‌ها در مناطق مختلف، مورد انتخاب طبیعی و همچنین تحت انتخاب توسط دامداران پرورش دهنده شتر قرار گرفته باشند. همچنین از بررسی دیگر ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه، از جمله ژن‌های مرتبط با رفتار، تحمل اشعه ماورای بنفش خورشید و باروری می‌توان چنین نتیجه گرفت که انتخاب مثبت این

منابع

- Almathen, F., P. Charruau, E. Mohandesan, J.M. Mwacharo, P. Orozco-terWengel, D. Pitt, A.M. Abdussamad, M. Uerpmann, H.P. Uerpmann, B. De Cupere and P. Magee. 2016. Ancient and modern DNA reveals dynamics of domestication and cross-continental dispersal of the dromedary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113: 6707-6712.
- Bahbahani, H., H. Clifford, D. Wragg, M.N. Mbole-Kariuki, C. Van Tassell, T. Sonstegard, M. Woolhouse, and O. Hanotte. 2015. Signatures of positive selection in East African Shorthorn Zebu: A genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Scientific Reports*, 5: 1-13.
- Bahbahani, H., H.H. Musa, D. Wragg, E.S. Shuiep, F. Almathen and O. Hanotte. 2019. Genome diversity and signatures of selection for production and performance traits in dromedary camels. *Frontiers in Genetics*, 893.
- Bolger, A.M., M. Lohse and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30: 2114-2120.
- Bayeriyar, M., S.H. Hafezian, A.H. Khaltabadi Farahani, A. Farhadi and H. Mohammadi. 2021. Bioinformatics Analysis of some genomic regions in sheep population based on meta-analysis. *Research on Animal Production*, 12: 150-159 (In Persian).
- Browning, B.L., X. Tian, Y. Zhou and S.R. Browning. 2021. Fast two-stage phasing of large-scale sequence data. *The American Journal of Human Genetics*, 108: 1880-1890.
- Bunel, A., A.L. Nivet, P. Blondin, C. Vigneault, F.J. Richard and M.A. Sirard. 2014. Cumulus cell gene expression associated with pre-ovulatory acquisition of developmental competence in bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 26: 855-865.
- Czech, B., B. Guldbandsen and J. Szyda. 2020. Patterns of DNA variation between the autosomes, the X chromosome and the Y chromosome in *Bos taurus* genome. *Scientific Reports*, 10: 1-13.
- Eusebi, P.G., N. Sevane, T. O'Rourke, M. Pizarro, C. Boeckx and S. Dunner. 2021. Gene expression profiles underlying aggressive behavior in the prefrontal cortex of cattle. *BMC Genomics*, 22: 1-14.
- Fallahsharoudi, A., N. de Kock, M. Johnsson, S.J. Ubhayasekera, J. Bergquist, D. Wright and P. Jensen. 2015. Domestication effects on stress induced steroid secretion and adrenal gene expression in chickens. *Scientific Reports*, 5: 1-10.
- Guo, J., H. Tao, P. Li, L.I. Li, T. Zhong, L. Wang, J. Ma, X. Chen, T. Song and H. Zhang. 2018. Whole-genome sequencing reveals selection signatures associated with important traits in six goat breeds. *Scientific Reports*, 8: 1-11.
- Harris, J.A and R.F. Westbrook. 1998. Evidence that GABA transmission mediates context-specific extinction of learned fear. *Psychopharmacology*, 140: 105-115.
- Hedayat-Evrigh, N., R. Khalkhali-Evrigh and M.R. Bakhtiarzadeh. 2020. Genome-wide identification and analysis of variants in domestic and wild bactrian camels using whole-genome sequencing data. *International journal of genomics*, 2020.
- Holmes, R.S. 2012. Vertebrate patatin-like phospholipase domain-containing protein 4 (PNPLA4) genes and proteins: a gene with a role in retinol metabolism, 3 *Biotech*, 2: 277-286.

15. Kashani, S.M.M., G. Rahimi Mianji and H. Moradi Shahrabak. 2018. Genome-wide scan for selection signatures in Iranian Sarabi and Taleshi indigenous breed. *Research on Animal Production*, 9: 88-99 (In Persian).
16. Khalkhali-Evrigh, R., S.H. Hafezian, N. Hedayat-Evrigh, A. Farhadi and M.R. Bakhtiarizadeh. 2018. Genetic variants analysis of three dromedary camels using whole genome sequencing data. *PLoS one*, 13: p.e0204028.
17. Khalkhali-Evrigh, R., N. Hedayat, L. Ming and Jirimitu. 2022. Identification of selection signatures in Iranian dromedary and Bactrian camels using whole genome sequencing data. *Scientific Reports*, 12: 1-10.
18. Kjærner-Semb, E., F. Ayllon, T. Furmanek, V. Wennevik, G. Dahle, E. Niemelä, M. Ozerov, J.P. Vähä, K.A. Glover, C.J. Rubin and A. Wargelius. 2016. Atlantic salmon populations reveal adaptive divergence of immune related genes—a duplicated genome under selection. *BMC Genomics*, 17: 1-12.
19. Li, H. and R. Durbin. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25: 1754-1760.
20. Liu, C., H. Chen, Z. Ren, X. Yang and C. Zhang. 2020. Development of genomic resources and identification of genetic diversity and genetic structure of the domestic Bactrian camel in China by RAD sequencing. *Frontiers in Genetics*, 797.
21. Lopes-Marques, M., A.M. Machado, L.Q. Alves, M.M. Fonseca, S. Barbosa, M.H.S. Sinding, M.H. Rasmussen, M.R. Iversen, M. Frost Bertelsen, P.F. Campos and R. da Fonseca. 2019. Complete inactivation of sebum-producing genes parallels the loss of sebaceous glands in Cetacea. *Molecular Biology and Evolution*, 36: 1270-1280.
22. Ma, Y., H. Zhang, Q. Zhang and X. Ding. 2014. Identification of selection footprints on the X chromosome in pig. *PLoS one*, 9: p.e94911.
23. McKenna, A., M. Hanna, E. Banks, A. Sivachenko, K. Cibulskis, A. Kernytsky, K. Garimella, D. Altshuler, S. Gabriel, M. Daly and M.A. DePristo. 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20: 1297-1303.
24. Niemann, C. and V. Horsley. 2012. Development and homeostasis of the sebaceous gland. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 928-936 pp.
25. Nieradka, A., G. Grech, M. Blazquez-Domingo, H. Beug and M. von Lindern. 2007. Translation of IGBP1 mRNA contributes to the regulation of expansion and differentiation of erythroid progenitors. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2: 162-163.
26. Novais, F.J., P.R.L. Pires, P.A. Alexandre, R.A. Dromms, A.H. Iglesias, J.B.S. Ferraz, M.P.W. Styczynski, H. and Fukumasu. 2019. Identification of a metabolomic signature associated with feed efficiency in beef cattle. *BMC Genomics*, 20: 1-10.
27. Pappas, A. 2009. Epidermal surface lipids. *Dermato-Endocrinology*, 1: 72-76.
28. Pujolar, J.M., M.W. Jacobsen and F. Bertolini. 2022. Comparative genomics and signatures of selection in North Atlantic eels. *Marine Genomics*, 62 p.
29. Quinlan, A.R. and I.M. Hall. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26: 841-842.
30. Rubin, C.J., H.J. Megens, A.M. Barrio, K. Maqbool, S. Sayyab, D. Schwochow, C. Wang, Ö. Carlborg, P. Jern, C.B. Jørgensen and A.L. Archibald. 2012. Strong signatures of selection in the domestic pig genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 19529-19536.
31. Salleh, M.S., G. Mazzoni, J.K. Höglund, D.W. Olijhoek, P. Lund, P. Løvendahl and H.N. Kadarmideen. 2017. RNA-Seq transcriptomics and pathway analyses reveal potential regulatory genes and molecular mechanisms in high-and low-residual feed intake in Nordic dairy cattle. *BMC Genomics*, 18: 1-17.
32. Szpiech, Z.A. and R.D. Hernandez. 2014. Selscan: an efficient multithreaded program to perform EHH-based scans for positive selection. *Molecular Biology and Evolution*, 31: 2824-2827.
33. Wang, T., M. Zhou, J. Guo, Y.Y. Guo, K. Ding, P. Wang and Z.P. Wang. 2021. Analysis of selection signatures on the Z chromosome of bidirectional selection broiler lines for the assessment of abdominal fat content. *BMC Genomic Data*, 22: 1-10.
34. Wu, H., Y.H. Liu, G.D. Wang, C.T. Yang, N.O. Otecko, F. Liu, S.F. Wu, L. Wang, L. Yu and Y.P. Zhang. 2016. Identifying molecular signatures of hypoxia adaptation from sex chromosomes: A case for Tibetan Mastiff based on analyses of X chromosome. *Scientific Reports*, 6: 1-9.
35. Yang, G., S. Li, Q. Zhao, J. Chu, B. Zhou, S. Fan, F. Shi, X. Wei, X. Hu, X. Zheng and Z. Liu. 2021. Transcriptomic and metabolomics insights into the variety of sperm storage in oviduct of egg layers. *Poultry Science*, 100: 101087.
36. Zhao, Y., Y. Hou, F. Liu, A. Liu, L. Jing, C. Zhao, Y. Luan, Y. Miao, S. Zhao and X. Li. 2016. Transcriptome analysis reveals that vitamin a metabolism in the liver affects feed efficiency in pigs. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6: 3615-3624.
37. Zhu, C., H. Fan, Z. Yuan, S. Hu, L. Zhang, C. Wei, Q. Zhang, F. Zhao and L. Du. 2015. Detection of selection signatures on the X chromosome in three sheep breeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 20360-20374.

Detection of Selection Signatures on the X Chromosome in Iranian Dromedary Camels using Whole Genome Sequencing Data

Reza Khalkhali-Evrigh¹ and Nemat Hedayat²

1- Postdoc Researcher, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, (Corresponding author: nhedayat@uma.ac.ir)

Received: 14 Jun, 2022 Accepted: 16 July, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: Although, unlike many livestock, no intense artificial selection has been made on dromedary camels, traces of natural selection along with selection by the human can still be found as selection signatures in the camel genome. Due to the development of new technologies as well as bioinformatics tools, the detection of these genomic regions can be done with high accuracy. This study aimed to identify the selection signatures on the X chromosome in Iranian dromedary camels using whole genome sequencing data.

Material and Methods: For the present study, the genomic data from six Iranian dromedary camels were used as the target population and also eight samples of dromedary camels from the Arabian Peninsula as the reference population. Signatures of selection were identified using two methods, including Fst and XP-EHH. A window size of 50kb and a step size of 25kb were used for this analysis, and genomic windows with scores higher than the 99th percentile of ZFst and XP-EHH distribution were considered as putative selection signatures. BEDtools program was used to extract genes located in these regions. Gene ontology analysis was performed on mentioned genes using g: profiler program.

Results: Based on the results, 13 and 27 genes identified using Fst and XP-EHH approaches as positively selected genes on the X chromosome in Iranian dromedary camels, respectively. The results of gene ontology (GO) analysis showed that terms related to fat metabolism have a significant contribution among the significant GO terms. Among the important identified genes, the genes of DGAT2L6 and AWAT2 may involve in the camel's resistance to high levels of ultraviolet radiation in desert conditions. Also, the NSDHL gene, which is involved in cholesterol biosynthesis, plays a role in male fertility. The only significant KEGG pathway in this study was related to vitamin A metabolism.

Conclusion: It seems that the positive selection of genes related to fat metabolism, behavior and resistance to ultraviolet radiation in Iranian dromedary camels has been for interaction with humans and harsh desert conditions. Due to the lack of breeding programs on camels, it seems that knowing the genomic features of this species can be considered as a prerequisite for designing breeding strategies.

Keywords: Adaptation, Fertility, Lipid metabolism, Positive selection, Sex chromosome