شناسایی نواحی تحت انتخاب مرتبط با دنبه در گوسفند نژاد افشاری

مریم روشندل قلعه زو [۱]، سعید زره داران [۲*]، علی جوادمنش [۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی ژنتیک و اصلاح نژاد دام وطیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳-استادیار،گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

***نویسنده مسئول:** zerehdaran@um.ac.ir

خلاصه

گوسفند افشاری یکی از نژادهای ارزشمند دنبه‌دار در ایران است که ازنظر تولید گوشت و پشم اهمیت زیادی دارد. با توجه به تمایل به کوچک کردن اندازه دنبه در این نژاد به دلیل کاهش راندمان تولید، محققین به دنبال یافتن راهکارهایی جهت حذف این صفت هستند. هدف از این مطالعه، شناسایی ژن‌های موثر در چربی دنبه در گوسفند افشاری در مقایسه با دو نژاد بدون دنبه نظیر دورپر و موتن آلمانی از طریق روش‌های بیوانفورماتیک است. بدین منظور در این مطالعه از ۲۹۷ رأس گوسفند (۳۷ راس نژاد افشاری ، ۹۹ راس نژاد دورپر و ۱۶۱ راس نژاد موتن آلمانی) که با استفاده از آرایه‌های ژنگانی ایلومینا Ovine SNP50K BeadChip تعیین ژنوتایپ شده بودند، استفاده شد. برای جستجوی نشانه‌های انتخاب از آزمون Fst در بسته نرم‌افزاری R نسخه ۱/۹ استفاده شد. نتایج Fst در دو جمعیت افشاری و دورپر در ۱۳۰ منطقه ژنومی و در دو جمعیت افشاری و موتن آلمانی در ۱۴۲ منطقه ژنومی دارای تمایز بودند. دو جمعیت افشاری در ۲۴ منطقه باهم اشتراک داشتند، که شامل ۲۴ ژن بود که ۵ ژن(ALK، ATRNL1، BCL6، SHTN1 و STXBP5L) در ارتباط با QTL های مرتبط با ذخیره چربی بودند. درنهایت، بررسی QTL های گزارش‌شده در مناطق ارتولوگ گوسفندی نشان داد که این ۲۴ ژن با QTLهای صفات مهم اقتصادی ازجمله صفات مرتبط با درصد چربی لاشه، چربی ذخیره‌شده در دنبه، اتصال ATP، توسعه سلول‌ها و همچنین وزن چربی در لاشه همپوشانی دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که، شناسایی این جایگاه‌های ژنی می‌تواند نقش مهمی در تحقیقات بعدی برای تشخیص مناطق ژنگانی مرتبط با صفات اقتصادی از جمله صفات مرتبط با چربی داشته باشد.

کلمات کلیدی: نواحی تحت انتخاب،Fst، چربی دنبه، گوسفند افشاری، گوسفند دورپر، گوسفند موتن آلمانی

۱. مقدمه

گوشت قرمز یکی از رایج‌ترین منابع تأمین پروتئین برای جامعه انسانی به شمار می‌رود. ایران با دارا بودن حدود ۶۰ میلیون رأس گوسفند از حدود ۲۷ نژاد مختلف، رتبه چهارم در پرورش گوسفند در جهان را به خود اختصاص داده

است[۱]. در بین جمعیت گوسفندان جهان، حدود ۲۶٪ از نوع دنبه‌دار و مابقی بدون دنبه‌اند. این در حالی است که حدود ۹۶٪ از گوسفندان ایرانی از نوع دنبه‌دار و تنها ۴٪ مابقی بی دنبه‌اند. با پیشرفت سریع جامعه، به دلیل در دسترس بودن منابع غذایی متنوع در شرایط سخت، دنبه بزرگ عملکرد خود را به‌عنوان ذخیره انرژی از دست داده است[۲]. همچنین امروزه دنبه یک عامل نگرانی برای پرورش‌دهندگان نیز محسوب شده و باعث کاهش راندمان استفاده از خوراک و درنتیجه کاهش کارایی اقتصادی پرورش گوسفند شده است. شناسایی ساختار ژنتیکی و ژن‌های درگیر در فرایند تشکیل دنبه، برای طراحی برنامه های اصلاح نژادی در جهت کاهش اندازه آن بسیار ضروری است. از روش‌های مختلف ژنومی مانند مطالعات گسترده ژنومی، مطالعه ردپای انتخاب (امضای انتخاب) یا تجزیه‌وتحلیل بیان ژن برای توصیف زمینه ژنتیکی احتمالی برای رسوب چربی در انواع نژادهای مختلف دنبه‌دار استفاده شده است. هدف از این مطالعه بررسی ردپای انتخاب برای تشکیل دنبه در گوسفندان دنبه‌دار (افشاری) در مقایسه با گوسفندان بدون دنبه (دورپر و موتن آلمانی) با استفاده از آنالیز آماری Fst (رایت ۱۹۵۰) بوده است.

مواد و روش

در این مطالعه از اطلاعات ژنتیکی و فنوتیپی ۲۹۷ رأس گوسفند شامل ۱۶۱ گوسفند بدون دنبه نژاد گوشتی موتن آلمانی و ۹۹ گوسفند نژاد بدون دنبه دورپر به شماره دسترسی GSE46231 از سایت (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE46231) و ۳۷ رأس گوسفند دنبه‌دار افشاری از سایت (http://widde.toulouse.inra.fr/widde/) تهیه شد.

ابتدا موقعیت ژنومی SNPها بر روی کروموزوم‌ها در گوسفندان مورد مطالعه به نسخه ژنومی Oar_v4.0 گوسفندی آپدیت شد. سپس برای اطمینان از کیفیت داده‌های ناشی از تعیین ژنوتیپ شده در تجزیه‌وتحلیل‌های پایانی، مراحل مختلف کنترل کیفیت روی داده‌ها انجام شد. در آغاز، حیوانات با بیش از ۱۰ درصد ژنوتیپ ازدست‌رفته از تجزیه‌های بعدی کنار گذاشته شدند. سپس SNPهایی که درمجموع حیوانات دارای کمترین فراوانی هم‌ردیفی ژنی (MAF) کمتر از ۱ درصد و Call rate (درصدی از نمونه‌ها که برای آن نشانگر تعیین ژنوتیپ شده‌اند) کمتر از ۹۹/۹ درصد بودند، حذف شدند. درنهایت برای SNPهای باقی‌مانده، آن‌هایی که در هرکدام از نژادهای مورد بررسی تعادل هاردی-واینبرگ نداشتند به‌عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ کنار گذاشته شدند[۴]. بدین جهت سطح احتمال $۱۰^{-۶}$ در نظر گرفته شد که با استفاده از تصحیح بنفرونی به دست آمد. تجزیه‌وتحلیل این بخش با نرم‌افزار PLINK نسخه ۱/۹ در محیط R انجام شد. در این تحقیق برای شناسایی نشانه‌های انتخاب از آماره Fst استفاده شد. این آماره یک روش ارزیابی جمعیتی است که بر پایه داده‌های چندشکلی ژنتیکی بنا شده است و برای تشخیص ردپای انتخاب در مطالعات متعددی استفاده شده است[۵]. ارزش‌های حاصل از این روش بین ۰ (بدون تفاوت) تا ۱ (تفاوت کامل، که هر جمعیتی برای آلل متفاوتی تثبیت شده‌اند) می‌تواند تغییر کند. مقدار Fst به شرح زیر محاسبه می‌شود:

$$Fst = \frac{H_T - H_S}{H_T} \quad (۱)$$

که H_T نمایانگر هتروزیگوسیتی مورد انتظار در کل جمعیت است که به‌صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$H_T = 1 - \sum(p^{-2} - q^{-2}) \quad (۲)$$

و H_S نیز هتروزیگوسیتی داخل زیر جمعیت‌ها است :

$$H_S = \frac{H_{expi} \times n_i}{N_{TOTAL}} \quad (۳)$$

در فرمول بالا p و q فراوانی آللی A_1 و A_2 در کل جمعیت هستند و H_{expi} و n_i نیز بیانگر هتروزیگوسیتی مورد انتظار و اندازه جمعیت در زیر جمعیت iام می‌باشند.

در این مطالعه، برای تعیین موقعیت ژنومی SNPها در سطح ژنوم گوسفند از پایگاه داده‌ای (www.ensembl.org) استفاده شد. همچنین برای بررسی QTLهای احتمالی شناسایی‌شده مرتبط با صفات چربی در مناطق ژنومی موردنظر، از مناطق ژنومی گوسفندی از پایگاه داده‌ای (https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/OA/index) استفاده شد. ژن‌های مرتبط با این QTL از ژنوم مرجع گوسفند نسخه Oar-v4.0 از پایگاه داده NCBI استخراج شد.

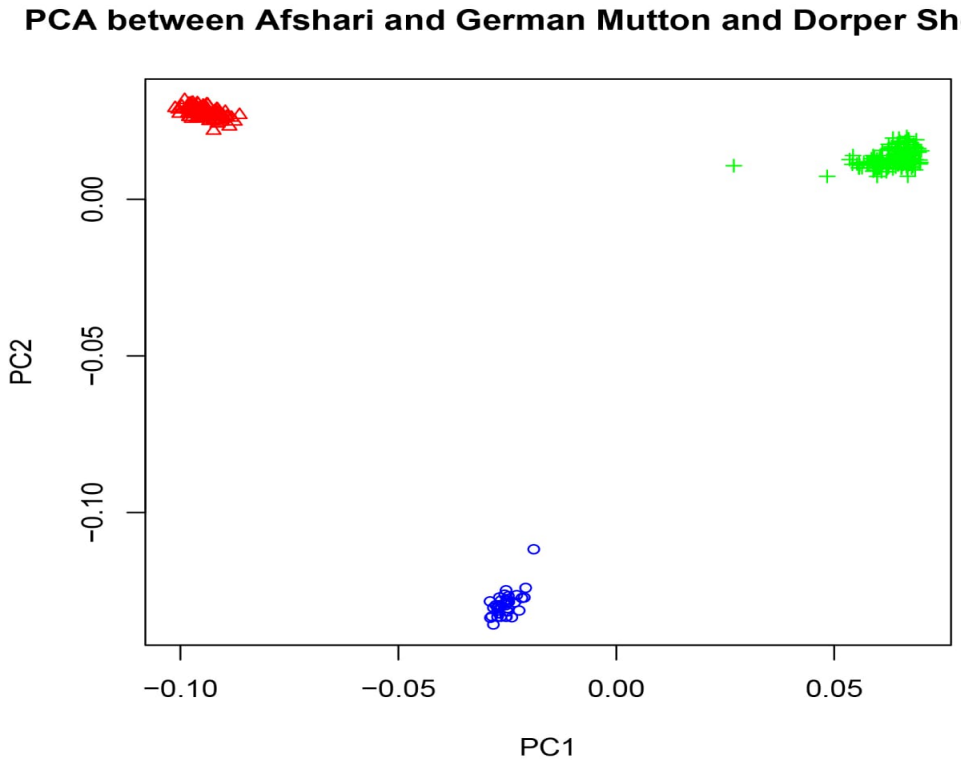
نتیجه و بحث

۱. کنترل کیفیت داده‌ها

در مجموع از ۵۲۴۱۳ SNP در مجموع دو نژاد دورپر با ۹۹ نمونه و موتن آلمانی با ۱۶۱ نمونه، بعد از مرحله کنترل کیفیت، ۹۸ نمونه نژاد دورپر با ۴۲۳۲۹ SNP و ۱۶۰ نمونه نژاد موتن آلمانی با ۴۲۷۹۲ SNP باقی ماند. در نژاد افشاری نیز از مجموع ۴۶۸۱۹ SNP از ۳۷ نمونه بعد از کنترل کیفیت تعداد ۴۴۸۲۶ SNP و۳۷ نمونه برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. پس از ادغام نژادهای افشاری و دورپر ۳۵۹۵۴ SNP با ۱۳۵ نمونه و پس از ادغام نژادهای افشاری با موتن آلمانی ۳۶۳۵۱ SNP با ۱۹۷ نمونه برای تجزیه‌وتحلیل مراحل بعدی باقی ماندند.

۲. تجزیه‌وتحلیل مؤلفه‌های اصلی

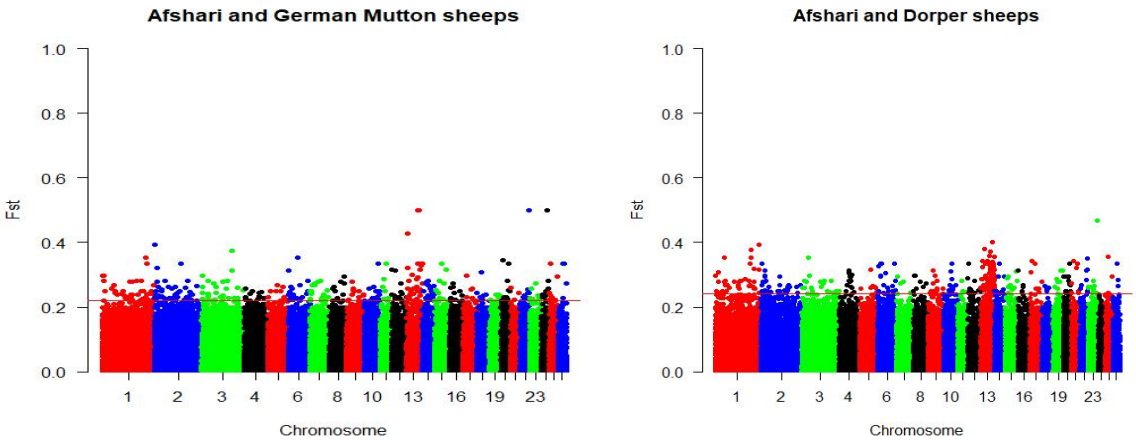
به‌منظور بررسی نحوه‌ی قرار گرفتن دام‌ها در گروه‌های نژادی، تجزیه‌وتحلیل PCA با به‌کارگیری اطلاعات تعیین نژادگان بین نژاد دنبه‌دار افشاری و بدون دنبه دورپر و موتن آلمانی به‌عنوان راهی متمایز به‌منظور توصیف واگرایی، مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت . نتایج نشان داد که با استفاده از دو مؤلفه PC1 و PC2 این سه نژاد در گروه‌های به‌طورمعمول جداگانه قرارگرفته‌اند و در هیچ نقطه‌ای باهم همپوشانی نداشتند (شکل۱).



شکل۱: تجزیه‌وتحلیل مؤلفه‌های اصلی بین نژاد افشاری، دورپر و موتن آلمانی(رنگ قرمز: دورپر، رنگ سبز: موتن آلمانی، رنگ آبی: افشاری

۳. شناسایی نشانه‌های انتخاب با روش Fst

در این مطالعه پلات منهتن برای مقایسه گوسفند افشاری و دورپر و گوسفند افشاری و موتن آلمانی به‌منظور بررسی مناطق ژنومی تحت انتخاب مثبت برای هر SNP در کل ژنوم به ترتیب در شکل‌های ۲ و۳ نشان داده‌شده است.



شکل۲ و ۳: منهتن پلات به ترتیب بین تفاوت افشاری و موتن آلمانی و گوسفند افشاری و دورپر را نشان می دهد.

در شکل‌های بالا بخش‌هایی از ژنوم که دارای Fst بالای هستند، نشان‌دهنده تمایز نژادهای مربوطه در آن مناطق است که به دنبال انتخاب در طی نسل‌های مختلف برای این جایگاه‌ها به وجود آمده‌اند. در این مطالعه برای شناسایی سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم از ارزش‌های عددی هر SNP استفاده شد و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرها دارای ارزش بالایی بودند و Fst>۰/۲۴، به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند. نتایج نشان داد که Fst در دو جمعیت افشاری و دورپر در ۱۳۰ منطقه ژنومی و در دو جمعیت افشاری و موتن آلمانی در ۱۴۲ منطقه ژنومی دارای تمایز هستند. همچنین دو جمعیت افشاری در ۲۴ناحیه باهم اشتراک داشتند که شامل ژن‌های زیر است

(جدول۱).

جدول۱-ژن‌های مشترک گوسفند افشاری در بین دو مقایسه (افشاری – دورپر و افشاری - موتن آلمانی)

CHR	POSITION	Gene names	QTL(Adjective /Id QTL)
20	chr20:21735289-21848878	ADGRF5	
3	chr3:37695541-38433907	ALK	(TFD */126987)
22	chr22:38714218-39513347	ATRNL1	(TFD /126991)
1	chr1:218064161-218088172	BCL6	(CFP†/14277)
2	chr2:113618183-113658668	BLK	
2	chr2:218711849-218857588	BMPR2	
19	chr19:27229259-27454337	CHL1	
23	chr23:57846808-58826451	DCC	
19	chr19:46531364-47429001	ERC2	
8	chr8:39702344-40582332	GRIK2	
8	chr8:3229412-3397268	IMPG1	
9	chr9:31545999-31559083	KLHL38	
8	chr8:60141653-60975728	LAMA2	
7	chr7:5792496-5878316	LOC101102985	
11	chr11:57087094-57407223	LOC101115486	
19	chr19:22887174-23032702	LOC105603426	
9	chr9:31437581-31608567	LOC105616014	
3	chr3:176432437-176484969	LOC114113782	
12	chr12:61841859-62212278	PAPPA2	
25	chr25:18000522-18119224	RTKN2	
22	chr22:40427043-40540504	SHTN1	(TFD /126991)
3	chr3:166825548-167123900	SRGAP1	
1	chr1:203617523-203947300	STXBP5L	(CFP /14277)
14	chr14:46106055-46179685	TDRD12	

نتایج Fst نشان داد که ژن‌های ALK، ATRNL1،BCL6، SHTN1 و STXBP5L دارای ردپای انتخاب مثبت بود و با QTL های مرتبط با صفات اقتصادی مثل ذخیره چربی در دنبه و درصد چربی لاشه مرتبط بودند. QTLهای مرتبط با ژن‌های ALK، ATRNL1 و SHTN1 توسط یوان و همکاران (۲۰۱۷) [۶] به عنوان ژن‌های که مرتبط با صفت ذخیره چربی در دنبه و ژن‌های BCL6 وSTXBP5L توسط کاوانا و همکاران (۲۰۱۰) [۷] به عنوان ژن‌های مرتبط با درصد چربی، شناسایی شد. ژنALK ، گیرنده تیروزین کیناز (که متعلق به خانواده گیرنده انسولین است) را کد می‌کند. این ژن به‌عنوان یک ژن نامزد لاغری در انسان و موش شناسایی شده است، زیرا حذف ژنتیکی آن منجر به مقاومت در برابر چاقی ناشی از رژیم غذایی و جهش لپتین می‌شود [۸]. ژن SHTN1 به‌عنوان یک ژن کد کننده

* Tail Fat Deposition
† Carcass Fat Percentage

پروتئین است و در تشکیل قطبیت عصبی و رشد آکسون و همچنین در فرآیندهای بیولوژی مثل انتقال سیگنال پروتئین RAS، تنظیم استقرار قطبیت سلولی و فسفوینوزیتید۳-کیناز (PI3K) نقش دارد.

ژن ATRNL1(Attractin Like 1) یک ژن کد کننده پروتئین است. از مهم‌ترین ژن‌های این بخش می‌توان به ژن ATRN اشاره کرد که QTL مربوط به این ژن توسط یوان و همکاران در سال (۲۰۱۷) [۶] شناسایی‌شده است. Attractin در ابتدا به‌عنوان گلیکوپروتئین ترشح شده انسانی کشف شد که توسط لنفوسیت های T فعال در سرم آزاد می‌شود و در تعدیل برهمکنش‌های سلول ایمنی نقش دارند[۹]. در مطالعه‌ای که هی و همکاران (۲۰۰۱) [۱۰] بر روی موش انجام دادند به این نتیجه رسیدند که عدم وجود ATRN باعث سرکوب چاقی می‌شود. همچنین لیو و همکاران (۲۰۱۸) [۱۱] طی مطالعه‌ای که باهدف تعیین ارتباط بین بیان ASIP (پروتئین سیگنالینگ آگوتی) و گیرنده‌های مختلف ذخیره چربی در بافت‌های مختلف گاو انجام دادند به این نتیجه رسیدند که ASIP و ATRN تأثیر مثبتی بر رسوب چربی در گاو داشته است. در این مطالعه ژن BCL6 مرتبط با QTL درصد چربی لاشه شناسایی شد. این ژن در فرایندهای مولکولی و بایولوژیکی نظیر اتصال کروماتین به DNA، تمایز سلول B ، تنظیم فعالیت GTPase و انتقال سیگنال پروتئین Rho نقش دارد. ژن STXBP5L نیز مرتبط با درصد چربی در لاشه است. این ژن در نقل و انتقال ویزیکول ها و مهار اگزوسیتوز نقش دارد. ازجمله نقش‌های بیولوژیکی این ژن می‌توان به چند مورد اشاره کرد، ازجمله: اگزوسیتوز، هموستاز گلوگز، تنظیم منفی ترشح انسولین.

درنهایت شناسایی این جایگاه‌های ژنی می‌تواند نقش مهمی در شناسایی مناطق ژنگانی مرتبط با صفات مرتبط با چربی داشته باشد و می تواند در جهت اصلاح ساختار ژنتیکی گوسفندان دنبه‌دار در جهت کاهش اندازه دنبه مورد استفاده قرار گیرد. البته انجام مطالعات مشابه با تعداد بالاتری از گوسفندان دنبه‌دار و بدون دنبه برای شناسایی دقیق‌تر ژن‌های مرتبط با تشکیل دنبه می‌تواند بسیار مناسب باشد.

مراجع

۱. جوادمنش, ع., et al., بررسی ناحیه *HVR-III* ژنوم میتوکندری گوسفندان ایرانی با روش توالی‌یابی. پژوهش های علوم دامی (دانش کشاورزی), ۲۰۱۷. ۲۷(۲): p. 133-141.

۲. Nejati-Javaremi, A., et al., *Selection in fat-tailed sheep based on two traits of fat-tail and body weight versus single-trait total body weight.* Int J Agri Biol, 2007. **9**(4): p. 645-648.

۳. Zhang, L., et al., *Genome-wide association studies for growth and meat production traits in sheep.* PloS one, 2013. **8**(6): p. e66569.

٤. Teo, Y.Y., et al., *On the usage of HWE for identifying genotyping errors.* Annals of Human genetics, 2007. **71**(5): p. 701-703.

٥. Moradi, M.H., et al., *Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition.* BMC genetics, 2012. **13**(1): p. 1-15.

٦. Yuan, Z., et al., *Selection signature analysis reveals genes associated with tail type in Chinese indigenous sheep.* Animal genetics, 2017. **48**(1): p. 55-66.

۷. Cavanagh, C.R., et al., *Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) in sheep. III. QTL for carcass composition traits derived from CT scans and aligned with a meta-assembly for sheep and cattle carcass QTL.* Genetics Selection Evolution, 2010. **42**(1): p. 36.

.۸ Orthofer, M., et al., *Identification of ALK in Thinness.* Cell, 2020. **181**(6): p. 1246-1262. e22.
.۹ Uchiyama, K., et al., *Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins.* Nature communications, 2013. **4**(1): p. 1-13.
.۱۰ He, L., et al., *A biochemical function for attractin in agouti-induced pigmentation and obesity.* Nature genetics, 2001. **27**(1): p. 40-47.
.۱۱ Liu, Y., et al., *Agouti signaling protein and its receptors as potential molecular markers for intramuscular and body fat deposition in cattle.* Frontiers in physiology, 2018. **9**: p. 172.

Abstract

Identification of selective signature related to tail shape in Afshari sheep

Afshari sheep is one of the valuable breeds of tails in Iran, which is very important in terms of meat and wool production. Due to the tendency toward reducing the size of fat tail in this breed due to reduced production efficiency, researchers are looking for ways to eliminate this trait. The aim of this study was to identify the genes that are effective in Afshari sheep tail fat in comparison with two breeds without tails such as German Mutton and Dorper sheeps through bioinformatics methods. For this purpose, 297 sheep (37 Afshari, 161 German mutton and 99 Dorper breeds) genotyped with Illumina Ovine SNP50K BeadChip genome arrays were used in this study. The F_{ST} test was used in the R software package version 1.9 to search for selection signature. F_{ST} results were different in populations of Afshari and Dorper in 130 genomic regions and in populations of Afshari and German Mutton in 142 genomic regions. Two Afshari populations shared 24 regions, including 24 genes in which, five of them (ALK, ATRNL1, BCL6, SHTN1 and STXBP5L) were in QTLs associated with fat storage. Finally, the study of reported QTL in sheep orthologous regions showed that these 24 genes overlap with QTL of important economic traits including traits related to carcass fat percentage, tail fat deposition, ATP binding, cell development as well as fat weight in carcass.The results of this study showed that the identification of these gene regions can play an important role in future research to identify genomic regions associated with economic traits, including fat-related traits.

Keywords: Selected genomic region, F_{ST}, tail fat, Afshari sheep, German mutton sheep, Dorper sheep