

جستجوی نشانه‌های انتخاب بین گاو میش‌های آذری و مازندرانی با استفاده از نشانه‌های SNP با تراکم زیاد

مهدی مخبر^{۱*}، محمد مرادی شهربابک^۲، مصطفی صادقی^۳، حسین مرادی شهربابک^۴ و جواد رحمانی‌نیا^۵

۱. استادیار، گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲، ۳، ۴. استاد، دانشیار و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۵. استادیار، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۱)

چکیده

به منظور یافتن نشانه‌های انتخاب بر روی ژنوم گاو میش از ۲۸۷ رأس گاو میش رودخانه‌ای شامل ۲۶۰ رأس آذری و ۲۷ رأس مازندرانی استفاده شد. ژنوتیپ نمونه‌ها به وسیله آرایه‌های ژنومی Axiom® Buffalo Genotyping 90K تعیین شد و برآوردگر ناریب F_{ST} (θ) برای یافتن نشانه‌های انتخاب مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع ۱۴ منطقه که نشانه‌های SNP آن‌ها بالاتر از ۰/۱ درصد حد بالای توزیع تجربی F_{ST} بودند، به عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی شدند. بعد از انطباق مناطق ژنومی انتخاب شده با مناطق ژنومی متناظر آن روی ژنوم گاو (UMD3.1 *Bos Taurus* Genome)، ۱۰۵ ژن و ۲۸ QTL شناسایی شد. از مجموع ۱۰۵ ژن شناسایی شده در مناطق ژنومی تحت انتخاب، ۲۷ ژن مربوط به گیرنده‌های بویایی بودند. همچنین یک سری از ژن‌های شناسایی شده در رشد و توسعه بافت‌های بدنی، مرگومیر سلولی، سیستم ایمنی بدن و توسعه بافت‌های پستانی نقش دارند. بررسی‌ها همچنین نشان داد که QTL‌های شناسایی شده در این مطالعه عمدتاً با صفات مربوط به رشد از قبیل وزن بدن در تولد، شیرگیری و بلوغ، چربی زیرپوستی، تولید گوشت لحم و وزن لاشه ارتباط دارد. QTL‌های مرتبط با تولید شیر، فقط با کیفیت شیر و تعداد سلول‌های شیر ارتباط دارند. در هر صورت، توصیه می‌شود جهت شناسایی نقش دقیق این ژن‌ها و QTL‌ها بایستی مطالعات ارتباطی انجام گیرد.

واژه‌های کلیدی: آرایه‌های ژنومی، شاخص تمایز جمعیتی، گاو میش آذری و مازندرانی.

Detection of selection signatures in Azeri and Mazandrani buffalo populations by high density SNP markers

Mahdi Mokhber¹, Mohammad Moradi Shahrabak^{2*}, Mostafa Sadeghi³, Hossein Moradi Shahrabak⁴ and Javad Rahmani⁵

1. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, Urmia university, Urmia, Iran

2, 3, 4. Professor, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

5. Assistant Professor, Department of Animal Breeding and Genetics, Animal Science Research institute of Iran (ASRI), Karaj, Iran

(Received: Feb. 25, 2017 - Accepted: Sep. 12, 2017)

ABSTRACT

In order to detect signature of selection on buffalo genome, a set of 287 water buffalo samples from 260 Azeri and 27 Mazandarani buffalo breeds were genotyped using the Axiom® Buffalo Genotyping 90K Array. The unbiased fixation index method (FST) was used to detect signatures of selection. In total, 14 regions with outlier FST values (0.1%) were identified. Annotation of these regions using the UMD3.1 *Bos taurus* Genome Assembly was performed to find putative candidate genes and QTLs within the selected and 105 genes and 28 QTLs with selection signatures were detected. A high proportion of identified genes (N=27) in regions under selection were involved in olfactory receptor, also some of the detected genes were associated with growth and body development, metabolic and apoptosis processes, immune system development, and mammary gland development. Some of the identified QTLs in regions under selection were associated with growth traits such as body weight at birth, weaning and mature, subcutaneous fat, meat yield and carcass weight. The detected QTL for milk traits were only associated with milk contents and somatic cell count. However, it is recommended to carry out association studies to show the actual function of these genes.

Keywords: Azeri and Mazandrani buffalo breeds, Genotyping Array, population differentiation index.

* Corresponding author E-mail: mehdimokhber@urmia.ac.ir

مقدمه

گاو‌میش آبی (*Bubabulus bubalis*) در اکثر مناطق دنیا به‌خصوص در کشورهای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا پراکنده است. گاو‌میش به‌طور عمده برای تولید شیر و گوشت پرورش داده می‌شود و نقش بسیار مهمی در اقتصاد روستائیان در آسیا دارد (Misra & Tyagi, 2010). برطبق آخرین گزارشات فائو، ۹۷ میلیون تن شیر (۱۲/۹٪) و ۳/۶ میلیون تن گوشت (۴/۵٪) تولید دنیا به گاو‌میش اختصاص دارد (FAO, 2014). همچنین شیر تولیدی گاو‌میش مواد غذایی (چربی، پروتئین، مواد معدنی و غیره) بالاتر و آب کمتری نسبت به شیر تولیدی گاو دارد (FAO, 2013). شیر گاو‌میش برای تولید کره، پنیرهای با کیفیت بالا و محصولات لبنی با کیفیت بالا، مناسب می‌باشد. در ضمن گوشت تولیدی گاو‌میش میزان چربی و کلسترول پایین‌تری نسبت به گوشت گاو دارد، همچنین چرم به‌دست‌آمده از گاو‌میش کیفیت بالایی دارد (Borghese, 2011). متأسفانه روند تغییرات جمعیت گاو‌میش در ایران در سال‌های اخیر کاهش چشمگیری نشان داده و این میزان از ۵۲۳ هزار رأس در سال ۱۳۸۱ (Borghese, 2005) به ۲۰۵ هزار رأس در سال ۱۳۹۳ کاهش یافته است (AGRI, 2015). در ایران استفاده از گاو‌میش به‌طور عمده برای تولید شیر بوده و گوشت در درجه بعدی اهمیت قرار دارد و ۲۹۳ هزار تن شیر (۲/۸٪) و ۲۴/۷ هزار تن (۲/۵٪) گوشت تولیدی کشور به گاو‌میش اختصاص دارد (AGRI, 2014). مطالعات مختلف (Mirhabibi et al., 2007; Naserian & Saremi, 2010) بر طبق صفات مورفولوژیک گاو‌میش‌های ایران را به سه اکوتیپ آذری، خوزستانی و شمالی (استان‌های گیلان و مازندران) تقسیم‌بندی کرده‌اند. ولی مطالعه انجام‌شده توسط Mokhber (2015) نشان داد که گاو‌میش‌های استان گیلان (از اقلیم شمال) به گاو‌میش‌های آذری تعلق دارند و کاملاً از گاو‌میش‌های استان مازندران مجزا هستند. همچنین *et al.* Azizi (2017) نشان دادند که تمایز بین گاو‌میش‌های آذری و استان گیلان بسیار ناچیز است که حاکی از اختلاط بالای جمعیتی در بین این گاو‌میش‌ها است. علی‌رغم مزایای متعدد پرورش

گاو‌میش، متأسفانه پرورش‌دهندگان و مزرعه‌داران به‌دلیل مشکلاتی از قبیل راندمان پایین تولید مثل، پتانسیل تولید کمتر از حالت مطلوب، عدم باروری و زنده‌مانی پایین گوساله، به پرورش این حیوان رغبت کافی نشان نمی‌دهند (Moaeen-ud-Din, 2014). متأسفانه جمعیت گاو‌میش در ایران نیز مانند برخی دیگر از کشورهای جهان به‌دلیل جایگزینی گاوهای پرتولید هلشتاین به جای گاو‌میش، مکانیزه شدن کشاورزی و کاهش تقاضای بازار نسبت به تولیدات این حیوان، کاهش چشمگیری داشته است (Borghese, 2005). به‌دلیل اهمیت این گونه در تولید و معیشت مردم، بهبود ژنتیکی این حیوان ضروری است (Othman, 2006) و استفاده از تکنولوژی‌های جدید و تحقیقات در حوزه ژنوم برای دستیابی به پیشرفت ژنتیکی صفات تولیدی نقش اساسی دارد. در سال‌های اخیر تحقیقات در حوزه ژنوم با توسعه آرایه‌های ژنومی با تراکم بالا در اغلب گونه‌های اهلی توسعه یافته است (Cole et al., 2009).

بر طبق تئوری خنثی (neutral theory) در ژنتیک جمعیت، بخش عمده‌ای از تنوع ژنتیکی موجود در درون گونه‌ها به‌وسیله رانش تصادفی آلل‌های چندشکل که از نظر انتخابی خنثی هستند، به‌وجود می‌آید (Kimura, 1985). انتخاب خنثی به انتخابی گفته می‌شود که هیچ تأثیری بر روی شایستگی ژنتیکی افراد نداشته باشد. در این شرایط وارپانت‌های جدید برای افزایش فراوانی در جمعیت نیاز به‌مدت زمان طولانی‌تری خواهند داشت که در طی این زمان به‌دلیل وقوع نوترکیبی در اطراف این جایگاه، عدم تعادل لینکاژی (LD) به‌وجودآمده در اطراف این جایگاه به‌تدریج شکسته و از به‌وجودآمدن یک هاپلوتایپ ویژه در جمعیت ممانعت به عمل می‌آید. آلل‌های متداولی که به‌این طریق در سطح ژنوم ایجاد شده‌اند و قابل تشخیص هستند عموماً قدیمی بوده و عدم تعادل لینکاژی به‌وجودآمده در اطراف این آلل دامنه کوتاهی دارد (Sabeti et al., 2002). رانش ژنتیکی به شیوه یکسانی بر روی همه جایگاه‌های موجود بر روی ژنوم تأثیر می‌گذارد (Akey et al., 2009; Amato et al., 2009). در صورتی که جهش به‌وجودآمده در سطح ژنوم باعث افزایش شایستگی افراد در جامعه شود، انتخاب

انسان، به دلیل این که حیوانات اهلی علاوه بر انتخاب طبیعی، به خصوص در سال های اخیر در معرض انتخاب های مصنوعی شدیدی نیز قرار گرفته اند، این قبیل حیوانات نمونه های مناسب تری برای شناسایی سیگنال های انتخاب در سطح ژنوم هستند و از آن ها برای شناسایی ژن های کنترل کننده فنوتیپ های مختلف استفاده می گردد (Biswas & Akey, 2006).

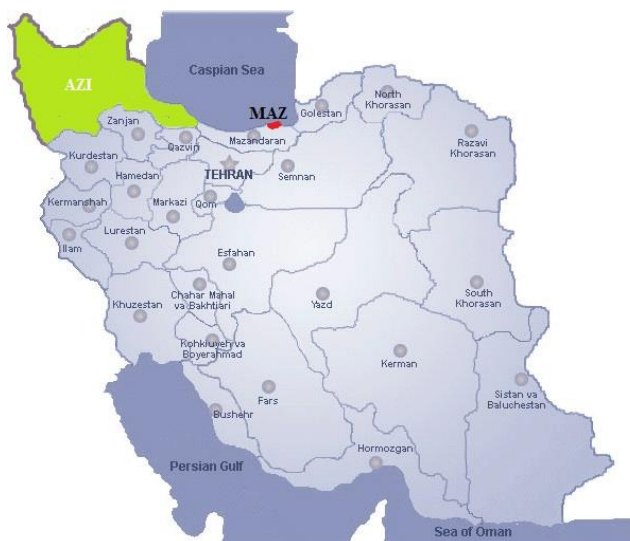
مطالعه حاضر به عنوان بخشی از مطالعات جامعی است که بر روی گاو میش های کشور انجام گرفته است. در این بخش از پژوهش دو نژاد (گاو میش های آذری و مازندرانی) از سه نژاد موجود در کشور (گاو میش های آذری، خوزستانی و مازندرانی) جهت شناسایی محل هایی از ژنوم که تحت انتخاب قرار داشتند، مورد واکاوی قرار گرفتند. این واکاوی به دلیل وجود تفاوت های موجود در اندازه های بدنی و تیپ و نیز تفاوت عملکرد تولید شیر در این دو نژاد (داده ها منتشر نشده است) و همچنین تأثیر احتمالی محیط های پرورش متفاوت بر روی ژنوم، صورت گرفت. بنابراین در این پژوهش صرفاً یک صفت خاص که در جهت های متفاوت تحت انتخاب شدید قرار داشته باشد، مد نظر نبوده و دو گروه ژنتیکی جهت شناسایی مناطقی از ژنوم که در طی سال های متمادی تحت تأثیر نیروهای انتخاب طبیعی یا مصنوعی قرار گرفته اند و احتمالاً با صفات اندازه های بدنی، تولید شیر و آداپته شدن به شرایط محیطی مختلف مرتبط هستند، انجام گرفت.

مواد و روش ها

در مطالعه حاضر از ۲۹۱ نمونه مو (۲۶۴ نمونه مو مربوط به جمعیت گاو میش آذری از ۱۷ شهرستان مربوط استان های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل و گیلان با مختصات جغرافیایی $36^{\circ}41'N$ - $49^{\circ}52'E$ و $37^{\circ}02'N$ - $38^{\circ}78'E$) و ۲۷ نمونه خون مربوط به جمعیت گاو میش مازندرانی از میانکاله شهرستان بهشهر با مختصات جغرافیایی $36^{\circ}41'N$ و $52^{\circ}41'E$) از گله هایی که تحت سیستم ثبت شجره و رکوردگیری مرکز اصلاح نژاد کشور قرار داشتند، جمع آوری شد (شکل ۱).

طبیعی باعث می شود تا افرادی که دارای شایستگی بیشتری هستند، هدف انتخاب مثبت قرار گرفته و در تشکیل نسل بعد مشارکت بیشتری داشته باشند (Akey *et al.*, 2009; Sabeti *et al.*, 2002). هرگاه یک آلل سودمند در طی زمان های مختلف هدف انتخاب مثبت قرار گیرد، باعث ایجاد نشانه هایی در سطح ژنوم می گردد که با موارد اشاره شده قابل تفکیک است (Biswas & Akey, 2006). این نشانه ها شامل کاهش تنوع ژنتیکی در آن ناحیه از ژنوم، انحراف از توزیع فراوانی آللی (Site Frequency Spectrum) و افزایش عدم تعادل لینکازی (Linkage Disequilibrium) و توسعه ساختار هاپلوتایپی (Haplotype Structure) می باشد (Qanbari *et al.*, 2014). در حال حاضر ابزارها و روش های مختلفی برای شناسایی نشانه های انتخاب در سطح ژنوم جمعیت های مختلف، به طور موفقیت آمیزی ابداع شده و استفاده می گردد (Li *et al.*, 2014). با وجود این که روش های موجود برای شناسایی نشانه های انتخاب بر روی داده های ژنومی در فرض ها و اجرا متفاوت هستند و انتظار می رود رابطه ضعیفی بین نتایج آن ها وجود داشته باشد، ولی مناطقی که با روش های مختلف به صورت مشترک به عنوان نشانه های انتخاب شناسایی می شوند، بر اساس شواهد قطعی تر نشان دهنده وجود انتخاب در این نواحی هستند (Utsunomiya *et al.*, 2013).

تاکنون مطالعات مختلفی در زمینه شناسایی نشانه های انتخاب بر روی انسان (Sabeti *et al.*, 2002; Hider *et al.*, 2013) و حیوانات اهلی از قبیل گاو (Pérez *et al.*, 2014; Qanbari *et al.*, 2014) گوسفند (Moradi *et al.*, 2012; Kijas *et al.*, 2012) طیور (Rubin *et al.*, 2010)، خوک (Yang *et al.*, 2014) و گاو میش (Mokhber *et al.*, 2015) انجام گرفته است و در برخی موارد ژن های موجود در مناطق مختلف ژنومی شناسایی و حتی عملکرد بیولوژیکی آن ها نیز تعیین شده است. در مطالعه Mokhber *et al.* (2015) نشانه انتخاب در بین گاو میش های خوزستانی و مازندرانی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که نواحی تحت انتخاب ژنوم احتمالاً با مسیرهای بیولوژیکی اهلی شدن حیوانات از جمله توسعه مغز و عملکردهای رفتاری، آداپته شدن به محیط و نیز تولید شیر مرتبط هستند. در مقایسه با



شکل ۱. مناطق پراکنش دو نژاد گاومیش مورد مطالعه در این پژوهش. نمونه‌های آذری از مناطقی که با رنگ سبز مشخص شده است (شامل استان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، اردبیل و گیلان مناطقی که با رنگ قرمز مشخص شده است (منطقه میانکاله واقع در شمال استان مازندران) تهیه شدند.

Figure 1. Distributions of the two Iranian Buffalo breeds used in this study. The Azeri buffalo samples were taken from green highlighted area (located in north and north-western part of Iran) consist of East-Azbarbajan, west-Azbarbajan, Ardebil and Gilan provinces, and Mazandarani samples were taken from red highlighted area (Miyankaleh region) that is located in north part of Mazandaran province.

کنترل کیفیت Affypipe را گذراندند و تنها ۲ حیوان به‌خاطر DQC (Dish Quality Control) پایین‌تر از ۰/۸۲ و CR (Call rate) کمتر از ۰/۹۷ حذف شدند. در مجموع از بین ۸۹۸۶۴ جایگاه مورد بررسی تعداد ۷۳۹۳۵ جایگاه که ژنوتیپ آنها به لحاظ کیفی مناسب بوده و در گروه‌بندی‌های ژنوتیپی تعریف شده در نرم‌افزار Affypipe قرار گرفته بودند، انتخاب شده و خروجی آن در فرمت ورودی نرم‌افزار Plink ذخیره شد. سپس جهت اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ در آنالیزهای نهایی مراحل مختلف کنترل کیفیت بر روی داده‌های اولیه اعمال شد. ابتدا حیوانات با بیش از ۵٪ ژنوتیپ از دست رفته حذف شدند (تعداد ۲ رأس گاومیش آذری) و سپس جهت داشتن یک دیدگاه کلی در خصوص ساختار جمعیتی حیوانات و نژادهای مورد مطالعه و شناسایی حیواناتی که خارج از گروه نژادی خود قرار گرفته‌اند، آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) و ساختار جمعیت صورت گرفت. آنالیز ساختار جمعیت با استفاده از نرم‌افزار Admixture صورت گرفت. در بررسی ساختارهای جمعیتی قبل از قضاوت نهایی در خصوص تعداد واقعی

نمونه‌های مو به همراه ریشه مو از بخش‌هایی از بدن دام که آلودگی کمتری داشت، به‌دست آمد (Campbell *et al.*, 1997) و نمونه‌های خون از وداج زیر دمی گاومیش تهیه گردید. استخراج DNA از مو بر طبق روش Alberts *et al.* (2010) با اندکی تغییر انجام شد. استخراج DNA از خون نیز با استفاده از روش بهینه نمکی (Grimberg *et al.*, 1989) انجام شد و در ۷۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی به‌وسیله دستگاه نانودراپ (Thermo 2000C) و ژل آگارز ۱/۲٪ صورت گرفت. سپس نمونه‌ها جهت انجام مراحل بعدی توالی‌یابی به آزمایشگاه ژنومیک مرکز تحقیقات پادانو (Parco Tecnologico Padano) کشور ایتالیا انتقال داده شدند. تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های Axiom® Buffalo Genotyping 90K مربوط به شرکت افی‌متریکس (Affymetrix) و در آزمایشگاه ژنومیک مرکز تحقیقات پادانو کشور ایتالیا صورت گرفت. تعیین کیفیت و فیلتراسیون اولیه داده‌های خام توسط نرم‌افزار Affypipe انجام شد (Nicolazzi *et al.*, 2014) و از مجموع ۲۹۱ نمونه، ۲۸۹ نمونه مراحل

بررسی ۰/۰۵ در نظر گرفته شده بود. کنترل‌های کیفی داده‌های ژنوتیپی به‌جز تعادل هاردی-واینبرگ به‌طور یک‌جا بر روی جمعیت‌های مورد مقایسه اعمال شد.

جهت بررسی الگوی ژنومی انتخاب مثبت در دو جمعیت گاومیش ایرانی، ارزش‌های F_{ST} برای هر SNP به روش ناریب تتا و در محیط R محاسبه گردید (Weir & Cockerham, 1984). مزیت این روش نسبت به روش پایه‌ای F_{ST} که توسط رایت ارائه شده این است که در روش تتا اندازه نمونه‌ها در فرمول لحاظ گردیده و در واقع خطای نمونه‌گیری در نظر گرفته شده است (Weir & Cockerham, 1984). با توجه به این‌که این روش ناریب است احتمال به‌دست آوردن ارزش‌های منفی نیز وجود دارد (Akey et al., 2002). ارزش‌های F_{ST} (تتا) برای هر SNP و به‌طور جداگانه‌ای برای کروموزوم‌های اتوزومی و کروموزوم X، محاسبه شد. جهت شناسایی بهتر نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم به‌جای در نظر گرفتن ارزش عددی هر SNP از میانگین‌گیری ارزش‌های عددی SNP‌های مجاور به روش Creeping Window (CW) با طول ۳۰۰ کیلو جفت باز استفاده شد (Qanbari et al., 2012) و تنها ۰/۱٪ مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانه‌های مجاور دارای ارزش بالایی بودند، به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند. جهت بررسی بصری نشانه‌های انتخاب، گراف منهن پلات با بسته نرم‌افزاری QQman در محیط R رسم گردید (شکل ۳). در مرحله بعد اطلاعات مربوط به این نواحی (شامل کروموزوم و موقعیت SNP‌های انتخابی بر روی کروموزوم) جهت شناسایی ژن‌هایی که احتمالاً با نواحی انتخابی مرتبط هستند، تعیین شدند. موقعیت کروموزومی این جایگاه‌ها با موقعیت ژن‌های لیست شده برای ژنوم گاو (UMD3.1 *Bos Taurus*) در Ensemble Biomart Tool (<http://www.ensembl.org/>) - EntrezGene (biomart) مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین این جایگاه‌ها با موقعیت QTL‌های موجود برای ژنوم گاو (UMD3.1 *Bos Taurus*) در پایگاه اطلاعاتی آنلاین QTL‌های گاو (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/browse>) مورد مقایسه قرار گرفت. در نهایت ژن‌ها و QTL‌های مرتبط با مناطق انتخابی به‌دست آمد و مورد بررسی‌های بیشتر قرار گرفت.

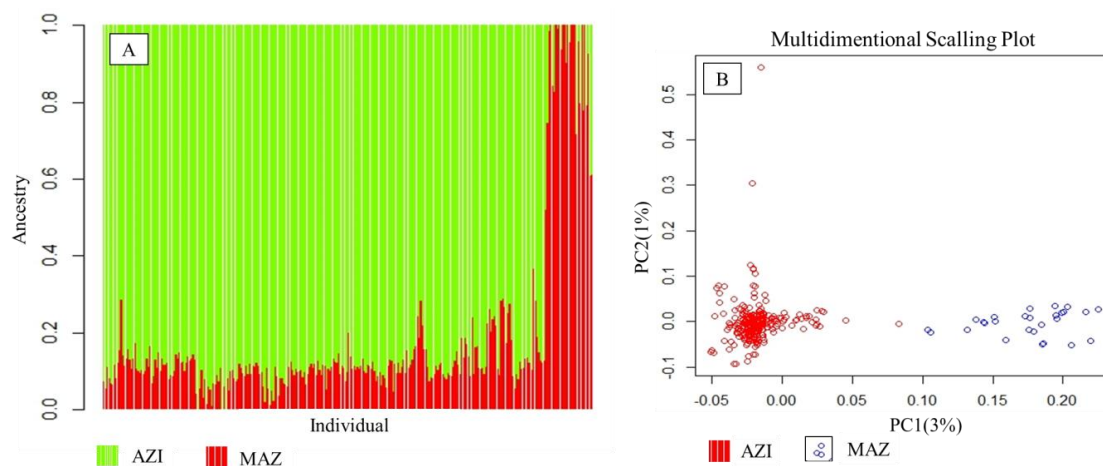
جمعیت، ساختارهای داده برای به‌دست‌آوردن فاکتور K مطلوب مورد بررسی قرار گرفت. این فاکتور در واقع شاخص خطای cross-validation (CV) بوده و ارزش عددی پایین برای این فاکتور نشان‌دهنده خطای پایین‌تر CV می‌باشد. این فاکتور در واقع تعداد جمعیت‌های احتمالی را تعیین می‌کند که در این مطالعه مقدار عدد مناسب برای آن ۲ به‌دست آمد.

آنالیز مؤلفه‌های اصلی بر اساس اطلاعات ماتریس خویشاوندی ژنومی انجام گرفت (Price et al., 2006) و توسط نرم‌افزار GeneABEL در محیط R صورت گرفت. تعداد ۴ نمونه مربوط به جمعیت آذری به‌خاطر قرار گرفتن خارج از گروه‌بندی بر اساس آنالیز PCA، حذف شدند و سپس قبل از انجام فیلتراسیون نهایی، جمعیت‌های مورد مطالعه برای خویشاوندی‌های نزدیک یا به عبارت دیگر ضرایب خویشاوندی ژنومی که توسط Leutenegger et al. (2003) ارائه شده، غربال شدند. تعداد ۲ رأس گاومیش مازندرانی و ۳ رأس گاومیش آذری به‌خاطر داشتن IBS بالای ۰/۸ از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شدند. برای اطمینان از این‌که کیفیت داده‌های مورد استفاده در آنالیزهای بعدی بالا باشد، فیلتراسیون نهایی بر روی ۲۸۰ حیوان باقی‌مانده جهت حذف داده‌های با کیفیت پایین و داده‌های دارای اطلاعات پایین، اعمال شد. این بخش توسط نرم‌افزار Plink انجام شد (Purcell et al., 2007). در این مرحله از فیلتراسیون SNP‌هایی که در مجموع حیوانات اطلاعات پایینی داشتند، حذف شدند. به‌ترتیب تعداد ۸۸۷۸ و صفر SNP به‌خاطر حداقل فراوانی آلی (MAF) کمتر از ۰/۰۲ و بیش از ۰/۵ ژنوتیپ از دست رفته (CR_{SNP}) حذف شدند. در نهایت برای SNP‌هایی که دارای تعادل هاردی-واینبرگ (HWE) برای هر کدام از جمعیت‌ها نبودند، به‌عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ (Teo et al., 2007) از ادامه محاسبات حذف شدند (به ترتیب تعداد ۱۹۵ و ۲ SNP برای جمعیت‌های گاومیش آذری و مازندرانی). سطح معنی‌داری در این تحقیق با استفاده از تصحیح بنفرونی ($\beta = \alpha/n$)، $6/8 \times 10^{-7}$ تعیین شد. در این رابطه، n تعداد آزمون است که در این‌جا برابر تعداد SNP (n= ۷۳۹۳۵) و α خطای آزمایش است که در این

نتایج و بحث

پس از انجام مراحل مختلف غربالگری براساس اطلاعات کنترل کیفی داده‌های خام و خویشاوندی حیوانات، در نهایت ۶۴۸۶۲ نشانگر SNP مربوط به ۲۷۸ حیوان (۲۵۳ گاو میش آذری و ۲۵ گاو میش مازندرانی) جهت انجام آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. نرخ تعیین ژنوتیپ در افراد باقیمانده برابر ۰/۹۹۵۴ بود. با این تعداد نشانگر SNP در مجموع Mbp ۲۶۴۹/۴۱ از ژنوم با میانگین فاصله ۴۳/۳ Kbp با انحراف معیار ۳۵/۶۸ Kbp تحت پوشش قرار گرفت. در این مطالعه، ساختار جمعیتی نژادهای گاو میش آذری و مازندرانی کشور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از بررسی ساختار جمعیت‌های گاو میش کشور به وسیله نرم‌افزار Admixture نشان داد که دو جمعیت گاو میش آذری و مازندرانی از هم مجزا هستند. نتایج همچنین نشان داد که این دو جمعیت دارای مقداری اختلاط نژادی هستند. نحوه تمایز جمعیت‌ها و میزان اشتراک ژنتیکی این جمعیت‌ها به صورت گراف نشان داده شده است (شکل A-۲). نتایج آنالیز PCA براساس PC1 و PC2 نشان داد که این دو نژاد در گروه‌های کاملاً مجزا قرار دارند و در هیچ نقطه‌ای همپوشانی ندارند. این دو PCA در

مجموع حدود ۰/۴ واریانس (۳٪) برای ویژه بردار ۱ و ۰/۱٪ برای ویژه بردار ۲ را توجیه می‌کنند (شکل A-۲). در گونه‌های اهلی دیگر از قبیل گاو و گوسفند و خوک نیز، حیوانات فقط براساس ویژه بردارهای یک و دو بر اساس نژاد و منطقه جغرافیایی دسته‌بندی شده‌اند (Yang *et al.*, 2014; Gibbs *et al.*, 2009; Kijas *et al.*, 2012). با وجود این که پایین بودن میزان واریانس توجیهی نشان دهنده ساختارهای جمعیتی کمتر تمایز یافته است ولی این جمعیت‌ها همان‌طور که گراف نشان می‌دهد کاملاً از هم تفکیک شده‌اند. بخشی از واریانس پایین می‌تواند بخاطر تنوع بالای نمونه‌گیری (۱۱۶ محل نمونه‌برداری)، باشد. در مطالعه‌ای که توسط Kijas *et al.* (2012) بر روی جمعیت‌های گوسفند دنیا صورت پذیرفت، ۲۰ تا PC اول در مجموع فقط ۱۶ درصد واریانس را توجیه کردند که بزرگترین مقدار مربوط به PC1 به میزان ۲/۹۸٪ و PC2 و PC3 به ترتیب ۱/۴۴ و ۱/۱۹٪ از واریانس توجیه کردند. در مطالعه‌ای (Barendse *et al.* 2009) میزان واریانس توجیهی برای PC1 و PC2 به ترتیب برابر ۶/۱ و ۳/۷ درصد بود. با همین میزان تفرق جمعیتی می‌توان امیدوار به یافتن نقاطی از ژنوم باشیم که به‌طور معنی‌دار مورد انتخاب قرار گرفته‌اند.



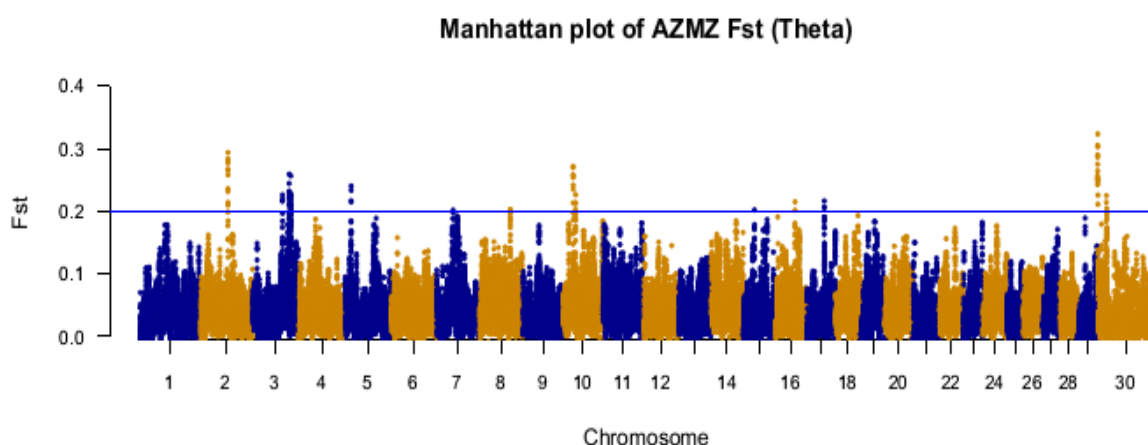
شکل ۲. دیاگرام آنالیز واریانس و ساختار جمعیت، جمعیت‌های گاو میش آذری (AZI) و مازندرانی (MAZ). (A) ساختار جمعیت‌های دو نژاد گاو میش آذری (AZI) و مازندرانی (MAZ) توسط نرم‌افزار Admixture با $k=2$ (B) دیاگرام آنالیز PCA بین افراد بر اساس ضریب خویشاوندی ژنومی. دو مؤلفه اول (PC) و واریانس توجیه شده به وسیله هر مؤلفه در محورهای مربوطه نشان داده شده است.

Figure 2. Principal components analysis and population structure diagrams of the studied buffalo populations. (A) Population structure of the studied buffalo populations constructed by Admixture software with $k=2$. (B) Principal components diagram based on the genomic kinship coefficients between individuals. The first two principal components (PC) and the variance explained by each component are shown on the corresponding axis.

نشان داد. نتایج مربوط به ژن‌های شناسایی در مناطق تحت انتخاب مذکور در مطالعه Mokhber *et al.* (2015) آورده شده است.

از آنجایی که حاشیه‌نویسی ژنوم (Genome Annotation) گاو میش هنوز کامل نشده است و توالی‌اش با توالی ژنوم گاو هم ردیف شده است، بنابراین مشخصات توالی ژنومی گاو میش بر اساس اطلاعات توالی ژنوم گاو ارائه شده است، از جمله مشخصات جایگاه نشانگر SNP مربوط به گاو میش بر اساس موقعیت‌های ژنومیک کروموزوم‌های گاو می‌باشد و نتایج به دست آمده بر اساس ترتیب ژنوم گاو بود. به دلایل عنوان شده استخراج اطلاعات ژن‌هایی که در مناطق انتخابی قرار دارند، آسان تر شده است. این هم‌ردیف‌سازی و حاشیه‌نویسی ژنوم گاو میش بر اساس اطلاعات ژنوم گاو به این دلیل بود که اکثر بخش‌های ژنوم گاو و گاو میش علی‌رغم تفاوت در تعداد کروموزوم‌ها (۳۰ جفت کروموزوم گاو در مقایسه با ۲۵ جفت کروموزوم گاو میش آبی) با هم همولوگ هستند. همچنین ترتیب ژن‌ها در هر دو گونه با هم منطبق بوده و به لحاظ سیتوژنتیکی کل ژنوم دو گونه با در نظر گرفتن بازوهای کروموزومی به جای کروموزوم کامل، در کنار هم قرار می‌گیرد (Amaral *et al.*, 2007).

حدود ۰/۱ درصد SNP‌های مورد مطالعه به‌عنوان نشانه انتخاب، تعیین شدند. آستانه تعیین شده، سخت‌گیرانه بوده و فقط مناطقی از ژنوم که بیشترین تمایز جمعیتی را در بین دو نژاد نشان می‌دهند، انتخاب شدند. این حد آستانه در مطالعات مختلف از ۰/۱ درصد (Moradi *et al.*, 2012) تا ۲/۵ درصد (Qanbari *et al.*, 2012) متغیر بوده است. در نهایت ۱۴ ناحیه بر روی ژنوم که ارزش عددی بالاتر از ۰/۲ را داشتند، به‌عنوان نشانه انتخاب تعیین شدند. این مناطق به ترتیب روی کروموزوم‌های ۲، ۳ (منطقه ۳)، ۵، ۷، ۸، ۱۰ (منطقه ۲)، ۱۵، ۱۶، ۱۷ و X (منطقه ۲) قرار داشتند (شکل ۳). در مطالعه Mokhber *et al.* (2015) برای شناسایی نواحی ژنومی تحت انتخاب در بین دو نژاد گاو میش خوزستانی و مازندرانی صورت گرفته بود، ۲۳ منطقه ژنومی به‌عنوان نشانه انتخاب شناسایی شدند. به جز منطقه ژنومی شناخته شده بر روی کروموزوم ۷ که در نزدیکی نواحی انتخابی مطالعه حاضر قرار داشت، مطابقتی در سایر مناطق مشاهده نشد. البته زمانی که ۰/۵ درصد SNP‌های مورد مطالعه در مطالعه حاضر به‌عنوان نشانه انتخاب تعیین شد، مناطق ژنومی شناسایی شده بیشتر بر روی کروموزوم‌های ۱، ۷ (منطقه ۲)، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ با مناطق تحت انتخاب در مطالعه Mokhber *et al.* (2015) مطابقت



شکل ۳. تصویر منتهن پلات مربوط به ارزش‌های میانگین‌گیری شده F_{ST} تا با طول پنجره ۳۰۰ کیلو جفت بازی مقایسه بین دو نژاد گاو میش آذری و مازندرانی را نشان می‌دهد. خط آبی حد آستانه نشانه‌های انتخاب بر روی کروموزوم‌های بدنی و کروموزوم جنسی X (۳۰) را نشان می‌دهد. حد آستانه در این مطالعه بر اساس توزیع تجربی F_{ST} تعیین شده است.

Figure 3. Genome-wide distribution of pairwise unbiased F_{ST} (Theta) between Azeri and Mazandarni buffalo breeds. Overlapped windows of 300 kb across the genome were used to identify putative signatures of selection. The threshold determined based on the 0.1 % of the empirical genome-wide distribution is shown by the blue line.

توالی‌های مشابه دارند و بوهایی که به لحاظ ساختاری شبیه هم باشند را شناسایی می‌کنند. با بررسی پایگاه‌های داده ژنوم انسان ۳۳۹ ژن کامل و ۲۹۷ ژن کاذب در زمینه گیرنده‌های بویایی شناسایی شد. بررسی‌ها همچنین نشان داد که این ژن‌ها بر روی نواحی مختلف کروموزوم شماره ۲۱ انسان قرار گرفته‌اند و در ۱۷۲ زیر خانواده قرار گرفته‌اند. اولین مرحله در تشخیص بوها به وسیله همین گیرنده‌های بویایی که در اعصاب حساس به بو در اپتلیوم بویایی بینی قرار گرفته‌اند، صورت می‌گیرد. این خانواده ژنی در طی تکامل مهره‌داران محافظت شده ولی تعداد آن از ۱۰۰ تا در ماهی تا بیش از ۱۰۰۰ تا در موش متغیر است (Malnic et al., 2004). در خصوص ژن‌های مربوط به ادراکات حسی، نشانه‌های انتخابی مشاهده شده مربوط به گیرنده‌های بویایی بودند. ژن‌های OR11L1, OR14C36, OR2M4, OR2AJ1, OR2AK2, OR2T1 و OR2T6 و چندین ژن (۱۷ ژن) دیگر از همین خانواده در ناحیه ۴۲۵۹۷۲۲۳ تا ۴۳۴۶۷۳۷۶ جفت بازی کروموزوم ۷ قرار دارند. این خانواده ژنی با اهلی شدن حیوانات ارتباط دارد (Qanbari et al., 2014).

به‌علاوه دو ژن OR5AU1 و OR10G3 از همین خانواده روی کروموزوم ۱۰ قرار دارند. وجود این نشانه‌ها در این بررسی با نتایج مطالعات مختلفی که وجود نشانه‌های انتخاب برای گیرنده‌های بویایی در انسان سگ (Chen et al., 2012) و خوک (Groenen et al., 2012) را اثبات کرده‌اند، در توافق بود. همچنین تعیین ژن‌های مربوط به گیرنده‌های بویایی به‌عنوان نشانه انتخاب با نتایج مطالعات Qanbari et al. (2014) و Gibbs et al. (2009) که در آن ژن‌های مرتبط با ادراکات حسی (بویایی و چشایی) در نژادهای گاو به‌عنوان نشانه انتخاب تعیین شدند، مطابقت داشت. در مطالعه Mokhber et al. (2015) علی‌رغم این‌که ژنی از این خانواده ژنی (OR) به‌عنوان نشانه ژنی شناخته نشد، ولی خانواده ژنی پروکاده‌رین که در ساختار و عملکرد ارتباطات عصبی نقش دارند و با اهلی شدن ارتباط دارند، به‌عنوان نشانه انتخاب تعیین شدند.

جهت شناسایی ژن‌های مرتبط با بخش‌های انتخابی ژنوم، از مناطق ارتولوگوس با نشانگر SNP که بیشترین ارزش عددی تتا را در هر پیک انتخابی دارد، استفاده شد. به‌علاوه ۵۰۰ کیلو جفت باز ناحیه اطراف این نشانگر SNP (در اینجا در مجموع ۱۴ مگا جفت باز) به‌وسیله Biomart (www.ensembl.org/biomart/martview)، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین این جایگاه‌ها با موقعیت QTL‌های موجود برای ژنوم گاو (UMD3.1 Bos) در پایگاه اطلاعاتی آنلین QTL‌های گاو مورد مقایسه قرار گرفت. از ۱۴ منطقه مورد بررسی تنها ۱۰ منطقه حاوی مناطق کدکننده ژن‌ها بودند. در مجموع ۱۰۵ ژن که در ارتباط با منطقه انتخابی بودند، شناسایی شدند. ۶ تا از این ژن‌ها پروتئین‌هایی بودند که خصوصیات و عملکرد آن‌ها تعیین نشده بود و از ۹۹ ژن باقیمانده ۲۷ تا مربوط به گیرنده‌های بویایی بودند که بیشتر (۲۴ ژن) روی کروموزوم ۷ و بقیه روی کروموزوم ۱۰ قرار داشتند (جدول ۱). اطلاعات مربوط به ۷۲ ژن دیگر به تفکیک مناطق ژنومی مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است. در این بخش فقط برخی از ژن‌ها را که احتمالاً تحت انتخاب بوده‌اند برجسته شده و مورد بحث و تحلیل قرار گرفت. تعدادی از این ژن‌ها که در این بررسی به‌عنوان نشانه‌های انتخاب گزارش شده‌اند، با مطالعات قبلی هم‌خوانی داشت. سپس ژن‌های به‌دست‌آمده در این بخش در DAVID و EnrichmentMap جهت تعیین و مشخص کردن مسیرهای بیولوژیکی و شبکه‌های ژنی مورد بررسی قرار گرفت. ولی هیچ شبکه یا مسیر بیولوژیکی معنی‌دار به‌دست نیامد.

یک‌سری از ژن‌های انتخابی مربوط ژن‌های درگیر با حس بویایی است. بوها به‌وسیله یک خانواده بزرگ از گیرنده‌های بویایی (Olfactory Receptor) تشخیص داده می‌شوند. گیرنده‌های بویایی برای شناسایی دامنه وسیعی از بوها و محرک‌های شیمیایی (برای یافتن غذا، پیدا کردن جفت و بچه‌هایشان و تشخیص قلمرو) ضروری هستند (Ache & Young, 2005). این گیرنده‌های بویایی توالی‌های پروتئینی متفاوتی دارند و بر اساس همین توالی‌ها به زیر خانواده‌های خاص اختصاص دارند. اعضای مربوط به هر زیر خانواده،

جدول ۱. فهرست ژن‌ها و QTL‌های کاندیدای مربوط به نواحی تحت انتخاب بین دو نژاد گاومیش آذری و مازندرانی براساس اطلاعات ژن‌ها و QTL‌های منتشر شده گاومیش *

Table 1. List of candidate genes in regions showing evidence of selection in Azeri vs Mazandarani buffalo breeds based on bovine published QTLs

Chr	Start pos (bp)	End pos (bp)	Genes	QTL_Name	QTL_ID	QTL Ref.
2	71554509	72554509	DBI-TMEM37-CFAP221-PTPN4-EPB41L5-RALB-INHBB-TMEM177	Age at puberty	29883	(Hawken <i>et al.</i> , 2012)
				Interval to first estrus after calving	30252	(Hawken <i>et al.</i> , 2012)
3	77736186	78736186	GNG12-SERBP1-C1orf141-SLC35D2-	Body weight (birth)	15715	(Imumorin <i>et al.</i> , 2011)
3	95229402	96229402	EPS15-TTC39A-FAF1	Calving ease (maternal)	30487	(Höglund <i>et al.</i> , 2012)
3	99725149	100725149	CYP4A22-EFCAB14-ATPAF1-MOB3C-MKNK1-KNCN-POMGNT1-PIK3R3	Stillbirth (maternal)	30488	(Höglund <i>et al.</i> , 2012)
				Calving index	30484	(Höglund <i>et al.</i> , 2012)
5	15749145	16749145	-	-	-	-
7	42527464	43527464	TRIM58 -(24 OR genes)	Milk protein %	2476	(Ashwell <i>et al.</i> , 2004)
				Productive life Length	2665	(McClure <i>et al.</i> , 2010)
				Carcass weight	10800	(McClure <i>et al.</i> , 2010)
				Marbling score (EBV)	10799	(McClure <i>et al.</i> , 2010)
				Heat intensity	5004	(Höglund <i>et al.</i> , 2009)
				Somatic cell count	2698	(Kuhn <i>et al.</i> , 2003)
8	79832563	80832563	NAA35	-	-	-
10	25319029	26319029	SALL2-METTL3-RAB2B-CHD8-SUPT16H-HNRPC-ZNF219-NDRG2-RAC1-BRN-C10H15ORF41-OR10G3-OR5AUI-RNASE13	-	-	-
10	31920032	32920032	-	Calving ease (maternal)	15185	(Sahana <i>et al.</i> , 2011)
15	29305596	30305596	CD3E-CD3G-UBE4A-ATP5L-KMT2A-TTC36-TMEM25-ARCN1-PHLDB1-BLR1-UPK2-FOXRI-CCDC84-TRAPPC4-TRAPPC4-VPS11-HMBS-C2CD2L-HINFP-ABCG4-NLRX1-PDZD3	Body weight (mature)	10997	(Seidenspinner <i>et al.</i> , 2009)
				Stillbirth (maternal)	11357	(Doran <i>et al.</i> , 2014)
				Lean meat yield	37093	(Doran <i>et al.</i> , 2014)
				Subcutaneous fat	36661	(Doran <i>et al.</i> , 2014)
				Carcass weight	37269	(Doran <i>et al.</i> , 2014)
16	50439245	51439245	-	Milk stearic acid%	32579	(Strillacci <i>et al.</i> , 2014)
				Milk fat %	34353	(Strillacci <i>et al.</i> , 2014a)
				Somatic cell count	32450	(Strillacci <i>et al.</i> , 2014b)
				Linoleic acid%	32298	(Strillacci <i>et al.</i> , 2014b)
				Trans-vaccenic acid%	32342	(Strillacci <i>et al.</i> , 2014b)
				Fat thickness	24653	(Saatchi <i>et al.</i> , 2014)
16	50439245	51439245	-	Milk protein yield	6109	(Saatchi <i>et al.</i> , 2014)
				Body weight (birth)	23858	(Daetwyler <i>et al.</i> , 2008)
				Residual feed intake	23859	(Daetwyler <i>et al.</i> , 2008)
				Metabolic body weight	23861	(Lu <i>et al.</i> , 2013)
				Body weight (weaning)	23864	(Lu <i>et al.</i> , 2013)
17	45435662	46435662	GOLGA3-ANKLE2-POLE-WBSCR17-DDX51	-	-	-
X	47524	1047524	-	-	-	-
X	22749342	23749342	F9-AT2	-	-	-

* نتایج بر اساس اطلاعات توالی ژنوم گاو (UMD3.1 Bos Taurus) نشان داده شده است.

* Results are shown based on bovine published genome sequence (UMD3.1 Bos Taurus)

چندین ژن مهم دیگر که در مناطق تحت انتخاب قرار گرفته‌اند ژن‌هایی هستند که در رشد حیوان نقش داشتند. از این میان ژن‌های PTPN4، EPB41L5 و KNCN در توسعه و تشکیل ماهیچه‌های بدنی در INHBB، ژن (EntrezGene; UniProtKB Gene)

از ژن‌های مهم دیگری که هدف انتخاب احتمالی بوده‌اند ژن DBI است که در پاسخ به رفتار ترس، توسعه پوست و فولیکول‌های مو نقش دارد (UniProtKB Gene). همچنین ژن EPB41L5 نیز در توسعه لایه‌های مختلف پوست نقش دارد (UniProtKB Gene).

(2014) نشان دادند که ژن‌هایی از خانواده ژن‌های Wnt از قبیل Wnt6، Wnt5A و Wnt11 با صفات مربوط به تولید شیر ارتباط دارند.

از جایگاه‌های ژنی مهم دیگر که در این بررسی به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی شدند، ژن‌های CD3E و BLR1 می‌باشند. این ژن‌ها در توسعه و فعال سازی سلول‌های ایمنی از قبیل لنفوسیت‌های T و B و پاسخ ایمنی نقش دارند (UniProtKB Gene). همچنین ژن NLRX1 تولید اینترلوکین و کنترل منفی در پاسخ ایمنی نقش دارد. جمع‌بندی نتایج مربوط به اطلاعات ژن‌ها نشان می‌دهد که ژن‌های انتخابی نقش اساسی در رشد و توسعه بافت‌های بدن، فرآیندهای متابولیکی، سیستم ایمنی، توسعه مغز و ادراکات حسی از قبیل حس بویایی دارند. برخی از این ژن‌ها از قبیل ژن‌های درگیر در حس بویایی، توسعه مغز و سیستم ایمنی احتمالاً در مسیرهای بیولوژیکی دخالت دارند که با اهلی شدن حیوانات ارتباط دارد (Qanbari *et al.*, 2014). ژن‌های درگیر در تولید عمدتاً به رشد ارتباط داشته و ژن‌های درگیر در تولید شیر در نواحی تحت انتخاب حضور کم‌رنگ‌تری داشتند. علاوه بر ژن‌های شناسایی‌شده در مناطق تحت انتخاب، یکسری QTL در این مناطق شناسایی شدند (جدول ۱). این QTL‌ها عمدتاً با صفات مربوط به رشد از قبیل وزن بدن در تولد، شیرگیری و بلوغ، چربی زیر پوستی، تولید گوشت لخم و وزن لاشه ارتباط دارد. QTL‌های مرتبط با تولید شیر، فقط با کیفیت شیر و تعداد سلول‌های شیر ارتباط دارند. گوساله‌زایی آسان و گوساله‌اندازی نیز از صفات دیگری هستند که احتمالاً در بین دو نژاد تحت انتخاب بوده‌اند. QTL‌های شناسایی‌شده در مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Mokhber *et al.* (2015) مطابقت داشت که در آن QTL‌های مرتبط با نواحی تحت انتخاب به‌طور عمده با صفات وزن بدن و کیفیت گوشت، کیفیت شیر تولیدی و گوساله‌زایی آسان ارتباط داشتند. با توجه به اینکه نمونه‌های مورد استفاده (داده‌ها منتشر نشده است) از این دو نژاد در این بررسی از لحاظ صفات تیپ تفاوت‌های معنی‌داری داشتند و همچنین به‌دلیل وجود تفاوت‌های اقلیمی محل پرورش این دو نژاد،

رشد و فعالیت فاکتور رشد، ژن NAA35 در ساختار ماهیچه‌های صاف و ژن SLC35D2 در توسعه سیستم اسکلتی جنین، نقش دارند. وجود این ژن‌ها در نواحی تحت انتخاب با توجه به تفاوت اندازه‌های بدنی در دو نژاد مورد بررسی، دور از انتظار نبوده و به نوعی مؤید فرض تحقیق است. برخی از این ژن‌های مثل ژن INHBB علاوه بر نقش بیولوژیکی عنوان شده، در تخمک‌گذاری و توسعه اووسیت‌ها، ترشح انسولین و پاسخ به گرسنگی نقش داشتند. علاوه بر ژن‌های مذکور که در رشد و توسعه بافت‌های بدن نقش دارند یکسری از ژن‌های دیگر که در مسیرهای بیولوژیکی مرگ و میر سلولی و فرآیندهای متابولیکی نقش دارند نیز با رشد و بافت‌های بدنی ارتباط دارند. تعدادی از ژن‌هایی که در این بررسی به‌عنوان نشانه انتخاب شناسایی شدند از قبیل CD3E، RALB، FAF1، NAA35 و AT2 در مرگ‌ومیر سلولی نقش دارند. این ژن‌ها در واقع نقش ضد آپوپتوسیزی داشته‌اند. در مطالعه Mokhber *et al.* (2015) ژن DNAJB1 که پروتئین باین‌دینگ استرس گرمایی را کد می‌کند و در مرگ و میر سلولی نقش دارد به‌عنوان نشانه انتخاب شناسایی شد. مطالعات دیگری نشان دادند که ترکیب ژن DNAJA1/Hsp70 بخاطر نقش ضد آپوپتوسیزی، در بافت و تردی گوشت گاوهای گوشتی اثر دارد (Bernard *et al.*, 2007). این نتیجه را می‌تواند به ژن‌هایی که در مطالعه حاضر نقش ضد آپوپتوسیزی داشتند، تعمیم داد. همچنین چند ژن از خانواده TMEM بر روی کروموزوم‌های ۲ و ۱۵ شناسایی شد که با تشکیل تومورهای سرطانی در انسان ارتباط دارند (Hrašovec *et al.*, 2013)، گزارشی از نقش این خانواده ژنی در صفات تولیدی و رشد حیوانات اهلی یافت نشد. ژن CHD8 در توسعه مغز نقش داشته و ضمناً این ژن نقش تنظیمی منفی در مسیر سیگنال‌دهی Wnt دارد (HGNC Symbol). مسیر Wnt در چندین مرحله از مراحل رشد و تمایز بافت پستانی در مراحل قبل و بعد از تولد درگیر است (Alexander *et al.*, 2012) و ژن‌های درگیر در این مسیر بیولوژیکی می‌توانند به‌عنوان کاندیدای ژن‌های درگیر در تولید شیر مطرح باشند. Raven *et al.*

انتخاب حضور کم‌رنگ‌تری داشتند. علاوه بر ژن‌های شناسایی شده در مناطق تحت انتخاب، QTL‌های شناسایی شده در مناطق تحت انتخاب عمدتاً با صفات مربوط به رشد بوده و QTL‌های شناسایی شده مرتبط با تولید شیر، فقط با کیفیت شیر و تعداد سلول‌های شیر ارتباط نشان دادند. نتایج به‌دست آمده از این بررسی می‌تواند در تحلیل تفاوت‌های بین دو نژاد و برنامه‌ریزی‌های اصلاح نژادی مفید باشد. در هر صورت، جهت شناسایی نقش دقیق این ژن‌ها بایستی مطالعات ارتباطی انجام گیرد.

سپاسگزاری

از مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور و مراکز امور دام استان‌های خوزستان، کرمانشاه و مازندران و شرکت دانشگاهی و دانش‌بنیان توسعه کشت و دام نواندیش البرز که حمایت مالی این پروژه را بر عهده داشتند و به‌خاطر همکاری‌شان در نمونه‌برداری و ثبت رکورد صفات تیپ و تولید و همچنین از مؤسسه تحقیقاتی Padano به‌خاطر کمک‌های ارزنده‌شان در خصوص تعیین ژنوتیپ و از جناب آقای دکتر صابر قنبری و دکتر محمدحسین مرادی به‌جهت راهنمایی‌های ارزنده ایشان در خصوص آنالیز داده‌ها، تشکر و قدردانی می‌گردد.

وجود این تفاوت‌ها محتمل بود و شناسایی این محل‌های ژنتیکی از مقایسه ژنومیکی بین این دو نژاد وجود این تفاوت‌ها را تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق پویس ژنومی جهت شناسایی نشانه‌های انتخاب در نژادهای گاومیش ایرانی آذری و مازندرانی انجام شد و نشانه‌های انتخاب در بخش‌هایی از ژنوم شناسایی شد که در مطالعات قبلی در انسان، گاو و دام‌های اهلی دیگر نیز تأیید شده بودند. همچنین مطالعه حاضر جزو اولین مطالعات انجام‌گرفته روی ژنوم گاومیش جهت شناسایی نشانه‌های انتخابی بوده و دارای اهمیت علمی فراوان است. همان‌طور که در بخش نتایج و بحث نیز آورده شد جمع‌بندی نتایج مربوط به اطلاعات ژن‌ها نشان می‌دهد که ژن‌های انتخابی نقش اساسی در رشد و توسعه بافت‌های بدن، فرآیندهای متابولیکی، سیستم ایمنی، توسعه مغز و ادراکات حسی از قبیل حس بویایی دارند. برخی از این ژن‌ها از قبیل ژن‌های درگیر در حس بویایی، توسعه مغز و سیستم ایمنی احتمالاً در مسیرهای بیولوژیکی دخالت دارند که با اهلی شدن حیوانات ارتباط دارد. ژن‌های درگیر در تولید نیز عمدتاً به رشد ارتباط داشته و ژن‌های درگیر در تولید شیر در نواحی تحت

REFERENCES

1. Ache, B. W. & Young, J. M. (2005). Olfaction: Diverse Species, Conserved Principles. *Neuron*, 48, 417-430.
2. Akey, J. M. (2009). Constructing genomic maps of positive selection in humans: Where do we go from here?. *Genome Research*, 19, 711-722.
3. AGRI. (2014). <http://amar.maj.ir>
4. Akey, J. M., Zhang, G., Zhang, K., Jin, L. & Shriver, M. D. (2002). Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Research*, 12(12), 1805-1814.
5. Alberts, C. C., Ribeiro-Paes, J. T., Aranda-Selverio, G., Cursino-Santos, J. R., Moreno-Cotuli, V. R., Oliveir, A. L. D., Santos Departamento, W. F. & Souza, E. B. (2010). DNA extraction from hair shafts of wild Brazilian felids and canids. *Genetics and Molecular Research*, 9 (4), 2429-2435.
6. Alexander, C. M., Goel, S., Fakhraldeen, S. A. & Kim, S. (2012). Wnt signaling in mammary glands: plastic cell fates and combinatorial signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(10), 8037-8042.
7. Amaral, M. E., Owens, K. E., Elliott, J. S., Fickey, C. & Schaffer, A. A. (2007). Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. *Animal Genetics*, 38, 311-314
8. Amato, R., Pinelli, M., Monticelli, A., Marino, D., Miele, G. & Cocozza, S. (2009). Genome-Wide Scan for Signatures of Human Population Differentiation and Their Relationship with Natural Selection, Functional Pathways and Diseases. *PLoS ONE*, 4(11), 7927-7933.
9. Ashwell, M. S., Heyen, D. W., Sonstegard, T. S., Van-Tassell, C. P., Da, Y., VanRaden, P. M., Ron, M., Weller, J. I. & Lewin, H. A. (2004). Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 87(2), 468-475.

9. Azizi, Z., Rafat, A., Shoja, J., Moradi Shahrababak, H. & Moradi Shahrababak, M. (2016). Study of population structure and stratification two ecotypes buffalo with dense single nucleotide polymorphism markers using Admixture, MDS, PCA and GC methods. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 8(2), 53-67.
10. Bernard, C., Cassar-Malek, I., Le Cunff, M., Dubroeuq, H., Renand, G. & Hocquette, J. F. (2007). New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5229-5237.
11. Barendse, W., Harrison, B. E., Bunch, R. J., Thomas, M. B. & Turner, L. B. (2009). Genome wide signatures of positive selection, the comparison of independent samples and the identification of regions associated to traits. *BMC Genomics*, 10, 178-192.
12. Biswas, S. & Akey, J. M. (2006). Genomic insights into positive Selection. *Trends in Genetics*, 22(8), 437-436.
13. Borghese, A. (2005). Buffalo Production and Research. FAO. 315.
14. Borghese, A. (2011). Situation and perspectives of buffalo in the world, Europe and Macedonia. *Macedonian Journal of Anim Science*, 1(2), 281-296.
15. Buitenhuis, B., Janss, L. L., Poulsen, N. A., Larsen, L. B., Larsen, M. K. & Sørensen, P. (2014). Genome-wide association and biological pathway analysis for milk-fat composition in Danish Holstein and Danish Jersey cattle. *BMC genomics*, 15(1), 1112-1118.
16. Campbell, A. M., Williamson, J., Padula, D. & Sundby, S. (1997). Use PCR & Single Hair to produce a "DNA Fingerprint". *The American Biology Teacher*, 59(3), 172-178.
17. Chen, R., Irwin, D. M. & Zhang, Y. P. 2012. Differences in Selection Drive Olfactory Receptor Genes in Different Directions in Dogs and Wolf. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 3475-3484.
18. Cole, J., Van-Raden, P., O'Connell, J., Van-Tassell, C., Sonstegard, T., Schnabel, R., Taylor, J. & Wiggans, G. (2009). Distribution and location of genetic effects for dairy traits. *Jornal of Dairy Science*, 92(6), 2931-2946.
19. Daetwyler, H. D., Schenkel, F. S., Sargolzaei, M. & Robinson, J. A. B. (2008). A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. *Journal of Dairy Science*, 91 (8), 3225-36.
20. Doran, A. G., Berry, D. P. & Creevey, C. J. (2014). Whole genome association study identifies regions of the bovine genome and biological pathways involved in carcass trait performance in Holstein-Friesian cattle. *BMC genomics*, 15, 837-843.
21. Ensembl BioMart: Ensembl online genome database BioMart Tool. <http://www.ensembl.org/biomart/martview/>.
22. EntrezGene: NCBI Resources EntrezGene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
23. FAO. (2013). FAO statistics website. <http://www.fao.org/statistics/en/>
24. FAO. (2014). FAO statistics website. <http://www.fao.org/statistics/en/>
25. Gibbs, R. A., Taylor, J. F., Van Tassell, C. P., Barendse, W., Eversole, K. A., Gill, C. A., Green, R. D., Hamernik, D. L., Kappes, S. M., Lien, S. & et al. (2009). Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science*, 324(5926), 528-532.
26. Grimberg, J., Nawoscihik, S., Belluscio, L., McKee, R., Turk, A. & Eisenberg, A. (1989). A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Research*, 17, 83-90.
27. Groenen, M. A. M., Archibald, A. L., Uenishi, H., Tuggle, C. K., Takeuchi, Y. & et al. (2012). Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, 491, 393-398.
28. Hawken, R. J., Zhang, Y. D., Fortes, M. R. S., Collis, E., Barris, W. C., Corbet, N. J. & et al. (2012). Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. *Journal of animal science*, 90(5), 1398-410.
29. Hider, J. L., Gittelman, R. M., Shah, T., Edwards, M., Rosenbloom, A., Akey, J. M. & Parra, E. J. (2013). Exploring signatures of positive selection in pigmentation candidate genes in populations of East Asian ancestry. *BMC Evolutionary Biology*, 13, 150-160.
30. Höglund, J. K., Guldbandsen, B., Lund, M. S. & Sahana, G. (2012). Analyzes of genome-wide association follow-up study for calving traits in dairy cattle. *BMC Genetics*, 13, 71-77.
31. Hoglund, J. K., Guldbandsen, B., Su, G., Thomsen, B. & Lund, M. S. (2009). Genome scan detects quantitative trait loci affecting female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 92(5), 2136-43.
32. Hrašovec, S., Hauptman, N., Glavač, D., Jelenc, F. & Ravnik-Glavač, M. (2013). TMEM25 is a candidate biomarker methylated and down-regulated in colorectal cancer. *Disease markers*, 34, 93-104.
33. Imumorin, I. G., Kim, E. H., Lee, Y. M., De Koning, D. J., van Arendonk, J. A., De Donato, M., Taylor, J. F. & Kim, J. J. (2011). Genome scan for parent-of-origin QTL effects on bovine growth and carcass traits. *Frontiers in Genetics*, 2, 44-49.

34. Kijas, J.W., Lenstra, J.A., Hayes, B., Boitard, S., Neto, L.R.P., San Cristobal, M., Servin, B., McCulloch, R., Whan, V., Gietzen, K. & Paiva, S. (2012). Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. *PLoS Biology*, 10(2), e1001258. doi:10.1371/journal.pbio.1001258.
35. Kimura, M. (1985). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, New York.
36. Kuhn, C., Bennewitz, J., Reinsch, N., Xu, N., Thomsen, H., Looft, C., Brockmann, G. A., Schwerin, M., Weimann, C., Hiendleder, S., Erhardt, G. & Medjugo, S. (2003). Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 360-8.
37. Leutenegger, A. L., Prum, B., Génin, E., Verny, C., Lemainque, A., Clerget-Darpoux, F. & Thompson, E. A. (2003). Estimation of the inbreeding coefficient through use of genomic data. *The American Journal of Human Genetics*, 73, 516-523.
38. Li, C., Sun, D., Zhang, S., Wang, S., Wu, X., Zhang, Q., Liu, L., Li, Y. & Qiao, L. (2014). Genome wide association study identifies 20 novel promising genes associated with milk fatty acid traits in Chinese Holstein. *PloS ONE*, 9(5), e96186.
39. Lu, D., Miller, S., Sargolzaei, M., Kelly, M., Vander Voort, G., Caldwell, T., Wang, Z., Plastow, G. & Moore, S. (2013). Genome-wide association analyses for growth and feed efficiency traits in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 91(8), 3612-33.
40. Malnic, B., Godfrey, P. A. & Buck, L. B. (2004). The human olfactory receptor gene family. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(8), 2584-2589 2.
41. McClure, M. C., Morsci, N. S., Schnabel, R. D., Kim, J. W., Yao, P., Rolf, M. M., McKay, S. D., Gregg, S. J., Chapple, R. H., Northcutt, S. L. & Taylor, J. F. (2010). A genome scans for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. *Animal Genetics*, 41(6), 597-607.
42. Mirhabibi, S., Manafiazar, G. H., Qaravisi, S. & Mahmoodi, B. (2007). Inbreeding and its effect on some productive traits in buffaloes of South Iran. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 372-376.
43. Misra, A. & Tyagi, S. (2010a). In vivo embryo production in buffalo: present and perspectives. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 74-91.
44. Moaen-ud-Din, M. (2014). Buffalo genome research - a review. *Animal Science Papers and Reports*, 32 (3), 187-199.
45. Mokhber, M. (2015). *A genome-wide scan for Selective signatures in Iranian buffalo breeds*. Ph.D. thesis, University of Tehran.
46. Mokhber, M., Moradi, M., Sadegi, M., Moradi, H. & Williams, J. (2015). Genome-Wide Survey of signature of positive selection in Khuzestani and Mazandrani buffalo breeds. *Iranian Journal of Animal Science*, 46(2), 119-131.
47. Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds, K. G. & McEwan, J. C. (2012). Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. *BMC Genetics*, 13, 10.
48. Moreno-Estrada, A., Casals, F., Rami´rez-Soriano, A., Oliva, B., Calafell, F. & et al. (2008). Signatures of Selection in the Human Olfactory Receptor OR511 Gene. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 144-154.
49. Naserian, A. A. & Saremi, B. (2010). Water buffalo industry in Iran. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 1404-5.
50. Nicolazzi, E. L., Iamartino, D. & Williams, J. L. (2014). AffyPipe: an open-source pipeline for Affymetrix Axiom genotyping workflow. *Bioinformatics*, 30(21), 3118-3119.
51. Nielsen, R. & Yang, Z. (1988). Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics*, 148, 929-936.
52. Othman, O. E. (2006). Restriction fragment length polymorphism and gene mapping of two genes associated with composition in Egyptian river buffalo. *Journal of Dairy Science*, 1(1), 84-92.
53. Pérez O'Brien, A. M., Utsunomiya, Y. T., Gábor Mészáros, V. B., Bickhart, D. M., Liu, G. E., Van Tassell, C. P., Sonstegard T. S., Silva, M. D., Garcia, J. F. & Sölkner, J. (2014). Assessing signatures of selection through variation in linkage disequilibrium between taurine and indicine cattle. *Genetics Selection Evolution*, 46, 19-25.
54. Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A., and Reich, D. 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 38, 904-909.
55. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J. & Sham, P. C. (2007). PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *The American Journal of Human Genetics*, 81, 559-575.
56. Qanbari, S., Pausch, H., Jansen, S., Somel, M., Strom, T.M., Fries, R., Nielsen, R. & Simianer, H. (2014). Classic Selective Sweeps Revealed by Massive Sequencing in Cattle. *PLoS Genetics*, 10(2), e1004148. doi:10.1371/journal.pgen.1004148

57. Qanbari, S., Strom, T. M., Haberer, G., Weigend, S., Gheyas, A. A., Turner, F., Burt, D. W., Preisinger, R., Gianola, D. & Simianer, H. (2012) A High Resolution Genome-Wide Scan for Significant Selective Sweeps: An Application to Pooled Sequence Data in Laying Chickens. *PLoS ONE*, 7(11), e49525. doi:10.1371/journal.pone.0049525.
58. R version3.0.2 [computer software]. (2013). [http:// www.r-project.org/](http://www.r-project.org/).
59. Raven, L. A., Cocks, B. G., Goddard, M. E., Pryce, J. E. & Hayes, B. (2014). Genetic variants in mammary development, prolactin signalling and involution pathways explain considerable variation in bovine milk production and milk composition. *Genetics Selection Evolution*, 46, 29-36.
60. Rodriguez-Zas, S. L., Southey, B. R., Heyen, D. W. & Lewin, H. A. (2002). Detection of quantitative trait loci influencing dairy traits using a model for longitudinal data. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2681-91.
61. Rubin, C. J., Zody, M. C., Eriksson, J., Meadows, J. R., Sherwood, E., Webster, M. T., Jiang, L., Ingman, M., Sharpe, T., Ka, S. & Hallböök, F. (2010). Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. *Nature*, 464, 587-591.
62. Sabeti, P. C., Reich, D. E., Higgins, J. M., Levine, H. Z., Richter, D. J., Schaffner, S. F., Gabriel, S.B., Platko, J. V., Patterson, N. J., McDonald, G. J. & Ackerman, H. C. (2002). Detecting recent positive selection in the human genome from Haplotype structure. *Nature*, 419, 832-837.
63. Sahana, G., Gulbrandtsen, B. & Lund, M. S. (2011). Genome-wide association study for calving traits in Danish and Swedish Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 94, 479-486.
64. Seidenspinner, T., Bennewitz, J., Reinhardt, F. & Thaller, G. (2009). Need for sharp phenotypes in QTL detection for calving traits in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126(6), 455-62.
65. Strillacci, M. G., Frigo, E., Canavesi, F., Ungar, Y., Schiavini, F., Zaniboni, L., Reghenzani, L., Cozzi, M. C., Samore, A. B., Kashi, Y., Shimoni, E., Tal-Stein, R., Soller, M., Lipkin, E., & Bagnato, A. (2014a). Quantitative trait loci mapping for conjugated linoleic acid, vaccenic acid and $\Delta(9)$ -desaturase in Italian Brown Swiss dairy cattle using selective DNA pooling. *Animal Genetics*, 45(4), 485-99.
66. Strillacci, M. G., Frigo, E., Schiavini, F., Samoré, A. B., Canavesi, F., Vevey, M., Cozzi, M. C., Soller, M., Lipkin, E., & Bagnato, A. (2014b). Genome-wide association study for somatic cell score in Valdostana Red Pied cattle breed using pooled DNA. *BMC genetics*, 15, 106-115.
67. Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
68. Teo, Y. Y., Fry, A. E., Clark, T. G., Tai, E. S. & Seielstad, M. (2007). On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Human Genetics*, 71, 701-703.
69. The Bovine HapMap Consortium, Gibbs, R. A., Taylor, J. F., Van Tassell, C. P., Barendse, W. & *et al.* (2009) Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. *Science*, 324, 528-532.
70. Utsunomiya, Y. T., O'Brien, A. M. P., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., do Carmo, A. S., Mészáros, G., Sölkner, J. & Garcia, J. F. (2013). Detecting Loci under Recent Positive Selection in Dairy and Beef Cattle by Combining Different Genome-Wide Scan Methods. *PLoS ONE*, 8(5), e64280. doi:10.1371/journal.pone.0064280.
71. Weir, B. S. & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *International Journal of Evolution*, 38, 1358-1370.
72. Yang, S., Li, X., Li, K., Fan, B. & Tang, Z. (2014). A genome-wide scan for signatures of selection in Chinese indigenous and commercial pig breeds. *BMC Genetics*, 15(7), 9. From: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/15/7>.