

بررسی تنوع ساختاری ژنگان سگ و گرگ بومی ایران با روش توالی‌یابی کل ژنوم

زینب امیری قنات سامان^۱، علی اسمعیلی زاده کشکونیه^{۲*} و مسعود اسدی فوزی^۳

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نژاد دام، بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

کرمان، ایران و عضو انجمن پژوهشگران جوان، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲ و ۳. استاد و دانشیار، بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۲۸)

چکیده

در این پژوهش، از سه قلابه سگ و سه قلابه گرگ بومی ایران نمونه‌گیری شد. توالی‌یابی کل ژنگان (ژنوم) برای هر نمونه سگ و گرگ با استفاده از روش توالی‌یابی نسل جدید انجام شد. داده‌ها توسط برنامه BWA با ژنگان مرجع (رفرنس) هم‌ردیف شدند. چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک ژنگان با برنامه GATK شناسایی شدند. تغییرپذیری (واریانت)‌های ساختاری با برنامه BreakDancer-1.1 تعیین شدند. مستندسازی چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک ژنگان با برنامه SnpEff انجام شد. مقادیر تنوع نوکلئوتیدی در نمونه‌های سگ و گرگ با VCFtools محاسبه شدند. در این پژوهش ۱۲۴۵۹۶۵۱ چندریختی تک نوکلئوتیدی به دست آمد که ۷۸۱۹۷۸۹ و ۱۰۴۵۴۹۹۴ به ترتیب مربوط به نمونه‌های سگ و گرگ بودند. از شمار کل چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی ۵۳/۵۷، ۳۱/۹۸۹ و ۰/۸۱۱ درصد به ترتیب در ناحیه بین ژنی، اینترون و اگزون قرار گرفتند. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تنوع ساختاری در ژنگان گرگ بیشتر از سگ است.

واژه‌های کلیدی: تغییرپذیری ساختاری، حذف و اضافه کوچک، چندریختی تک نوکلئوتیدی.

مقدمه

از دیدگاه تکاملی، اهلی شدن سگ رویداد مهمی در توسعه تمدن بشری است که زمان و مکان رخداد این رویداد مورد بحث است و اطلاعات کمی درباره تغییرپذیری‌های ژنتیکی همراه با تغییر شکل اجداد گرگ‌ها به سگ‌های اهلی موجود است. به طوری که ادعا شده است، فسیل‌هایی از سگ با قدمت ۳۳۰۰۰ سال در کوه‌های آلتایی در سیبری مشاهده شده است (Ovodov *et al.*, 2011). این در حالی است که فسیل‌های دیگری با قدمت ۱۲۰۰۰-۱۱۰۰۰ سال، همراه با انسان در فلسطین اشغالی یافت شده که نشان‌دهنده نخستین شواهدی از وجود و نگهداری

سگ هستند (Davis & Valla, 1978). الگوهایی از تغییرپذیری ژنتیکی نشان می‌دهد که اهلی شدن سگ دست‌کم ۱۰۰۰۰ سال پیش (Skoglund *et al.*, 2011) در جنوب شرقی آسیا (Pang *et al.*, 2009) یا آسیای میانه (Pollinger *et al.*, 2010) آغاز شده است. این مسئله که چرا و چگونه سگ اهلی شده است، ناشناخته است. دو فرضیه در ارتباط با اهلی شدن سگ وجود دارد. فرض اول این است که انسان‌ها ممکن است از نوزادان گرگ برای نگهداری و شکار استفاده کرده باشند و در نتیجه منجر به انتخاب صفات مهمی برای این وظایف شده است. فرض دوم این است که هم‌زمان با تغییر زندگی انسان از عشایری به

چندی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید توسط پژوهشگران انجام شده است که می‌توان به پژوهش Wang *et al.* (2013) اشاره کرد. Wang *et al.* (2013) در رابطه با شناسایی ژن‌های مشترک بین انسان و سگ در فرآیند تکامل، گزارش کردند که شماری از ژن‌های مرتبط با هضم، فرآیندهای عصبی و سرطان در هر دو تحت انتخاب بوده‌اند. در یک پژوهش دیگر Stothard *et al.* (2011) با بررسی ژنگان گاوهای هولشتاین و آنگوس گزارش کردند تفاوت‌های ژنتیکی عمده‌ای بین ژنگان این دو نژاد وجود دارد. سگ و گرگ بومی ایران از منابع ارزشمند کشور هستند. به دلیل اینکه تابه‌حال بررسی ژنگانی (ژنومیک) کاملی روی ژنگان سگ و گرگ بومی ایران صورت نگرفته است. لذا در این پژوهش، ژنگان سگ و گرگ بومی ایران به‌منظور بررسی ساختار آن و مقایسه تنوع‌های ساختاری آن‌ها، با پوشش‌دهی بالا توالی‌یابی و بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از بافت و خون سه قلاده گرگ از استان‌های تهران، کرمان و همدان، و سه قلاده سگ یکی از شهرستان گلپایگان (بوم‌جور قدرجان) و دو قلاده دیگر از شهرستان‌های بیجار و سنندج (سگ تازی یا سالوکی) نمونه‌گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱. محل نمونه‌گیری و نوع بوم‌جور

| Table 1. Sampling location and ecotypes | | | |
|---|----------|-----------------|-----------|
| Sample | Location | Type of ecotype | ID Sample |
| Dog | Sanandaj | Tazi or Saluki | YPi2849 |
| Dog | Bijar | Tazi or Saluki | YPi2860 |
| Dog | Esfahan | Qahderijan | YPi2776 |
| Wolf | Hamadan | | YPi2985 |
| Wolf | Tehran | | YPi3649 |
| Wolf | Kerman | | YPi3656 |

استخراج DNA از نمونه‌های خون با روش استخراج نمکی و از نمونه‌های بافت با روش کلروفورم ایزوآمیل انجام شد. توالی‌یابی کل ژنگان به‌صورت Paired-End توسط شرکت ایلومینا HiSeq 2500 در کشور چین انجام شد (www.berrygenomics.com). کیفیت داده‌ها توسط برنامه fastqc (<http://www.bioinformatics>).

روستایی، گرگ‌ها به سمت زباله‌های نزدیک به محل سکونت انسان‌ها جذب شده و به‌تدریج با منابع غذایی جدید سازگار شده‌اند (Coppinger & Coppinger, 2002). با توجه به اینکه سگ‌های مدرن از نظر ویژگی‌های مانند کاهش رفتار تهاجمی و قابلیت‌های شناخت اجتماعی تغییر یافته‌اند، از گرگ‌ها متفاوت‌اند. بنابراین به‌احتمال تغییرپذیری رفتاری از جمله هدف‌های اولیه فرآیند اهلی‌شدن بوده‌اند (Hare & Wrangham, 2012). بررسی بیان شمار محدودی ژن در هیپوتالاموس سگ و گرگ نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در سگ و گرگ متفاوت است (Saetre *et al.*, 2004). فرآیند اهلی‌شدن از راه انتخاب مصنوعی و طبیعی سبب تغییر فراوانی ژن‌ها بین گونه‌های اهلی و وحشی شده است. به‌طوری‌که با انجام انتخاب مصنوعی برای صفت دوستی در روباه نقره‌ای، فراوانی ژن‌های مرتبط با صفات ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) و رفتاری تغییر کرد (Hare & wrangham, 2012). همچنین در جانوران ژن‌هایی وجود دارد که باعث جدایی جور (تیپ)‌های وحشی از اهلی می‌شوند. از جمله می‌توان به ژن MC1R^۱ (مسئول تنوع‌های پوشش رنگی) در خوک (Fang *et al.*, 2009) و ژن TSHR^۲ (ژن مؤثر در تولیدمثل فصلی) در مرغ (Rubin *et al.*, 2010) اشاره کرد. ژنگان (ژنوم) در برگرفته تنوع‌های ژنتیکی پرشماری از جمله، چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs)^۳، حذف و اضافه‌های کوچک (Indels)^۴ و تغییرپذیری (واریانت)‌های ساختاری (حذف، اضافه، معکوس و جابه‌جایی) است. در بسیاری از پژوهش‌ها از تنوع‌های ژنتیکی برای بررسی روابط تکاملی و شناسایی نژادهای مختلف استفاده می‌شود. در دهه‌های اخیر روش‌های پرشماری در راستای تعیین تنوع ساختار ژنتیکی به یاری متخصصان آمده‌اند که از میان آن‌ها می‌توان به روش توالی‌یابی نسل جدید (NGS)^۵ اشاره کرد. این روش توانایی و دقت شناسایی بالایی دارد. پژوهش‌های

1. Melanocortin 1 receptor
2. Thyroid Stimulating Hormone Receptor
3. Single Nucleotide Polymorphisms
4. Small Insertions and Deletions
5. Next Generation Sequencing

چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک نیز با برنامه SnpSift محاسبه شدند.

نتایج و بحث

نتایج کنترل کیفیت داده‌ها نشان داد که Reads Short کیفیت بالا و بدون آلودگی اولیه (پرایمری) داشتند. طول Short Reads برای همه داده‌ها ۱۲۵ بود. درصد همردیفی برای چهار نمونه بالای ۹۶ درصد و دو نمونه دیگر بالای ۷۰ درصد بود. که نشان‌دهنده کیفیت بالای همردیفی با ژنگان مرجع است (جدول ۲). میزان پوشش‌دهی در نمونه‌های توالی‌یابی شده بین ۱۴/۵۱X تا ۱۷/۱۵X بود.

در این پژوهش شمار ۱۲۴۵۹۶۵۱ چندریختی تک نوکلئوتیدی به دست آمد که ۷۸۱۹۷۸۹ چندریختی تک نوکلئوتیدی در نمونه‌های سگ و ۱۰۴۵۴۹۹۴ چندریختی تک نوکلئوتیدی در نمونه‌های گرگ دیده شد (جدول ۳). همچنین شمار کل حذف و اضافه‌های کوچک ۳۴۸۷۳۴۲ بود که ۲۳۹۸۹۹۸ و ۳۰۳۳۴۱۶ به ترتیب مربوط به نمونه‌های سگ و گرگ بودند. این نتایج نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بیشتر در ژنگان گرگ نسبت به سگ است. *wang et al.* (2013) با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل ژنگان، ۱۳۹۲۳۲۲۳ چندریختی تک نوکلئوتیدی را در یازده نمونه سگ و گرگ گزارش نمودند، به طوری که ۱۰۷۴۰۳۷۷، ۷۱۶۴۱۳۶ و ۶۹۵۸۲۸۶ به ترتیب در چهار نمونه گرگ، سه نمونه سگ بومی چین و چهار نمونه سگ با نژاد مشخص دیده شدند.

شمار چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک ناخالصی در مقایسه به خالصی در همه نمونه‌ها بیشتر بود (جدول ۴). با تجزیه و تحلیل بیشتر چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی مشخص شد که شمار جهش‌های از نوع جابه‌جایی دو برابر شمار جهش‌های از نوع معکوس است (جدول ۴). به علت سازوکارهای مولکولی ایجادکننده جهش‌ها در مولکول DNA، شمار چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی که توسط جهش‌های جابه‌جایی تولید می‌شوند، در مقایسه با چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی که توسط جهش‌های معکوس ایجاد می‌شوند، نزدیک به دو برابر

بررسی شد. برای همردیفی^۱ Short reads با ژنگان مرجع^۲ (<http://ftp.ensembl.org/pub/release-82/fasta/>) 3.1) (http://ftp.ensembl.org/pub/release-82/fasta/canis_familiaris/dna/) از الگوریتم MEM در برنامه BWA (Li & Durbin, 2009)^۳ استفاده شد. SAM^۴ فایل‌های تولیدشده توسط برنامه Samtools (Li *et al.*, 2009) به BAM^۵ فایل تبدیل شدند. سپس BAM فایل‌ها بر پایه موقعیت ژنگانی مرتب و نمایه (ایندکس)^۶ شدند. کیفیت BAM فایل‌ها توسط دو فراسنجه^۷ (درصد همردیفی^۷ Short reads با ژنگان مرجع و پوشش‌دهی^۸) بررسی شدند. خطاهای PCR^۹ با برنامه

picard (<https://github.com/broadinstitute/picard>) حذف و چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) و حذف و اضافه‌های کوچک (Small Indels) توسط برنامه GATK3.4-46- (Mckenna *et al.*, 2010) ^{۱۰} gbc02625 شناسایی و بنا بر پیش‌فرض این برنامه پالایش شدند. تغییرپذیری‌های ساختاری (حذف، اضافه، معکوس، جابه‌جایی‌های درون و بین کروموزومی) توسط برنامه BreakDancer-1.1 (Chen *et al.*, 2009) تعیین شدند. مستندسازی^{۱۱} چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی با برنامه Cingolani (*et al.*, 2012) SnpEff 4.0e انجام شد. تنوع نوکلئوتیدی برای ۳۸ کروموزوم اتوزومی در نمونه‌های سگ و گرگ با برنامه vcftools (Danecek *et al.*, 2011) محاسبه شد (window size 50 kb). شمار جهش‌های جابه‌جایی^{۱۲} و معکوس^{۱۳} در چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی با برنامه SnpSift (Cingolani *et al.*, 2012) محاسبه شدند. شمار خالصی (هموزیگوس)ها و ناخالصی (هتروزیگوس)ها در

1. Alignment
2. Genome Reference
3. Burrows-Wheeler Aligner
4. Sequence Alingment MAP
5. Binary Alingment MAP
6. Index
7. Alignment
8. Coverage
9. Mark duplicates
10. Genome Analysis Toolkit
11. Annotation
12. Transition
13. Transversion

۰/۰۰۱۲۲۸ و درون نمونه‌های گرگ ۰/۰۰۱۷۰۴ و ۰/۰۰۱۶۳۹ بود. Wang *et al.* (2013) روند کاهشی برای تنوع ژنتیکی به ازای هر نوکلئوتید از نمونه‌های گرگ به نمونه‌های سگ (نژاد مشخص مانند ژرمن شفر) گزارش کردند. نتایج مستندسازی نشان داد که بیشتر چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی بین ژن‌ها و درون اینترون‌ها قرار دارند (جدول ۵). Stothard *et al.* (2011) نیز نتایج یکسانی را با استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید گاوهای نژاد هولشتاین و آنگوس گزارش کردند.

است (Collins & Jukes, 1994). یکی از سازوکارهای عمده ایجادکننده جهش (موتاسیون)‌های جابه‌جایی دی آمیناسیون آکسیداتیو^۱ است. ۵ متیل^۲ سیتوزین در دی نوکلئوتیدهای CPG متیله شده، به علت دی آمیناسیون خودبه‌خودی بیشتر مستعد به سیتوزین غیر متیله و در نهایت سبب تبدیل سیتوزین به تیمین می‌شود. همین دلیل نادر بودن جزایر CPG^۳ در ژنگان است (Ebersberger *et al.*, 2002).

میانگین و میانه تنوع نوکلئوتیدی در ۳۸ کروموزوم اتوزومی درون نمونه‌های سگ ۰/۰۰۱۳۰۵ و

جدول ۲. خروجی توالی‌یابی برای شش نمونه

Table 2. Sequencing output for six samples

| ID Sample | Total number of short reads | Short reads length | Total number of short reads aligned | Mean depth or coverage |
|-----------|-----------------------------|--------------------|-------------------------------------|------------------------|
| YPi2849 | 300830756 | 125 | 299566646 | 15.02X |
| YPi2860 | 321722012 | 125 | 320224240 | 16.24X |
| YPi2776 | 327604955 | 125 | 326163070 | 16.82X |
| YPi2985 | 285864970 | 125 | 284280842 | 14.51X |
| YPi3649 | 334497849 | 125 | 332944929 | 17.15X |
| YPi3656 | 313534286 | 125 | 311172864 | 16.03X |

جدول ۳. شمار چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک برای شش نمونه پیش و پس از پالایش کردن
Table 3. Number of single nucleotide polymorphisms and small insertions and deletions for 6 samples before and after filtering

| Sample | ID sample | Raw or filtered | Number of SNPs | Number of Indels |
|----------------|-----------|-----------------|----------------|------------------|
| dog | Ypi2849 | raw | 5060098 | 1285825 |
| dog | Ypi2849 | filtered | 4658554 | 1282911 |
| dog | Ypi2860 | raw | 5043139 | 1268977 |
| dog | Ypi2860 | filtered | 4624244 | 1266491 |
| dog | Ypi2776 | raw | 5144922 | 1347439 |
| dog | Ypi2776 | filtered | 4741165 | 1344338 |
| wolf | Ypi2985 | raw | 6876898 | 1776196 |
| wolf | Ypi2985 | filtered | 6360953 | 1773198 |
| wolf | Ypi3649 | raw | 6916727 | 1794569 |
| wolf | Ypi3649 | filtered | 6430171 | 1790888 |
| wolf | Ypi3656 | raw | 6921297 | 1772691 |
| wolf | Ypi3656 | filtered | 6467804 | 1769908 |
| total raw | | raw | 13519228 | 3497597 |
| total filtered | | filtered | 12459651 | 3487342 |

جدول ۴. شمار جابه‌جایی، معکوس و خالصی و ناخالصی

Table 4. The number of transition, transversion and homozygous, heterozygous

| Sample | ID sample | The number of homozygous / heterozygous in SNP | The number of homozygous / heterozygous in indel | The number of transition in SNP | The number of transversions in SNP | Transition/transversion ratio in SNP |
|--------|-----------|--|--|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| dog | Ypi2849 | 1873778/2784776 | 624450/658461 | 3108871 | 1549683 | 2.0061 |
| dog | Ypi2860 | 1849780/2774464 | 606987/659504 | 3083331 | 1540913 | 2.0009 |
| dog | Ypi2776 | 1768009/2973156 | 612488/731850 | 3156044 | 1585121 | 1.991 |
| wolf | Ypi2985 | 2712589/3648364 | 872036/901162 | 4283743 | 2077210 | 2.0622 |
| wolf | Ypi3649 | 2534357/3895814 | 836374/954514 | 4328066 | 2102105 | 2.0589 |
| wolf | Ypi3656 | 2637476/3830328 | 850707/919201 | 4362918 | 2104886 | 2.0727 |

1. Oxidative deamination
2. 5-Methylcytosine
3. CPG islands

جدول ۵. شمار اثرگذاری‌های چندریختی تک نوکلئوتیدی در نواحی مختلف ژنگان

Table 5. Number of SNP effects in different regions of genome

| Sample | Down stream | Exon | Inter genic | Intron | None | Splice_ site_ acceptor | Splice_ Site_ donor | Splice_ site_ region | Transcript | Upstream | Utr_3_ prime | Utr_5_ prime |
|--------|-------------|----------|-------------|-----------|----------|------------------------|---------------------|----------------------|------------|----------|--------------|--------------|
| Dog | 429701 | 76811 | 4895571 | 2909718 | 328247 | 243 | 193 | 6722 | 62 | 446942 | 40668 | 12115 |
| Wolf | 607610 | 105255 | 7053895 | 4166631 | 421329 | 334 | 289 | 9172 | 94 | 642810 | 56747 | 17714 |
| Total | 702305 | 122896 | 8121058 | 4849376 | 533853 | 336 | 282 | 10828 | 90 | 732293 | 66712 | 19332 |
| | (4.633)% | (0.811)% | (53.57)% | (31.989)% | (3.522)% | (0.002)% | (0.002)% | (0.071)% | (0.001)% | (4.831)% | (0.44)% | (0.127)% |

ژنی، اینترون، بالادست ژن‌ها، پایین دست ژن‌ها، 3' UTR و 5' UTR در ژنگان قرار گرفتند. همچنین ۰/۶۳ و ۰/۶۳ درصد از چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی به ترتیب غیرهم معنی و هم معنی بودند.

در این پژوهش شمار کل تغییرپذیری‌های ساختاری از نوع حذف، اضافه، معکوس، جابه‌جایی‌های درون کروموزومی و جابه‌جایی‌های بیرون کروموزومی به ترتیب ۲۹۴۳۳، ۳۶۳۰، ۱۲۱۲، ۱۶۰۸ و ۳۸۷۶ به دست آمد. شمار کل تغییرپذیری‌های ساختاری به جز نوع اضافه در نمونه‌های گرگ بالاتر از سگ است (جدول ۷). به‌طور کلی نتایج نشان داد که تنوع ساختاری ژنگان گرگ بیشتر از سگ است و بالاتر بودن تنوع ساختاری در ژنگان گرگ تأییدکننده رابطه‌ی اجدادی بین سگ و گرگ است. نتایج همسانی در پژوهش *Freedman et al.* (2014) نیز گزارش شد. *Atanur et al.* (2013) شمار ۷۱۹۹۲۹ تغییرپذیری ساختاری را در ژنگان ۲۶ سویه موش توالی‌یابی شده توسط پلاتفرم ایلومینا گزارش کرد. *Varki et al.* (2005) در پژوهشی تفاوت بین ژنگان انسان و شامپانزه را حدود ۴ درصد گزارش کرد که ۳۵ میلیون چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و ۹۰ مگابایت حذف و اضافه‌ها را شامل می‌شد.

از شمار کل چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی ۴/۶۳۳، ۴/۸۳۱، ۵۳/۵۷، ۳۱/۹۸۹ و ۰/۸۱۱ درصد به ترتیب درون نواحی پایین دست ژن، بالادست ژن، بین ژنی، اینترون و اگزون یافت شدند (جدول ۵). همچنین از شمار کل ۱۲۲۸۹۶ چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی واقع شده در ناحیه اگزون، ۵۹/۵۵۶، ۰/۴۲۳ و ۴۰/۰۲۱ درصد از آن‌ها به ترتیب از نوع جهش‌های خاموش، بی معنی و بدمعنی بودند (جدول ۶). *Atanur et al.* (2013) در پژوهش روی ژنگان ۲۶ سویه موش ۹۶۶۵۳۴۰ چندریختی تک نوکلئوتیدی گزارش کردند به طوری که از شمار ۶۷۶۱۶ چندریختی واقع شده در توالی رمزکننده پروتئین، ۲۹۱۳۱ و ۳۸۴۸۵ به ترتیب غیر هم معنی و هم معنی بودند. *Stenson et al.* (2003) در پژوهش معرفی پایگاه جهش انسان (HGMD)^۱ گزارش کردند که شمار زیادی از فنوتیپ‌ها (هردوی مندلی و کمی) در انسان و دیگر حیوانات با چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی غیر هم معنی مرتبط هستند. *da Silva et al.* (2015) با بررسی تغییرپذیری‌های ژنگانی در ژنگان گاو نلور گزارش کردند که از شمار کل چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی ۶۴/۹۷، ۲۳/۵۹، ۵/۲، ۴/۴ و ۰/۲۸ و ۰/۰۹ درصد به ترتیب درون نواحی بین

جدول ۶. شمار اثرگذاری‌های چندریختی تک نوکلئوتیدی با دسته عملکردی

Table 6. Number of SNP effects by functional class

| Sample | Missense (Percent) | Nonsense (Percent) | Silent (Percent) |
|--------|--------------------|--------------------|------------------|
| Dog | 29309 (40.521%) | 290 (0.401%) | 42732 (59.078%) |
| Wolf | 40771 (41.212%) | 447 (0.452%) | 57712 (58.336%) |
| Total | 46300 (40.021%) | 489 (0.423%) | 68899 (59.556%) |

جدول ۷. شمار تغییرپذیری‌های ساختاری در نمونه‌های سگ و گرگ

Table 7. Number of structural variants in samples of dog and wol

| Sample | Deletion | Insertion | Inversions | Inter chromosomal Translocations | Intra chromosomal Translocations |
|--------|----------|-----------|------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Dog | 23063 | 3255 | 800 | 1048 | 2535 |
| Wolf | 32065 | 1163 | 1020 | 1269 | 3125 |
| Total | 29433 | 3630 | 1212 | 1608 | 3876 |

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش برای بررسی تنوع ساختار ژنگان سگ و گرگ، کل ژنگان شش نمونه سگ و گرگ بومی ایران توسط روش توالی‌یابی نسل جدید، به صورت Paired-End با پوشش‌دهی بالا توالی‌یابی و بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی نسل جدید تفاوت‌های ساختاری بین ژنگان سگ و گرگ را به خوبی نشان داد. تفاوت بین ژنگان سگ و گرگ به عنوان نشانه‌هایی برای تخصیص دادن تفاوت‌های ژنتیکی به صفات فیزیکی، رفتاری و همچنین بیماری هستند و بیانگر تغییر ژنگان گرگ در طی فرآیند اهلی شدن همراه با ایجاد صفات جدید در سگ

هستند. سگ به عنوان مدل حیوانی در بسیاری از تحقیقات است. بنابراین اطلاعات به دست آمده از این پژوهش برای مقایسه‌های بین گونه‌ای سودمند خواهند بود.

سپاسگزاری

از مسئولان اداره کل محیط‌زیست استان تهران و همه افرادی که در روند نمونه‌گیری همکاری لازم را داشته‌اند، قدردانی می‌شود. نمونه‌گیری برای اجرای این پژوهش با دریافت مجوز از اداره کل محیط‌زیست استان تهران با شماره ۹۳/۳۴۰۸۹ مورخ ۱۳۹۳/۰۷/۲۲ صورت پذیرفت.

REFERENCES

- Atanur, S. S., Diaz, A. G., Maratou, K., Sarkis, A., Rotival, M., Game, L. & Keane, T. M. (2013). Genome sequencing reveals loci under artificial selection that underlie disease phenotypes in the laboratory rat. *Cell*, 154(3), 691-703.
- Chen, K., Wallis, J. W., McLellan, M. D., Larson, D. E., Kalicki, J. M., Pohl, C. S. & Mardis, E. R. (2009). BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation. *Nature methods*, 6(9), 677-681.
- Cingolani, P., Patel, V. M., Coon, M., Nguyen, T., Land, S. J., Ruden, D. M. & Lu, X. (2012). Using drosophila melanogaster as a model for genotoxic chemical mutational studies with a new program, snpsift. In *Toxicogenomics in non-mammalian species*, (Vol. 3, P. 35). Frontiers E-books.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L. & Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, snpeff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, 6(2), 80-92.
- Collins, D. W. & Jukes, T. H. (1994). Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics*, 20(3), 386-396.
- Coppinger, R. & Coppinger, L. (2002). Dogs: a new understanding of canine origin, behavior and evolution. *University of Chicago Press*.
- da Silva, J. M., Giachetto, P. F., da Silva, L. O. C., Cintra, L. C., Paiva, S. R., Caetano, A. R. & Yamagishi, M. E. B. (2015). Genomic variants revealed by invariably missing genotypes in nelore cattle. *Plos one*, 10(8), e0136035.
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A. & Durbin, R. (2011). The variant call format and vcf tools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158.
- Davis, S. J. & Valla, F. R. (1978). Evidence for domestication of the dog 12,000 years ago in the Natufian of Israel. *Nature*, 276, 608-610.
- Ebersberger, I., Metzler, D., Schwarz, C. & Pääbo, S. (2002). Genomewide comparison of DNA sequences between humans and chimpanzees. *The American Journal of Human Genetics*, 70(6), 1490-1497.
- Fang, M., Larson, G., Ribeiro, H. S., Li, N. & Andersson, L. (2009). Contrasting mode of evolution at a coat color locus in wild and domestic pigs. *PLoS Genet*, 5(1), e1000341.
- Freedman, A. H., Gronau, I., Schweizer, R. M., Ortega-Del Vecchyo, D., Han, E., Silva, P. M. & Beale, H. (2014). Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genetics*, 10(1), e1004016.
- Hare, B., Wobber, V. & Wrangham, R. (2012). The self-domestication hypothesis: evolution of bonobo psychology is due to selection against aggression. *Animal Behaviour*, 83(3), 573-585.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N. & Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and sam tools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Li, H. & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.

16. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzsky, A. & DePristo, M. A. (2010). The genome analysis toolkit: a mapreduce frame work for analyzing next-generation dna sequencing data. *Genome research*, 20(9), 1297-1303.
17. McLaren, W., Pritchard, B., Rios, D., Chen, Y., Flicek, P. & Cunningham, F. (2010). Deriving the consequences of genomic variants with the ensembl api and snp effect predictor. *Bioinformatics*, 26(16), 2069-2070.
18. Ovodov, N. D., Crockford, S. J., Kuzmin, Y. V., Higham, T. F., Hodgins, G. W. & van der Plicht, J. (2011). A 33,000-year-old incipient dog from the altai mountains of Siberia: evidence of the earliest domestication disrupted by the last glacial maximum. *PLoS One*, 6 (7), e22821.
19. Pang, J. F., Kluetsch, C., Zou, X. J., Zhang, A. B., Luo, L. Y., Angleby, H. & Savolainen, P. (2009). MtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze river, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular biology and evolution*, 26(12), 2849-2864.
20. Pollinger, J. P., Lohmueller, K. E., Han, E., Parker, H. G., Quignon, P., Degenhardt, J. D. & Wayne, R. K. (2010). Genome-wide snp and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*, 464(7290), 898-902.
21. Skoglund, P., Götherström, A. & Jakobsson, M. (2011). Estimation of population divergence times from non-overlapping genomic sequences: examples from dogs and wolves. *Molecular biology and evolution*, 28(4), 1505-1517.
22. Rubin, C. J., Zody, M. C., Eriksson, J., Meadows, J. R., Sherwood, E., Webster, M. T. & Andersson, L. (2010). Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. *Nature*, 464(7288), 587-591.
23. Saetre, P., Lindberg, J., Leonard, J. A., Olsson, K., Pettersson, U., Ellegren, H. & Jazin, E. (2004). From wild wolf to domestic dog: gene expression changes in the brain. *Molecular Brain Research*, 126(2), 198-206.
24. Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S. & Cooper, D. N. (2003). Human gene mutation database (HGMD®): update. *Human mutation*, 21(6), 577-581.
25. Stothard, P., Choi, J. W., Basu, U., Sumner-Thomson, J. M., Meng, Y., Liao, X. & Moore, S. S. (2011). Whole genome resequencing of black angus and holstein cattle for snp and cnv discovery. *BMC genomics*, 12(1), 559.
26. Varki, A. & Altheide, T. K. (2005). Comparing the human and chimpanzee genomes: searching for needles in a haystack. *Genome research*, 15(12), 1746-1758.
27. Wang, G. D., Zhai, W., Yang, H. C., Fan, R. X., Cao, X., Zhong, L. & Zhang, Y. P. (2013). The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. *Nature communications*, 4, 1860.

Study of structural diversity of genome Iranian native dog and wolf with the method whole genome sequencing

Zeinab Amiri Ghanatsaman¹, Ali Esmailzadeh Koshkoiyeh^{2*} and Masood Asadi Fozi³

1. Ph.D. Student of Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran and Yang Reseachers Society, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2, 3. Professor and Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

(Received: Jan. 26, 2016 - Accepted: May 17, 2016)

ABSTRACT

In this research, samples were collected from three Iranian native dogs and three wolves. Whole-genome sequencing for each individual was performed using next-generation sequencing technology. All short reads were aligned to the reference genome using BWA tool. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and small insertions and deletions (Indels) were detected using the genome analysis toolkit (GATK). Structural variants were predicted using the BreakDancer software. Annotating single-nucleotide polymorphisms and small insertions and deletions was done using SnpEff Software. Nucleotide diversity values in dogs and wolves samples were calculated using VCFtools. In current researche, 12459651 SNPs were detected that 7819789 and 10454994 were for dog and wolf, respectively. Of the total number of Single-nucleotide polymorphisms, 53.57%, 31.989% and 0.811% were located within intergenic, introns and exon regions. The results showed that structural diversity of wolf genome is higher than that in dog.

Keywords: Single-nucleotide polymorphism, small insertions and deletions, structural variant.