

## پوش ژنگانی نشانه‌های انتخاب مرتبط با بیماری ورم پستان در گاو هلشتاین آلمانی

بیبا عباسی مشایی<sup>۱</sup>، قدرت‌الله رحیمی میانجی<sup>۲\*</sup>، اردشیر نجاتی جوارمی<sup>۳</sup>، محمدحسین مرادی<sup>۴</sup> و سون کونینگ<sup>۵</sup>  
۱. دانشجوی دکتری و استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران  
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران  
۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه اراک، اراک، ایران  
۴. استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه کاسل، ویتزن هوزن، آلمان  
۵. استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه کاسل، ویتزن هوزن، آلمان  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۲)

### چکیده

اهلی‌سازی و انتخاب به شدت در ویژگی‌های ظاهری و رفتاری حیوان‌های اهلی امروزی تغییر ایجاد کرده است. در این مسیر انتخاب‌های انجام شده توسط انسان نشانه‌های قابل شناسایی را در ژنگان (ژنوم) گاوهای امروزی به جا گذاشته که آشکارسازی این نشانه‌ها می‌تواند به اصلاح و بهبود ژنتیکی صفات مهم اقتصادی در این دام‌ها کمک کند. امروزه بیماری ورم پستان یکی از مهم‌ترین چالش‌های اقتصادی در صنعت گاو شیری است که به‌طور عمده به دلیل انتخاب گسترده در دهه‌های اخیر برای افزایش تولید شیر به وجود آمده است. در این تحقیق با هدف شناسایی مناطق ژنگانی مرتبط با ورم پستان، از اطلاعات طرح ملی گاو شیری هلشتاین آلمان استفاده شد. نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های Illumina Bovine 50K SNP تعیین نژادگان (ژنوتیپ) شدند. ۱۳۳ رأس دام بیمار و ۱۳۳ رأس دام سالم بر پایه اطلاعات ثبت شده در رابطه با ابتلا به ورم پستان در نخستین دوره شیردهی برای جستجوی نشانه‌های انتخاب با استفاده از آماره تمایز جمعیتی تا انتخاب شدند. با در نظر گرفتن صدک ۹۹/۹ کل ارزش‌های تا، ده ناحیه ژنگانی روی کروموزوم‌های ۱ (۲ ناحیه)، ۳، ۵، ۶، ۱۴ (۲ ناحیه)، ۲۱ (۲ ناحیه) و ۲۸ شناسایی شد. بررسی‌های بیشتر داده‌های زیستی (بیوانفورماتیک) نشان داد، ژن‌های موجود در این مناطق با سامانه ایمنی و بیماری‌های خود ایمنی، شبکه عصبی، انواع سرطان از جمله سرطان پستان و تولید شیر مرتبط هستند. در مجموع، نتایج این تحقیق می‌تواند منبع اطلاعاتی ارزشمندی در زمینه شناسایی مناطق ژنگانی و در نتیجه ژن‌های مرتبط با ورم پستان در گاو شیری فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: آزمون تا، گاو هلشتاین آلمانی، نشانه‌های انتخاب، ورم پستان.

## Genomic scan for selection signatures associated with mastitis in German Holstein cattle

Bitā Abbasi Moshaii<sup>1</sup>, Ghodratalah Rahimi-Mianji<sup>2</sup>, Ardeshtir Nejadi-Javaremi<sup>3</sup>,  
Mohammad Hossein Moradi<sup>4</sup> and Sven Konig<sup>5</sup>

1, 2. Ph.D. Candidate and Professor, Department of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran

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

4. Assistant Professor, Department of Animal Science, Arak University, Arak, Iran

5. Professor, Department of Animal Science, Kassel University, Witzenhausen, Germany

(Received: Sep. 20, 2017 - Accepted: Dec. 3, 2017)

### ABSTRACT

Domestication and selection has changed behavioral and phenotypic traits in modern domestic animals significantly. The selection of animals by humans left detectable signatures on the genome of modern cattle. The identification of these signals can help us to improve the genetic characteristics of economically important traits in cattle. Nowadays, mastitis is one of the main economically important diseases in dairy cattle that mostly caused by intense selection for milk production in recent decades. In this study, to identify the genomic regions associated with mastitis, the genomic data of national project in Germany Holstein dairy cattle was used. The samples were genotyped using Illumina Bovine 50K SNP. 133 case and 133 control cows were chosen for investigating of selection signatures using Theta ( $\theta$ ) population differentiation statistics. With 99.90 percentile threshold of the obtained Theta ( $\theta$ ) values, 10 genomic regions on chromosomes 1 (2 regions), 3, 5, 6, 14 (2 regions), 21 (2 regions) and 28 were identified. Further investigation using bioinformatics tools showed these genomic regions overlapped with the genes associated with immune system, autoimmune diseases, different type of cancers expressly breast cancer and milk production. In conclusion, the results of this study may provide an important source to facilitate the identification of genomic regions and then, the genes affecting mastitis in dairy cows.

**Keywords:** German Holstein Cattle, Mastitis, Selection signatures, Theta statistics.

\* Corresponding author E-mail: rahimimianji@yahoo.com

## مقدمه

طی دهه‌های گذشته، انجام تحقیقات به‌منظور تشخیص ژن‌ها یا مناطق ژنگانی (ژنومی) که هدف انتخاب قرار گرفته‌اند، رو به گسترش بوده است. شناسایی نشانه‌های انتخاب می‌تواند دیدگاه ارزشمندی در ارتباط با ژن‌ها یا مناطق ژنگانی که تحت فشار انتخاب قرار گرفته‌اند، فراهم کند که منجر به درک و شناخت بهتر ارتباط نژادگان- پدیدگان (ژنوتیپ- فنوتیپ) خواهد شد (Gholami, 2014). شناسایی مناطق تحت انتخاب یکی از هدف‌های اساسی ژنتیک تکاملی است (De Simoni Gouveia *et al.*, 2014). حیوان‌های اهلی به دلیل اینکه افزون بر انتخاب طبیعی، هدف انتخاب‌های مصنوعی شدیدی قرار گرفته‌اند، نمونه مناسب‌تری برای شناسایی نشانه‌های انتخاب در سطح ژنگان و شناسایی ژن‌های مهارکننده پدیدگان‌های مختلف به شمار می‌آیند (Biswas & Akey, 2006; Gu *et al.*, 2009; Hays *et al.*, 2009).

بر پایه نظریه خنثی (Neutral theory) بیشتر جهش‌های ایجاد شده در سطح ژنگان از دیدگاه انتخابی خنثی هستند (Kimura, 1989) که هیچ تأثیری روی شایستگی ژنتیکی افراد ندارند. در این حالت جهش‌های جدید به زمانی طولانی برای افزایش فراوانی در جمعیت نیاز دارند. حال چنانچه یک جهش جدید باعث افزایش شایستگی افراد حامل آن نسبت به دیگر افراد جامعه شود، انتخاب طبیعی یا مصنوعی باعث می‌شود افرادی که شایستگی بیشتری دارند در تشکیل نسل بعد مشارکت بیشتری داشته باشند. به این ترتیب فراوانی واریانت جهش‌یافته بسته به سهم آن در افزایش شایستگی به سرعت آغاز به افزایش خواهد کرد. به هر نوع انتخاب برای افزایش فراوانی آلل‌های سودمند انتخاب مثبت (Positive Selection) گفته می‌شود. به دنبال انتخاب مثبت و افزایش فراوانی واریانت‌های سودمند، فراوانی آلل‌های موجود در جایگاه‌های خنثی یا به نسبت خنثی که با واریانت مطلوب پیوسته (لینک) هستند نیز افزایش خواهد یافت که این پدیده را انتقال همراه (Genetic Hitchhiking) می‌گویند. به کاهش یا حذف تنوع در

جایگاه‌های مجاور یک جهش سودمند در فرآیند انتخاب مثبت، جاروب انتخاب (Selective Sweep) گفته می‌شود (Akey, 2006; Biswas & Akey, 2006; Moradi *et al.*, 2012).

انتخاب می‌تواند منجر به تغییر فراوانی یک آلل در یک جمعیت شود درحالی‌که فراوانی آن در جمعیت‌هایی که تحت انتخاب نبوده‌اند بدون تغییر باقی می‌ماند. نتیجه این حالت ایجاد تفرق در بین جمعیت‌ها در این مناطق ژنگانی است. بنابراین تفاوت به نسبت زیاد در فراوانی آللی بین جمعیت‌ها (چه برای خود آلل انتخابی و یا جایگاه‌های اطراف آن) نیز می‌تواند به‌عنوان نشانه‌ای از انتخاب مثبت در جایگاه‌های ژنگانی مربوطه به شمار آید. از مهم‌ترین آزمون‌های آماری مورد استفاده در این زمینه می‌توان به آماره تمایز جمعیتی یا شاخص تثبیت ( $F_{ST}$ : Fixation index) (Akey *et al.*, 2002; MacEachern *et al.*, 2009) اشاره کرد. ارزش‌های  $F_{ST}$  مربوط به جایگاه‌های منفرد است و از لحاظ نظری ارزش آن بین صفر (بدون تفاوت) و یک (تفاوت کامل) متغیر است.

نتایج تحقیقات گسترده روی گاو در طی چند سال اخیر نشان داده است، اهلی کردن و به دنبال آن شکل‌گیری نژادها و انتخاب طبیعی یا مصنوعی باعث ایجاد نشانه‌های انتخاب در مناطق مختلف ژنگان شده است (Barendse *et al.*, 2009; Hays *et al.*, 2009; MacEachern *et al.*, 2009; Qanbari *et al.*, 2010; Stella *et al.*, 2010) که می‌توان این جایگاه‌ها را از مقایسه تمایز جمعیتی در نژادهای مختلف با استفاده از روش‌های آماری مناسب شناسایی کرد.

طی تحقیقی نژادهای متفاوتی از گاوهای شیری و گوشتی آلمان، کانادا و استرالیا برای شناسایی نشانه‌های انتخاب، با استفاده از آرایه‌های SNP K ۵۰ گاوی تعیین نژادگان شدند و ۲۳۶ ناحیه ژنگانی شناسایی شد که تحت انتخاب مثبت قرار گرفته بودند. یکی از مهم‌ترین مناطق شناسایی شده روی BTA18 قرار داشت که بر پایه تحقیقاتی که پیشتر صورت گرفته بود یک QTL بزرگ اثر مرتبط با طول عمر تولیدی و تولیدمثلی در گاو هلشتاین در این ناحیه گزارش شده است (Qanbari *et al.*, 2011). محققانی

گاوهای MAF و Call rate به ترتیب کمتر از ۲ درصد و ۹۵ درصد داشتند حذف شدند (Moradi *et al.*, 2017). سپس از بین SNP های باقی مانده نشانگرهایی که به شدت از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف داشتند ( $P\text{-value} < 10^{-6}$ ) به عنوان معیار دیگری از خطای تعیین نژادگان از تجزیه نهایی کنار گذاشته شدند (Teo *et al.*, 2007).

پس از اجرای مراحل مختلف کنترل کیفیت داده‌ها، نشان‌های انتخاب بررسی شد. روش‌های آماری مختلفی برای شناسایی نواحی تحت انتخاب وجود دارد که در این تحقیق از آزمون  $F_{ST}$  استفاده شد. روش  $F_{ST}$  مناطقی از ژنگان را شناسایی می‌کند که در دو جمعیت (سالم و بیمار) به صورت متمایز و واگرا هدف انتخاب قرار گرفته‌اند (Moradi *et al.*, 2012).

در این تحقیق دام‌های در شیروراری اول که برای هر نوع از ورم پستان (بالینی ۱۳۲ رأس و تحت بالینی ۱ رأس) رکورد داشتند، به عنوان بیمار و دام‌هایی که هیچ نوع از بیماری ورم پستان را نشان ندادند به عنوان سالم در نظر گرفته شدند. با توجه به اینکه شمار زیاد دام‌ها تشخیص  $F_{ST}$  را با مشکل روبه‌رو می‌کند و همچنین برای گروه‌بندی بهتر و تمایز بیشتر دام‌های سالم و بیمار، با استفاده از نرم‌افزار DMU v6 برای پدیدگان بیماری ورم پستان، اثر باقی مانده محاسبه و دام‌های ۱ درصد دو انتهای منحنی باقی مانده (۱۳۳ دام بیمار و ۱۳۳ دام سالم) به عنوان دو گروه بیمار و سالم انتخاب شدند. در این تحقیق برای تجزیه داده‌ها از رابطه زیر استفاده شد (Bagheri *et al.*, 2013):

$$P_{ij} = H_i + Y_j + e_{ij}$$

که در این رابطه  $p_{ij}$  پدیدگان فرد،  $H_i$  اثر ثابت گله،  $Y_j$  اثر ثابت فصل-سال  $\lambda_j$  و  $e_{ij}$  اثر تصادفی اثر باقی مانده است.

آزمون تمایز جمعیتی  $F_{ST}$  به دو روش رایج (Wright, 1951 & 1965) و روش برآوردگر ناریب تتا (Weir & Cockerham, 1984) (0) محاسبه می‌شود. یکی از مشکلات اصلی روش رایج در نظر نگرفتن خطای نمونه‌گیری است که این مشکل توسط ویر و کوکرهام با ارائه روش تتا تصحیح شد که مستقل از

در پنج نژاد گاو ایتالیایی با استفاده از آماره  $F_{ST}$  نشان‌های انتخاب در BTA13 و BTA6 شناسایی کردند که در این مناطق برخی ژن‌های نامزد برای صفات شیر و گوشت گزارش شده بود (Mancini *et al.*, 2014). همچنین در بررسی با ارزیابی نشان‌های انتخاب روی کروموزوم‌های ۵ و ۱۴ در ۳۹۶ حیوان از نژاد Canchim (آمیخته شاروله و زبو)، مناطق حاوی ژن‌های مؤثر در سوخت‌وساز (متابولیسم) و زیست‌ساخت (بیوسنتز) ملانین و توسعه استخوان و جنین شناسایی شدند (Urbinati *et al.*, 2016).

با توجه به اهمیت صفات سلامت و آسیب‌های ناشی از بیماری‌ها در صنعت گاو شیری، همچنین نقش مؤثر نژاد هلشتاین در تولید شیر در بیشتر کشورهای جهان، هدف از این تحقیق، کاوش ژنگانی نشان‌های انتخاب و شناسایی نواحی نامزد مرتبط با بیماری ورم پستان در سطح ژنگان گاوهای هلشتاین بود که با همکاری دانشگاه Kassel آلمان روی گاوهای هلشتاین این کشور اجرا شده است.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از اطلاعات طرح ملی گاو شیری آلمان که روی نژاد هلشتاین صورت گرفته، استفاده شد. در این پروژه پس از کنترل اولیه، نژادگان ۱۵۰۰۰ گاو هلشتاین از ۷۲ گله بزرگ در شمال شرق آلمان که تحت قرارداد برای ثبت صفات بیماری بودند و با استفاده از آرایه‌های Illumina Bovine 50K SNP تعیین نژادگان شدند، در اختیار قرار گرفت.

برای اطمینان از کیفیت داده‌های به دست آمده در تجزیه‌های نهایی مراحل مختلف ویرایش داده‌ها توسط Plink روی داده‌های اولیه اعمال شد. در نخستین مرحله، گاوهای با بیش از ۵ درصد نژادگان از دست‌رفته از تجزیه‌های بعدی حذف شدند. دلیل این امر آن است که نمونه‌هایی که نژادگان گمشده بالایی دارند احتمال بیشتری دارد که با خطای تعیین نژادگان همراه باشند (Barendse *et al.*, 2009). پس از آن دو عامل حداقل فراوانی آلی (MAF: Minor Allele) و نرخ تعیین نژادگان (Call rate) برای هر SNP محاسبه شده و SNP‌هایی که در مجموع

### نتایج و بحث

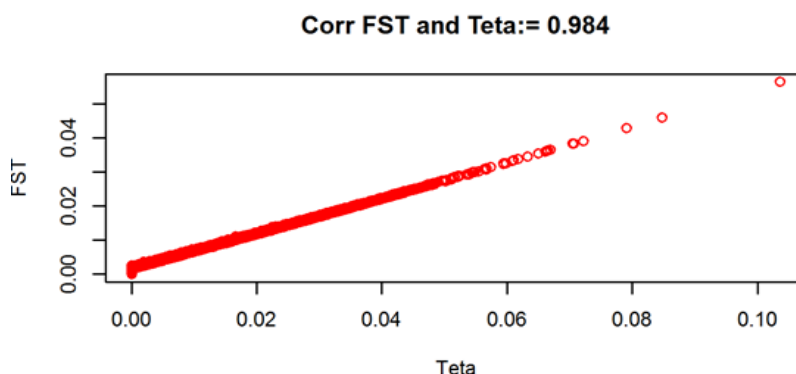
پس از انجام مراحل کنترل کیفیت، از شمار ۴۵۶۱۳ نشانگر در ۲۶۶ گاو (۱۳۳ رأس بیمار و ۱۳۳ رأس سالم)، شمار ۴۴۴۳۱ نشانگر برای انجام تجزیه‌های بعدی باقی ماند. داده‌های نژادگانی مورد استفاده در این تحقیق (۴۵۶۱۳ نشانگر) مراحل اولیه کنترل کیفیت را در طی اجرای پروژه ملی روی نژاد هلشتاین گذرانده بودند و به همین خاطر در فرآیند انجام مراحل ویرایش داده‌ها در این تحقیق تنها ۱۱۸۰ نشانگر به خاطر MAF پایین و ۲ نشانگر به دلیل انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ، با توجه به تغییر شمار نمونه برای بررسی نشانه‌های مرتبط با ورم پستان، از تجزیه نهایی حذف شدند.

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی همبستگی بین ارزش‌های شاخص تمایز جمعیتی رایت ( $F_{ST}$ ) و روش ناریب تتا ( $\theta$ ) بیانگر همبستگی بالای (۹۸/۴ درصد) بین آن‌ها بود (شکل ۱). به همین علت در این تحقیق تنها نتایج به‌دست‌آمده از روش تمایز جمعیتی تتا نمایش داده شده است. البته با توجه به اینکه مبنای آماری این دو روش بسیار همسان است (Weir & Cockerham, 1984) همبستگی بالای مشاهده شده به‌ویژه هنگامی که شمار نمونه‌ها در دو جمعیت مورد مقایسه همسان باشد قابل انتظار است. همچنین در بررسی‌های پیشین نیز همبستگی بالای (بیش از ۹۹ درصد) این دو آزمون در مقایسه نژادهای گوسفند ایرانی دنبه‌دار و بدون دنبه (Moradi *et al.*, 2012) و در مقایسه نژادهای مختلف گوسفند ایرانی (Manzari *et al.*, 2016) گزارش شده است.

شمار گروه‌های نمونه‌گیری شده و شمار افراد داخل هر گروه است (Weir & Cockerham, 1984). ارزش‌های به‌دست‌آمده از این روش‌ها بین ۰ تا ۱ متغیر است.

محاسبه‌های مربوط به دو روش رایت و تتا در محیط R انجام گرفت. پس از محاسبه ارزش تتا برای هر نشانگر SNP، برای نمایش بهتر مناطق تحت انتخاب به‌جای ارزش هر SNP، میانگین ارزش عددی تتای هر پنج SNP مجاور به‌عنوان ارزش Win5 هر نشانگر محاسبه شد و سپس نگاره (گراف) منتهن ارزش تمایز جمعیتی تتا در سطح ژنگان گاو هلشتاین با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شد. همچنین پس از مرتب کردن نشانگرها بر پایه ارزش محاسبه شده، ارزش p-Value با استفاده از نرم‌افزار Excel برای صدک ۹۹/۹ محاسبه و مناطقی که برای همه نشانگرهای مجاور ارزش بالایی داشتند به‌عنوان نشانه انتخاب در نظر گرفته شدند.

پس از شناسایی مناطق دارای نشانه انتخاب، برای بررسی ژن‌های گزارش شده در این مناطق و ۵۰۰ کیلو جفت باز اطراف آن‌ها (Moradi *et al.*, 2012) از پایگاه اطلاعاتی Ensemble Biomart tool UMD3.1 Bos Taurus و برای بررسی عملکرد ژن‌های شناسایی شده از وبسایت PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)، DAVID، GeneCards (<http://www.genecards.org>)، proteINSIDE و 6.8 (<https://david.ncicrf.gov/>) استفاده شد.



شکل ۱. همبستگی بین ارزش‌های شاخص تمایز جمعیتی رایت ( $F_{ST}$ ) و روش ناریب تتا ( $\theta$ ) در گاو هلشتاین آلمانی  
Figure 1. Correlation between population differentiation statistic of Write ( $F_{ST}$ ) and unbiased Theta ( $\theta$ ) values in German Holstein cattle

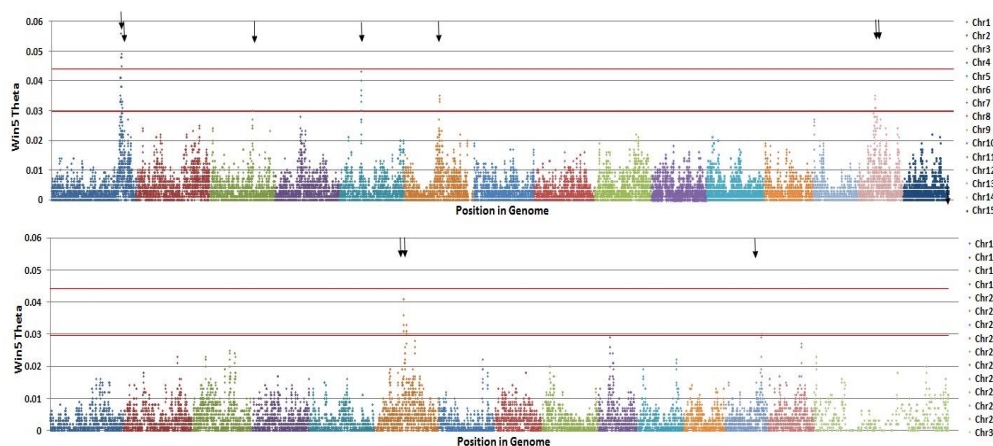
ژن‌های مشخص‌شده در جدول ۱ عملکردهای متفاوتی در مهار سامانه ایمنی، تولید شیر و پروتئین، تولید چربی شیر و سرطان پستان بوده که می‌توانند به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با صفت ورم پستان مرتبط باشند.

به علت عدم پیشرفت کافی در مهار بیماری ورم پستان توسط روش‌های سنتی دامپزشکی، امروزه بیشترین توجه به روش‌های طبیعی بر پایه ایمنی طبیعی گاوها بر علیه عفونت غدد پستانی است. شمار یاخته‌های بدنی در ۱ میلی‌لیتر شیر پایه (SSC: Somatic Cell Count) که به‌طور عمده برای ارزیابی وضعیت سلامت غدد پستانی است (Swiderek *et al.*, 2006) می‌تواند در نتیجه عفونت‌های باکتریایی در غدد پستانی افزایش یابد. به همین خاطر ژن‌های نامزد ورم پستان بالینی یک یا چند نقش در سامانه ایمنی میزبان دارند که پراهمیت‌ترین آن‌ها کمپلکس سازگاری بافتی، سیتوکین و گیرنده‌های سیتوکین و مقاومت طبیعی مرتبط با پروتئین ماکروفاژ-۱ است (Bagheri *et al.*, 2013). لذا، بسیاری از ژن‌های شناسایی‌شده در این تحقیق در جایگاه‌های مختلف همچون ATP1B3, RNF7, RASA2, SPSB4, FAIM, PSTPIP1, LOC505658, LOC509956, LOC617313, LOC786126, LOC508858, GZMB با سیستم ایمنی در ارتباط هستند.

با توجه به اینکه انتخاب، افزون بر جهش سودمند جایگاه‌های مجاور آن را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد (Akey *et al.*, 2002) در این تحقیق، میانگین ارزش عددی تنای هر پنج SNP مجاور به‌عنوان ارزش Win5 هر نشانگر محاسبه شد و آنگاه نگاره منتهن ارزش تمایز جمعیتی تتا در سطح ژنگان گاو هلشتاین ترسیم شد (شکل ۲). مناطق دارای ارزش بالای تتا می‌توانند نشان‌دهنده مناطقی از ژنگان باشند که در گروه‌های سالم و مبتلا به بیماری ورم پستان به‌صورت متمایز هدف انتخاب قرار گرفته و می‌توانند به‌عنوان نامزد برای این صفت مهم اقتصادی در گاوهای هلشتاین مطرح باشند.

در این تحقیق با در نظر گرفتن ارزش عددی win5 Theta بالاتر از حد آستانه ۰/۰۱ درصد (Moradi *et al.*, 2010) و ۰/۱ درصد (Manzari *et al.*, 2016) به ترتیب ۲ و ۱۰ منطقه ژنگانی به‌عنوان مناطق دارای نشانه انتخاب شناسایی شدند (شکل ۲) که روی کروموزوم‌های ۱ (دو منطقه و در آستانه ۰/۰۱ درصد)، ۳، ۵، ۶، ۱۴ (دو منطقه)، ۲۱ (دو منطقه) و ۲۸ قرار داشتند.

پس از شناسایی مناطق ژنگانی تحت انتخاب، ژن‌های موجود در این مناطق شناسایی و عملکرد بیوشیمیایی آن‌ها بررسی شد (جدول ۱). همچنین جدول میانگین تولید شیر، درصد چربی و پروتئین شیر و میزان SCC در هر میلی‌لیتر شیر ارائه شده است (جدول ۲).



شکل ۲. توزیع ارزش‌های win5 تتا در سطح ژنگان نژاد هلشتاین آلمانی: موقعیت ژنگانی SNPها روی محور X و ارزش عددی win5 تتا روی محور Y نمایش داده شده است. خطوط رسم شده نشان‌دهنده صدک ۹۹/۹۹ و ۹۹/۹ است.

Figure 2. Distribution of windowed Theta values across the genome of German Holstein breed: SNP position in the genome is shown on the X-axis, and win5 Theta values are plotted on the Y-axis. The values above the lines are in the 99.99 and 99.9 percentile.

جدول ۱. ژن‌های شناسایی شده در مناطق ژنگانی تحت انتخاب مرتبط با ورم پستان در گاوهای شیری هلشتاین  
Table 1. Identified genes within the genomic regions under selection pressure which are associated with mastitis in Holstein dairy cows

Chromosome	Location on the genome (bp)	Genes
1	127961597-129424205	<b>ATR</b> , XRN1, GK5, <b>TFDP2</b> , <b>ATP1B3</b> , GRK7, <b>RNF7</b> , <b>RASA2</b> , PXYLP1, <b>SPSB4</b> , <b>SLC25A36</b> , TRIM42, CLSTN2, LOC511302, ZBTB38
	131227520-131642361	COPB2, <b>MRPS22</b> , *PRR23A, <b>PIK3CB</b> , FAIM, CEP70, <b>ESYT3</b> , <b>MRAS</b> , NME9, <b>ARMC8</b> , DBR1, A4GNT, DZIPL1, *PRR23B, *LOC783600, FOXL2
3	79333053	INSL5, TCTEX1D1, SGIP1, PDE4B, *MGC137454
5	40512359-40762830	CNTN1, LRRK2, <b>SLC2A13</b> , SNORA18
6	65749899-65833751	GABRG1
14	31513907-31589988	<b>CYP7B1</b> , <b>ARMC1</b> MTFR1, PDE7A, DNAJC5B
	33372261-33384807	<b>VCPIP1</b> , <b>SGK3</b> , MCMDC2, PPP1R42 <b>COPS5</b> , CSPP1, <b>ARFGEF1</b> , CPA6
21	32598936-32758644	ISL2, SCAPER, RCN2, <b>PSTPIP1</b> , TSPAN3, <b>PEAK1</b> , HMG20A
	35640578-35777432	<b>LOC505658</b> , <b>LOC509956</b> , <b>LOC617313</b> <b>LOC786126</b> , <b>LOC508858</b> , <b>GZMB</b> , STXBP6
28	40093345	<b>CCSER2</b>

ژن‌های مشخص شده با قلم پررنگ بنابر گزارش‌های پیشین و نقش آن‌ها، احتمال دارد با ورم پستان و بیماری‌های مرتبط با پستان در ارتباط باشند.  
\* ژن‌های با عملکرد نامشخص

The bold type genes are the reported genes associated with mastitis and udder diseases

\* The genes with uncharacterized function

جدول ۲. میانگین (انحراف معیار) تولید شیر، درصد چربی، درصد پروتئین شیر و SCC در دو گروه بیمار و سالم مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. Mean (standard deviation) of milk yield, milk fat and protein percentage and SCC in sick and healthy animal used in this study

	Milk yield (kg)		Milk fat (%)		Milk protein (%)		SCC*1000 / ml	
	Sick	Healthy	Sick	Healthy	sick	Healthy	Sick	Healthy
Mean	30.28(6.27)	28.23(5.15)	3.88(0.6)	3.85(0.63)	3.38(0.27)	3.4(0.29)	276.93(705.47)	107.41(262.4)

ساخت (سنتر) چربی بدن بر عهده دارند می‌توانند بر سلامت پستان تأثیر داشته باشند (Kaupé *et al.*, 2007). نتایج این تحقیق نیز این فرضیه‌ها را تأیید می‌کند به طوری که ژن CYP7B1 شناسایی شده روی کروموزوم ۱۴ در تولید شیر و پروتئین، و ژن ARMC1 در کروموزوم ۱۴ در تولید چربی شیر در گاوهای شیری نقش دارند (Marques, 2009). از سوی ژن‌های SLC25A36 و SLC2A13 که به ترتیب روی کروموزوم‌های ۱ و ۵ قرار دارند متعلق به خانواده ژنی SLC هستند که در برخی بررسی‌ها ارتباط این خانواده ژنی با صفات تولید و ترکیب‌های شیر مانند چربی و پروتئین گزارش شده است (Ogorevc *et al.*, 2009).

افزون بر این بسیاری از ژن‌ها شناسایی شده در این تحقیق از جمله ATR, TFDP2, FAIM, MRPS22,

از سوی، از آنجا که برنامه‌های بهنژادی گاوهای شیری در طی دهه‌های اخیر به طور عمده در جهت افزایش صفات تولیدی از جمله تولید شیر، درصد چربی و پروتئین بوده است، به دلیل همبستگی ژنتیکی منفی به‌ویژه بین میزان تولید شیر و مقاومت به ورم پستان، این امر باعث کاهش مقاومت دام به بیماری‌ها از جمله ورم پستان شده است. به طور معمول تولید شیر بالا با افزایش بروز ورم پستان همراه است از این رو تصور می‌شود که شماری از QTL‌های مسئول ورم پستان در نزدیکی QTL‌های مؤثر بر صفات تولیدی شیر قرار داشته باشند (Pasandideh *et al.*, 2016). نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد، گاوهای شیری انرژی زیادی را برای تولید چربی مصرف می‌کنند، زیرا چربی نقش بسزایی را در باروری و سلامت پستان‌ها ایفا می‌کند. بنابراین ژن‌هایی که نقش اصلی را در

افزون بر این وجود ژن‌هایی با عملکرد نامشخص PRR23A, PRR23B, LOC783600, MGC137454 اهمیت داشته و می‌توان این ژن‌ها و مناطق را برای مهار صفت مورد بررسی، ارزیابی بیشتری کرد.

برای تأیید نتایج به‌دست‌آمده، مناطق و ژن‌های شناسایی‌شده با بررسی‌های پیشین نیز مقایسه شد. در یک بررسی که روی گاوهای آفریقایی و اروپایی با استفاده از روش (Composite selection) CSS صورت گرفت فهرستی از ژن‌های شناسایی‌شده روی کروموزوم‌های مختلف ارائه شد که در برخی موارد با ژن‌ها (MRPS22, ESYT3, COPB2, LOC783600, FOXL2, PIK3CB, FAIM, CEP70, MRAS) و موقعیت کروموزومی (۱/۱۳۱-۱۳۱/۶۴ مگا باز) شناسایی‌شده در این بررسی همسانی دارد (Randhawa *et al.*, 2015). همچنین شناسایی دوباره موقعیت کروموزومی ۳۱۵۰۰bp-۳۱۰۰۰bp با ژن‌های SGK3, PPP1R4, COPS5, CSPP1, APFGEF1, و ۳۳۵۰۰-۳۳۰۰۰bp با ژن CYP7B1 در این بررسی، که پیشتر در تحقیقی روی هفت نژاد گاو شیری و گوشتی گزارش شده بود (Zhao *et al.*, 2015) نشان‌دهنده اهمیت بالای نتایج به‌دست‌آمده است.

در مجموع، با توجه به شمار زیاد نمونه‌ها و ارزش اقتصادی بیماری ورم پستان در صنعت گاو شیری، و همچنین شناسایی ژن‌هایی که به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم با ورم پستان در ارتباط هستند، نتایج این تحقیق می‌تواند منبع اطلاعاتی با ارزشی برای شناسایی مناطق ژنگانی نامزد مرتبط با این بیماری فراهم کند.

#### نتیجه‌گیری کلی

در این بررسی برای شناسایی نشانه‌های انتخاب از آماره تمایز جمعیتی تا استفاده شد و نشانه‌های انتخاب در بخش‌هایی از ژنگان شناسایی شد که برخی از این مناطق در بررسی‌های پیشین در انسان و دام‌های اهلی دیگر نیز تأیید شده بودند. بررسی ژن‌ها در نواحی تحت انتخاب نشان داد، ژن‌های موجود در این مناطق با سامانه ایمنی و بیماری‌های خود ایمنی،

PIK3CB, ESYT3, MRAS, NME9, ARMC8, VCIPI1, SGK3, COPS5, ARFGEF1, PEAK1, CCSER2 (جدول ۱) با سرطان پستان در ارتباط هستند. ژن MRPS22 به نام پروتئین S22 ریبوزومی میتوکندریایی نامیده می‌شود که روی کروموزوم شماره ۱ قرار گرفته است. پروتئین‌های ریبوزومی میتوکندریایی در پستانداران با ژن‌های هسته کد شده و در ساخت پروتئین درون میتوکندری کمک می‌کند (Genecards). شواهد ژنتیکی و ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) نشان می‌دهد که این ژن با بروز برخی از سرطان‌ها به‌ویژه سرطان پستان در انسان در ارتباط است (Sotgia *et al.*, 2012). ژن PIK3CB یک ایزوفرم از زیرمجموعه کاتالیزوری kinase (PI3K) phosphoinositide 3- را کدگذاری می‌کند. این کینازها در مسیرهای سیگنال‌دهنده شامل گیرنده‌هایی روی غشای خارجی یاخته‌های یوکاریوتی اهمیت دارند و برای زیر واحد کاتالیزوریشان نام‌گذاری شده‌اند. نشان داده شده PI3KB بخشی از مسیر فعال‌سازی در نوتروفیل‌هایی است که کمپلکس‌های ایمنی را در مکان‌های آسیب‌دیده یا عفونی محدود کرده‌اند (Genecards). باور بر این است که PIK3CB به‌طور گسترده‌ای در سرطان پستان بیان می‌شود (Crowder *et al.*, 2009). همچنین نقش پروتئینی که توسط ژن FAIM (Fas Apoptotic Inhibitory Molecule) کد می‌شود محافظت در برابر مرگ یاخته‌ای ناشی از گیرنده مرگ است و سیگنال‌دهی و تمایز یاخته B را تنظیم می‌کند (Genecards). FAIM1, FAIM2, و FAIM3 مهار مرگ یاخته ناشی از Fas را موجب می‌شوند. فعالیت ضد مرگ یاخته‌ای FAIM2 در برخی از انواع سرطان‌ها نقش دارد. FAIM2 بیش‌ازحد در یاخته‌های سرطانی بدخیم بیان شده است. ایزوفرم جدید FAIM2 به نام FAIM2b قابلیت ضد مرگ یاخته را حفظ می‌کند و در بافت‌های سرطان پستان به‌شدت بیان می‌شود (Planells-Ferrer *et al.*, 2016). در بین ژن‌های بیان شده، ژن CCSER2 از ژن‌های خانه‌دار سرطان پستان است. ژن‌های خانه‌دار به‌عنوان بهترین ژن‌های نامزد برای مهار درونی بیان ژن هستند (Tilli *et al.*, 2016).

تولید شیر، چربی، پروتئین و انواع سرطان از جمله سرطان پستان مرتبط هستند. در مجموع، نتایج این تحقیق می‌تواند منابع اطلاعاتی با ارزشی در جهت شناسایی ژن‌های مهارکننده بیماری ورم پستان ارائه دهد و آغازی برای بررسی‌های بیشتر در این زمینه و استفاده از اطلاعات به‌دست‌آمده در شناسایی ویژگی‌های ژنتیکی این بیماری مهم اقتصادی در صنعت گاو شیری باشد.

## REFERENCES

1. Akey, J. M. (2009). Constructing genomic maps of positive selection in humans: where do we go from here. *Genome Research*, 19(5), 711-722.
2. 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.
3. Bagheri, M., Mirai-Ashtiani, R., Moradi-Shahrbabak, M., Nejati-Javaremi, A., Pakdel, A., Von Borstel, U. U., Pimentel, E. C. G. & KÖnig, S. (2013). Selective genotyping and logistic regression analyses to identify favorable SNP-genotypes for clinical mastitis and production traits in Holstein dairy cattle. *Livestock Science*, 151, 140-151.
4. 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.
5. Biswas, S. & Akey, J. M. (2006). Genomic insights into positive selection. *Trends in Genetics*, 22(8), 437-436.
6. Crowder, R. J., Phommaly, Ch., Tao, Y., Hoog, J., Luo, J., Perou, Ch. M., Parker, J. S., Miller, M. A., Huntsman, D. G., Lin, L., Snider, J., Davies, Sh. R., Olson, J. A., Watson, M. A., Saporita, A., Weber, J. D. & Ellis, M. J. (2009). PIK3CA and PIK3CB inhibition produce synthetic lethality when combined with estrogen deprivation in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Research*, 69(9), 3955-3962.
7. De Simoni Gouveia, J. J., Da Silva, M. V. G. B., Paiva, S. R. & De Oliveira, S. M. P. (2014). Identification of selection signatures in livestock species. *Genetics and Molecular Biology*, 37(2), 330-342.
8. Gholami, M. (2014). *Selection signature detection in a diverse set of chicken breeds*. Ph.D. thesis. Faculty of Agricultural Sciences Georg-August-University, Germany.
9. Gu, J., Orr, N., Park, S. D., Katz, L. M., Sulimova, G., MacHugh, D. E. & Hill, E. W. (2009). A genome scan for positive selection in Thoroughbred horses. *PLoS ONE*, 4(6), e5767-e5783.
10. Hays, B. J., Chamberlain, A. J., Maceachern, S., Savin, K., Mcpartlan, H., Macleod, I., Sethuran, L. & Goddard, M. E. (2009). A genome map of divergent artificial selection between Bos Taurus dairy cattle and Bos Taurus beef cattle. *Animal Genetic*, 40(2), 176-184.
11. Kaupe, B., Brandt, H., Prinzenberg, E. M. & Erhardt, G. (2007). German Holstein cattle production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk. *Journal of Animal Science*, 85, 11-21.
12. Kimura, M. (1989). The neutral theory of molecular evolution and the world view of neutralists. *Genome*, 31(1), 24-31.
13. MacEachern, S., Hayes, B., McEwan, J. & Goddard, M. (2009). An examination of positive selection and changing effective population size in Angus and Holstein cattle populations (Bos taurus) using a high density SNP genotyping platform and the contribution of ancient polymorphism to genomic diversity in domestic cattle. *BMC Genomics*, 10, 181-199.
14. Mancini, G., Gargani, M., Chillemi, G., Nicolazzi, E. L., Marsan, P. A., Valentini, A. & Pariset, L. (2014). Signatures of selection in five Italian cattle breeds detected by a 54K SNP panel. *Molecular Biology Reports*, 41, 957-965.
15. Manzari, Z., Mehrabani-Yeganeh, H., Nejati-Javaremi, A. & Moradi, M. H. (2016). *Genomic evaluation for selection signatures in some Iranian sheep breeds*. Ms. Thesis. Faculty of Genetic and animal breeding Tehran University, Iran. (in Farsi)
16. Manzari, Z., Mehrabani-Yeganeh, H., Nejati-Javaremi, A., Moradi, M. H. & Gholizadeh, M. (2016). Study of selective signatures in some Iranian sheep breeds. In: *Proceedings of 2<sup>nd</sup> International & 14<sup>th</sup> Iranian genetics congress*, 21-23 May, Sh. Beheshti University, Tehran, Iran, pp. 1-5. (in Farsi)
17. Marques, E. F. (2009). *Application of genomics-based tools leading to the identification of markers on bovine chromosome 14 influencing milk production and carcass quality traits*. Ph.D. thesis. Faculty of Agricultural, Food and Nutritional Science Alberta University, Alberta.
18. Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds, K. G. & McEwan, J. C. (2010). Whole-genome scan of population differentiation in Zel and Lori-Bakhtiari sheep breeds. *Journal of Agricultural biotechnology*, 2(2), 57-70. (in Farsi)



19. 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, 10-24.
20. Moradi, M. H., Phua, S. H., Hedayat, N., Khodaei-Motlagh, M. & Razmkabir, M. (2017). Haplotype and genetic diversity of mtDNA in indigenous Iranian sheep and an insight into the history of sheep domestication. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19(3), 591-601.
21. Ogorevc, J., Kunej, T., Razpet, A. & Dovc, P. (2009). Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*, 40(6), 832-851.
22. Pasandideh, M., Kharrati Koopaei, H., Mohammad Abadi, M. R. & Esmailzadeh Koshkoiyeh, A. (2016). Association of the OPN and PPARGC1A alleles with milk somatic cell count in Iranian Holstein cattle. *Modern Genetics Journal*, 11(3), 357-365. (in Farsi)
23. Planells-Ferrer, L., Urresti, J., Coccia, E., Galenkamp, K. M., Calleja-Yagüe, I., López-Soriano, J. Carriba, P., Barneda-Zahonero, B., Segura, M. F. & Comella, J. X. (2016). Fas apoptosis inhibitory molecules: more than death-receptor antagonists in the nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 139(1), 11-21.
24. Qanbari, S., Pimentel, E. C. G., Tetens, J., Thaller, G., Lichtner, P., Sharifi, A. R. & Simianer, H. (2010). A genome-wide scan for signatures of recent selection in Holstein cattle. *Animal Genetics*, 41(4), 377-389.
25. Qanbari, S., Gianola, D., Hayes, B., Schenkel, F., Miller, S., Moore, S., Thaller, G. & Simianer, H. (2011). Application of site and haplotype-frequency based approaches for detecting selection signatures in cattle. *BMC Genomics*, 12, 318-329.
26. Randhawa, I. A. S., Khatkar, M. S., Thomson, P. C. & Raadsma, H. W. (2015). Composite selection signals for complex traits exemplified through bovine stature using multibreed Cohorts of European and African Bos Taurus. *G3:Genes/Genomes/Genetics*, 5(7), 1391-1401.
27. Sotgia, F., Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U. E., Salem, A. F., Tsigos, A., Lamb, R., Sneddon, S., Hulit, J., Howell, A. & Lisanti, M. P. (2012). Mitochondria "fuel" breast cancer metabolism: fifteen markers of mitochondrial biogenesis label epithelial cancer cells, but are excluded from adjacent stromal cells. *Cell Cycle*, 11(23), 4390-401.
28. Stella, A., Ajmone-Marsan, P., Lazzari, B. & Boettcher, P. (2010). Identification of selection signatures in cattle breeds selected for dairy production. *Genetics*, 185(4), 1451-1461.
29. Swiderek, W. P., Charon, A. W. & Gruszczynska, J. (2006). Relationship between blood lymphocyte phenotype, DBR1 (MHC class II) Gene polymorphism and somatic cell count in ewe milk. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50, 73-77.
30. 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.
31. Tilli, T. M., da Silva Castro, C., Tuszyński, J. A. & Carels, N. (2016). A strategy to identify housekeeping genes suitable for analysis in breast cancer diseases. *BMC Genomics*, 17(1), 639-649.
32. Urbinati, I., Stafuzza, N. B., Oliveira, M. T., Chud, T. C. S., Higa, R. H., de Almida Regitano, L. C., de Alencar, M. M., Buzanskas, M. E. & Munari, D. P. (2016). Selection signatures in Canchim beef cattle. *Journal of animal science and biotechnology*, 7, 29-37.
33. Weir, B. S. & Clark Cockerham, C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
34. Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.
35. Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3), 395-420.
36. Zhao, F., McParland, S., Kearney, F., Du, L. & Berry, D. (2015). Detection of selection signatures in dairy and beef cattle using high-density genomic information. *Genetic Selection Evolution*, 47, 49-60.