

## Research Paper

# Identification of Genetic Variants Based on Single Nucleotide Polymorphisms and Insertion-Deletion Events in *TLR8*, *IRF10b*, and *GAPDH* Genes Related to the Immune System in Rainbow Trout Using Transcriptomic Data

Najmeh Fazeli Moghadam<sup>1</sup>, Ghodrat Rahimi Miyanj<sup>2</sup>, Ayoub Farhadi<sup>3</sup>,  
Ardeshir Nejati Jawarami<sup>4</sup> and Elham Younesi Melardi<sup>5</sup>

1- Ph.D. student in Animal Genetics and Breeding, Department of Animal Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran, (Corresponding author: najmehfazeli938@gmail.com)

2- Professor, Department of Animal Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

3- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

4- Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran

5- Ph.D. graduate, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

Received: 22 February, 2024

Accepted: 15 June, 2024

## Extended Abstract

**Background:** Viral hemorrhagic septicemia (VHS) is one of the most common viral diseases in the rainbow salmon farming industry, which causes heavy economic losses. Rainbow trout's importance in the Iranian aquaculture industry, on the one hand, and the increase in deaths due to the spread of infectious diseases, on the other hand, highlight the need for further understanding of the fish immune system and obtaining a tool to accurately diagnose the causes of diseases in this fish species. The control and prevention of disease outbreaks in farmed fish requires the implementation of a regular diagnosis and treatment program, for which molecular markers can be useful as a monitoring and diagnostic tool. Recent studies have shown that computational approaches to identify sequenced RNA variants are very efficient and cost-effective methods for tracking genomic diversity. Some variants based on single nucleotide polymorphisms (SNPs), including synonymous, non-synonymous, and non-coding, as well as insertion-deletion (InDel) events resulting in RNA sequencing data, can be used as a desirable genetic marker in genetic differentiation analysis, especially in investigating allele-specific expression. The present study aimed to identify genetic variants based on SNP and InDel occurrence using transcriptomic data in some genes expressed in rainbow trout treated with the VHS virus.

**Methods:** RNA sequencing data from the spleen tissue of rainbow trout treated with the VHS virus was used in this research. Quality control and alignment of readings were done using FastQC and STAR software, respectively. A set of bioinformatics tools (GATK) was used to identify SNPs and InDels. Variants were identified in the first step using GTAK HaplotypeCaller, and the GTAK Variant Filtration tool was used in the next step to increase the accuracy and filtering of the initially identified SNPs. After filtering, the detected variants were annotated and identified using SnpEff software. In the final step, the genes related to the three main genes (*TLR8*, *IRF10*, and *GAPDH*) were identified using STRING software, and the gene network was drawn based on these three genes. The *GAPDH* gene was considered the main gene.

**Results:** In this research, genomic variants of SNPs and InDel events in three *TLR8*, *IRF10b*, and *GAPDH* genes, which are related to the immune system, were identified and reported in rainbow trout for the first time. In total, 72 SNPs and 15 InDels in the *TLR8* gene, 20 SNPs and 3 InDels in the *IRF10* gene, and 21 SNPs and 8 InDels in the *GAPDH* gene were identified in this study. In the *TLR8* gene locus, 9.7 and 2.8% of SNP variants were detected upstream and downstream of this gene, respectively, and the occurrence of InDel was equal to 26.7%, which was detected in both upstream and downstream of this gene. In the *IRF10* gene locus, 10 and 65% of SNP variants were detected upstream and downstream, respectively, and only 33.3% of InDel events were detected downstream of this gene. In the *GAPDH* downstream gene position, each of the SNP and InDel variants was detected with frequencies equal to 47.6% and 12.5%, respectively, only in the downstream site of this gene. None of these types of variants were identified in the upstream site of the *GAPDH* gene.

**Conclusion:** One of the essential research works in deciphering phenotypic and genotypic maps in domestic animals is to identify specific alleles in gene regulation. In this regard, the first step



is to track the genomic variants in the expressed genes. The analysis of the results in this research showed that the location, type, and frequency of genetic variants were different in each of the studied marker sites. According to the identification of variants based on SNP and the occurrence of InDel in the three *TLR8*, *IRF10b*, and *GAPDH* genes, the results can be used in breeding programs using the MAS technique against viral infections, such as VHS, and in the design of SNP chips in fish species. Since the different variants identified in each of the studied marker sites have a regulatory role, it is very important to investigate the effect of each of them on allele-specific expression. Furthermore, acquiring information on genes involved in the immune system, identifying molecular markers associated with these loci, and studying the correlation between these loci and quantitative traits can be used in designing breeding programs in the fish farming industry to produce disease-resistant strains.

**Keywords:** Genetic Markers, InDel, Rainbow Trout, RNA-sequencing, SNP, Viral Hemorrhagic septicemia (VHS)

**How to Cite This Article:** Fazeli Moghadam, N., Rahimi Miyanj, Gh., Farhadi, A., Nejati Jawarami, A., & Younesi Melardi, E. (2024). Identification of Genetic Variants Based on Single Nucleotide Polymorphisms and Insertion-Deletion Events in *TLR8*, *IRF10b*, and *GAPDH* Genes Related to the Immune System in Rainbow Trout Using Transcriptomic Data. *Res Anim Prod*, 15(4), 93-106. DOI: 10.61186/rap.15.4.93

## مقاله پژوهشی

# شناسایی واریانت‌های ژنتیکی مبتنی بر چندشکلی تک نوکلئوتیدی و رخداد حذف-اضافه در ژن‌های TLR8، IRF10b و GAPDH مرتبط با سیستم ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از داده‌های ترانسکریپتومی

نجمه فاضلی مقدم<sup>1</sup>، قدرت رحیمی میانجی<sup>۲</sup>، ایوب فرهادی<sup>۳</sup>، اردشیر نجاتی جوارمی<sup>۴</sup> و الهام یونسی ملردی<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران،  
(نویسنده مسوول: najmehfazeli938@gmail.com)

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۴- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۵- فارغ‌التحصیل دکتری تخصصی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۳

صفحه ۹۳ تا ۱۰۶

## چکیده مبسوط

**مقدمه و هدف:** سپتی سمی همورازیک ویروسی (VHS) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ویروسی در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است که باعث خسارات اقتصادی سنگین می‌شود. اهمیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در صنعت آبی‌پروری ایران از یک سو و افزایش تلفات ناشی از شیوع بیماری‌های عفونی از سوی دیگر نیاز به شناخت بیشتر سیستم ایمنی ماهیان و همچنین دست‌یابی به ابزاری جهت تشخیص دقیق عوامل ایجاد بیماری‌های این گونه از ماهیان را مشخص می‌سازد. کنترل و پیشگیری از شیوع بیماری‌ها در ماهیان پرورشی مستلزم اجرای یک برنامه منظم تشخیص و درمان می‌باشد که در این رابطه نشانگرهای مولکولی می‌توانند به‌عنوان یک ابزار پایش و تشخیص مفید باشند. مطالعات اخیر نشان داد که رویکردهای محاسباتی برای شناسایی واریانت‌های RNA توالی‌یابی شده، از روش‌های بسیار کارآمد و مقرون به‌صرفه جهت ردیابی تنوع ژنومیکی هستند. برخی از واریانت‌های مبتنی بر چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP)، از جمله مترادف، غیر مترادف و غیر کد شونده و همچنین رخداد حذف-اضافه (InDel) ناشی از داده‌های RNA توالی‌یابی شده می‌توانند به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی مطلوب در آنالیزهای تفرق ژنتیکی به‌ویژه در بررسی بیان اختصاصی آلل‌ها مورد استفاده قرار گیرند. هدف از مطالعه حاضر شناسایی واریانت‌های ژنتیکی مبتنی بر SNP و رخداد حذف-اضافه با استفاده از داده‌های ترانسکریپتومی در برخی از ژن‌های بیان شده در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با ویروس VHSV بود.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق از داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA از بافت طحال ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با ویروس VHSV استفاده شد. کنترل کیفی و هم‌ردیفی خوانش‌ها به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای FastQC و STAR انجام شد. برای شناسایی SNPها و InDelها از مجموعه‌ای از ابزارهای بیوانفورماتیکی (GATK) استفاده شد. واریانت‌ها در مرحله نخست با استفاده از GTAK HaplotypeCaller شناسایی و در مرحله بعد برای افزایش دقت و فیلترینگ SNPهای شناسایی شده اولیه، از ابزار GTAK Variant Filtration استفاده شد. پس از فیلترینگ، واریانت‌های شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار SnpEff حاشیه‌نویسی و تعیین هویت شدند. در مرحله پایانی با استفاده از نرم‌افزار STRING ژن‌های مرتبط با سه ژن اصلی TLR8، IRF10b و GAPDH شناسایی و شبکه ژنی بر مبنای این سه ژن ترسیم و ژن GAPDH به‌عنوان ژن اصلی در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** در این تحقیق واریانت‌های ژنومیکی از نوع چندشکلی تک نوکلئوتیدی و رخداد حذف-اضافه در سه ژن TLR8، IRF10b و GAPDH که از ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی هستند در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای اولین بار شناسایی و گزارش شدند. در این پژوهش تعداد ۷۲ SNP و ۱۵ InDel در ژن TLR8، ۲۰ SNP و ۳ InDel در ژن IRF10b و ۲۱ SNP و ۸ InDel در ژن GAPDH شناسایی شد. در جایگاه ژنی TLR8، به‌ترتیب ۹/۷ و ۲/۸ درصد از واریانت‌های SNP در بالادست و پائین‌دست این ژن و نیز رخداد InDel برابر با ۲۶/۷ درصد در بالادست و ۲۶/۷ درصد در پائین‌دست این ژن شناسایی شدند. در جایگاه ژنی IRF10b به‌ترتیب ۱۰ و ۶۵ درصد از واریانت‌های SNP در بالا دست و پائین دست و تنها ۳۳/۳ درصد از رخداد InDel در پائین‌دست این ژن شناسایی شدند. در جایگاه ژنی GAPDH هریک از واریانت‌های SNP و InDel به‌ترتیب برابر با ۴۷/۶ و ۱۲/۵ درصد تنها در پائین‌دست این ژن شناسایی شدند. هیچ‌یک از این نوع واریانت‌ها در بالادست جایگاه ژنی GAPDH شناسایی نشده است.

**نتیجه‌گیری:** از کارهای تحقیقاتی ضروری در رمزگشایی نقشه‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در دام‌های اهلی، شناسایی آلل‌های خاص در تنظیم بیان ژن‌هاست. در این راستا اولین گام، ردیابی واریانت‌های ژنومیکی در ژن‌های بیان شده است. آنالیز نتایج این تحقیق نشان داد که موقعیت مکانی، نوع و وفور واریانت‌های ژنتیکی در هریک از جایگاه‌های نشانگر مورد مطالعه متفاوت بودند. با توجه به شناسایی واریانت‌های مبتنی بر SNP و رخداد InDel در سه ژن TLR8، IRF10b و GAPDH می‌توان از این یافته‌ها در برنامه‌های اصلاح نژادی با استفاده از روش انتخاب به‌کمک نشانگر در برابر عفونت‌های ویروسی از جمله VHS و همچنین در طراحی اسنیپ چیپ‌ها در گونه ماهی استفاده نمود. از آنجایی که واریانت‌های مختلف شناسایی شده در هریک از جایگاه‌های نشانگری مورد مطالعه نقش تنظیمی در بیان ژن‌ها دارند، فلذا بررسی تأثیر هریک از آن‌ها در بیان اختصاصی آلل‌ها بسیار حائز اهمیت است. همچنین با داشتن اطلاعات ژن‌های درگیر در سیستم ایمنی و با شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط به این جایگاه‌ها و از طرفی مطالعه همبستگی بین این جایگاه‌ها با صفات کمی می‌توان از آن‌ها در طراحی برنامه‌های اصلاح نژاد در صنعت پرورش ماهی برای تولید سویه‌های مقاوم در مقابل بیماری‌ها بهره برد.

**واژه‌های کلیدی:** بیماری سپتی سمی همورازیک ویروسی، توالی‌یابی RNA، قزل‌آلای رنگین‌کمان، واریانت‌های ژنتیکی، SNP، InDel

## مقدمه

شمالی می‌باشند. تقاضای روزافزون جهانی برای منابع غذایی دریایی و محدودیت در ظرفیت برداشت از منابع طبیعی موجب توسعه آبی‌پروری در سرتاسر جهان شده است. امروزه مزارع پرورش ماهی ۳۰ درصد از تولید جهانی آبیاری را به‌خود اختصاص داده‌اند و پیش‌بینی می‌شود این میزان تا سال ۲۰۳۰ به ۵۰ درصد برسد (D'Agaro et al., 2022). پرورش جمعیت

ماهیان سرد آبی، منابع غذایی ارزشمندی هستند که به‌دلیل محتوای پروتئین بالا، چربی کم و حداقل خارهای داخل عضلانی شناخته شده‌اند (Gjedrem et al., 2012). بیشتر این ماهیان از خانواده آزاد ماهیان (Salmonidae) بوده که مشتمل بر ماهیان آب شیرین و ماهیان مهاجر موجود در نیمکره

VHS یک ویروس بسیار مسری و بیماری‌زا در گونه‌های مختلف آبزیان و آب شیرین است. این ویروس دارای گستره میزبانی با بیش از ۷۰ گونه ماهی است و می‌تواند خسارات بیولوژیکی و اقتصادی قابل توجهی ایجاد کند (Kim & Faisal, 2011; OIE, 2009). همچنین در آب‌های ۱۵ تا ۱۸ درجه سانتی‌گراد بیماری معمولاً در زمان کوتاه‌تری و با شدت بیماری‌زایی متوسط اتفاق می‌افتد اما بیشترین رخداد بیماری در ماه‌های ۹ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Noga, 2010). VHS متعلق به جنس *Novirhabdovirus* از خانواده *Rhabdoviridae* می‌باشد، که گروهی از ویروس‌های پوششی گلوله‌ای شکل حاوی یک مولکول RNA تک‌ رشته‌ای سنس منفی، و یک پوشش غشایی گلیکوپروتئینی است (Sandlund *et al.*, 2014). ژنوم ویروس کدکننده: نوکلئو پروتئین (N)، گلیکو پروتئین (G)، فسفو پروتئین (P)، آنزیم پلیمرز (L)، ماتریکس پروتئین (M) و ژن کدکننده پوشش پروتئینی (NV) می‌باشد که در فرایند عفونت‌زایی ویروس ضروری هستند (Walker *et al.*, 2011). از نظر آسیب‌شناسی، VHS یک بیماری خونریزی دهنده است که باعث مرگ و میر بالا و تلفات قابل توجه در مزارع آبزی پروری می‌شود. با این حال تغییرات دژنراتیو و نکروز از علائم پاتولوژیک اصلی در این بیماری می‌باشند که در بافت‌های کبد و کلیه بسیاری از ماهیان آلوده یافت می‌شوند. در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، سلول‌های اندوتلیال کلیه و طحال اولین هدف VHSV هستند. پس از آن، عناصر خونساز کلیه و طحال دچار نکروز و دژنراسیون می‌شوند (Soliman and El-Matbouli, 2006). ماهی‌های درگیر با علائم رفتاری شامل بی‌حالی، شنای غیرطبیعی، آبشش‌های کم‌رنگ و علائم بالینی شامل تیرگی بدن (ملانوز)، آگزوفتالمی یا بیرون‌زدگی چشم‌ها، تورم شکمی، کبد، طحال، کلیه کم‌خون و خونریزی در مغز و دیگر نقاط بدن مشاهده می‌شود. بیماری در ماهی‌های آب شیرین ممکن است به سه فرم کلاسیک حاد، مزمن و عصبی (تأخیری) ظاهر شود، که علائم بالینی و کالبدگشائی متنوعی را نشان می‌دهند (Noga, 2010). همچنین شروع بیماری با مرگ و میر بسیار بالا توأم است (Olson *et al.*, 2013) بنابراین، روش‌های سریع و قابل اعتماد برای تشخیص VHSV برای جلوگیری از آلودگی و گسترش بیماری بسیار مورد نیاز است. با ظهور تکنیک‌های زیست‌شناسی مولکولی، روش‌های جدیدی برای تشخیص ویروس برای بهبود تعیین استاندارد اثر سیتوپاتیک بر روی کشت سلولی و تأیید آنتی‌بادی اختصاصی ویروس ایجاد شده است (Nazari *et al.*, 2016). برخی از محققان به‌طور کامل زیست‌شناسی این‌گونه را در سطوح فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و رونویسی مطالعه کردند تا فرآیند بیوشیمیایی را که پایه عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی و مقاومت در برابر بیماری را تشکیل می‌دهد، توصیف کنند (Nazari *et al.*, 2016). بنابراین در طول دهه گذشته، تلاش‌های بین‌المللی برای افزایش داده‌های ژنومی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شده است که منجر به تولید حجم قابل توجهی از اطلاعات در پایگاه‌های داده عمومی می‌شود (Palti *et al.*, 2015). توالی‌یابی رونوشت‌های *de novo* با موفقیت برای کشف ژن، شناسایی پلی‌مورفیسم تک

بالایی از گونه‌های آبزیان در سیستم‌های آب شیرین، شور یا دریایی، موجب مواجهه آن‌ها با شرایط محیطی سخت و احتمالاً بیماری‌های جدید می‌شود. در شرایط طبیعی، به دلیل وجود فضای بیشتر و به‌دنبال آن تحرک آزادانه، احتمال ابتلا به بیماری‌های همه‌گیر کمتر است، اما در مزارع پرورش ماهی به دلیل تراکم بالای جمعیت و وارد شدن تنش به آبزیان، توانایی آن‌ها برای مقابله با عفونت‌ها کاهش می‌یابد. همچنین عملیات-های مختلف در این مزارع انتشار سریع بیماری‌ها را تسهیل می‌کند (Ghiasi & Rizbandi, 2015). بنابراین تولید و تکثیر مصنوعی آبزیان به صورت تجاری و پرورش آن‌ها در مزارع، ضرورتاً نیازمند مدیریت صحیح پرورشی از نقطه‌نظر ارزیابی ساختار ژنتیکی و بهداشتی است. جنبه‌های ژنتیکی ذخایر مولدین از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا پتانسیل یک جمعیت را در حقیقت ژنتیک آن جمعیت تعیین می‌کند. اما متأسفانه مسائلی از قبیل حفظ خزانه ژنی، دورگه‌گیری، جلوگیری از هم‌خونی و رانش ژنتیکی چندان مورد توجه پرورش‌دهندگان قرار نمی‌گیرند، در نتیجه تکثیر غیرعلمی و غیر اصولی، می‌تواند واریانس ژنتیکی یک جمعیت را از بین برده و باعث ایجاد مشکلات ژنتیکی و هم‌خونی در نسل پیشرو و همچنین بروز صفات نامطلوب ناشی از آن می‌شود (Barbier *et al.*, 2020). قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، یکی از اعضای خانواده *Salmonidae*، یک گونه بومی سواحل اقیانوس آرام آمریکای شمالی و اروپا است (Wringe *et al.*, 2010). امروزه این گونه ماهی دارای پراکندگی وسیعی در تمام نقاط جهان می‌باشد. این گونه به دلیل آسانی در تکثیر مصنوعی، رشد سریعتر نسبت به سایر گونه‌ها، قدرت سازش‌پذیری بالاتر نسبت به غذای مصنوعی، مقاومت بیشتر در مقابل بیماری‌ها و حساسیت کمتر نسبت به شرایط محیطی مانند درجه حرارت و اکسیژن محلول توانست جایگاه خوبی در صنعت پرورش مصنوعی پیدا کند (Davidson, 2012). در نتیجه یکی از مناسب‌ترین، راحت‌ترین و جذاب‌ترین گونه‌هایی است که به‌طور گسترده در سراسر جهان برای تأمین منابع پروتئینی پرورش داده می‌شوند و تولید تجاری آنها به‌طور قابل توجهی به صنعت آبزی پروری در کشورهای مختلف جهان کمک می‌کند. علاوه بر این، یکی از گونه‌هایی است که به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است، زیرا به‌عنوان ارگانسیم مدل در تحقیقات زیست‌پزشکی از جمله ایمنی‌شناسی، سرطان‌زایی، فیزیولوژی، تغذیه، سم‌شناسی، پاتوژن میکروبی و اکولوژی استفاده می‌شود (Davidson, 2012; Giaquinto, 2012; Hara, 2008; Welsh *et al.*, 2008; Williams, 2012). این گونه در سال ۱۹۴۸ از کشور نروژ وارد ایران شد. ایران یکی از بزرگترین تولیدکنندگان قزل‌آلای رنگین‌کمان در آسیا است، اما این صنعت به‌شدت به دلیل شیوع بالای بیماری‌های عفونی، به‌ویژه سپتی سمی هموراژیک ویروسی (VHS) با مانع مواجه شده است. در میان انواع بیماری‌های آبزیان، این بیماری ناشی از ویروس، به‌عنوان یک معضل اساسی به‌شمار می‌رود، زیرا تا به‌حال روش‌های درمانی مؤثر بسیار محدودی برای مقابله با آن‌ها توسعه یافته‌اند (Ghaderzadeh *et al.*, 2021; Haghghi *et al.*, 2007).

شده با ویروس VHS برای شناسایی واریانتهای ژنتیکی مبتنی بر چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی و نیز رخداد حذف- اضافه استفاده شد.

### مواد و روش‌ها

#### پرورش و تیمار ویروسی ماهیان

مرحله کلی پرورش ماهیان مورد استفاده در این تحقیق، مبتنی بر شیوه پژوهش قادرزاده (Ghaderzadeh *et al.*, 2021) بوده است. کلیه ماهیان مورد استفاده در این پژوهش (قزل‌آلای سویه تروتلاچ آمریکایی) با توجه به دستورالعمل، حقوق و آسایش آبیان مطابق منشور سازمان دامپزشکی کشور پرورش یافتند. چالش ویروسی در این پژوهش با توجه به نظارت مستقیم و موارد ایمنی زیستی زیر نظر متخصصان بیماری‌های آبیان سازمان دامپزشکی کشور انجام شد. در این پژوهش ۳۱۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نژاد تروتلاچ آمریکایی (۱۷ قطعه ماهی در هر تانک) با متوسط وزن  $3.38 \pm 0.88$  گرم، به مدت پنج هفته نگهداری شدند. کلیه تانک‌های پرورش ماهی فایبرگلاس با ابعاد (عرض ۴۵ سانتی‌متر، طول ۶۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۷۰ سانتی‌متر) بودند. مقدار توده پرورشی مورد استفاده در هر تانک ۱/۷ کیلوگرم بود. دوره‌ی سازگاری ماهیان ۱۸ روز بود و غذادهی ماهیان براساس وزن توده‌ی زنده ماهیان و دمای آب براساس استانداردهای موجود و راهنمای غذادهی انجام شد. غذادهی ماهیان سه نوبت در شبانه‌روز (صبح، ظهر و غروب) و تعویض آب مخازن پرورشی دوبار (صبح و شب) انجام شد. واحدهای آزمایش به‌صورت سیستم مدار بسته بود و تعویض و جایگزینی آب هر سه ساعت یک‌بار به‌صورت خودکار انجام شد. هوادهی ماهیان در داخل هر تانک به‌وسیله‌ی سنگ هوا (تغذیه شده با پمپ) و بیوفیلتر (شرکت ماهیران) انجام شد. این پژوهش در بخش پرورش آبیان، مرکز رشد و کارآفرینی دانشگاه آزاد واحد رودهن واقع در شهرستان رودهن از توابع استان تهران انجام شد. در این پژوهش، ۲۴ ساعت قبل از تزریق ویروس، غذادهی به ماهیان قطع شد و در روز هجدهم پرورش ماهیان تحت چالش ویروس قرار گرفتند. در این مرحله ماهیان به پنج گروه دسته‌بندی و در داخل تانک (۲۰ ماهی در هر تانک) قرار داده شدند. گروه اول تیمار با ۰/۰۶ ml ویروس VHS، گروه دوم تیمار با ۰/۰۳ ml ویروس VHS، گروه سوم تیمار با ۰/۰۶ ml سرم فیزیولوژی، گروه چهارم تیمار با ۰/۰۳ ml سرم فیزیولوژی، گروه پنجم تیمار شاهد بدون تزریق بودند. تزریق صفاقی ویروس ( $5 \times 10^5$  PFU/ml)، توسط سرنگ ۱ ml مخصوص انسولین انجام شد. ویروس VHSV از مرکز ملی تشخیص وابسته به سازمان دامپزشکی کل کشور واقع در استان البرز تهیه شد.

#### نمونه‌برداری

در این پژوهش در روز هشتم بعد از تزریق ویروس، نمونه بافت طحال از ماهیان تلف شده گروه بیمار (تزریق ۰/۰۶ cc ویروس)، و گروه کنترل (بدون تزریق ویروس)، جداسازی و به فریزر  $-20^{\circ}\text{C}$  انتقال داده شد. از هر دو گروه تیمار و شاهد تعداد شش نمونه (هر کدام از پنج تا ۱۰ نمونه پولد شده)، تهیه شدند.

نوکلئوتیدی (SNPs)، توسعه نشانگر مولکولی، تشخیص جایگاه‌های صفات کمی (QTL) و پروفایل ژن‌هایی با بیان متفاوت استفاده شده است (Liu *et al.*, 2015).

مطالعات ژنومی امکان کشف تعداد زیادی از چند شکلی‌های ژنتیکی مفید مانند نشانگرهای SSR و SNP برای مطالعات ارتباطی با صفات تولیدی، مانند رشد یا مقاومت در مقابل بیماری را فراهم می‌کند، که در نهایت می‌تواند در برنامه‌های انتخاب به‌کمک نشانگر (MAS) استفاده شود. استفاده از MAS باعث افزایش بهره‌وری در دام‌هایی شده است که قبلاً در معرض انتخاب سنتی مبتنی بر فنوتیپ بودند (Robledo *et al.*, 2016). هرچه نشانگر به جایگاه DNA مسئول تفاوت‌های فنوتیپی نزدیک‌تر باشد، می‌توان انتخاب مؤثرتری انجام داد، یا حتی اگر خود نشانگر این تفاوت را ایجاد کند بهتر است. نشانگرها در ژن‌هایی که از نظر فیزیولوژیکی با صفت موردنظر مرتبط هستند ممکن است به‌طور بالقوه امکان انتخاب ساده‌تری را فراهم کنند (Bonin, 2008). علاوه بر این، شناسایی نشانگرهای مرتبط با ژن برای تشخیص ساختار ژنتیکی و یا پاسخ‌های ایمنی هم در جمعیت‌های وحشی و هم پرورشی در گونه‌های تجاری مختلف به‌ویژه به‌منظور حفاظت و مدیریت در شیلات دریایی استفاده شده است (Bekkevold *et al.*, 2015). نشانگرهای SNP با توزیع ژنومی گسترده برای تهیه نقشه‌های پیوستگی ژنتیکی، با تراکم بالایی که دارند، در فراهم نمودن اطلاعات ژنومی و نیز افزایش دقت در تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در مقایسه با سایر انواع نشانگرها کارایی بیشتری دارند (Jenkins *et al.*, 2019). در سال‌های اخیر، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر SNP در تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مولد، در برنامه‌های حفاظت از منابع ژنتیکی و اصلاحی، آزمون شناسایی والدین، پاسخ‌های ایمنی و تشخیص جایگاه صفات کمی به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Khoshkholgh & Nazari, 2020). علاوه بر این، جایگزینی‌های غیرمتعارف SNPها در مناطق کدگذاری شده ممکن است به شناسایی ژن‌های کاندید برای انتخاب به‌کمک نشانگر کمک کنند. به‌منظور ارائه بهترین پوشش ژنومی برای تجزیه و تحلیل صفات کمی، تعداد زیادی از SNP با توزیع نسبتاً یکنواخت در سراسر ژنوم موردنیاز است. بنابراین، به‌دلیل اهمیت آن‌ها برای مطالعه عملکرد ژن‌های مرتبط با صفات ایمنی، عملکردی و دیگر صفات اقتصادی در آبی‌پروری، نیاز به مطالعات و شواهد علمی بیشتری از SNPهای مشتق شده از نسخ رونوشت‌ها می‌باشد (Nazari & Pourkazmi, 2021). توالی‌یابی نسل جدید تا حد زیادی شناسایی نشانگر را در گونه‌های غیر مدل تسهیل کرده است (Soltani *et al.*, 2023). در این راستا، توالی‌یابی رونوشت‌ها با استفاده از رونق فناوری‌های مبتنی بر RNA-seq نیز امکان شناسایی نشانگرهای SSR/SNP را با هزینه مقرون به‌صرفه فراهم نموده است (Nazari & Pourkazmi, 2021). هدف از این مطالعه استفاده از فناوری RNA-Sequencing به‌عنوان ابزاری توانمند برای شناسایی نشانگرهای SNP و InDel واقع در ناحیه کد شونده ژن‌ها در ماهی قزل‌آلا بوده است. در این تحقیق از رونوشت‌های بافت طحال در نمونه‌های کنترل و تیمار

### استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل، با استفاده از کیت استخراج (یکتا تجهیز، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. ارزیابی کیفیت RNA کل با روش الکتروفورز، روی ژل آگارز ۱٪ انجام گرفت. جهت حذف هرگونه باقیمانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، از آنزیم DNase I، استفاده شد. در ادامه با استفاده از آنزیم نسخه‌برداری معکوس کیت سنتز cDNA شرکت یکتا تجهیز و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، RNA کل به cDNA تبدیل شد و cDNAهای سنتز شده در فریزر  $-20^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند.

### توالی‌یابی و آنالیز داده‌ها

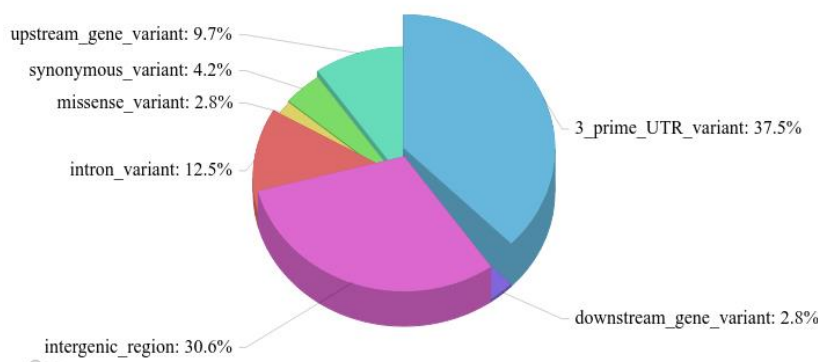
نمونه‌ها جهت توالی‌یابی به شرکت نوواژن چین ارسال و با استفاده از پلت فرم Illumina Hiseq 2500 به صورت paired end توالی‌یابی شدند (Houston *et al.*, 2014). پس از دریافت توالی، ابتدا کیفیت خوانش‌ها برای هر نمونه، با استفاده از نرم‌افزار FastQC، بررسی شدند (Andrews, 2010). سپس با استفاده از نرم‌افزار STAR خوانش‌ها روی ژنوم مرجع هم‌تراز شدند. همه مراحل انجام کار در محیط لینوکس (4.4.0 148) انجام شد. GENERIC x 86 64 انجام شد برای فراخوانی و شناسایی SNPها و رخدادهای حذف-اضافه، از مجموعه ابزار بیوانفورماتیکی GATK استفاده شد. سپس با استفاده از کالیبراسیون مجدد، امتیاز کیفیت پایه و تشخیص واریانت‌ها با استفاده از نرم‌افزار GTAK HaplotypeCaller انجام گرفت (McKenna *et al.*, 2010). در انتها SNP و InDel با استفاده از نرم‌افزار GATK Select Variants جدا شده و برای افزایش

دقت شناسایی و به حداقل رساندن فراخوانی واریانت‌های مثبت کاذب، SNPهای اولویت‌دار با استفاده از ابزار GATK Variant Filtration و اسکریپت‌های سفارشی Perl فیلتر و شناسایی شدند. آنالیز بررسی هریک از واریانت‌ها با استفاده از نرم‌افزار SnpEff انجام و رسم شبکه ژنی با استفاده از پایگاه داده STRING انجام شد.

### نتایج و بحث

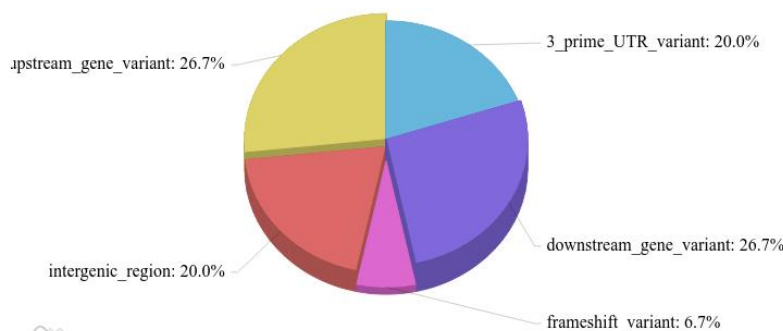
برآورد وفور هریک از واریانت‌های مختلف ژنتیکی مرتبط به نشانگر SNP و InsDel در جایگاه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در اشکال ۶-۱ نشان داده شد. در این پژوهش تعداد ۷۲ SNP و ۱۵ InDel در ژن TLR8 و تعداد ۲۰ SNP و ۳ InDel در ژن IRF10 و تعداد ۲۱ SNP و ۸ InDel در ژن GAPDH شناسایی شدند. در نواحی مختلف جایگاه TLR8 در ۳۷/۵ درصد از واریانت‌های حاصل از نشانگرهای SNP در ناحیه 3'UTR، ۹/۷ درصد در بالادست ژن، ۲/۸ درصد در پائین‌دست ژن، ۱۲/۵ درصد در ناحیه اینترون، ۳۰/۶ درصد در نواحی بین ژنی، ۲/۸ درصد واریانت‌های غیر مترادف و ۴/۲ درصد واریانت‌های مترادف شناسایی شدند (شکل ۱). توزیع واریانت‌های مرتبط به نشانگر InsDel در جایگاه TLR8 شامل ۷/۲۶ درصد در بالادست و پائین‌دست، ۲۰ درصد در ناحیه بین ژنی، ۶/۷ درصد منجر به جابه‌جایی قاب خوانش و ۲۰ درصد در ناحیه 3'UTR بود (شکل ۲).

### TLR8



شکل ۱- توزیع انواع مختلف واریانت‌های ژنتیکی مرتبط به نشانگر SNP در جایگاه TLR8  
Figure 1. Distribution of different types of genetic variants related to SNP marker in TLR8 site

### TLR8

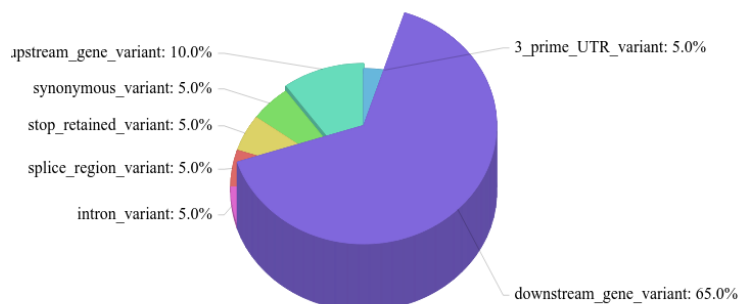


شکل ۲- توزیع انواع مختلف واریانتهای ژنتیکی مرتبط به نشانگر InsDel در جایگاه TLR8  
Figure 2. Distribution of different types of genetic variants related to InsDel marker in TLR8 site

جایگاه ژنی واریانتهای مرتبط به نشانگر InsDel با وفور ۳۳/۳ درصد در هریک از نواحی پائین دست، ناحیه اسپلایسینگ و جهش منجر به جابه‌جایی قاب خوانش مشاهده شد (شکل ۴).

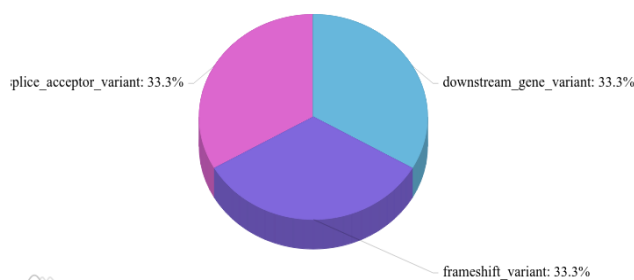
واریانتهای حاصل از نشانگر SNP در نواحی مختلف جایگاه IRF10 شامل ۶۵ درصد در پائین دست، ۱۰ درصد در ناحیه بالادست و ۵ درصد برای هریک از واریانتهای، در نواحی بین ژنی، کدون خاتمه‌دهنده، ناحیه اسپلایسینگ، واریانتهای مترادف و ناحیه ۳' UTR شناسایی شدند (شکل ۳). در این

### IRF10b



شکل ۳- توزیع انواع مختلف واریانتهای ژنتیکی مرتبط به نشانگر SNP در جایگاه IRF10b  
Figure 3. Distribution of different types of genetic variants related to SNP marker in IRF10b site

### IRF10b

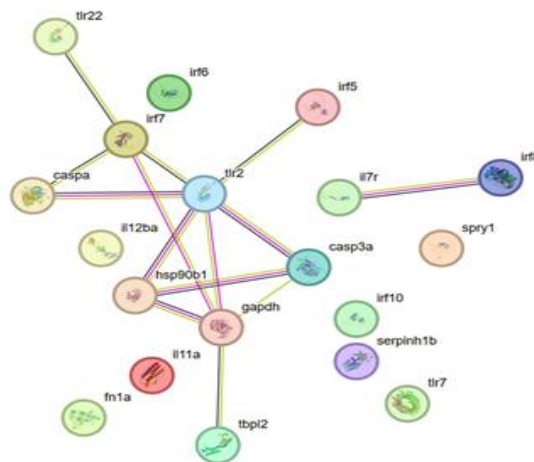


شکل ۴- توزیع انواع مختلف واریانتهای ژنتیکی مرتبط به نشانگر InsDel در جایگاه IRF10b  
Figure 4. Distribution of different types of genetic variants related to InsDel marker in IRF10b site

واریانتهای مرتبط به رخداد InsDel شامل واریانتهای در ناحیه اسپلایسینگ موقعیت ۵' و جهش‌های منجر به جابه‌جایی قاب خوانش هریک ۲۵ درصد، بین ژنی، ناحیه پائین دست، ناحیه

در نواحی مختلف جایگاه GAPDH واریانتهای حاصل از نشانگر SNP شامل ۴۷.۶ درصد در ناحیه پائین دست، ۴۲/۹ درصد در نواحی بین ژنی و ۹/۵ درصد به صورت واریانتهای مترادف مشاهده شدند (شکل ۵). در این جایگاه ژنی





شکل ۷- تجزیه و تحلیل شبکه‌های ژن‌های مرتبط با ژن GAPDH  
Figure 7. Network analysis of genes related to GAPDH gene

پلی‌سیتیدیلیک اسید (Poly I:C) می‌تواند بیان ژن IRF10 را در ماهی‌های زبرا و گورخر ماهی ژاپنی القا کند (Li *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2014). گزارش شده است که بیان بیش از حد ژن IRF10 در گورخر ماهی، فعال شدن برخی از پروموتورهای ژن IFN نوع I را مهار کرده و سطح رونویسی برخی از ژن‌های تحریک شده با IFN را کاهش می‌دهد. فلذا استدلال شده است که ژن IRF10 ممکن است نقش مهمی را در سیستم ایمنی در ماهی ایفا نماید (Li *et al.*, 2014).

نتایج این مطالعه، نقش سه ژن TLR8 و IRF10b و GAPDH را در دسته ژن‌های پاسخ به ایمنی ذاتی نشان می‌دهد که در مطالعات قبلی ارتباط آن‌ها با عفونت‌های ناشی از ویروس گزارش شده بود. در مطالعه سو و همکاران (Su *et al.*, 2015) در نوعی از گونه کپور ماهی، تعداد هشت SNP حاوی یک SNP در اینترون، سه SNP در ناحیه کدکننده و چهار SNP در ناحیه 3' ژن TLR8 شناسایی شد. در گزارشات دیگری نیز جایگاه TLR8 را با ایمنی ضد ویروسی در ماهی مرتبط دانسته‌اند، به‌عنوان مثال مقاومت در برابر ویروس نکروز پانکراس عفونی (IPNV) در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Skjesol *et al.*, 2011) و همچنین در پاسخ ایمنی در برابر رتوویروس در کپور علف‌خوار گزارش شده است (Chen *et al.*, 2013).

در مطالعه پالتی و همکاران (Palti *et al.*, 2015) ژن‌های omTLR7، omTLR8a1 و omTLR8a2 در ماهی قزل‌آلای سالم در بافت طحال و بافت قدامی کلیه و نیز بافت خلفی کلیه، بالاترین میزان بیان را نشان دادند. در مطالعه Inkpen و همکاران، چندین عضو از ژن‌های خانواده IRF (Irf4b، Irf4a، Irf7، Irf8، Irf10) در ماهی کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*) از طریق داده‌های حاصل از توالی‌یابی مورد شناسایی قرار گرفته بودند. در این تحقیق دو واریانت از نوع اسپلایسینگ در جایگاه Irf10 در ماهی کاد اقیانوس اطلس شناسایی شد. تجزیه و تحلیل مبتنی بر RT-PCR نشان داد که ژن‌های

در پژوهش حاضر واریانت‌های مختلف ژنتیکی از نوع SNP و InsDel در سه ژن TLR8 و IRF10 و GAPDH در ماهی قزل‌آلا در نمونه‌های بافت طحال شناسایی شده‌اند که با سیستم ایمنی مرتبط هستند. در گزارش قادرزاده (Ghaderzadeh *et al.*, 2021) نیز هر سه ژن TLR8 و IRF10 و GAPDH بیان متفاوت در گروه تیمار شده با ویروس VHS و گروه کنترل به‌عنوان ژن‌های مهم و مرتبط با سیستم ایمنی گزارش شده بودند.

با توجه به این که نشانگرهای InDel و SNP حاصل از توالی‌های رونویسی به ژن‌های کدکننده پروتئین مرتبط هستند، فلذا ممکن است پیامدهای فیزیولوژیکی قابل توجهی را به‌دنبال داشته باشند (Bai *et al.*, 2011). مولکول‌های IRF از اجزای بسیار مهم ایمنی ذاتی و ایمنی تطبیقی هستند که نقش مهمی در تنظیم ایمنی ایفا می‌کنند (Battistini, 2009; Tamura *et al.*, 2008).

IRF10 در چندین ماهی استخوانی از جمله در ماهی کف زبان چینی (*Cynoglossus semilaevis*) و ماهی اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*) شناسایی شده‌اند. نشان داده شده است که ژن IRF10 با ژن IFN تداخل داشته و بیان این ژن را سرکوب می‌کند (Inkpen *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). اولین تجزیه و تحلیل عملکردی مرتبط به ژن IRF10 در پرندگان گزارش شده است. به‌طوری‌که در مرغ ژن IRF10 اثر القایی در بیان ژن‌های اینترفرون نوع I و اینترفرون گاما دارد (Nehyba *et al.*, 2002). بیان ژن IRF10 در مرغ می‌تواند همچنین توسط ویروس بیماری بورس عفونی القا شود (Li *et al.*, 2007; Nehyba *et al.*, 2002). ژن IRF10 همچنین در چندین گونه از ماهیان مدل، مانند گورخر ماهی *Danio rerio*، *medaka*، *rubripes fugu*، *Takifugu*، *Gasterosteus stickleback*، *Oryzias latipes*، *Paralichthys olivaceus* و ماهی پرندۀ ژاپنی *aculeatus* شناسایی شده است (Xu *et al.*, 2016). همچنین،

به‌عنوان واسطه‌های مهم پاسخ ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان عمل کنند. TLRها در ساختار خارج سلولی خود حاوی تکرارهای غنی از لوسین هستند که به لیگاند‌های حوزه سیتوزولی متصل شده و سیگنالینگ پایین‌دست را تنظیم می‌کنند (Akira & Takeda, 2004). به‌طور کلی، به‌نظر می‌رسد ارتولوگ‌های موجود در ماهی‌ها مثل اکثر TLRهای پستانداران بسیار حفاظت شده باشند. با این‌حال، TLRهای ماهی استخوانی در مقایسه با پستانداران تفاوت‌هایی وجود دارد که نشان دهنده وجود ساز و کارهای متفاوت در تشخیص بیماری و سیگنال‌دهی التهابی است. به‌عنوان مثال گزارش شده است که در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در پاسخ‌های سلولی بیان TLR5 از طریق روش بازخورد مثبت تقویت می‌شود، اما حضور آن در پستانداران تأیید نشده است. به‌طور کلی در گروهی از ماهیان TLRهایی شناسایی شده‌اند که هیچ ارتولوگ مشابه آن‌ها در پستانداران رؤیت نشده است. برای مثال ارتولوگ‌های TLR21-23 که به‌عنوان یک گیرنده جایگزین احتمالی برای تشخیص LPS (در غیاب TLR4) عمل می‌کنند (Akira & Takeda, 2004). در مطالعه جین و همکاران (Jin et al., 2018) سطح رونویسی TLR7 و TLR8 در بافت‌های مخاطی قزل‌آلای رنگین‌کمان متعاقب عفونت *Vibrio anguillarum* و *Streptococcus iniae* تحت تأثیر قرار گرفت (Jin et al., 2018).

در مطالعه قادرزاده (Ghaderzadeh et al., 2021) مجموعه‌ای از ژن‌های دارای افتراق بیان و مرتبط با سیستم ایمنی و بیماری VHS شناسایی شده بود. نشان داده شد که ژن GAPDH به‌عنوان هاب ژن عمل نموده و با بیشتر ژن‌های موجود در شبکه ژنی ترسیم شده دارای ارتباط بود. از طرفی ژن GAPDH نقش مهمی در التهاب ایفا می‌کند به‌طوری‌که GAPDH در ماکروفاژها، به چندین mRNA از جمله TNF $\alpha$  که در فرایندهای التهابی نقش دارند متصل می‌شود و آنرا سرکوب می‌کند. در ادامه پس از تحریک LPS، GAPDH تحت فرایند مالونیل‌اسیون روی لیزین ۲۱۳ قرار می‌گیرد که منجر به جدا شدن آن از mRNA ژن TNF $\alpha$  و در ادامه منجر به ترجمه آن می‌شود (Galván-Peña et al., 2019).

اغلب واریانت‌های شناسایی شده در بخش‌های مختلف جایگاه‌های مورد مطالعه در این تحقیق نقش قابل‌توجه و تأثیرگذاری بر تنظیم بیان ژن‌ها دارند. برای مثال، ناحیه ۳'UTR، از مناطق تنظیمی بسیار مهمی است که پس از فرایند رونویسی بر بیان ژن تأثیر می‌گذارد. این نواحی می‌توانند بر فرایندهای پلی‌آدنیل‌اسیون، کارایی ترجمه، مکان‌یابی و پایداری مولکول‌های mRNA تأثیر بگذارند. این نواحی حاوی مکان‌های اتصال برای پروتئین‌های تنظیم‌کننده و میکروRNAها (miRNAs) هستند که این مولکول‌ها می‌توانند با اتصال به مکان‌های خاص در ۳'UTR بیان mRNAهای مختلف را ترجمه مهار و یا مستقیماً با تخریب رونوشت‌ها و فور آن‌ها را کاهش دهند. علاوه بر این، ۳'UTRها دارای مناطق خاموش‌کننده هستند که به پروتئین‌های سرکوب‌کننده متصل می‌شوند و بیان mRNA را مهار می‌کنند (Barret et al., 2012). نقش دو ناحیه بالادست (upstream

IRF7 و IRF8 و هر دو رونوشت IRF10 در تمام ۱۵ بافت در ماهی کاد بیان شدند در حالی که IRF4a و IRF4b در برخی از بافت‌ها وجود نداشتند. نتایج حاصل از این مطالعات نشان می‌دهند که ژن‌های خانواده IRF در پاسخ‌های ایمنی در ماهیان تحت چالش عفونت‌های ویروسی و باکتریایی مهم و تأثیرگذار هستند (Inkpen et al., 2015). در مطالعه زو و همکاران (XU et al., 2016) هر دو پارالوگ IRF10a (IRF10a و IRF10b) در ماهی قزل‌آلای در بافت‌های تیموس، خون و طحال بیان بالا داشتند اما در بافت کلیه نسبتاً کم بیان شدند. میزان بیان IRF10b به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از IRF10a در بافت‌های پوششی مانند آبشش، پوسته‌ها، پوست، روده، باله‌های کناری و باله‌های دمی بوده است که نشان می‌دهد نقش ژن IRF10b ممکن است در ایمنی بافت‌های مخاطی مهم‌تر باشد. بیان این ژن‌ها به‌شدت توسط Poly I:C هم در *in vivo* و *in vitro* با عفونت ویروسی القا شده بود اما کمتر به پپتیدوگلیکان و عفونت باکتریایی پاسخ داده بودند. این نتایج نشان از نقش مهم ژن IRF10 در دفاع ضد ویروسی در ماهی دارد. گزارش شده است که IFN- $\gamma$  یک القاکننده قوی در بیان IRF10 در ماکروفاژهای اولیه در ماهی قزل‌آلای است. با این‌حال، بیان IFN- $\gamma$  نیز در ماهیانی که در معرض VHSV بیماری‌زا قرار گرفته بودند، ۱۰ برابر بیشتر از ماهیانی بود که توسط VHSV غیر بیماری‌زا تیمار شده بودند. این داده‌ها نشان می‌دهد که حداقل در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، القای IRF10a و IRF10b ممکن است نشان‌دهنده پاسخ ایمنی ذاتی میزبان به عفونت‌های ویروسی باشد (Xu et al., 2016). دلیل اصلی و قابل‌توجه در انتخاب ژن‌های خانواده TLR برای بررسی بیشتر، به نقش کلیدی این ژن‌ها در سیستم ایمنی ماهیان باز می‌گردد. TLRها خانواده‌ای از پروتئین‌های غشایی هستند که نقش کلیدی در سیستم ایمنی ماهیان دارند و ساختارهای حفاظت شده پاتوژن‌ها را تشخیص می‌دهند و در ادامه مولکول‌های مؤثر در سیستم ایمنی اولیه را تحریک می‌کنند. بنابراین می‌توانند در مطالعات ژنتیکی مربوط به مقاومت به بیماری‌ها به‌عنوان ژن‌های کاندید در نظر گرفته شوند (Ballesteros et al., 2015).

TLRها از طریق شناخت الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMPs) مانند لیپوپلی‌ساکارید، فلاژلین و dsRNA، می‌توانند مسیرهای سیگنالینگ پیش‌التهابی و ضد ویروسی را ایجاد کنند و در نهایت منجر به حذف پاتوژن‌های مهاجم شوند (Baoprasertkul et al., 2007). در مطالعه آکیرا و تاکدا (Akira & Takeda, 2004) نشان داده شد که بیان TLR-2، TLR-7، TLR-8 و TLR-22 تحت تأثیر تیمار ویروسی VHS قرار می‌گیرد

در پژوهش آقاجری و همکاران (Aghajari et al., 2017) چند شکلی الی ژن TLR که دخیل در سیستم ایمنی در برخی از نژادهای بومی مرغ؛ آذربایجانی، مرندي و مازندرانی بود، شناسایی و مورد بررسی قرار گرفت که برای جایگاه ژنی TLR4 سه نوع ژنوتیپ CC، GG و CG شناسایی شد. برای ال C دو باند ۳۸ و ۱۱۹ جفت بازی و برای G سه باند ۱۱۹، ۳۹ و ۹۹ جفت بازی مشاهده شد. بنابراین، TLRها ممکن است

مرتبط با حساسیت به بیماری و آلل G مرتبط به محافظت در مقابل بیماری بوده است (Servantes *et al.*, 2024). در تحقیق حسنوند و همکاران (hasanvand *et al.*, 2023) نیز چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی با استفاده از داده‌های RNA-seq در بافت کبد جوجه‌های گوشتی نژاد آرین مبتلا به آسیت شناسایی و گزارش شده‌اند. این پژوهش در ژن CPQ در نمونه‌های مبتلا به آسیت تعداد ۸ و در نمونه‌های سالم تعداد ۳ چندشکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شد که برای اولین بار در این پژوهش شناسایی و گزارش شده‌اند، همچنین در ژن‌های HPSE و B3GAT2 در نمونه‌های مبتلا به آسیت به ترتیب تعداد ۴ و ۱ چندشکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شد اما برای این ژن‌ها در نمونه‌های سالم چندشکلی تکنوکلئوتیدی یافت نشد.

در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار STRING ژن‌های مرتبط با سه ژن اصلی TLR8، IRF10، و GAPDH شناسایی و شبکه ژنی بر مبنای این سه ژن ترسیم و ژن GAPDH به‌عنوان ژن اصلی در نظر گرفته شد. در شبکه ژنی ارائه شده بیشترین ارتباط عملکردی و ارتباط بیولوژیکی ژن GAPDH با ژن‌های CASP3a، HSP90b1، IRF7، TLR2 و TBPL2 که مرتبط با سیستم ایمنی بودند، مشاهده شد.

#### نتیجه‌گیری کلی

مطابق اطلاعات موجود و بررسی‌های انجام گرفته تا به‌حال واریانت‌های ژنتیکی مبتنی بر چندشکلی تک نوکلئوتیدی و یا رخداد حذف-اضافه برای جایگاه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش و ثبت نشده است.

با توجه به این‌که واریانت‌های مختلف در هریک از جایگاه-های ژنی مورد مطالعه در بیان این ژن‌ها نقش تنظیمی دارند، فلذا بررسی تأثیر هریک از آن‌ها در قالب بیان اختصاصی آلل‌ها بسیار حائز اهمیت است و می‌توان از این آلل‌ها به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی مطلوب در آنالیزهای تفرق ژنتیکی به‌ویژه در ارتباط با بیماری‌ها استفاده نمود.

#### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی شرکت فناوری‌های پیشرفته مبارک اندیش انجام شد. لذا نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولان محترم این شرکت اعلام می‌دارند.

#### References

- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*, 4(7), 499-511.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. In: Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Aghajeri, J., Rahimi mianji, G., Hafezian, H., Gholizadeh, M. (2018). Genetic Diversity of TLR4 and IL2 Loci Involved In Immune System in Some Iranian Indigenous Chicken Breeds. *Research on Animal Production*. 9(21), 120-128. [In Persian]
- Bai, X., Rivera-Vega, L., Mamidala, P., Bonello, P., Herms, D. A., & Mittapalli, O. (2011). Transcriptomic signatures of ash (*Fraxinus* spp.) phloem. *PLoS One*, 6(1), e16368.
- Ballesteros, N. A., Alonso, M., Saint-Jean, S. R., & Perez-Prieto, S. I. (2015). An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 877-888.

gene regions) یا بخش ۵' و پائین‌دست (downstream gene regions) یا ۳' به ترتیب در جهت رونویسی (یا ترجمه) و نیز جهت پلیمرز (یا ریپوزوم) را مشخص می‌سازند. یافته‌ها نشان می‌دهند که ژن‌های پائین‌دست از طریق دو مسیر اصلی شامل ایجاد رقابت برای پروتئین‌های تنظیم‌کننده و نیز تأثیر بر فرایند تخریب این پروتئین‌ها در تنظیم ژنتیکی در سلول نقش دارند. ژن‌های پائین‌دست در زمان‌های مختلف و در بافت‌های مختلف توسط فاکتورهای رونویسی که توسط ژن‌های کننده بالادستی کدگذاری می‌شوند، روشن یا خاموش می‌شوند. یک ژن کنترل کننده اصلی ممکن است برخی از ژن‌های پائین‌دستی که فاکتورهای رونویسی خود را رمزگذاری می‌کنند فعال کند (Lodish *et al.*, 2008). ناحیه ۵'UTR‌ها نیز نقش مهمی را در تنظیم فرایند ترجمه رونوشت‌ها با استفاده از مکانیسم‌های مختلف در ویروس‌ها، پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها ایفا می‌کنند. نشان داده شد که این نواحی غالباً با پروتئین‌های دخیل در فرایند متابولیسم در تنظیم بیان ژن‌ها نقش تأمل دارند (Cenik *et al.*, 2011). نقش واریانت‌های حاصل از جایگاهی قاب خوانش نیز با تأثیر بر نحوه خواندن کدون‌های ژن در طول ترجمه، اسیدهای آمینه موجود در پروتئین را تغییر می‌دهند. در این نوع واریانت‌ها، جهش‌های حاصل از حذف یا افزودن ۱، ۲ و ۴ نوکلئوتید روند خوانش چارچوب ریپوزوم را تغییر می‌دهند و باعث خاتمه زود هنگام ترجمه در یک کدون بی‌معنی یا پایان زنجیره جدید می‌شوند (Rausell *et al.*, 2014). SNP‌ها نیز در مناطق کدکننده واریانت‌های مختلف به دو صورت شامل جهش‌های مترادف و یا جهش‌های غیرمترادف اعمال نقش دارند.

در مطالعه لی و همکاران (Lee *et al.*, 2013)، ژن TLR7 و سه ژن از خانواده TLR8 (TLR8a2، TLR8b1 و TLR8b2) در ماهی آزاد اقیانوس اطلس مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی داده‌ها نشان داد که در ماهی قزل‌آلای ژن‌های TLR8b1 و TLR8b2 بیشترین شباهت توالی اسید آمینه‌ای را با ژن TLR8b در گورخر ماهی دارند. چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی می‌توانند عملکرد بیان ژن‌ها را تغییر دهند. برای مثال در جایگاه ژنی TLR8 دو نوع واریانت ژنتیکی شامل واریانت‌های V1/V2 گزارش شده است که هریک از آن‌ها دارای نرخ ترجمه متفاوتی هستند. نشان داده شد که در بیماری مایکوباکتریوم توپر کلوزیس، چندشکلی این ژن موجب شناسایی دو آلل A و G شده به طوری که آلل A

- Baoprasertkul, P., Xu, P., Peatman, E., Kucuktas, H., & Liu, Z. (2007). Divergent Toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S, TLR20, TLR21. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(6), 1218-1230.
- Barbier, M., Araújo, R., Rebours, C., Jacquemin, B., Holdt, S. L., & Charrier, B. (2020). Development and objectives of the PHYCOMORPH European Guidelines for the Sustainable Aquaculture of Seaweeds (PEGASUS). *Botanica Marina*, 63(1), 5-16.
- Barret, M., Malamut, G., Rahmi, G., Samaha, E., Edery, J., Verkarre, V., . . . Cerf-Bensussan, N. (2012). Diagnostic yield of capsule endoscopy in refractory celiac disease. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 107(10), 1546-1553.
- Battistini, A. (2009). Interferon regulatory factors in hematopoietic cell differentiation and immune regulation. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29(12), 765-780.
- Bekkevold, D., Helyar, S. J., Limborg, M. T., Nielsen, E. E., Hemmer-Hansen, J., Clausen, L. A., & Carvalho, G. R. (2015). Gene-associated markers can assign origin in a weakly structured fish, Atlantic herring. *ICES Journal of Marine Science*, 72(6), 1790-1801.
- Bonin, A. (2008). Population genomics: a new generation of genome scans to bridge the gap with functional genomics. In: Wiley Online Library.
- Cenik, C., Chua, H. N., Zhang, H., Tarnawsky, S. P., Akef, A., Derti, A., . . . Roth, F. P. (2011). Genome analysis reveals interplay between 5' UTR introns and nuclear mRNA export for secretory and mitochondrial genes. *PLoS Genetics*, 7(4), e1001366.
- Chen, X., Wang, Q., Yang, C., Rao, Y., Li, Q., Wan, Q., . . . Su, J. (2013). Identification, expression profiling of a grass carp TLR8 and its inhibition leading to the resistance to reovirus in CIK cells. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(1), 82-93.
- D'Agaro, E., Gibertoni, P., & Esposito, S. (2022). Recent Trends and Economic Aspects in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Sector. *Applied Sciences*, 12(17), 8773.
- Davidson, W. (2012). Adaptation genomics: next generation sequencing reveals a shared haplotype for rapid early development in geographically and genetically distant populations of rainbow trout. In: Wiley Online Library.
- Galván-Peña, S., Carroll, R. G., Newman, C., Hinchy, E. C., Palsson-McDermott, E., Robinson, E. K., . . . Haneklaus, M. (2019). Malonylation of GAPDH is an inflammatory signal in macrophages. *Nature Communications*, 10(1), 338.
- Ghaderzadeh, M., Rahimi Mianji, G., Nejati Javaremi, A., & Shahbazian, N. (2021). Effect of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) disease on the biometric parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Researches & Biological Products*, 34(1), 111-123.
- Ghiasi, F., & Rizbandi, T. (2013). Determination of VHS virus titer in experimentally infected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In *6th International Conference Water and Fish*.
- Giaquinto, P. C., & Hara, T. J. (2008). Discrimination of bile acids by the rainbow trout olfactory system: evidence as potential pheromone. *Biological Research*, 41(1), 33-42.
- Gjedrem, T., Robinson, N., & Rye, M. (2012). The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture*, 350, 117-129.
- Haghighi, A., Soltani, M., Kazemi, B., Sohrabi, I., & Sharifpour, I. (2007). Use of Immunohistochemical and PCR Methods in Diagnosis of Infection Haematopoietic Necrosis Disease in some Rainbow Trout Hatcheries in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(2), 230-234.
- Houston, R. D., Taggart, J. B., Cézard, T., Bekaert, M., Lowe, N. R., Downing, A., . . . Bron, J. E. (2014). Development and validation of a high density SNP genotyping array for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 15(1), 1-13.
- Hassnvand, S., Farhadi, A., Yonesi, E., Rahimimianji, G., & Hasan Pur, K. (2024). Identification of Single-Nucleotide Polymorphisms in B3GAT2, CPQ, and HPSE Genes in the Liver Tissue of Arian Broilers with Ascites using RNA-seq Data. *Research on Animal Production*, 15(3), 10-19. [In Persian]
- Inkpen, S. M., Hori, T. S., Gamperl, A. K., Nash, G. W., & Rise, M. L. (2015). Characterization and expression analyses of five interferon regulatory factor transcripts (Irf4a, Irf4b, Irf7, Irf8, Irf10) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish & Shellfish Immunology*, 44(1), 365-381.
- Jenkins, T. L., Ellis, C. D., & Stevens, J. R. (2019). SNP discovery in European lobster (*Homarus gammarus*) using RAD sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 11(3), 253-257.
- Jin, S., Zhao, X., Wang, H., Su, J., Ding, C., Li, Y., & Xiao, T. (2018). Molecular characterization and expression of TLR7 and TLR8 in barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*): Responses to stimulation of grass carp reovirus and lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 83, 292-307.
- Khoshkholgh, M., & Nazari, S. (2020). Characterization of single nucleotide polymorphism markers for the narrow-clawed crayfish *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) based on RAD sequencing. *Conservation Genetics Resources*, 12(4), 549-553.
- Kim, R., & Faisal, M. (2011). Emergence and resurgence of the viral hemorrhagic septicemia virus (Novirhabdovirus, Rhabdoviridae, Mononegavirales). *Journal of Advanced Research*, 2(1), 9-23.
- Lee, P.-T., Zou, J., Holland, J. W., Martin, S. A., Kanellos, T., & Secombes, C. J. (2013). Identification and characterization of TLR7, TLR8a2, TLR8b1 and TLR8b2 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology*, 41(2), 295-305.

- Li, S., Lu, L.-F., Feng, H., Wu, N., Chen, D.-D., Zhang, Y.-B., . . . Zhang, Y.-A. (2014). IFN regulatory factor 10 is a negative regulator of the IFN responses in fish. *The Journal of Immunology*, 193(3), 1100-1109.
- Li, Y., Handberg, K., Juul-Madsen, H., Zhang, M., & Jørgensen, P. H. (2007). Transcriptional profiles of chicken embryo cell cultures following infection with infectious bursal disease virus. *Archives of Virology*, 152, 463-478.
- Liu, S., Vallejo, R. L., Palti, Y., Gao, G., Marancik, D. P., Hernandez, A. G., & Wiens, G. D. (2015). Identification of single nucleotide polymorphism markers associated with bacterial cold water disease resistance and spleen size in rainbow trout. *Frontiers in Genetics*, 6, 298.
- Lodish, H. F., Zhou, B., Liu, G., & Chen, C.-Z. (2008). Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nature Reviews Immunology*, 8(2), 120-130.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., . . . Daly, M. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297-1303.
- Nazari, S., Jafari, V., Pourkazemi, M., Miandare, H. K., & Abdolhay, H. A. (2016). Association between myostatin gene (MSTN-1) polymorphism and growth traits in domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Agri Gene*, 1, 109-115.
- Nazari, S., & Pourkazmi, M. (2021). Isolation and characterization of SNP markers of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) from transcriptomic sequences. *Molecular Biology Reports*, 48(1), 989-995.
- Nehyba, J., Hrdličková, R., Burnside, J., & Bose Jr, H. R. (2002). A novel interferon regulatory factor (IRF), IRF-10, has a unique role in immune defense and is induced by the v-Rel oncoprotein. *Molecular and Cellular Biology*, 22(11), 3942-3957.
- Noga, E. J. (2010). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. John Wiley & Sons.
- OIE. (2009). Manual of diagnostic tests for aquatic animals. In: OIE Paris.
- Olson, W., Emmenegger, E., Glenn, J., Simchick, C., Winton, J., & Goetz, F. (2013). Expression kinetics of key genes in the early innate immune response to Great Lakes viral hemorrhagic septicemia virus IVb infection in yellow perch (*Perca flavescens*). *Developmental & Comparative Immunology*, 41(1), 11-19.
- Palti, Y., Gao, G., Liu, S., Kent, M., Lien, S., Miller, M., . . . Moen, T. (2015). The development and characterization of a 57 K single nucleotide polymorphism array for rainbow trout. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 662-672.
- Rausell, A., Mohammadi, P., McLaren, P. J., Bartha, I., Xenarios, I., Fellay, J., & Telenti, A. (2014). Analysis of stop-gain and frameshift variants in human innate immunity genes. *PLoS Computational Biology*, 10(7), e1003757.
- Robledo, D., Fernández, C., Hermida, M., Sciara, A., Álvarez-Dios, J. A., Cabaleiro, S., . . . Bouza, C. (2016). Integrative transcriptome, genome and quantitative trait loci resources identify single nucleotide polymorphisms in candidate genes for growth traits in turbot. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 243.
- Sandlund, N., Gjerset, B., Bergh, Ø., Modahl, I., Olesen, N. J., & Johansen, R. (2014). Screening for viral hemorrhagic septicemia virus in marine fish along the Norwegian coastal line. *PLoS One*, 9(9), e108529.
- Servantes, D. M., Pelcerman, A., Salvetti, X. M., Salles, A. F., de Albuquerque, P. F., de Salles, F. C. A., . . . Filho, J. A. O. (2012). Effects of home-based exercise training for patients with chronic heart failure and sleep apnoea: a randomized comparison of two different programmes. *Clinical Rehabilitation*, 26(1), 45-57.
- Skjesol, A., Skjæveland, I., Elnæs, M., Timmerhaus, G., Fredriksen, B. N., Jørgensen, S. M., . . . Jørgensen, J. B. (2011). IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virology Journal*, 8, 1-14.
- Soliman, H., & El-Matbouli, M. (2006). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS). *Veterinary Microbiology*, 114(3-4), 205-213.
- Soltani, Z., Moghadam, A., Tahmasebi, A., & Niazi, A. (2023). Integrative systems biology analysis of barley transcriptome- hormonal signaling against biotic stress. *PLoS One*, 18(4), e0281470.
- Suzuki, Y., Yasuike, M., Kondo, H., Aoki, T., & Hirono, I. (2011). Molecular cloning and expression analysis of interferon regulatory factor 10 (IRF10) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 67-76.
- Su, J., Su, J., Shang, X., Wan, Q., Chen, X., & Rao, Y. (2015). SNP detection of TLR8 gene, association study with susceptibility/resistance to GCRV and regulation on mRNA expression in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Fish & Shellfish Immunology*, 43(1), 1-12.
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., & Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annual Review of Immunology*, 26, 535-584.
- Walker, P. J., Dietzgen, R. G., Joubert, D. A., & Blasdel, K. R. (2011). Rhabdovirus accessory genes. *Virus Research*, 162(1-2), 110-125.

- Welsh, P. G., Lipton, J., Mebane, C. A., & Marr, J. C. (2008). Influence of flow-through and renewal exposures on the toxicity of copper to rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(2), 199-208.
- Williams, D. E. (2012). The rainbow trout liver cancer model: response to environmental chemicals and studies on promotion and chemoprevention. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(1), 121-127.
- Wringe, B. F., Devlin, R. H., Ferguson, M. M., Moghadam, H. K., Sakhrani, D., & Danzmann, R. G. (2010). Growth-related quantitative trait loci in domestic and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genetics*, 11(1), 1-14.
- Xu, Q., Jiang, Y., Wangkahart, E., Zou, J., Chang, M., Yang, D., . . . Wang, T. (2016). Sequence and expression analysis of interferon regulatory factor 10 (IRF10) in three diverse teleost fish reveals its role in antiviral defense. *PLoS One*, 11(1), e0147181.
- Zhang, J., Li, Y.-x., & Hu, Y.-h. (2015). Molecular characterization and expression analysis of eleven interferon regulatory factors in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 44(1), 272-282.