



کاوش ژنومی برای ردیابی نشانه‌های انتخاب در اسب نژاد ترکمن

علیرضا خان احمدی^۱، قدرت رحیمی میانجی^۲، حسین مرادی شهر بابک^۳، سید حسن حافظیان^۴
و محمد باقر زندی باغچه مریم

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (نویسنده مسوول: ali.khanahmadi@gmail.com)
۲ و ۴- استاد و دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار، گروه علوم دامی، پردیس دانشگاه تهران
۵- استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۲

چکیده

انتخاب در جهت افزایش فراوانی جهش‌های جدیدی که در برخی از جمعیت‌ها مفید هستند باعث به جا گذاشتن نشانه‌هایی در سطح ژنوم می‌شوند. از آنجایی که این مناطق غالباً صفات مهم اقتصادی را کنترل می‌نمایند، در نتیجه شناسایی و ردیابی این مناطق از موضوعات مهم در مباحث ژنتیک حیوانی به حساب می‌آید. هدف از انجام این تحقیق ردیابی نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم در جمعیت اسب نژاد ترکمن با استفاده از ۷۰۰۰۰ نشانگر SNP بود. تعداد ۲۳ رأس اسب نژاد ترکمن از مناطق مختلف گنبد کاووس انتخاب، بعد از خون‌گیری و استخراج DNA، تعیین ژنوتیپ شدند. جهت جستجوی نشانه‌های انتخاب از آزمون‌های مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی (LD) شامل آزمون EHH (هموزیگوسیتی هاپلوتیپی بسط داده شده) و iHS (رتبه‌بندی هاپلوتایپ یکپارچه) استفاده شد. برای شناسایی مناطقی از ژنوم که دارای بیشترین نشانه‌های انتخاب بودند از آماره iHS استفاده شد و در نهایت ۶ منطقه ژنومی که در صدک ۹۹/۹٪ کل ارزش‌های iHS قرار داشتند به‌عنوان مناطق کاندیدای نشانه انتخاب، انتخاب شدند. این مناطق در کروموزوم‌های ۵، ۴، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ قرار داشتند. نتایج آماره EHH به همراه بررسی دیگرام‌های شاخه‌بندی هاپلوتیپی وجود نشانه‌های انتخاب در این مناطق ژنومی را تأیید کرد. براساس نتایج حاصله از آماره EHH در برخی از جایگاه‌ها فرسایش LD با سرعت بیشتر (کروموزوم ۷، ۹ و ۱۰) و در برخی جایگاه‌ها به کندی (۴، ۵ و ۸) اتفاق افتاده است به‌طوری‌که آلل‌های موجود روی کروموزوم‌های ۴، ۵ و ۸ دامنه طولانی از LD داشته و فراوانی آنها به ترتیب برابر با ۴۳، ۵۲ و ۳۷ درصد بودند. بنابراین، این مناطق از ژنوم اسب ترکمن احتمالاً هدف انتخاب مثبت بوده است.

واژه‌های کلیدی: انتخاب مثبت، کاوش ژنومی، نشانه‌های انتخاب، اسب ترکمن

مقدمه

در بین موجودات، حیوانات اهلی علاوه بر انتخاب طبیعی در طی هزاران سال، هدف انتخاب‌های شدید مصنوعی نیز قرار گرفته‌اند. همین امر سبب شده است که آن‌ها به‌عنوان نمونه مناسبی برای شناسایی نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم و ژن‌های کنترل‌کننده صفات مختلف محسوب شوند (۲۰۱۰، ۱۳۰۱). بر اساس نظریه کیمورا (۱۶) واریانت‌های بوجود آمده یا از بین می‌روند و یا برای افزایش فراوانی به زمان طولانی نیاز دارند در این مدت به دلیل نوترکیبی، عدم تعادل پیوستگی (LD) موجود در اطراف این واریانت‌ها به صورت عمده فرسایش می‌یابد (تعداد آلل‌های که در اطراف SNP مرکزی که با آن در حالت عدم تعادل پیوستگی هستند کاهش می‌یابد) و از غالب شدن یک هاپلوتایپ خاص در جامعه جلوگیری می‌کند (۲۰). در این حالت واریانت‌های متداول^۲ مشاهده شده در سطح ژنوم عموماً قدیمی بوده و دارای دامنه کوتاهی از عدم تعادل پیوستگی می‌باشند. در حالیکه واریانت‌های نادر می‌توانند جوان یا پیر بوده و با عدم تعادل پیوستگی در دامنه کوتاه یا طولانی قرارگیرند. هرچه به آلل مورد انتخاب نزدیک‌تر شویم میزان تنوع ژنتیکی در اطراف آن کاهش یافته و عدم تعادل لینکازی افزایش می‌یابد و در نهایت ممکن است یک هاپلوتایپ خاص که حاوی چندین ژن است تنها هاپلوتایپ یا مهم‌ترین هاپلوتایپ موجود در جمعیت باشد (۲۷، ۲۶، ۵، ۳). بر اساس دیدگاه انتقال همراه ژنتیکی

همیشه تغییرات فراوانی واریانت‌ها به خاطر انتخاب طبیعی نیست بلکه ممکن است در نزدیکی آن واریانت، ژن دیگری روی همان کروموزوم باشد که تحت انتخاب واقع شده و این امر سبب تغییر فراوانی واریانت می‌شود. هنگامی که یک ژن تحت تأثیر رانش ناشی از انتخاب واقع می‌شود فراوانی چند شکلی‌های نزدیک آن که در حالت عدم تعادل پیوستگی هستند نیز تغییر می‌کند (۲۹). انتخاب در جهت افزایش فراوانی جهش‌های ایجاد شده که فقط در برخی از جمعیت‌ها مفید هستند باعث به جا گذاشتن نشانه‌هایی همچون کاهش تنوع ژنتیکی، انحراف از توزیع فراوانی، افزایش عدم تعادل پیوستگی و توسعه ساختار هاپلوتیپی در سطح ژنوم می‌شود (۲۵، ۲۴، ۲۱). اگر جهش جدید باعث افزایش شایستگی افراد حامل آن در جامعه شود، انتخاب باعث می‌شود افرادی که شایستگی بیشتری دارند سهم بیشتری در تشکیل نسل بعد داشته باشند. بنابراین، فراوانی واریانت‌های جهش یافته در جامعه افزایش می‌یابد. به این نوع انتخاب که سبب افزایش فراوانی واریانت‌های مفید در جامعه می‌شود انتخاب مثبت^۳ می‌گویند (۲۷، ۱). بنابراین، دو پدیده مهم، یکی تغییر فراوانی واریانت‌ها در ژنوم و دیگری وجود عدم تعادل پیوستگی قوی در جایگاه‌های مجاور اطلاعاتی در رابطه با نشانه‌های انتخاب در طی فرایند تکامل فراهم می‌کنند. امیلین و همکاران (۶) در مطالعه پویش ژنومی برای صفت مسافت طی شده در ۱۱۸ رأس اسب‌های ترابرد از ریزآرایه‌های اسی

1- Linkage disequilibrium
3- Selective sweep

2- Common Allele
4- Positive selection

واینبرگ به‌عنوان معیار خطای تعیین ژنوتیپ انجام شد (۳۴). برای این منظور سطح احتمال $7 - 10 \times 9/29$ با استفاده از ضریب تصحیح بنفرونی ($\beta = \alpha/n$) در نظر گرفته شد. در این رابطه، n تعداد آزمون است که در اینجا برابر تعداد SNP (۵۳۷۶۴) و α خطای آزمایش است که در این بررسی 0.05 در نظر گرفته شد. در پایان تعداد ۵۳۷۶۹ SNP برای بررسی الگوی انتخاب مثبت استفاده شدند. همه موارد فوق با نرم‌افزار Plink نسخه ۱/۹ انجام گرفت (۲۳). برای تعیین فازهای هاپلوتیپی از نرم‌افزار Fastphase نسخه ۱/۴ (۲۹) استفاده شد. هاپلوتایپ‌های تولید شده در محیط R (۳۵) و برنامه Sweep نسخه ۱/۱ (۲۷) برای بررسی الگوی انتخاب در سطح ژنوم اسب ترکمن از آزمون‌های مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی (LD)، آزمون هموزیگوسیتی هاپلوتیپی بسط داده شده (EHH) (معادله ۱)، آماره iHS (معادله ۲) و ترسیم گراف‌های شاخه‌بندی هاپلوتیپی استفاده شد (۸).

$$EHH = \frac{1}{n_{as}(n_{as} - 1)} \sum_{k=0}^{k_{asr}} n_k(n_k - 1) \quad (1)$$

در آن: a_s واریانت مرکزی، N_{as} = تعداد تعداد هاپلوتیپ حامل واریانت a_s ، $K_{as,t}$ = تعداد هاپلو تیپ‌های توسعه یافته منحصر به فرد حامل واریانت a_s از فاصله s تا t snp روی کروموزوم و N_k = تعداد نمونه‌ها از هاپلوتیپ توسعه یافته k با استفاده از رابطه زیر مقادیر iHH برای هر اسنپ محاسبه شد (۳۹).

$$iHS = \frac{\log \left(\frac{iHH_a}{iHH_d} \right) - E_{ps} \left[\log \left(\frac{iHH_a}{iHH_d} \right) \right]}{sd_{ps} \left[\log \left(\frac{iHH_a}{iHH_d} \right) \right]} \quad (2)$$

iHS_a = هموزیگوسیتی هاپلوتیپ یکپارچه اجدادی، iHS_d = هموزیگوسیتی هاپلوتیپ یکپارچه مشتق شده، $SNP=S$ مرکز، P_s = فراوانی واریانت s ، Sd = انحراف استاندارد، E_{ps} = امید ریاضی برای کلیه نشانگرهای موجود روی کروموزوم‌ها، آماره iHS محاسبه، سپس برای اطمینان از این که داده‌های حاصل از آماره iHS دارای توزیع نرمال هستند. یا خیر، این داده‌ها با توزیع استاندارد گوسی مطابقت داده شدند. در نهایت نشانگرهایی که ارزش iHS آنها در صدک بالای ۹۹/۹٪ قرار داشتند برای مشاهده نشان‌های انتخاب مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور شناسایی ژن‌های مرتبط با بخش‌های شناسایی شده به‌عنوان نواحی انتخاب، ناحیه‌ای به طول ۵۰۰ کیلو جفت باز اطراف چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی که ارزش iHS آنها در صدک بالای ۹۹/۹٪ قرار داشتند به‌عنوان نواحی حامل نشان‌های انتخاب، به وسیله پایگاه داده‌ای بیومارت^۴ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

پس از اجرای کنترل کیفیت داده‌ها در مجموع تعداد ۵۳۷۶۴ نشانگر SNP جهت آنالیز استفاده شدند. توزیع

استفاده کردند در این تحقیق، اسب‌ها برای مسافت‌های کوتاه ۱۳۰۰ متر و متوسط ۱۹۰۰-۲۱۱۲ متر تعیین ژنوتیپ شدند. بیشتر اسنپ‌های مؤثر روی کروموزوم ۱۸ قرار داشته که تقریباً به فاصله ۶۹۰ کیلو جفت باز از ژن میوستاتین تعیین مکان شدند. زندی و همکاران (۴۳) با مطالعه پویش ژنومی نژادهای اسب ترکمن و کاسپین هفت منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های ۳، ۶، ۸ و ۳۰ شناسایی و ارزش تمایز ژنتیکی (پارامتر θ) بیشتر از ۰/۲۲۵ گزارش کردند همچنین، این محققین با بررسی آماره‌های تمایز جمعیتی و آماره مبتنی بر عدم تعادل لینکاژی نشان دادند که انتخاب در جهت کاهش اندازه بدن روی کروموزوم شماره ۶ برای نژاد کاسپین بوده در حالی که در کروموزوم شماره ۳ افزایش فراوانی الل مطلوب در نژاد ترکمن در جهت افزایش اندازه بدن اتفاق افتاده است. مرادی و همکاران (۲۰) در کاوش ژنومی تمایز جمعیتی در نژادهای زل و لری بختیاری با استفاده از آرایه‌های ژنومی 54K گوسفندی، ۵ منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های ۲، ۵، ۷ و X که حامل نشان‌های انتخاب بودند با استفاده از آزمون‌های مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی و آزمون هموزیگوسیتی هاپلوتیپی بسط داده شده در این دو نژاد شناسایی نمودند. کاساردا و همکاران (۱۵) در کاوش ژنومی نشان‌های انتخاب در گاو نژاد پینزگو^۱ با استفاده از ریزآرایه‌های 50K گاو در دو گله استرالیایی و اسلوواکی از دو آماره Fst و iHS برای بررسی نشان‌های انتخاب استفاده نمودند. با استفاده از آماره iHS ۷ منطقه ژنومی که دارای نشان‌های انتخاب بوده و در صدک بالای ۹۹٪ شناسایی شدند. در نهایت اعلام نمودند که این دو آماره برای شناسایی نشان‌های انتخاب مثبت که اخیراً در ژنوم رخ داده است مفید می‌باشند. عمده تحقیقات انجام شده در اسب ترکمن محدود به تعیین چندشکلی برخی از ژن‌های کاندیدا و نشانگرهای میکروساتالایت بوده است. بنابراین، هدف این پژوهش شناسایی نشان‌های انتخاب در ژنوم اسب ترکمن با استفاده از چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی SNP بوده است که در طی سالیان مورد انتخاب قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق نمونه‌های خون از ۲۳ راس اسب نژاد ترکمن در منطقه گنبد کاووس از نواحی داشلی برون، چپر قویمه و حومه شهر گنبد کاووس جمع‌آوری و استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته از خون کامل انجام گرفت. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، نمونه‌ها جهت تعیین ژنوتیپ به آزمایشگاه Geneseeک اسکاتلند ارسال و با تراشه ژنوم Equine 70k تعیین ژنوتایپ شدند. برای اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ در آنالیزهای بعدی، مراحل مختلف کنترل کیفیت شامل حذف حیوانات بیش از ۵ درصد ژنوتیپ از دست رفته، SNP‌های با فراوانی آلی کمتر از ۵٪ (MAF) و call rat کمتر از ۹۵٪ (درصدی از نمونه‌ها که برای آن نشانگر تعیین ژنوتیپ شده‌اند)، حذف شدند. در نهایت برای SNP‌های باقی‌مانده آزمون بررسی تعادل هاردی

1- Pinzgau cattle

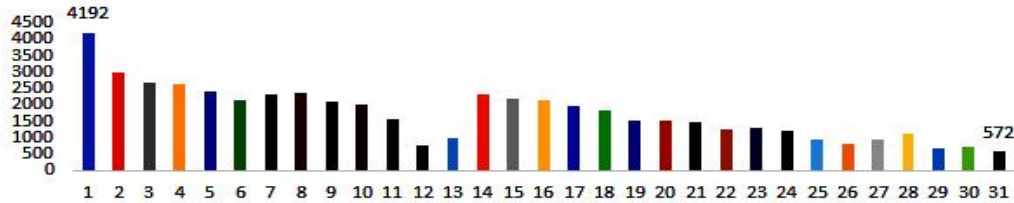
2- Minor Allele frequency

3- Core SNP

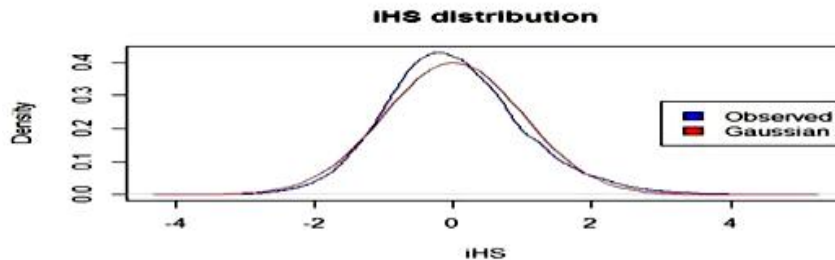
4- www.ensembl.org/biomart/martview

نشانه‌گرهای SNP برابر با ۴۵/۳۲ کیلو جفت باز بود. براساس ارزش‌های iHS، ۶ منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های ۴، ۵، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ شناسایی شد (جدول ۱).

نشانه‌گرهای روی کروموزوم‌ها متفاوت بود به طوری که بیشترین نشانه‌گر (۴۱۹۲) روی کروموزوم ۱ و کمترین تعداد (۵۷۲) روی کروموزوم ۳۱ قرار داشتند (شکل ۱). متوسط فاصله بین



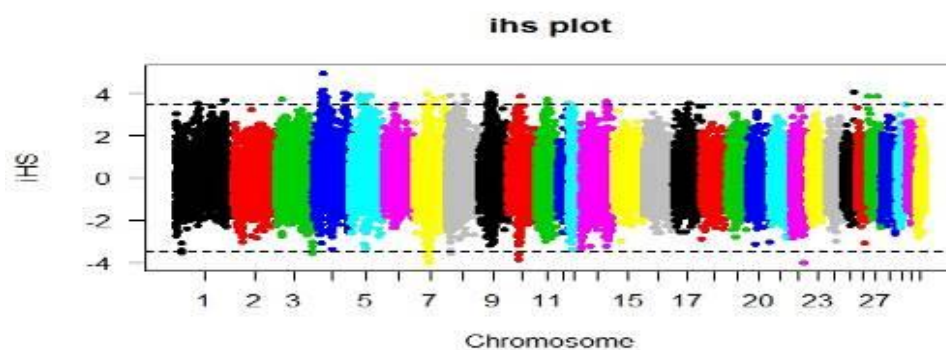
شکل ۱- توزیع نشانه‌گرهای SNP روی کروموزوم‌های اسب ترکمن
Figure 1. Distribution of SNP markers on Turkmen horse chromosome



شکل ۲- مقایسه ارزش‌های استاندارد شده iHS با توزیع گوسی
Figure 2. Comparison of standardized values of iHS with Gaussian distribution

طول دوران اهلی شدن و به دنبال آن تأثیر انتخاب سبب ایجاد نشانه‌های انتخاب در مناطق مختلف ژنوم در نژادهای مختلف اسب شده است (۱۳). با بررسی این مناطق از ژنوم بوسیله روش‌های آماری مختلف و از طریق مقایسات تمایز بین و درون جمعیتی نژادها می‌توان این جایگاه‌ها را شناسایی کرد. با مقایسه EHH در هاپلوتیپ‌های حامل آلل‌های مشتق شده و اجدادی وجود یک تفاوت غیر معمول در هموزیگوسیت بین دو آلل می‌تواند نشان انتخاب باشد (۱۱). با توجه به شکل‌های ۴ و ۵ نمودارهای مربوط به EHH و گراف‌های شاخه‌بندی هاپلوتیپی (جدول ۲) فرسایش LD در اطراف آلل‌های انتخابی به خوبی مشهود انتخابی به عنوان می‌باشد که با افزایش فاصله از آلل‌های هسته مرکزی مقدار EHH کاهش می‌یابد. در گراف‌های شاخه‌بندی هاپلوتیپی قطر هر شاخه بیانگر تعداد نمونه‌هایی است که دارای هاپلوتیپ‌های مشابهی هستند. در برخی از جایگاه‌ها این فرسایش با سرعت بیشتر (کروموزوم‌های ۱۰، ۹، ۷) و در برخی جایگاه‌ها به کندی (کروموزوم‌های ۸، ۴، ۵) اتفاق افتاده است. بر اساس تئوری خنثی کیمورا (۱۶) اگر آللی تحت تأثیر انتخاب واقع شود این آلل دارای دامنه طولانی از LD بوده، فراوانی بالا و جدید می‌باشد. براساس نتایج حاصله از این تحقیق آلل‌های موجود روی کروموزوم‌های ۴، ۵ و ۸ دامنه طولانی از LD داشته و فراوانی آنها به ترتیب برابر با ۴۳، ۵۲ و ۳۷ درصد می‌باشد (شکل ۴).

آماره iHS برای شناسایی نشانه‌های انتخاب برای آلل‌هایی که در جمعیت چندشکل بوده، ولی هنوز به مرحله تثبیت نرسیده‌اند استفاده می‌شود (۱۱، ۲۶، ۳۲، ۳۹، ۴۲). iHS‌های کمتر از صفر مبین این است که هاپلوتیپ مربوطه حامل آلل مشتق شده است و iHS بزرگتر از صفر نشان می‌دهد که هاپلوتیپ مورد نظر حامل آلل اجدادی است (۳۹). پس از شناسایی مناطق ژنومی حامل نشانه‌های انتخاب با استفاده از محیط نرم‌افزار R، از آماره EHH جهت بررسی LD مناطق ژنومی مورد نظر استفاده شد (شکل ۴). این آماره ابزار قدرتمندی است که فرسایش LD در اطراف منطقه ژنومی مورد انتخاب را با ارزیابی خصوصیات هاپلوتیپی در داخل یک جمعیت بررسی می‌کند (۲۶). در این تحقیق نشانه‌گرهایی که دارای بیشترین مقدار iHS بودند به عنوان هسته مرکزی در آنالیز EHH در نظر گرفته شدند. آلل‌های دیگری که ارزش iHS آنها کمتر از صدک قید شده بالا هستند نیز می‌توانند به عنوان مناطق کاندیدای انتخاب مورد بررسی قرار گیرند، اما در این تحقیق فقط مناطقی که در صدک بالای ۹۹/۹ قرار داشتند انتخاب شدند. براساس پدیده رانش ناشی از انتخاب‌های اخیر در ژنوم موجودات فراوانی جهش‌های مفید افزایش یافته و این امر سبب کاهش تنوع هاپلوتیپی در اطراف جهش مفید می‌شود. چنین رخدادهایی بدون نیاز به یک جمعیت مرجع به دلیل اثر انتقال ژنتیکی همراه قابل شناسایی هستند. نتیجه گزارشات سایر محققین در سال‌های اخیر روی اسب مشخص کرد که در

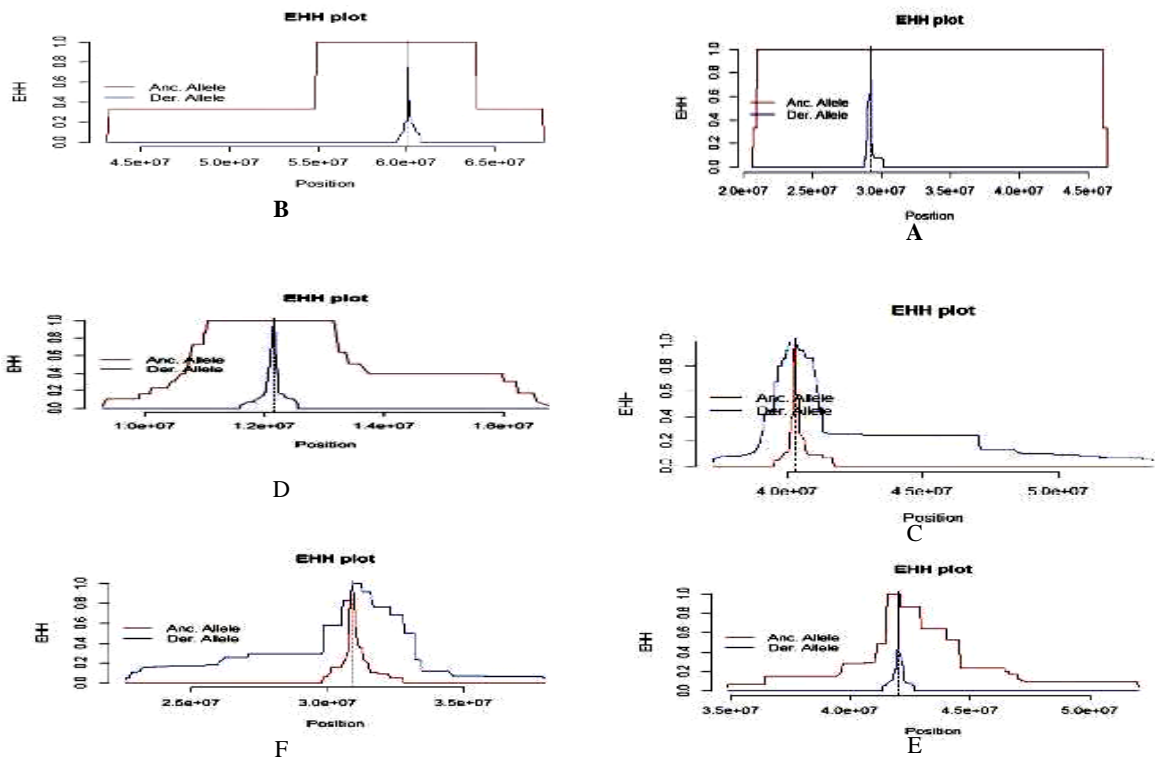


شکل ۳- توزیع ارزش‌های iHS در سطح ژنوم اسب ترکمن
Figure 3. Distribution of iHS values on Turkmen horse genome

جدول ۱- نشانگرهای شناسایی شده بر اساس ارزش iHS

Table 1. The markers identified based on iHS value

نام نشانگر	موقعیت مکانی نشانگر	کروموزوم	iHS
BIEC2_857744	۲۸۸۶۸۰۲۶	۴	۴٫۹۶۸
BIEC2_857883	۲۹۱۶۱۳۵۷	۴	۴٫۱۷۷
BIEC2_854041	۲۲۰۴۰۵۹۱	۴	۴٫۰۱۹
BIEC2_873837	۹۱۶۶۵۸۳۵	۴	۴٫۰۱
BIEC2_853998	۲۲۰۱۱۱۲۹	۴	۴٫۰۰۶
BIEC2-912215	۶۰۰۷۱۹۹۰	۵	۳٫۹۳۱
BIEC2_899306	۲۹۶۵۵۰۷۳	۵	۳٫۹۱۴
BIEC2_996504	۹۹۲۳۶۷۷۲	۷	۳٫۹۵۴
BIEC2_1011999	۸۷۵۰۰۴۳۹	۷	۳٫۸۳۹
BIEC2_1005114	۶۵۶۵۸۲۴۳	۷	۳٫۷۴۲
BIEC2_1051۰۸۷	۳۹۸۶۳۶۹۲	۷	-۴
BIEC2_۹۹۶۶۱۰	۴۰۲۷۸۱۷۵	۷	-۳٫۸
BIEC2_1030306	۱۲۱۷۰۰۸۳	۸	۳٫۹۱۰
BIEC2_1052388	۵۲۶۳۶۶۱۳	۸	۳٫۸۹۸
BIEC2_1087135	۱۲۴۸۲۹۸۲	۸	۳٫۸۹۴
BIEC2_1086540	۳۳۳۸۰۲۸۲	۹	۴٫۰۳۶۸
BIEC2_1090233	۴۱۹۹۴۰۲۲	۹	۳٫۹۲۱۱
BIEC2_1086534	۳۳۳۷۰۶۴۴	۹	۳٫۸۷۰۱
BIEC2_1۱۲۰۵۴	۲۹۹۱۳۱۶۴	۱۰	-۳٫۸۶
BIEC2_1۱۲۵۱۶	۳۰۹۳۵۲۱۸	۱۰	-۳٫۸۵



شکل ۴- توزیع EHH در اطراف مناطق کاندیدای نشانه‌های انتخاب (A تا F) به ترتیب روی کروموزوم‌های ۴، ۵، ۷، ۸، ۹ و ۱۰
 Figure 4. Distribution of EHH around The candidate of signal selection (A-F) on 4, 5, 7, 8, 9 and 10 chromosomes

ترکمن ایران بر خلاف اسب تروبرد بیشتر در مسابقات استقامت و مسیرهای طولانی از آن استفاده شده است تا در مسابقات سرعت و مسافت‌های کوتاه (۱۴)، لذا فراوانی آلل‌های این ژن در این نژاد کمتر از صدک انتخابی قرار گرفته و به‌عنوان نشانه انتخاب تایید نشد. از آنجا که شناسایی موقعیت همه ژن‌ها^۱ در ژنوم اسب بطور کامل انجام نشده است، لذا برای بسیاری از جایگاه‌های ژنی شناسایی شده در اسب ارتباط آن با صفات و یا بیماری گزارش نشده است بنابراین، در این تحقیق جایگاه‌های شناسایی شده با استفاده از بررسی پایگاه‌های داده‌های^۲ مورد بررسی قرار گرفته و ارتباط این جایگاه‌ها با صفات و یا بیماری در سایر گونه‌های گزارش شده است (جدول ۳). از آنجایی که اکثر این جایگاه‌ها مؤثر بر برخی صفات در گونه‌های مختلف بجز اسب گزارش شده است، لذا پیشنهاد می‌شود با انجام مطالعات کاوش ژنومی (GWAS) و نقشه‌یابی، همچون مطالعات مک کوی و همکاران (۱۹) و ایمیلن و همکاران (۶)، این نواحی بیشتر بررسی شوند از آنجاییکه این تحقیق برای اولین بار در اسب نژاد ترکمن گزارش شده است می‌تواند اطلاعات مفیدی در جهت شناسایی مناطق ژنومی کاندیدا برای برخی صفات مهم در این نژاد محسوب شود.

بنابراین، این مناطق از ژنوم اسب ترکمن احتمالاً هدف انتخاب مثبت بوده است. جایگاه‌هایی که دارای فراوانی واریانت زیاد و مقدار EHH بالا هستند هدف انتخاب مثبت می‌باشند (۲۵). علاوه بر جایگاه‌های مورد نظر جایگاه‌های مجاور آلل انتخابی که دارای EHH بالایی هستند هدف انتخاب مثبت بوده و در دام‌ها علاوه بر انتخاب طبیعی انتخاب مصنوعی نیز در افزایش آن مؤثر می‌باشد. در نتیجه این جایگاه‌ها می‌توانند بعنوان جایگاه‌های کاندیدا برای ژن‌های با اثر عمده باشند (۹). اما آلل‌های موجود روی کروموزوم‌های ۷، ۹ و ۱۰ که دامنه کوتاهی از LD دارند، اما فراوانی بالایی به ترتیب ۶۳، ۳۷ و ۵۰ درصد دارند براساس تئوری فوق این آلل‌ها قدیمی می‌باشند. ژن GYS1 در ارتباط با افزایش تولید گلیکوژن در عضلات اسکلتی در فاصله ۱۰ مگا جفت بازی از ناحیه گزارش شده روی کروموزوم ۱۰ اسب در این تحقیق گزارش شد (۱۹). همچنین، جهشی در ارتباط با صفت مسافت طی شده در اسب در فاصله ۶۹۰ کیلوگفت باز از ژن میوستاتین روی کروموزوم ۱۸ اسب تروبرد برای مسابقات سرعت مسافت کوتاه (۱۳۰۰-۱۹۰۰ متر) و متوسط (کمتر از ۲۰۰۰ متر) گزارش شد (۶)، اما در این پژوهش نشانه‌هایی از انتخاب در صدک بالای ۹۹/۹٪ روی این کروموزوم مشاهده نشد. یک دلیل احتمالی می‌تواند این باشد که اسب نژاد

جدول ۲- فراوانی آللی SNPهای نشان دهنده نشانه‌های انتخاب و گراف‌های شاخه‌بندی هاپلوتیپی به ترتیب از A تا F مربوط به SNPهای توضیح داده شده به ترتیب در شکل ۴

Table 2. Allelic frequencies of SNPs showing signature of selection and haplotype bifurcation diagrams from A to F for the SNP explained in The Figure 4

گراف	شاخه‌بندی هاپلوتیپی	فراوانی هاپلوتیپی
A		<input type="checkbox"/> 1 <input checked="" type="checkbox"/> 1 43% CCCCCA <input checked="" type="checkbox"/> 2 26% CCCCCC <input checked="" type="checkbox"/> 3 22% CAAACC <input checked="" type="checkbox"/> 4 7% CCCACG <input type="checkbox"/> 5 2% ACCCCC
B		<input checked="" type="checkbox"/> 1 52% CCCCC <input checked="" type="checkbox"/> 2 26% CACC <input checked="" type="checkbox"/> 3 15% CCCA <input checked="" type="checkbox"/> 4 7% ACAC
C		<input checked="" type="checkbox"/> 1 63% CCCCCC <input checked="" type="checkbox"/> 2 22% ACAAAA <input checked="" type="checkbox"/> 3 9% CCACCC <input type="checkbox"/> 4 4% AAAAAA <input type="checkbox"/> 5 2% CCAAAA
D		<input checked="" type="checkbox"/> 1 37% CCC <input checked="" type="checkbox"/> 2 30% ACC <input checked="" type="checkbox"/> 3 17% CAC <input checked="" type="checkbox"/> 4 13% CAA <input type="checkbox"/> 5 2% CCA
E		<input checked="" type="checkbox"/> 1 37% CACCA <input checked="" type="checkbox"/> 2 30% ACAACG <input checked="" type="checkbox"/> 3 20% CCCCC <input checked="" type="checkbox"/> 4 9% CCAACG <input type="checkbox"/> 5 2% ACAAAA <input type="checkbox"/> 6 2% CCCACG
F		<input checked="" type="checkbox"/> 1 50% CCCCCAC <input checked="" type="checkbox"/> 2 24% AAACCC <input checked="" type="checkbox"/> 3 15% ACCACC <input checked="" type="checkbox"/> 4 9% ACCCCC <input type="checkbox"/> 5 2% CCCCCA

جدول ۳- نواحی تحت انتخاب مثبت و ژن‌های شناسایی شده در این نواحی در اسب و سایر گونه‌ها

Table 3. Area under the positive selectin and genes were detected in Horse and other species

منبع	حیوان مورد مطالعه	صفت	ژن	کروموزوم
Wade	اسب	سیستم ایمنی		۴
Jiang	انسان	بیماری هیرشپرونک	Sema3a(Ig)	۴
Takahashi	خرگوش-ماهی	نقص سیستم عصبی روده	SEMA3D SEMA3D	۴
Traba.j	انسان	نقل و انتقال ATP		۵
Busch-Nentwich Ralph Knöll	ماهی موش	کاهش اندازه چشم رشد غیر طبیعی جفت	SLC25A24	۷ ۷
Akio Matsuda	انسان	هیپرتروفی عضله قلب	PLXNA2 E2f8	۷ ۸
Heli Venhoranta	انسان	تعدیل/تنظیم سیکنالهای I-kappaB kinase/NF-kappaB	CSRP3 ZDHHC13	
Savage	گاو	سندروم PIRM	UBE3B	۸
Kyoko Tashiro	خرگوش	مقاومت به انسولین	Acacb	۸
Estrada-Curzano Debaditya	انسان	تنظیم ERK1 and ERK2	GAREM1 C8orf37	۹
Mukhopadhyay Zou, Y	انسان-خرگوش موش	دیستروفی کان راد پروتئین فعال SUMO ناهنجاری استخوان ران	SENp6 COL12A1	۱۰ ۱۰

منابع

1. Akey, J.M. 2009. Constructing genomic maps of positive selection in humans. Where do we go from here? *Genome Research*, 19: 711-722.
2. Biswas, S. and J.M. Akey. 2006. Genomic insights into positive selection. *Trends in Genetics*, 22: 437-436.
3. Brookfield, J.F.Y. 2001. Population genetics. The signature of selection. *Current Biology*, 11: 388-390.
4. Busch-Nentwich, E., R. Kettleborough, C.M. Dooley, C. Scahill, I. Sealy, R. White, C. Herd, S. Mehroke, N. Wali, S. Carruthers, A. Hall, J. Collins, R. Gibbons, Z. Pusztai, R. Clark and D.L. Stemple. 2013. Sanger Institute Zebrafish Mutation Project mutant data submission. ZFIN Direct Data Submission (<http://zfin.org>).
5. Carlson, C.S., D.J. Thomas, M.A. Eberle, J.E. Swanson, R.J. Livingston, M.J. Rieder and D.A. Nickerson. 2005. Genomic regions exhibiting positive selection identified from dense genotype data. *Genome Research*, 15: 1553-1565.
6. Emmeline, W., H. Beatrice, A. McGivney, G.U. Jingjing, R. Whiston, E. MacHugh. 2010. A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. *Biomedical central*, 11: 1471-2164.
7. Estrada-Cuzcano, A., K. Neveling, S. Kohl, E. Banin, Y. Rotenstreich, D. Sharon, T.C. Falik-Zaccai, S. Hipp, R. Roepman, B. Wissinger, S.J.F. Letteboer and D.A. Mans. 2012. Mutations in C8orf37, encoding a ciliary protein, are associated with autosomal-recessive retinal dystrophies with early macular involvement. *American Journal of Human Genetics*, 90: 102-109.
8. Gautier, M. and R. Vitalis. 2012. Rehh: An R package to detect footprints of selection in genome-wide SNP data from haplotype structure. *PLoS ONE*, 7: 1176-7.
9. Hayes, B., S. Lien, H. Nilsen, H.G. Olsen, P. Berg, S. MacEachern, S. Potter and T.H.E. Meuwissen. 2008. The origin of selection signatures on bovine chromosome six. *Animal Genetics*, 39: 105-111.
10. Hays, B.J., A.J. Chamberlain, S. Maceachern, K. Savin, H. Mcpartlan, I. Macleod, L. Sethuran and M.E. Goddard. 2009. A Genome map of divergent artificial selection between *Bos Taurus* dairy cattle and *Bos Taurus* beef cattle. *Animal Genetic*, 40: 176-184.
11. Hudson, R., K. Bailey, D. Skarecky, J. Kwiatowski and F. Ayala. 1994. Evidence for positive selection in the superoxide dismutase (Sod) region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 136: 1329-1340.
12. Jiang, Q., S. Arnold, T. Heanue, K.P. Kilambi, B. Doan, A. Kapoor, A.Y. Ling, M.X. Sosa, M. Guy, Q. Jiang, G. Burzynski, K. West, S. Bessling, P. Griseri, J. Amiel, R.M. Fernandez, J.B. Verheij, R.M. Hofstra, S. Borrego, S. Lyonnet, I. Ceccherini, J.J. Gray, V. Pachnis, A.S. McCallion and A. Chakravarti. 2015. Functional loss of semaphorin 3C and/or semaphorin 3D and their epistatic interaction with ret are critical to Hirschsprung disease liability. *American Journal of Human Genetics*, 96: 581-596.
13. Jingjing, G.U., N. Orr, S.D. Park, L.M. Katz, G. Sulimova, D.E. MacHugh and E.W. Hill. 2009. A genome scan for positive selection in thoroughbred horses. *Journals PLoS ONE*, 4: 57-67.
14. Khalili, M. 1387. Horses and my expertise. Zareh, Tehran, 694 pp (In Persian).
15. Kasarda, R., N. Moravčiková, A. Trakovická, G. Mészáros and K. Ondrej. 2015. Genome-wide selection signatures in Pinzgau cattle. *Potravinárstvo*, 9: 268-274.
16. Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution and the world view of neutralists. *Genome*, 24-31.
17. Knöll, R., M. Hoshijima, H.M. Hoffman, V. Person, I. Lorenzen-Schmidt, M.L. Bang, T. Hayashi, N. Shiga, H. Yasukawa, W. Schaper, W. McKenna, M. Yokoyama, N.J. Schork, J.H. Omens, A.D. McCulloch, A. Kimura, C.C. Gregorio, W. Poller, J. Schaper and H.P. Schultheiss. 2002. The Cardiac Mechanical Stretch Sensor Machinery Involves a Z Disc Complex that Is Defective in a Subset of Human Dilated Cardiomyopathy. *Cell*, 111: 943-955.
18. Matsuda, A., Y. Suzuki, G. Honda, S. Muramatsu, O. Matsuzaki, Y. Nagano, T. Doi, Shimotohno, T. Harada, E. Nishida, H. Hayashi and S. Sugano. 2003. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Oncogene*, 22: 3307-3318.
19. McCoy, A.M., R. Schaefer, J.L. Petersen, P.L. Morrell, M.A. Slamka, J.R. Mickelson, S.J. Valberg and M.E. McCue. 2013. Evidence of positive selection for a glycogen synthase (GYS1) mutation in domestic horse populations. *Journal of heredity*, 105: 163-172.
20. Moradi, M.H., A. Nejati-Javaremi, M. Moradi-Shahrbabak, K.G. Dodds and J.C. McEwan. 1389. Whole-genome scan of population differentiation in Zel and Lori-Bakhtiari sheep breeds. *Journal of Agricultural biotechnology*, 2: 57-70.
21. Mukhopadhyay, D., A. Arnaoutov and M. Dasso. 2010. The SUMO protease SENP6 is essential for inner kinetochore assembly. *Journal of Cell Biology*, 188: 681-692.
22. Petersen, J.L., S.J. Valberg, J.R. Mickelson and M.E. McCue. 2014. Haplotype diversity in the equine myostatin gene with focus on variants associated with race distance propensity and muscle fiber type proportions. *Animal Genetics*, 45: 827-835.
23. Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, M.A. Ferreira, D. Bender, J. Maller, P. Sklar, P.I. De Bakker and M.J. Daly. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3): 559-575.
24. Qanbari, S., D. Gianola, B. Hayes, F. Schenkel, S. Miller, S. Moore, G. Thaller and H. Simianer. 2011. Application of site and haplotype-frequency based approaches for detecting selection signatures in cattle. *BMC Genomics*, 12: 318 pp.
25. Qanbari, S., H. Pausch, S. Janse, M. Somel, T.M. Strom, R. Fries, R. Nielsen, H. Simianer. 2014. Classic Selective Sweeps Revealed by Massive Sequencing in Cattle. *PLoS Genet*, 10: 41-48.
26. Sabeti, P., D.E. Reich, J.M. Higgins, H.Z. Levine, D.J. Richter, S.F. Schaffner, S.B. Gabriel, J.V. Platko, N.J. Patterson, G.J. McDonald, H.J. Ackerman, S.J. Campbell, D. Altshuler, R. Cooper, D. Kwiatkowski, R. Ward and E.S. Lander. 2002. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature*, 419: 832-837.
27. Sabeti, P., S.F. Schaffner, B. Fry, J. Lohmueller, P. Varily, O. Shamovsky, A. Palma, T.S. Mikkelsen, D. Altshuler and E.S. Lande. 2006. Positive natural selection in the human lineage. *Science*, 3129: 1614-1620.
28. Savage, D.B., C.S. Choi, V.T. Samuel, Z. X. Liu, D. Zhang, A. Wang, X.M. Zhang, G.W. Cline, X.X. Yu, J.G. Geisler, S. Bhanot, B.P. Monia and G.I. Shulman. 2006. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *Journal of Clinical Investigation*, 11: 817-24.
29. Scheet, P. and M. Stephens. 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(4): 629-644.

30. Smith, J.M. and J. Haigh. 1974. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetical Research*, 23: 23-35.
31. Takahashi, K.I., M. Ishida and H. Takahashi. 2009. Expression of Sema3D in subsets of neurons in the developing dorsal root ganglia of the rat. *Neuroscience Letter*, 455: 17-21.
32. Tang, K., K. Thornton and M. Stoneking. 2007. A new approach for using genome scans to detect recent positive selection in the human genome. *PLoS Biol*, 5: 171 pp.
33. Tashiro, K., T. Tsunematsu, H. Okubo, T. Ohta, E. Sano, E. Yamauchi, H. Taniguchi and H. Konish. 2009. GAREM, a Novel Adaptor Protein for Growth Factor Receptor-bound Protein 2, Contributes to Cellular Transformation through the Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase Signaling. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 284: 20206-20214.
34. Teo, Y.Y., A.E. Fry, T.G. Clark, E.S. Tai and M. Seielstad. 2007. On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Hum Genetics*, 71: 701-703.
35. R Development core team. 2015. Free software environment for statistical computing and graphics. <http://www.r-project.org/>.
36. Tian, Y., P. Jackson, C. Gunter, J. Wang, C.O. Rock and S. Jackowski. 2006. Placental Thrombosis and Spontaneous Fetal Death in Mice Deficient in Ethanolamine Kinase 2. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 281: 28438-28449.
37. Traba, J., A.D. Arco, M.R. Duchon, G. Szabadkai and J. Satrústegui. 2011. SCaMC-1 promotes cancer cell survival by desensitizing mitochondrial permeability transition via ATP/ADP-mediated matrix Ca²⁺ buffering. Published online. PMC ID:PMC, 33: 79-81.
38. Venhoranta, H., H. Pausch, K. Flisikowski, C. Wurmser, J. Taponen, H. Rautala, A. Kind, A. Schnieke, R. Fries, H. Lohi and M. Andersson. 2014. In frame exon skipping in BE3B is associated with developmental disorders and increased mortality in cattle. *BioMedical Engineering Genetics online*, 15: 890.
39. Voight, B., S. Kudravalli, X. Wen and J. Pritchard. 2006. A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biol*, 4: 72.
40. Wade, C.M., E. Giulotto, S. Sigurdsson, M. Zoli, S. Gnerre, F. Imsland, T.L. Lear, D.L. Adelson, E. Bailey, R.R. Bellone, H. Blocker, O. Distl, R.C. Edgar and M. Garber. 2009. Equus caballus isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 4 genomic scaffold, EquCab2.0 scaffold_11, whole genome shotgun sequence. *NCBI Reference Sequence*, 10: 74-86.
41. Wagh, K., A. Bhatia, G. Alexe, A. Reddy, V. Ravikumar, M. Seiler, M. Boemo, M. Yao, M. Cronk, A. Naqvi, S. Ganesan, A.J. Levine, G. Bhan. 2012. Lactase Persistence and Lipid Pathway Selection in the Maasai. *PLoS ONE*, 7: 44-75.
42. Wang, E.T., G.K. Odama, P. Baldi and R. Moyzis. 2006. Global landscape of recent inferred Darwinian selection for Homo sapiens. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 135-140.
43. Zandi, M.B., A. Nejati-Javaremi and A. Pakdel. 2013. Genome-Wide of Genome Structure and signature of selection in Turkmen and Caspian horses. Ph.D. thesis, College of Agriculture, university of Tehran. 135 pp (In Persian).
44. Zou, Y., D. Zwolanek, Y. Izu, S. Gandhi, G. Schreiber, K. Brockmann, M. Devoto, Z. Tian, Y. Hu, G. Veit, M. Meier, J. Stetefeld, D. Hicks, V. Straub, N.C. Voermans, D.E. Birk, E.R. Barton, M. Koch and C.G. Bonnemann. 2014. Recessive and dominant mutations in COL12A1 cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, 23: 2339-52.

Genomic Scan for Detection of Selective Sweeps in Turkmen Horse Breed

Ali Reza Khanahmadi¹, Ghodrat Rahimi Mianji², Hossein Moradi Shahrebabak³,
Seyyed Hassan Hafezian⁴ and Mohammad Bagher Zandi Baghcheh Maryam⁵

1- PhD Student, College of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Science and Natural Resources University (Corresponding author: ali.khanahmadi@gmail.com)

2 and 4- Professor and Associate Professor, College of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Science and Natural Resources University

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Theran

5- Assistant Professor, College of Agriculture, University of Zanjan

Received: July 27, 2016

Accepted: January 11, 2017

Abstract

Selection not only increases the frequency of new-useful mutations but also remains some signals throughout the genome. Since these areas are often control economically important traits, identify and tracking these areas is the most important issue in the animal genetics. The aim of this study was to detect signals of selection in the genome of Turkmen horse using 70K SNP chip. Twenty-three Turkmen horses were selected from different areas of Gonbad-e kavuos. After blood sampling and DNA extraction all samples were genotyped to detect footprint of signal selection, some tests based on linkage disequilibrium (LD) such as extended haplotype homozygosity (EHH) and integrated haplotype score (iHS) was used. For identification of the regions on the genome that contains the most signals of selection, iHS statistics was used and accordingly 6 genomic regions which were in the 99.99% percentile of iHS values selected for further analysis. These regions were located in 6 areas on chromosomes 4, 5, 7, 8, 9 and 10. Results of EHH test with bifurcation diagram of haplotype, confirmed signals of selection in these areas. Based on the results of the EHH test, sharp decay of LD in some regions was observed (chromosomes 7, 9 and 10) while in other regions it wasn't so significant (chromosomes 4, 5 and 8). So that alleles on chromosomes 4,5 and 8 had long range of LD with the frequency of, %43, %52 and %37, there for, it can be stated that respectively, these regions of the genome of Turkmen horse most likely has been the target of positive selection.

Keyword: Genomic scan, Positive selection, Signals of selection, Turkmen horse