

بررسی الگوی عدم تعادل پیوستگی در سه نژاد از گوسفندان بومی ایران

سمیه بارانی^۱، محمد مرادی شهربابک^{۲*}، اردشیر نجاتی جوارمی^۳، محمد حسین مرادی^۴، محسن قلی زاده^۵ مجید خان سفید^۶
۱. ۲. ۳ و ۶. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، استاد، دانشیار و استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و

منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۴. استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه اراک

۵. استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۳)

چکیده

شناخت الگوی عدم تعادل پیوستگی در جمعیت‌های مختلف اطلاعات سودمندی برای بررسی‌های انتخاب ژنومیک (ژنومیک) (GS) و پویس ژنوم یا ژنوم (GWAS) و شناخت معماری ژنتیکی صفات از طریق بررسی فاز پایداری عدم تعادل پیوستگی بین نشانگر و جایگاه صفت کمی فراهم می‌کند. هدف از این پژوهش بررسی عدم تعادل پیوستگی در سه نژاد از گوسفندان بومی ایران (بلوچی، لری-بختیاری و زل) است. بدین منظور از ۱۸۶ نمونه گوسفند (شامل ۹۶ نمونه بلوچی، ۴۵ نمونه لری بختیاری و ۴۵ نمونه زل) خون‌گیری به عمل آمد و با استفاده از آرایه‌های Ovine 50K SNPChip شرکت ایلومینا تعیین ژنوتیپ و آنگاه عدم تعادل پیوستگی در هر نژاد با استفاده از آماره r^2 اندازه‌گیری شد. بنابر نتایج این بررسی، بیشترین میانگین LD در فاصله‌های کمتر از ۱۰Kb در نژاد بلوچی، لری بختیاری و زل به ترتیب 0.392 ± 0.323 ، 0.360 ± 0.308 و 0.340 ± 0.306 برآورد شد. بررسی LD در کروموزوم‌های اتوزوم هر نژاد، کروموزوم‌های ۲۴ و ۲۵ در نژاد بلوچی، ۹ و ۲۱ در نژاد لری بختیاری و ۲۳ و ۲۴ در نژاد زل بیشترین میانگین r^2 را داشتند. بررسی همبستگی عدم تعادل پیوستگی بین نژادهای مختلف، بیشترین پایداری فاز LD را بین نژادهای زل و لری بختیاری نشان داد که احتمال دارد ناشی از وجود نیاکان مشترک بین این نژادها باشد. هر چه میزان LD بالاتر باشد تراکم نشانگری پایین‌تری در بررسی‌های ارتباطی مورد نیاز است. نتایج این بررسی مشخص کرد برای به دست آمدن صحت ۸۵ درصدی (با فرض اینکه دیگر عامل‌های مؤثر بر صحت انتخاب ژنومیک برطرف شده باشد) در بررسی‌های انتخاب ژنومیک و GWAS به آرایه‌هایی با تراکم نشانگری بالاتر از 50K نیاز خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: انتخاب ژنومیک، پویس ژنومیک، لری-بختیاری، زل، بلوچی، عدم تعادل پیوستگی.

The pattern of linkage disequilibrium in three native Iranian sheep breeds

Somayeh Barani¹, Mohammad Moradi-Shahrbabak^{2*}, Ardeshtir Nejati-Javaremi³,
Mohammad Hossein Moradi⁴, Mohsen Gholizadeh⁵ and Majid Khansefid⁶

1, 2, 3, 6. M. Sc. Student, Professor, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Arak, Iran
5. Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Sari, Iran
(Received: Dec. 4, 2016 - Accepted: 22, Jan. 2017)

ABSTRACT

Understanding the pattern of linkage disequilibrium (LD) in different populations provides useful information for genomic selection (GS), genome wide association studies (GWAS) and identification of genetic architecture of traits by estimating the persistence of LD phase between markers and quantitative trait loci (QTL). The aim of this research was to estimate of the extent of LD in three Iranian native sheep breeds. Therefore, 186 blood samples were taken from three sheep breeds (96 Baluchi, 45 Lori-Bakhtiari and 45 Zel) and genotyped by Illumina ovine 50K SNPChip, then linkage disequilibrium in any breed were measured using r^2 . The results showed that the highest average values of r^2 at inter marker distance of less than 10Kb were 0.392 ± 0.323 , 0.360 ± 0.308 and 0.340 ± 0.306 in Baluchi, Lori-Bakhtiari and Zel, respectively. The highest average values of r^2 in autosome chromosomes of each breed were obtained for chromosome 24 and 25 in Baluchi, 9 and 21 in Lori-Bakhtiari and 23 and 24 in Zel. The amount of LD reduced with increasing the distance between markers, the extent of LD was less than 0.1 at inter marker distances greater than 100Kb. The comparison of correlation coefficients LD between different breeds showed a strong persistence of LD phase between Zel and Lori-Bakhtiari breeds which is probably due to recent common ancestors between these two breeds. Generally, with increase amount of LD means that lower marker density in association studies will be required. The results of this study showed to achieve genomic prediction accuracy of 85% (assuming there is no other accuracy limiting factor) and robust GWAS results, the density of markers must be higher than 50K SNPChip.

Keywords: Blochi, Genomic selection (GS), Genome Wide Association Studies (GWAS), Linkage disequilibrium, Lori-Bakhtiars, Zel.

مقدمه

توسعه فناوری‌های توالی‌یابی DNA^۱ و دستیابی به اطلاعات صدها هزار جایگاه نشانگر تک نوکلئوتیدی (SNP)^۲ امکان ارزیابی کل ژنوم و شناسایی مناطق ژنومیک مرتبط با صفات کمی و انتخاب ژنومیک یا ژنومیک (GS)^۳ را به‌جای استفاده از برنامه ارزیابی‌های اصلاح نژاد سنتی فراهم آورده است و از این راه باعث افزایش صحت انتخاب در دام‌های جوان و تسریع در بهبود ژنتیکی حیوانات اهلی شده است. در ارزیابی ژنومیک اثر همه نشانگرهای ژنتیکی در سراسر ژنوم به‌طور همزمان برآورد می‌شوند. در این حالت فرض می‌شود که هر QTL^۴ دست‌کم باید با یک نشانگر در عدم تعادل پیوستگی (LD)^۵ باشد (Meuwissen et al., 2001). عدم تعادل پیوستگی به‌عنوان ارتباط غیر تصادفی میان آلل‌های جایگاه‌های مختلف درون یک جمعیت تعریف می‌شود که به‌طور عمومی ناشی از ارتباط فیزیکی بین جایگاه‌های ژنی است (Khatkar et al., 2008). عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرها و QTLها در برآورد اثر نشانگری جمعیت مرجع در برآورد ارزش اصلاحی جمعیت تأیید استفاده می‌شود. به همین دلیل صحت انتخاب ژنومیک تحت تأثیر میزان و پایداری فاز عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرها و جایگاه صفت کمی قرار می‌گیرد. هرچه این پایداری بالاتر باشد صحت انتخاب ژنومیک بیشتر می‌شود. بنابراین مبنای ارزیابی‌های ژنومیک عدم تعادل پیوستگی است (Meuwissen et al., 2001).

شناخت عدم تعادل پیوستگی در سطح ژنوم اطلاعات مهمی در مورد آسان پیدا کردن ژن‌ها و جهش‌های مرتبط با صفات کمی در بررسی‌های پویش ژنوم (GWAS)^۶، استنباط و توزیع کراسینگ اور، بررسی تنوع و ساختار جمعیتی و تشخیص مناطق ژنومیک که تحت انتخاب قرار گرفته‌اند را فراهم می‌کند (Mokry et al., 2014). به‌طورکلی LD در

بررسی‌هایی که هدف آن‌ها بررسی ارتباط یک نشانگر با نشانگرهای دیگر و ارتباط یک نشانگر با یک مکان ژنی است کاربرد دارد. عدم تعادل پیوستگی تحت تأثیر عامل‌های مختلفی از جمله تاریخچه و ساختار جمعیت مورد بررسی، اندازه جمعیت، نوع و تراکم نشانگری، روش برآورد هاپلوتیپ، نوترکیبی^۷، دقت در ویرایش SNPها، تعادل هاردی-واینبرگ و استفاده از هاپلوتیپ‌های مادری و یا هر دو والد در برآورد LD قرار می‌گیرد (Bohmanova et al., 2010). بررسی الگوی LD در جمعیت‌های حیوانی با روی کار آمدن انتخاب ژنومیک (GS)، بررسی‌های پویش ژنومیک، بررسی تاریخچه و ساختار جمعیتی، از اقدام‌های بسیار ضروری به‌شمار می‌آید. بنابراین محققان زیادی الگوی عدم تعادل پیوستگی را در حیوانات اهلی مختلف بررسی کرده‌اند (Niu et al., 2016). به دلیل اهمیت عدم تعادل پیوستگی بررسی‌های گسترده‌ای در این ارتباط در سطح ژنوم گونه‌های مختلف از جمله انسان (Skipper et al., 2004; Gabriel et al., 2002)، خوک (Badke et al., 2012; Wang et al., 2013)، اسب (Corbin et al., 2010)، سگ (Pfahler & Distl., 2015)، گربه (Alhaddad et al., 2013)، مرغ (Fu et al., 2010; Qanbari et al., 2015)، بز (Brito et al., 2015) و گاو (Biegelmeier et al., 2016; Jasielczuk et al., 2016; Karimi et al., 2015; Niu et al., 2016) صورت گرفته است. عدم تعادل پیوستگی در سطح ژنوم گوسفند اسپانیایی دارای میانگین r^2 برابر ۰/۳۲۹ در فاصله‌های کمتر از ۱۰Kb و در فاصله‌های ۵۰۰Kb-۲۰۰ برابر ۰/۰۶۱ بود (García-Gómez et al., 2012) درحالی‌که این میزان در گوسفندان استرالیایی نژاد بوردر لایستر، مرینو و پول دورست در فاصله‌های کمتر از ۱۰Kb به‌ترتیب ۰/۳۴، ۰/۲۷ و ۰/۳۳ گزارش شده است (Al-Mamun et al., 2015). گوسفند به لحاظ بزرگی جمعیت، تنوع ژنتیکی و نژادی گسترده در کشور بخش بزرگی از ذخایر ژنتیک دامی را شامل می‌شود. بنابراین آگاهی از منابع ژنتیکی، ارزیابی نژادها در شرایط مدیریتی

1. Deoxyribonucleic acid
2. Single-nucleotide polymorphism
3. Genomic Selection
4. Quantitative trait locus
5. Linkage Disequilibrium
6. Genome Wide Association Studies(GWAS)

در بین جایگاه‌های ژنی مختلف تعریف شد. در رابطه با $F_{req.A}$, $F_{freq.a}$, $F_{freq.B}$, $F_{freq.b}$ به ترتیب فراوانی آللی برای آلل‌های A, a, B, b است همچنین به ترتیب $F_{freq.AB}$, $F_{freq.ab}$, $F_{freq.Ab}$, $F_{freq.aB}$ فراوانی هاپلوتیپ‌های AB, ab, Ab, aB هستند (Ardlie *et al.*, 2002). میزان r^2 بین ۰ و ۱ تغییر می‌کند و هنگامی که جایگاه‌های آللی در حالت LD کامل باشند میزان r^2 برابر ۱ و همبستگی ژنتیکی بین این جایگاه‌های آللی ۱۰۰ درصد خواهد بود. r^2 های محاسبه شده در فاصله‌های مختلف برای اندازه کم نمونه‌ها با استفاده از رابطه زیر تصحیح شد.

$$r^2_{Corrected} = \frac{r^2_{computed} - \frac{1}{n}}{1 - \frac{1}{n}}$$

در رابطه با n برابر با شمار هاپلوتیپ موجود در هر نمونه (دو برابر شمار نمونه برای هر جمعیت) در نظر گرفته می‌شود (Gouveia *et al.*, 2014; Karimi *et al.*, 2014; Nilsen *et al.*, 2015). در این بررسی از تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر پایه ماتریس خوشاوندی ژنومیک با استفاده از بسته نرم‌افزاری GeneABEL در محیط R برای شناسایی حیوانات خارج گروه‌های نژادی استفاده شد و سپس پایداری فاز عدم تعادل پیوستگی بین نژادهای مختلف با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون بنابر رابطه زیر به دست آمد:

$$R_{k,k'} = \frac{\sum_{(i,j) \in p} (r_{ij(k)} - \bar{r}_{(k)}) (r_{ij(k')} - \bar{r}_{(k')})}{S_{(k)} S_{(k')}}}$$

در این رابطه $R_{k,k'}$ همبستگی فاز بین $r_{ij(k)}$ از جمعیت k ام و $r_{ij(k')}$ از جمعیت k' ام، $S_{(k)}$ و $S_{(k')}$ به ترتیب انحراف معیار $r_{ij(k)}$ و $r_{ij(k')}$ همچنین $\bar{r}_{(k)}$ و $\bar{r}_{(k')}$ میانگین r_{ij} بین همه نشانگرهای i و j در نسل p ام بین جمعیت k و k' در نظر گرفته می‌شود (Badke *et al.*, 2012). روند کاهش LD در جمعیت‌های مختلف با در نظر گرفتن سطح بهینه عدم تعادل پیوستگی تعیین‌کننده توان شناسایی جایگاه صفات کمی خواهد بود (Qanbari *et al.*, 2010). برای دستیابی به صحت بالای ۸۵ درصد در بررسی‌های

مختلف و بهبود ژنتیکی دام‌ها نسبت به دیگر اقدام‌ها در جهت بهبود عملکرد تولید، اهمیت بسیار بالایی در افزایش بهره‌وری دارد و برای توسعه پایدار دام‌پروری در کشورهای جهان به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه بسیار اثربخش خواهد بود (Shrestha & Fahmy, 2005). با توجه به اهمیت عدم تعادل پیوستگی در بررسی‌های ژنومیک، هدف از این بررسی الگوی عدم تعادل پیوستگی در سه نژاد از گوسفندان بومی ایران خواهد بود.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از ۱۸۶ نمونه گوسفند که شامل ۹۶ نمونه بلوچی، ۴۵ نمونه لری بختیاری و ۴۵ نمونه زل که به ترتیب در تحقیق Gholizadeh *et al.* (2014) و Moradi *et al.* (2012) تعیین ژنوتیپ شده بودند استفاده شد. نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های Ovine 50K SNPChip شرکت ایلومینا تعیین ژنوتیپ شده بود. مراحل ویرایش داده‌های ژنومیک به صورت جداگانه برای هر نژاد با استفاده از نرم‌افزار Plink 1.9 با حذف SNPهایی که در مجموع حیوانات دارای آلل کمیاب (MAF) ^۱ و نسبت فراخوانی (Call rate) ^۲ کمتر از ۰/۰۵ و ۰/۹۵ بودند صورت پذیرفت (Purcell *et al.*, 2007). همچنین SNPهایی که به میزان زیاد (10^{-6}) از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف داشتند از تجزیه‌های نهایی کنار گذاشته شدند. فازبندی داده‌های ژنوتیپی ویرایش شده با استفاده از نرم‌افزار Beagle 3.3.2 انجام شد (Browning, 2011) و ورودی نرم‌افزار Haploview برای اندازه‌گیری LD ایجاد شد (Barrett *et al.*, 2005). الگوی عدم تعادل پیوستگی در بررسی موردنظر با استفاده از اسمبلی OAR 3.1 و با استفاده از آماره r^2 برای نشانگرهای مجاور هم و بر پایه رابطه زیر در فاصله کمتر از ۲۰ Mb محاسبه شد.

$$r^2 = \frac{(Freq.AB * Freq.ab - Freq.Ab * Freq.aB)^2}{(Freq.A * Freq.a * Freq.B * Freq.b)}$$

r^2 به عنوان همبستگی ژنتیکی بین دو جایگاه ژنی توسط هیل و رابرتسون (۱۹۶۸) برای اندازه‌گیری LD

1. Minor allele frequency (MAF)

۲. درصدی از نمونه‌ها که برای آن نشانگر ژنوتیپ با کیفیت دارند.

تعیین ژنوتیپ شده بود. پس از مراحل ویرایش داده‌های ژنومیک در مجموع ۴۳۰۹۱، ۴۲۵۴۰ و ۴۲۶۴۰ نشانگر SNP به ترتیب در ۴۵ نمونه گوسفند زل، ۴۵ نمونه لری بختیاری و ۸۸ نمونه بلوچی روی کروموزوم‌های اتوزوم برای انجام تجزیه‌های بعدی انتخاب شدند (جدول ۱). فراوانی آلل کمیاب از جمله عامل‌هایی است که میزان عدم تعادل پیوستگی را تحت تأثیر قرار می‌دهد میانگین این فراسنجه پس از حذف نشانگرهایی که $MAF < 0.05$ داشتند در نژاد بلوچی، زل و لری بختیاری به ترتیب ۰/۲۸، ۰/۲۹ و ۰/۲۹ نشان می‌دهد در حالی که پیش از ویرایش داده‌ها میانگین MAF در نژاد زل، لری بختیاری و بلوچی به ترتیب ۰/۲۷، ۰/۲۷ و ۰/۲۵ بود (شکل ۱).

انتخاب ژنومیک LD بالاتر از ۰/۲ توصیه می‌شود. سطح بهینه r^2 در انتخاب ژنومیک ۰/۲ و در بررسی‌های ارتباطی ۰/۳ در نظر گرفته می‌شود (Mokryet al., 2014). در این پژوهش با بررسی روند کاهش r^2 و با در نظر گرفتن سطح بهینه ۰/۲ تراکم نشانگری مورد نیاز برای بررسی‌های انتخاب ژنومیک در هر نژاد تعیین شد.

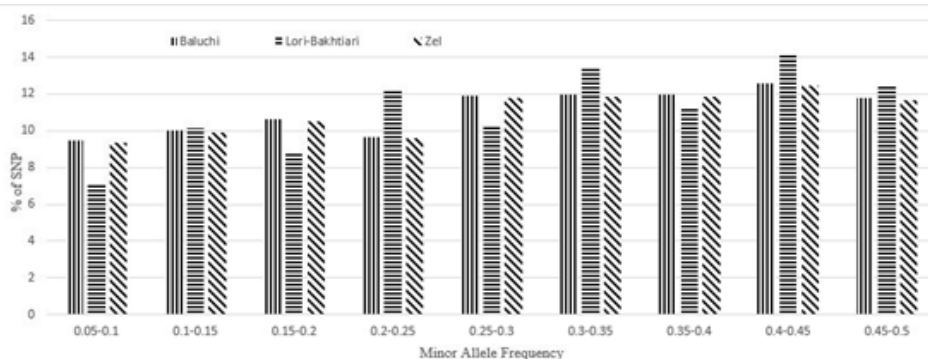
نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از کنترل کیفیت داده‌های ژنوتیپی به طور کلی شمار ۵۱۱۰۳ نشانگر برای ۹۶ حیوان بلوچی، ۴۵ نمونه زل و ۴۵ نمونه لری بختیاری با استفاده از آرایه Illumina OvineSNP50K Beadchip

جدول ۱. مراحل مختلف کنترل کیفیت داده‌های ژنوتیپی مربوط به هر نژاد

Table 1. Summary of quality control steps on genotyping data of different sheep breeds

Breeds	Excluding unknown SNPs	$MAF \leq 5\%$	SNP Call Rate $\leq 95\%$	Animal Call Rate $\leq 95\%$	$H-W \geq 10^{-6}$	Excluding the sexual chromosomes SNPs	SNPs remaining
Baluchi	746	6359	187	8	5	1166	42640
Lori-Bakhtiari	746	4742	1893	0	6	1176	42540
Zel	746	4330	1760	0	11	1165	43091



شکل ۱. توزیع SNPها در سراسر ژنوم به عنوان تابعی از فراوانی آلل کمیاب در هر نژاد

Figure 1. The distribution of SNPs across the genome as a function of the minor allele frequency (MAF) for each breed

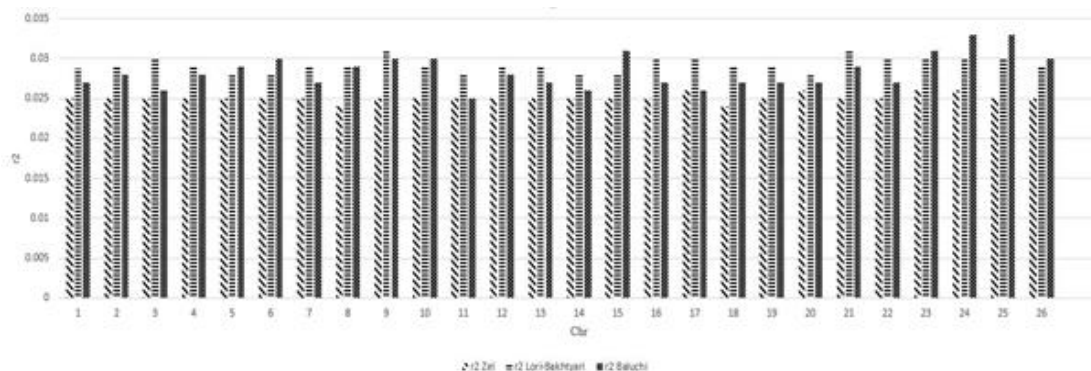
۰/۴۹ گزارش شده است. عدم تعادل پیوستگی در جمعیت‌های مختلف به دلیل تفاوت در اندازه مؤثر جمعیت، نسبت نوترکیبی، فشار انتخاب و دیگر عامل‌های دخیل در اندازه‌گیری LD متفاوت خواهد بود. در این بررسی کروموزوم‌های ۲۴ و ۲۵ در نژاد بلوچی، کروموزوم ۹ و ۲۱ در نژاد لری بختیاری و کروموزوم ۲۳ و ۲۴ در نژاد زل با اختلاف بسیار اندکی نسبت به دیگر کروموزوم‌ها بیشترین میانگین r^2 را

میزان عدم تعادل پیوستگی در نشانگرهای مجاور در هر کروموزوم

انتظار می‌رود میزان عدم تعادل پیوستگی گوسفند در مقایسه با گاو به علت فشار کمتر انتخاب مصنوعی، پایین‌تر باشد. به طور مثال با مقایسه بررسی Biegelmeyer et al. (2016) و García-Gómez et al. (2012) میانگین عدم تعادل پیوستگی (r^2) در فاصله ۱Mb-۰/۵ به ترتیب در گاو (هرفورد) و گوسفند (چورا) ۰/۰۷ و

داشتند (شکل ۲). در حالی که کروموزوم‌های ۱۰، ۲۲ و ۲۳ در گوسفندان اهلی استرالیا بیشترین میانگین LD بالاترین نسبت از بلوک‌های هاپلوتیپی و ناخالصی (هموزایگوسیتی) را نشان می‌دهند (Al-Mamun *et al.*, 2010).

به‌طور کلی تفاوت در میانگین LD کروموزوم‌ها به عامل‌های مختلفی از جمله نسبت نوترکیبی، میزان هموزایگوسیتی، رانش ژنی و اثر ناشی از فشار انتخاب در هر کروموزوم بستگی دارد (Qanbari *et al.*, 2010).



شکل ۲. میانگین ارزش عدم تعادل پیوستگی (r^2) در هر کروموزوم برای نژادهای مختلف
Figure 2. Mean values of linkage disequilibrium (r^2) per chromosome for different breeds

طبیعی در نمونه‌های به‌دست‌آمده از گله‌های بلوچی و لری بختیاری موجود در مراکز اصلاح نژادی و یا ساختار جمعیتی متفاوت در بین این نژادها باشد کاهش اندازه مؤثر جمعیت یکی از عامل‌هایی است که باعث کاهش سطح عدم تعادل پیوستگی در جمعیت‌ها می‌شود. Moradi *et al.* (2012) با بررسی اندازه مؤثر جمعیت در نژاد زل و لری بختیاری از ۲۰ تا ۲۰۰۰ نسل پیش نشان دادند اندازه مؤثر جمعیت از ۴۹۰۰ در هر دو نژاد به ۸۴۰ حیوان در نژاد زل و ۵۳۲ حیوان در نژاد لری بختیاری رسیده است. بنابراین پایین بودن سطح عدم تعادل پیوستگی زل نسبت به لری بختیاری می‌تواند ناشی از اندازه مؤثر بالای آن باشد.

پایداری فاز گامتی بین نژادهای مختلف

تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای اطلاع از یک دیدگاه کلی از ساختار ژنتیکی با استفاده از ماتریس خویشاوندی ژنومیک و به‌عنوان همبستگی ژنتیکی بین حیوانات انجام می‌شود. تجزیه PCA در این بررسی نشان داد ارتباط ژنتیکی بین نژادهای مورد بررسی نیست بنابراین این سه جمعیت از نظر ساختار جمعیتی از همدیگر جداگانه هستند (شکل ۳). پایداری فاز گامتی به‌عنوان میزان سازگاری فاز LD بین نشانگرها در دو

میانگین r^2 با افزایش فاصله بین SNP‌های مجاور کاهش می‌یابد. درصد r^2 بالاتر از ۰/۳ در فاصله‌های کمتر از ۱۰ Kb برای نژادهای بلوچی، لری بختیاری و زل به ترتیب ۴۸، ۴۴ و ۴۱ درصد بود. با افزایش فاصله نشانگرها در طول ژنوم درصد $r^2 > 0/3$ ، میانه و میانگین r^2 کاهش می‌یابد. یکی از عامل‌های بسیار مهم و مؤثر در برآورد میزان عدم تعادل پیوستگی، اندازه نمونه جمعیت‌های مورد بررسی است آماره r^2 نسبت به D' کمتر تحت تأثیر اندازه نمونه قرار می‌گیرد. Khatkar *et al.* (2008) در بررسی عدم تعادل پیوستگی در گاو هلشتاین، کمترین اندازه نمونه برای برآورد LD با استفاده از آماره D' و r^2 را به ترتیب ۴۰۰ و ۷۵ نمونه پیشنهاد کردند. در حالی Bohmanova *et al.* (2010) نشان دادند آماره r^2 در جمعیت‌هایی با اندازه نمونه کمتر از ۲۲ نمونه بیش از حد برآورد خواهد شد. در این بررسی میزان LD در فاصله‌های مختلف برای اندازه کم نمونه تصحیح شده است (جدول ۲). نتایج این بررسی نشان داد عدم تعادل پیوستگی در نژاد زل پایین‌تر از دو نژاد دیگر است با توجه به شرایط نمونه‌گیری در هر نژاد (نمونه‌های مربوط به نژاد زل از گله‌های مردمی و نمونه‌های دیگر نژادهای مورد بررسی از ایستگاه‌های اصلاح نژادی تهیه شده است) می‌تواند ناشی از فشار بالای انتخاب مصنوعی و

از هدف‌های دیگر پایداری فاز عدم تعادل پیوستگی بررسی میزان ارتباط بین جمعیت‌های مختلف است. هرچه پایداری فاز LD بین نژادهای مختلف بالاتر باشد نشان‌دهنده تاریخچه مشترک بین جمعیت‌ها است (Wang *et al.*, 2013). در این بررسی پایداری فاز LD بین نژادهای زل-لری بختیاری بالاتر از لری بختیاری-زل و بلوچی-زل بود که به احتمال ناشی از همسانی اجدادی بیشتری نسبت به دیگر ترکیب‌های نژادی و یا اختلاف در برنامه‌های اصلاح نژادی بین جمعیت‌های مورد بررسی است (شکل ۴).

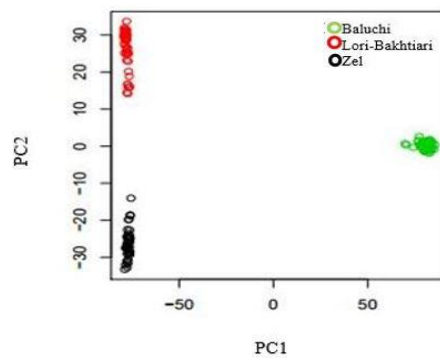
جمعیت مختلف در نظر گرفته می‌شود. بررسی پایداری فاز LD بین نژادهای مختلف اطلاعات بسیار سودمندی برای بررسی انتخاب ژنومیک بین جمعیت‌های آمیخته و تعیین زمان انشقاق نژادها فراهم خواهد آورد (Badke *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). در جمعیت‌هایی با پایداری بالای فاز LD، از اطلاعات ژنومیک بخشی از جمعیت می‌توان برای بررسی‌های مختلف ارزیابی ژنوم استفاده کرد و نتایج آن را به کل جمعیت تعمیم داد (Mokry *et al.*, 2014).

جدول ۲. میانگین ارزش r^2 و \pm انحراف معیار و درصد نشانگرهای با $r^2 > 0.3$ در فاصله‌های مختلف ژنوم اتوزوم
Table 2. Average values of linkage disequilibrium (r^2) and \pm standard deviations and percentage of SNPs with average $r^2 > 0.3$ over different physical distances in autosome genome

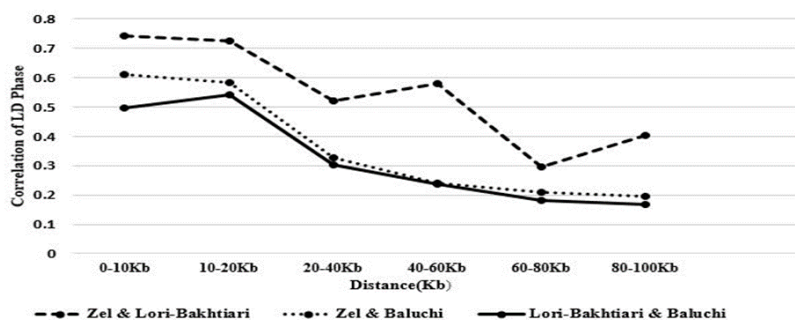
Distance	Baluchi			Lori-Bakhtiari			Zel		
	$r^2 \pm SD$	$r^2 \pm SD$ Corrected	0.3 > r^2 Percentage	$r^2 \pm SD$	$r^2 \pm SD$ Corrected	$r^2 > 0.3$ Percentage	$r^2 \pm SD$	$r^2 \pm SD$ Corrected	$r^2 > 0.3$ Percentage
<10 Kb	0.392 ± 0.323	0.388 ± 0.324	48.45	0.360 ± 0.308	0.353 ± 0.311	44.3	0.340 ± 0.306	0.333 ± 0.309	41.14
10-20 Kb	0.315 ± 0.286	0.311 ± 0.287	38.33	0.280 ± 0.268	0.272 ± 0.271	34.13	0.277 ± 0.263	0.269 ± 0.266	33.26
20-40 Kb	0.247 ± 0.243	0.242 ± 0.245	28.38	0.209 ± 0.217	0.200 ± 0.219	22.68	0.208 ± 0.212	0.199 ± 0.214	23.06
40-60 Kb	0.208 ± 0.213	0.204 ± 0.214	22.5	0.171 ± 0.187	0.161 ± 0.189	16.36	0.164 ± 0.180	0.155 ± 0.183	15.57
60-80 Kb	0.179 ± 0.183	0.174 ± 0.184	17.7	0.140 ± 0.150	0.131 ± 0.152	11.06	0.133 ± 0.149	0.123 ± 0.151	10.57
80-100 Kb	0.164 ± 0.165	0.159 ± 0.165	14.93	0.125 ± 0.134	0.115 ± 0.135	8.46	0.116 ± 0.132	0.106 ± 0.134	7.76
100-200 Kb	0.143 ± 0.141	0.139 ± 0.142	11.44	0.100 ± 0.100	0.090 ± 0.102	4.3	0.088 ± 0.094	0.078 ± 0.095	3.46
200-500 Kb	0.126 ± 0.116	0.121 ± 0.117	8.3	0.082 ± 0.068	0.072 ± 0.068	1.51	0.066 ± 0.053	0.055 ± 0.053	0.63
500 Kb- 1Mb	0.117 ± 0.106	0.112 ± 0.107	6.84	0.076 ± 0.058	0.066 ± 0.059	0.85	0.060 ± 0.040	0.049 ± 0.041	0.15
1-2 Mb	0.108 ± 0.095	0.103 ± 0.096	5.17	0.073 ± 0.053	0.062 ± 0.054	0.59	0.058 ± 0.038	0.048 ± 0.038	0.084
2-5 Mb	0.088 ± 0.074	0.083 ± 0.075	2.69	0.068 ± 0.048	0.058 ± 0.049	0.52	0.057 ± 0.037	0.047 ± 0.037	0.05
5-10 Mb	0.071 ± 0.056	0.066 ± 0.056	0.82	0.064 ± 0.043	0.052 ± 0.044	0.17	0.057 ± 0.036	0.046 ± 0.036	0.046
10- 20 Mb	0.057 ± 0.038	0.051 ± 0.039	0.15	0.061 ± 0.039	0.050 ± 0.040	0.11	0.056 ± 0.035	0.045 ± 0.046	0.042

* SD = Standard deviation

* SD = انحراف معیار



شکل ۳. خوشه‌بندی حیوانات بر پایه تجزیه PCA با استفاده از اطلاعات ژنوتیپ نمونه‌ها
Figure 3. Animals clustered on the basis of principal components analysis using individual genotype



شکل ۴. پایداری فاز گامتی بین نژادهای مختلف در فاصله ۰-۱۰۰Kb در سراسر ژنوم
Figure 4. Persistence of gametic phase between different breeds in 0-100Kb across the genome

بررسی‌های GWAS و انتخاب ژنومیک برای دستیابی به صحت بالای ۸۵ درصد نیاز خواهد بود.

نتیجه‌گیری کلی

یکی از محدودیت‌های این بررسی اندازه کم نمونه بود بنابراین میزان r^2 برای این عامل تصحیح شد. در نهایت نتایج این بررسی نشان می‌دهد عدم تعادل پیوستگی در نژاد بلوچی بالاتر از دو نژاد بررسی شده دیگر است که ناشی از عامل‌های مختلفی از جمله انتخاب، اندازه مؤثر پایین در جمعیت مورد بررسی خواهد بود. بررسی پایداری فاز LD بین نژادهای مورد بررسی به صورت دوه‌دو در فاصله کمتر از ۱۰۰Kb، پایداری بالایی از فاز عدم تعادل پیوستگی بین نژاد لری بختیاری و زل را نشان داد که می‌تواند به تاریخچه مشترک اجدادی بین این نژادها برگردد. میزان r^2 بالاتر از ۰/۲ در هر نژاد برای تعیین سطح سودمند عدم تعادل پیوستگی مشخص کرد برای دستیابی به صحت ۸۵ درصدی در بررسی‌های انتخاب ژنومیک و GWAS به آرایه‌هایی با تراکم نشانگری بالاتر از 50K نیاز خواهد بود.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه مرکز اصلاح نژاد کشور و عباس‌آباد مشهد به دلیل در اختیار گذاشتن حیوانات تحت پوشش و رکوردهای گردآوری شده و همچنین از حمایت‌های مالی مرکز اصلاح نژاد کشور، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، مؤسسه مبارک اندیش، مرکز تحقیقاتی AgResearch نیوزلند و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF)، تشکر و قدردانی می‌گردد.

شواهد و تحقیقات زیادی نشان می‌دهد، اهلی شدن گوسفند ۹۰۰۰ سال پیش از میلاد مسیح در غرب ایران و شرق عراق کنونی صورت گرفت (Zygyiannis, 2006). و با توجه به اینکه نژاد زل یکی از قدیمی‌ترین نژادهای ایرانی است بنابراین احتمال همسانی نژادی با توجه به پایداری فاز عدم تعادل پیوستگی بین این نژادها افزایش خواهد یافت. بررسی اندازه مؤثر جمعیت در دو نژاد زل و لری بختیاری نشان داد، این دو نژاد در ۱۱۰۰ نسل پیش از یکدیگر تمایز پیدا کرده‌اند (Moradi et al., 2012). نتایج این بررسی پایداری فاز عدم تعادل پیوستگی بین نژادهای مختلف در فاصله ۲۰Kb-۱۰ را به‌طور میانگین بالاتر از ۰/۵ نشان داد. بنابراین اگر فاصله بین دو جفت نشانگر کمتر از ۲۰Kb باشد می‌توان انتظار داشت به احتمال ۵۰ درصد فاز عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرها در جمعیت‌های مورد بررسی پایدار خواهد ماند.

سطح سودمند عدم تعادل پیوستگی

شناخت الگوی عدم تعادل پیوستگی برای تعیین تراکم مناسب SNPها در بررسی‌های پویش پیوستگی ژنوم و انتخاب ژنومیک ضروری است (Biegelmeyer et al., 2016). روند کاهش r^2 در این بررسی با در نظر گرفتن LD بالاتر از ۰/۲ نشان داد سطح سودمند عدم تعادل پیوستگی برای بررسی‌های انتخاب ژنومیک در نژاد بلوچی تا حدودی در فاصله ۴۰Kb و در نژاد زل و لری بختیاری در فاصله ۲۷Kb به r^2 کمتر از ۰/۲ می‌رسد بنابراین با توجه به این فاصله‌های نشانگری در دستیابی به سطح سودمند r^2 در هر نژاد، وجود آرایه‌های با تراکم بالاتر از 60K SNPChip در نژاد بلوچی و 90K در نژاد لری بختیاری و زل برای

REFERENCES

1. Alhaddad, H., Khan, R., Grahn, R. A., Gandolfi, B., Mullikin, J. C., Cole, S. A., ... & Lyons, L. A. (2013). Extent of linkage disequilibrium in the domestic cat, *Felis silvestris catus*, and its breeds. *PLoS One*, 8(1), e53537
2. Al-Mamun, H. A., Clark, S., Kwan, P. & Gondro, C. (2015). Genome-wide linkage disequilibrium and genetic diversity in five populations of Australian domestic sheep. *Genetics Selection Evolution*, 47(1), 1.
3. Ardlie, K. G., Kruglyak, L. & Seielstad, M. (2002). Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 3(4), 299-309.
4. Badke, Y. M., Bates, R. O., Ernst, C. W., Schwab, C. & Steibel, J. P. (2012). Estimation of linkage disequilibrium in four US pig breeds. *BMC genomics*, 13(1), 1.
5. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. D. M. J. & Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), 263-265.

6. BEAGLE 3.3.2 (2011). Department of Medicine Division of Medical Genetics University of Washington. Browning, B. L.
7. Biegelmeyer, P., Gulias-Gomes, C. C., Caetano, A. R., Steibel, J. P. & Cardoso, F. F. (2016). Linkage disequilibrium, persistence of phase and effective population size estimates in Hereford and Braford cattle. *BMC genetics*, 17(1), 1.
8. Bohmanova, J., Sargolzaei, M. & Schenkel, F. S. (2010). Characteristics of linkage disequilibrium in North American Holsteins. *BMC genomics*, 11(1), 1.
9. Brito, L. F., Jafarikia, M., Grossi, D. A., Kijas, J. W., Porto-Neto, L. R., Ventura, R. V., ... & Schenkel, F. S. (2015). Characterization of linkage disequilibrium, consistency of gametic phase and admixture in Australian and Canadian goats. *BMC genetics*, 16(1), 1.
10. Corbin, L. J., Blott, S. C., Swinburne, J. E., Vaudin, M., Bishop, S. C. & Woolliams, J. A. (2010). Linkage disequilibrium and historical effective population size in the Thoroughbred horse. *Animal Genetics*, 41(s2), 8-15.
11. Fu, W., Dekkers, J. C., Lee, W. R. & Abasht, B. (2015). Linkage disequilibrium in crossbred and pure line chickens. *Genetics Selection Evolution*, 47(1), 1.
12. Gabriel, S. B., Schaffner, S. F., Nguyen, H., Moore, J. M., Roy, J., Blumenstiel, B., ... & Liu-Cordero, S. N. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 296(5576), 2225-2229.
13. Gholizadeh, M., Rahimi-Mianji, G., Nejati-Javaremi, A., de Koning, D. J. & Jonas, E. (2014). Genome-wide association study to detect QTL for twinning rate in Baluchi sheep. *Journal of genetics*, 93(2), 489.
14. Gouveia, J. J. D. S., Silva, M. V. G. B. D., Paiva, S. R. & Oliveira, S. M. P. D. (2014). Identification of selection signatures in livestock species. *Genetics and molecular biology*, 37(2), 330-342.
15. Hayes, B. J. & Goddard, M. E. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157(4), 1819-1829.
16. Jasielczuk, I., Gurgul, A., Szmatoła, T., Zabek, T., Pawlina, K., Semik, E. & Bugno-Poniewierska, M. (2016). Linkage disequilibrium and haplotype block structure in Limousin, Simmental and native Polish Red cattle. *Livestock Science*, 191, 57-63.
17. Karimi, K., Koshkoivah, A. E. & Gondro, C. (2015). Comparison of linkage disequilibrium levels in Iranian indigenous cattle using whole genome SNPs data. *Journal of Animal Science and Technology*, 57(1), 1.
18. Khatkar, M. S., Nicholas, F. W., Collins, A. R., Zenger, K. R., Cavanagh, J. A., Barris, W., ... & Raadsma, H. W. (2008). Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. *BMC genomics*, 9(1), 1.
19. Lewontin, R. C. (1964). The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics*, 49(1), 49-67.
20. Mokry, F. B., Buzanskas, M. E., de Alvarenga Mudadu, M., do Amaral Grossi, D., Higa, R. H., Ventura, R. V., ... & da Silva, M. V. G. B. (2014). Linkage disequilibrium and haplotype block structure in a composite beef cattle breed. *BMC genomics*, 15(7), 1.
21. 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(1), 1.
22. Nilsen, H., Hayes, B., Berg, P. R., Roseth, A., Sundsaasen, K. K., Nilsen, K. & Lien, S. (2008). Construction of a dense SNP map for bovine chromosome 6 to assist the assembly of the bovine genome sequence. *Animal genetics*, 39(2), 97-104.
23. Niu, H., Zhu, B., Guo, P., Zhang, W., Xue, J., Chen, Y., ... & Li, J. (2016). Estimation of linkage disequilibrium levels and haplotype block structure in Chinese Simmental and Wagyu beef cattle using high-density genotypes. *Livestock Science*, 190, 1-9.
24. Pfahler, S. & Distl, O. (2015). Effective Population Size, Extended Linkage Disequilibrium and Signatures of Selection in the Rare Dog Breed Lundehund. *PLoS one*, 10(4), e0122680.
25. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., ... & Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559-575.
26. Qanbari, S., Hansen, M., Weigend, S., Preisinger, R. & Simianer, H. (2010). Linkage disequilibrium reveals different demographic history in egg laying chickens. *BMC Genetics*, 11(1), 1.
27. Qanbari, S., Pimentel, E. C. G., Tetens, J., Thaller, G., Lichtner, P., Sharifi, A. R. & Simianer, H. (2010). The pattern of linkage disequilibrium in German Holstein cattle. *Animal genetics*, 41(4), 346-356.
28. Shrestha, J. N. B. & Fahmy, M. H. (2005). Breeding goats for meat production: a review: 1. Genetic resources, management and breed evaluation. *Small Ruminant Research*, 58(2), 93-106.
29. Skipper, L., Wilkes, K., Toft, M., Baker, M., Lincoln, S., Hulihan, M., ... & Farrer, M. (2004). Linkage disequilibrium and association of MAPT H1 in Parkinson disease. *The American Journal of Human Genetics*, 75(4), 669-677.
30. Wang, L., Sørensen, P., Janss, L., Ostensen, T. & Edwards, D. (2013). Genome-wide and local pattern of linkage disequilibrium and persistence of phase for 3 Danish pig breeds. *BMC Genetics*, 14(1), 115.
31. Zygoyiannis, D. (2006). Sheep production in the world and in Greece. *Small Ruminant Research*, 62(1), 143-147.