

بررسی جمعیت مؤثر، نامتعادلی پیوستگی و ساختار بلوک تک‌جوری در گاو میش‌های نژاد آذربایجانی با استفاده از تراشه‌های متراکم نشانگری

محمدحسین فلاحی^۱، حسین مرادی شهربابک^{۲*}، محمد مرادی شهربابک^۳ و رستم عبدالهی آرپناهی^۴
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۴. استادیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۲)

چکیده

هدف از این پژوهش برآورد میزان نامتعادلی پیوستگی، تعیین ساختار بلوک‌های تک‌جوری (هاپلو تیبی) و اندازه مؤثر جمعیت گاو میش آذربایجانی با استفاده از اطلاعات نشانگرهای SNP پراکنده در سراسر ژنوم (ژنوم) حاصل از تراشه‌های متراکم (۹۰K SNPchip) بود. حیوان‌های مورد بررسی و ارزیابی ۲۴۳ رأس گاو میش آذربایجانی پراکنده در استان‌های گیلان، اردبیل، آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی بود. پس از کنترل کیفیت داده‌های نژادگانی (ژنوتیبی)، ۶۲۱۴۱ SNP برای تجزیه و تحلیل ساختار جمعیت، شناسایی ساختار تک‌جورها و اندازه مؤثر جمعیت استفاده شد. بیشترین میانگین نامتعادلی پیوستگی در کل جمعیت در فاصله بین ۲/۵ کیلو جفت باز تا ۵ کیلو جفت باز بین ۰/۲۹-۰/۲۵ و کمترین میانگین نامتعادلی پیوستگی (r^2) در فاصله ۹۰۰-۱۰۰۰ کیلو جفت باز بین ۰/۱۲-۰/۱۴ به دست آمد. مقدار r^2 با افزایش فاصله میان جفت SNP‌ها کاهش زیادی نشان داد. در کل نمونه‌های تجزیه شده، ۱۶۹۳ بلوک مشاهده شد که ۱۱ درصد کل SNP‌ها درون بلوک‌های تک‌جوری خوشه‌بندی شدند و 202 ± 3.4 مگا جفت باز از کل ژنوم اتوزومی را پوشش می‌دهند. اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از آماره (r^2) محاسبه شد. اندازه مؤثر جمعیت حدود دو نسل پیش نزدیک به ۴۲۲ برآورد شد.

واژه‌های کلیدی: اندازه مؤثر جمعیت، بلوک تک‌جوری، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، گاو میش، نامتعادلی پیوستگی.

Investigation of effective population, linkage disequilibrium and haplotype block structure in Azarbaijani breed buffalo using high density SNP markers

Mohammad Hossein Fallahi¹, Hossein Moradi Shahrabak^{2*}, Mohammad Moradi Shahrabak³ and Rostam Abdollahi Arpanahi⁴

1, 2, 3. M. Sc. Student, Assistant Professor and Professor, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture Abureyhan, University of Tehran, Iran

(Received: Aug. 20, 2016 - Accepted: Nov. 3, 2017)

ABSTRACT

The aim of this study was to determine genomewide linkage disequilibrium (LD), Haplotype block and effective population size using the information obtained from 243 Azarbaijani breed buffalo using a high density SNP panel (Axiom® Buffalo Genotyping 90K). After quality control of SNP markers data, 62,141 SNP markers remained for identification of linkage disequilibrium, haplotype blocks and effective population size. LD was measured by the square of the correlation coefficient (r^2) between alleles. The maximum LD measured by r^2 varied from 0.25 to 0.29 at a distance of < 2.5 kb, and the minimum average values of r^2 varied from 0.012 to 0.014 at distances ranging from 900 to 1000 kb, clearly showing that the average r^2 reduced with the increase in SNP pair distances. Overall, 1693 blocks were observed through the genome. Eleven percent of all SNPs were clustered into haplotype blocks, covering 202 ± 3.4 Mb of the total autosomal genome size. Effective population size (N_e) was estimated based on expected linkage disequilibrium. N_e was estimated to be 422 in our population.

Keywords: Buffalo, effective population size, haplotype blocks, linkage disequilibrium, SNP.

* Corresponding author E-mail: hmoradis@ut.ac.ir

مقدمه

نامتعادلی پیوستگی^۱ (LD) نشانه‌ای از ارتباط غیرتصادفی همدیاف (آلل)ها در مکان (لوکوس)های ژنی مختلف است. هر تک‌جور (هاپلوتیپ)^۲ را می‌توان همانند یک رشته از حرف‌ها که هر یک نمایانگر یک نوکلئوتید در یک موقعیت SNP^۳ است در نظر گرفت. توسعه نقشه LD و توصیف ساختار بلوک‌های تک‌جوری در سطح جمعیت، فراسنجه‌های سودمند برای بررسی‌های پویش کل ژنگان یا ژنوم^۴ (GWAS)، ژن نامزد (کاندیدا)، بررسی ناحیه‌های نامزد و درک رابطه‌های غیرخطی میان پدیدگان (فنوتیپ) و ژن‌ها هستند (De La Veg et al., 2002). عامل‌هایی مانند ساختار جمعیت، مهاجرت، انتخاب، رانش ژنی، جهش و نوترکیبی بر LD اثر دارند (Hedrick, 2005). اطلاع از نامتعادلی پیوستگی (LD)، می‌تواند اطلاعات سودمندی در ارتباط با اندازه مؤثر جمعیت، تاریخچه جمعیت، شمار افراد مورد نیاز برای کارهای نقشه‌یابی فراهم کند. آگاهی از میزان LD همچنین می‌تواند در انتخاب ژنگانی برای پی بردن به تراکم نشانگری مورد نیاز و برآورد دوباره اثرگذاری SNP در طول زمان استفاده شود.

بررسی‌های گوناگونی در زمینه LD در جمعیت‌های گاو انجام شده است. نخستین بررسی پویش ژنگانی LD در جمعیت گاو سیاه و سفید هلندی بر پایه ۲۸۴ نشانگر ریزماهواره انجام شد (Farnir et al., 2000). بعدها، بررسی‌های زیادی در زمینه LD در گاو و نسل دوم نقشه‌های LD با SNPchip، ۳۰K یا بیشتر توسعه یافتند (Villa-Angulo et al., 2009).

در سال‌های اخیر نتیجه پژوهش با SNPchip در ۷۰۰K در گاو Nellore منتشر شده است (Espigolan et al., 2013)، که می‌تواند به عنوان نسل سوم نقشه‌های LD مطرح شود. بررسی دیگری نیز در زمینه نامتعادلی پیوستگی در گاو آمیخته صورت گرفت که در آن بیشترین میانگین نامتعادلی پیوستگی در فاصله

کمتر از ۲/۵ کیلو جفت باز بین ۰/۳۳ تا ۰/۴۰، و کمترین میانگین ارزش r^2 در فاصله ۵۰۰-۴۰۰ کیلو جفت باز بین ۰/۰۷-۰/۰۵ بود و با افزایش فاصله میان جفت SNPها، r^2 کاهش یافت (Mokry et al., 2014). بلوک‌های تک‌جوری^۵ به‌طور عمده به ناحیه‌ای از ژنگان اطلاق می‌شود که شواهد تاریخی، نرخ پایینی از نوترکیبی و تنوع تک‌جوری را در آن ناحیه نشان می‌دهد. ساختار بلوک‌های تک‌جوری در موجودهای زیادی مانند انسان، موش، خوک، گاو و غیره بررسی شده است. نخستین بار ساختار بلوک‌های تک‌جوری در گاو هلستاین توسط Khatkar et al. (2006) روی کروموزوم ۶ بررسی شد و ۴۰ بلوک روی این کروموزوم شناسایی شد که ۴۱ درصد کروموزوم را پوشش می‌داد. پس از این بررسی، (Khatkar et al., 2007) دوباره در بررسی جامع‌تری، ساختار بلوک‌ها را در کل ژنگان گاو هلستاین بررسی کردند. آنان ۷۲۷ بلوک با بیش از سه نشانگر با متوسط طول ۶۹/۷۷ کیلو جفت باز در ژنگان ۱۰۰۰ گاو هلستاین استرالیایی شناسایی کردند. همچنین این محققان از مقایسه نتایج خود با نتایج پروژه Hap-Map انسانی دریافتند، اندازه بلوک‌ها در گاو هلستاین ۵ الی ۱۰ برابر اندازه بلوک‌ها در جمعیت‌های انسانی است. این بلوک‌ها در حدود ۵۰۶۳۸ کیلو جفت باز از ژنگان گاو (۲/۸ درصد طول کروموزوم‌های اتوزوم) را پوشش دادند. در نهایت پیش‌بینی شد که در حدود ۷۰۰۰۰ الی ۱۰۰۰۰۰ نشانگر برای شناسایی همه بلوک‌های جمعیت لازم است (Khatkar et al., 2007). بررسی دیگر با حدود ۷۱۱۹ نشانگر روی ۲۰۰ گاو هلستاین ایالات متحده آمریکا انجام شد که میانگین اندازه بلوک‌ها در حدود ۱۱۳-۲۶ کیلو جفت باز بود. ساختار بلوکی ژنگان انسان، نخستین بار با مشاهده‌های Patial et al. (2011) در بررسی تنوع تک‌جورها در کروموزوم ۲۱ در بین ۲۲ نفر مورد توجه قرار گرفت.

از آنجایی که در کشور ایران برای جمعیت گاو همیشه کشور هنوز چنین بررسی انجام نشده است، هدف‌های مورد نظر از انجام این بررسی: (۱) تعیین میزان

1. Linkage disequilibrium
2. Haplotype
3. Single nucleotide polymorphism
4. Genome-wide association studies

کمتر از ۹۵ درصد حذف شدند و ۲۴۳ حیوان برای تجزیه و تحلیل باقی ماندند.

برآورد آماره پیوستگی

برای برآورد میزان LD از آماره r^2 استفاده شد که چنین برآورد می‌شود:

$$D = f_{A_1 B_1} f_{A_2 B_2} - f_{A_1 B_2} f_{A_2 B_1}$$

$$r^2 = \frac{D^2}{f_{A_1} f_{A_2} f_{B_1} f_{B_2}}$$

در رابطه‌های بالا معیار D تفاوت بین حاصل ضرب فراوانی‌های دو تک‌جور جفتی (سیس) از حاصل ضرب فراوانی‌های دو تک‌جور غیرجفتی (ترانس) است و $f_{A_1 B_1}$ و $f_{A_2 B_2}$ به ترتیب برابر فراوانی تک‌جور $A_1 B_1$ ، $A_2 B_2$ ، $A_1 B_2$ و $A_2 B_1$ هستند و همچنین در این رابطه، f_{A_1} و f_{A_2} فراوانی آلل‌های SNP₁ و f_{B_1} و f_{B_2} فراوانی آلل‌های SNP₂ هستند. آماره r^2 برای اندازه‌گیری LD استفاده می‌شود و کاربرد آن در مورد استفاده از نشانگرهای دو آللی مانند SNPها چون مستقل از اندازه نمونه بوده بسیار سودمند است (Qanbari et al., 2010; Lu et al., 2012). در این بررسی r^2 با استفاده از برنامه haploview^{۴/۲} (Barrett et al., 2005) در فاصله بین ۱ تا ۱۰۰۰ کیلو جفت باز محاسبه شد. نگاره (گراف) LD با استفاده از بسته (پکیج) fields (Furrer et al., 2009) برنامۀ R ترسیم شد.

ساختار بلوک تک‌جوری

برای شناسایی تک‌جورها از نرم‌افزار Beagle نسخه ۳/۲ استفاده شد. در این برنامه از روش مدل پنهان مارکوف^۵ (HMM) برای فازبندی تک‌جورها استفاده می‌شود (Browning & Browning, 2007). بلوک‌های تک‌جوری با برنامه haploview نسخه ۴/۲ در فاصله بین ۱ تا ۱۰۰۰ کیلو جفت باز با استفاده از الگوریتم Gabriel et al. (2002) برای هر کروموزوم تعیین شدند. در هر منطقه از ژنگان، بزرگترین ناحیه‌ای که در آن بیش از ۹۵ درصد از جفت اسنیپ‌ها به شدت همبسته باشند یک بلوک تک‌جوری را معین می‌کند (Villa-Angulo et al., 2009).

آماره‌های مختلف پیوستگی (D', r -Square، ۲) تعیین اختصاصی ساختار تک‌جوری و ۳) تعیین اندازه مؤثر جمعیت در جمعیت گاومیش آذربایجانی بود.

مواد و روش‌ها

ساختار جمعیت

در این بررسی ۲۵۱ حیوان از جمعیت گاومیش آذری با پراکنش در منطقه‌های مختلف برای بررسی میزان نامتعادلی پیوستگی (LD)، ساختار تک‌جوری و اندازه مؤثر جمعیت استفاده شد. از منظر و دیدگاه جغرافیایی و بنابر منشاء نمونه، نژاد آذری را می‌توان در جمعیت دام‌های موجود در استان‌های شمال غرب کشور از جمله آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، اردبیل و گیلان به شمار آورد.

استخراج DNA و کنترل کیفیت داده‌های ژنگانی

استخراج DNA از نمونه‌های بافت ریشه مو و خون به ترتیب با استفاده از روش بهینه یافته Alberts et al. (2010) و استخراج نمکی بهینه یافته انجام شده بود (Rahmaninia et al., 2015; Mokhber et al., 2015). پس از بررسی کیفیت، نمونه‌های DNA برای تعیین نژادگان (ژنوتیپ) به پارک فناوری پادانو^۱ در کشور ایتالیا ارسال شد و با استفاده از SNP-chip گاومیش (۹۰K)، طراحی شده توسط شرکت Affymetrix® نمونه‌ها تعیین نژادگان شدند.

برای کنترل کیفیت داده‌های SNP، از سه معیار فراوانی آللی حداقل^۲، نرخ فراخوانی^۳ و انحراف از تعادل هاردی واینبرگ استفاده شد. تنها نشانگرهایی با فراوانی آللی حداقل بیش از ۱ درصد، نرخ فراخوانی بیش از ۹۵ درصد و p-value سطح انحراف از تعادل هاردی واینبرگ بیشتر از 10^{-6} استفاده شدند. پس از تجزیه و تحلیل کنترل کیفیت شمار ۶۲۱۴۱ جایگاه که نژادگان آنها که کیفیت مناسبی داشتند، برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی استفاده شدند. در حین مراحل کنترل کیفیت هشت حیوان از کل حیوان‌ها به دلیل نرخ فراخوانی نشانگری

1. Parco Tecnologico Padano
2. Minor Allele Frequency
3. Calling rate

4. Hidden Markov Model

چپ) سعی شده است SNP‌هایی که فراوانی آللی بینابین دارند برای طراحی تراشه استفاده شوند.

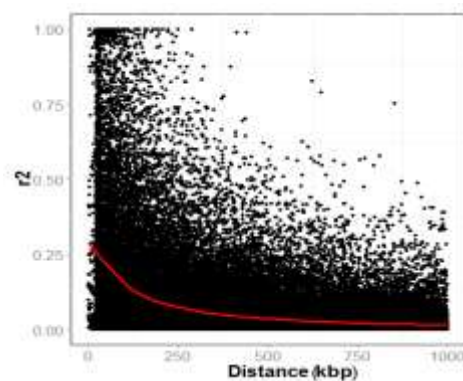
جدول ۱. توزیع فراوانی آللی نادر (MAF) در کل جمعیت

Table 1. Distribution frequency of Minor allele (MAF) in the total population

MAF	Number SNP	Proportion of SNP (%)
0.01-0.05	956	1.543
0.05-0.1	2579	4.15
0.1-0.2	9262	14.9
0.2-0.3	13595	21.87
0.3-0.4	17134	27.6
0.4-0.5	18612	29.95

آماره‌های پیوستگی (D' و r^2)

مقدار آماره‌های نامتعادلی پیوستگی یعنی r^2 و D' در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. با افزایش فاصله میان جفت SNP‌ها میزان r^2 و D' کاهش یافته است (شکل ۱) به طوری که بیشترین میانگین r^2 در فاصله ۵ تا ۷/۵ کیلو جفت باز و کمترین میزان r^2 در فاصله ۹۰۰ تا ۱۰۰۰ کیلو جفت باز به ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۳۳ است. این درحالی است که درصد SNP‌های که r^2 بالای ۰/۳ دارند، روند کاهشی دارند. در فاصله کمتر از ۱۰ کیلو جفت باز شمار بالاتری از جفت SNP‌ها r^2 بالای ۰/۳ دارند و درصد کمی از جفت SNP‌ها در فاصله بالای ۱۰۰ کیلو جفت باز r^2 بالای ۰/۳ دارند (جدول ۲).



شکل ۱. میزان نامتعادلی پیوستگی در فواصل مختلف ژنگان گاومیش‌های جمعیت‌های آذربایجانی بر پایه (R^2)
Figure 1. The extent of linkage disequilibrium in the different distances genome of buffalo population Azerbaijani based on (R^2)

ساختار تک‌جوری گاومیش‌های نژاد آذربایجانی

خلاصه‌ای از ساختار بلوک‌های تک‌جوری گاومیش‌های

برآورد اندازه مؤثر جمعیت بر پایه برآورد نامتعادلی پیوستگی

از فرمول زیر برای برآورد اندازه مؤثر جمعیت در صورت نبود پدیده جهش استفاده شد:

$$E(r^2) = \frac{1}{1+4N_e c}$$

در رابطه بالا $E(r^2)$ بیانگر میانگین ارزش r^2 برای تمام جفت SNP‌ها و c میانه فاصل بین SNP‌ها به مورگان است. و همچنین N_e اندازه مؤثر جمعیت بوده است که در فواصل < 0.25 ، $0.25 - 0.5$ ، $0.5 - 1$ ، $1 - 1.5$ ، $1.5 - 2$ ، $2 - 2.5$ و $2.5 - 3$ سانتی‌مورگان برآورد شد. افزون بر این $(1 \text{ Mb} \sim 1 \text{ CM})$ برابر با $\frac{1}{2c}$ نسل پیش است (Qanbari et al., 2010; Moradi et al., 2012).

نتایج

کنترل کیفیت و پالایش داده‌های ژنگانی برای کل جمعیت

نرخ تعیین نژادگان در افراد باقی‌مانده ۹۹/۶۸ درصد بود. در مجموع از ۸۹۸۶۴ جایگاه مورد بررسی، پس از حذف نشانگرهای با نرخ فراخوانی نژادگانی پایین، ۷۱۳۳۳ نشانگر SNP باقی ماندند و فایل خروجی با فرمت نرم‌افزار Plink ذخیره شد. درزمینه SNP‌ها هم ۳۳۶ SNP به دلیل نامتعادلی هاردی واینبرگ، ۸۸۵۵ SNP به خاطر فراوانی آللی نادر کمتر از ۰/۰۱ حذف شدند. هیچ‌کدام از SNP‌ها به دلیل نژادگان از دست‌رفته بالای ۰/۰۵ حذف نشد و در نهایت ۶۲۱۴۱ SNP برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی استفاده شد.

توزیع کمترین فراوانی آللی در سراسر ژنگان

جدول ۱ توزیع فراوانی آللی نادر در سراسر ژنگان را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، MAF ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ کمترین شمار SNP (۹۵۹ عدد) که ۱/۵۳۴ درصد از مجموع SNP و SNP‌ها با MAF ۰/۴ تا ۰/۵۰ دارای بیشترین شمار (۱۸۶۱۲ عدد) که ۲۹/۹۵ درصد از SNP‌ها را شامل می‌شود. این چنین توزیع فراوانی آللی می‌تواند ناشی از این باشد که در هنگام طراحی تراشه

کروموزوم ۱ بیشترین شمار SNP (۳۹۴۷) و بلوک‌های تک‌جوری (۱۴۱) و کروموزوم ۲۷ کمترین شمار SNP (۱۱۶۴) و کروموزوم ۲۶ کمترین شمار بلوک‌های تک‌جوری (۲۵) را داشتند. میانگین طول کل بلوک‌های تک‌جوری ۱۱۹/۴ کیلو جفت باز بود. ۸ درصد از طول ژنگان را بلوک تک‌جوری پوشش دادند که کروموزوم ۱۹ با ۱۱/۵ درصد بیشترین و کروموزوم ۱۸ با ۴/۷۲ درصد کمترین پوشش را داشتند.

جمعیت آذربایجانی در جدول ۳ ارائه شده است. از ۶۲۱۴۱ SNP در کل ژنگان ۷۱۰۲ SNP درون بلوک‌های تک‌جوری خوشه‌بندی شدند که ۱۱ درصد از کل SNP‌ها را شامل می‌شود (میانگین هر ۴ SNP درون هر بلوک). بیشترین و کمترین شمار SNP درون بلوک، به ترتیب روی کروموزوم ۱ و ۲۷ با ۵۸۴ و ۱۰۸ مشاهده شد. ۱۶۹۳ بلوک مشاهده شد که ۸ درصد (۳/۴±۲۰) مگاجفت (باز) از ژنگان اتوزومی را پوشش می‌دهد.

جدول ۲. خلاصه‌ای از تجزیه نامتعادلی پیوستگی SNP‌ها در کل ژنگان
Table 2. Summary of the analysis of linkage disequilibrium SNP in total genome

Distance(kb)	SNP pairs	r ²	SD	Median	SNP pair with r ² > 0.3 (%)	D'
<2.5	148	0.25	0.27	0.14	47(31.76)	0.71
2.5-5	119	0.28	0.29	0.15	43(36)	0.70
5-7.5	181	0.29	0.32	0.13	66(36.5)	0.70
7.5-10	142	0.27	0.27	0.16	53(37.3)	0.74
10-20	1482	0.26	0.28	0.15	485(32.73)	0.70
20-30	26443	0.24	0.26	0.14	7961(30)	0.68
30-40	16103	0.24	0.27	0.13	4847(30.1)	0.67
40-50	11905	0.20	0.24	0.11	2811(23.6)	0.63
50-60	17094	0.19	0.23	0.10	3823(22.36)	0.61
60-70	16503	0.18	0.23	0.09	3478(21.1)	0.60
70-80	15420	0.16	0.21	0.08	2861(18.55)	0.56
80-90	15753	0.15	0.20	0.07	2593(16.5)	0.55
90-100	15775	0.14	0.19	0.06	2343(14.85)	0.53
100-200	157369	0.10	0.17	0.04	15212(9.66)	0.46
200-300	157282	0.07	0.11	0.024	7030(4.46)	0.37
300-400	156234	0.04	0.085	0.015	3634(2.32)	0.30
400-500	155787	0.03	0.07	0.01	2046(1.3)	0.26
500-600	155936	0.026	0.055	0.008	1129(0.75)	0.25
600-700	155640	0.021	0.048	0.006	746(0.48)	0.24
700-800	155387	0.017	0.043	0.005	544(0.35)	0.23
800-900	154861	0.014	0.037	0.004	361(0.23)	0.22
900-1000	154735	0.012	0.033	0.004	265(0.17)	0.22

جدول ۳. خلاصه‌ای از ساختار بلوک‌های تک‌جوری در جمعیت گاومیش‌های آذربایجانی
Table 3. Haplotype block summary in total buffalo population Azerbaijani

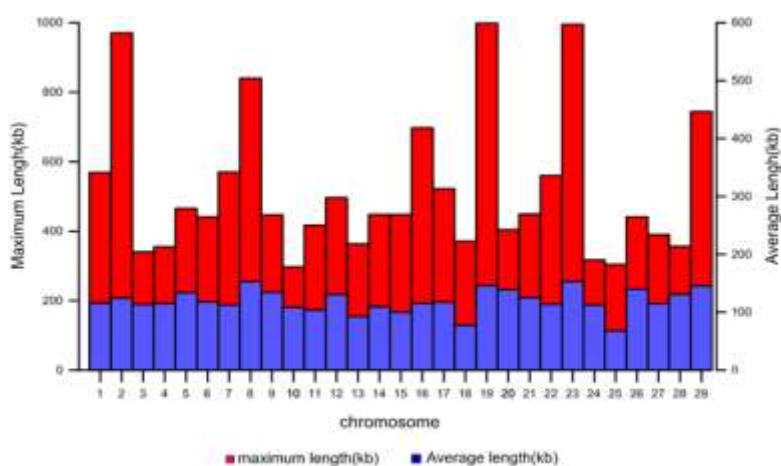
Chr	Number of SNPs	Chr length (Mb)	Average SNPs distance (kb)	Number of Blocks	Block coverage length (Mb)	Mean-Block (Kb)	% Chr block Coverage	SNPs in blocks	% SNPs in blocks
1	3947	158.13	40.06	141	16.34	115.9	10.33	584	15
2	3434	136.5	39.75	115	14.33	124.6	10.5	465	13.54
3	3024	121.22	40.1	94	10.64	113.2	8.77	392	13
4	2964	120.4	40.6	74	8.54	115.4	7.01	306	10.32
5	2961	120.53	40.71	90	12.043	133.8	10	395	13.34
6	2891	119.4	41.3	75	8.83	117.7	7.4	310	10.72
7	2781	112.5	40.45	58	6.525	112.5	5.8	253	9.1
8	2764	113.14	40.93	76	11.6	152.6	10.24	365	13.2
9	2561	105.9	41.19	62	8.33	134.3	7.9	287	11.21
10	2616	103.85	39.7	68	7.36	108.2	7.1	290	11.1
11	2668	107.13	40.15	86	8.9	103.5	8.31	338	12.8
12	2088	91.01	43.6	56	7.3	130.3	8.01	250	12
13	2160	83.7	38.74	50	4.62	92.4	5.53	190	8.8
14	2171	83.36	38.4	42	4.6	109.5	5.5	178	8.2
15	2044	84.9	41.54	50	5	100	5.9	184	9
16	1979	81.2	41.02	71	8.2	115.5	10.1	284	14.35
17	1857	75	40.37	41	4.8	117.1	6.4	180	9.7
18	1630	65.6	40.25	40	3.1	77.5	4.72	130	8
19	1601	63.5	39.66	50	7.3	146	11.5	239	15
20	1743	71.8	41.18	41	5.7	139.02	7.94	177	10.15
21	1707	71.04	41.61	52	6.5	125	9.15	222	13
22	1587	61.24	38.6	46	5.225	113.6	8.53	190	12
23	1299	52.11	40.12	35	5.34	152.6	10.23	165	12.7
24	1628	62.06	38.12	35	3.942	112.6	6.3	148	9.1
25	1167	42.7	36.6	36	2.44	67.8	5.7	115	9.85
26	1313	51.23	39.02	25	3.5	140	6.83	109	8.3
27	1164	45.33	38.94	27	3.1	114.8	6.84	108	9.3
28	1171	46.04	39.32	26	3.4	130.7	7.4	113	10.2
29	1221	50.8	41.6	31	4.5	145.2	8.9	135	11.1
Total	62141	2501.3	40 ± 1.36	1693	202 ± 3.45	119.4	8 ± 1.83	7102	11 ± 2.1

جمعیت در نژاد گاومیش آذربایجانی یک روند کاهشی را از ۲۲۰۰ نسل پیش نشان می‌دهد (شکل ۳). نتایج تجزیه و تحلیل یک روند ثابت کاهش اندازه مؤثر جمعیت در طی نسل‌های گذشته را نشان داد، به طوری که اندازه مؤثر جمعیت از ۳۴۴۳ در ۲۲۰۰ نسل پیش به ۱۴۱۶ در ۲۰۰ نسل پیش رسیده است و از ۲۰۰ تا حدود ۱۶ نسل پیش اندازه مؤثر جمعیت یک روند افزایشی داشته است. به طوری که در نسل ۲۰۰ اندازه مؤثر جمعیت به ۱۹۷۵ رسیده است پس از آن اندازه مؤثر جمعیت دوباره یک روند کاهشی در پیش گرفته است. اندازه مؤثر جمعیت در ۱/۸ نسل پیش معادل با ۴۲۲ برآورد شد.

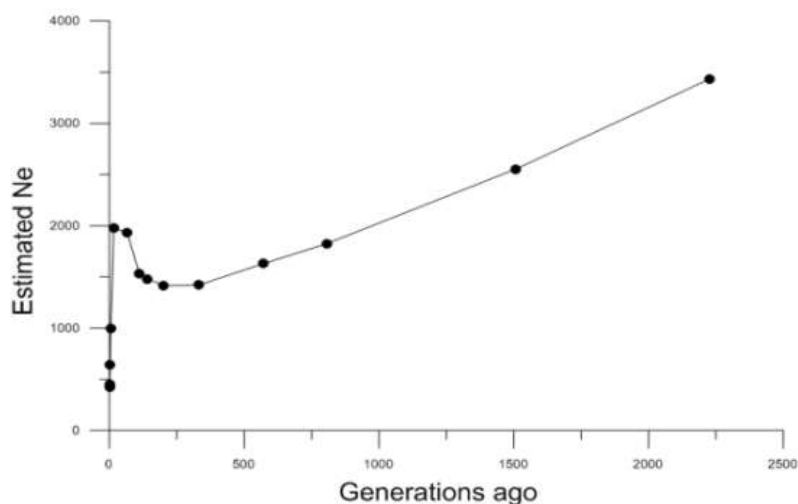
شکل ۲ میانگین و بیشترین طول بلوک تک‌جوری را در ناحیه‌های کروموزومی کل جمعیت نشان می‌دهد که بیشترین میانگین طول بلوک تک‌جوری را نواحی کروموزومی ۸ و ۲۳ با ۱۵۲/۶ کیلو جفت باز و ناحیه کروموزومی ۲۵ با ۶۷/۸ کیلو جفت باز کمترین میانگین طول بلوک را تشکیل دادند. بیشترین طول بلوک تک‌جوری مربوط به نواحی کروموزومی ۱۹، ۲۳، ۹۹۵ و ۹۹۸ کیلو جفت باز نشان داد.

اندازه مؤثر جمعیت

در شکل ۳ از داده‌های ساختار LD جمعیت برای برآورد اندازه مؤثر جمعیت استفاده شد. اندازه مؤثر



شکل ۲. میانگین و بیشترین طول بلوک‌های تک‌جوری در کل جمعیت
Figure 2. Maximum and average haplotype block length in whole population



شکل ۳. اندازه مؤثر جمعیت در گاومیش نژاد آذربایجانی
Figure 3. Effective population size in Azarbaijani breed buffalo

بحث

در این بررسی، میزان LD با استفاده از آماره R^2 در سراسر ژنگان گاومیش آذربایجانی برآورد شد. دلیل استفاده از r^2 به جای D' برای ارزیابی اندازه‌گیری‌های LD در یک جمعیت، به دلیل این واقعیت است که r^2 کمتر تحت تأثیر فراوانی آلی قرار می‌گیرد. در مقایسه با D' ، که تمایل به برآورد بیش از حد LD در نمونه‌های کوچک و فراوانی آلی پایین دارد (Ardlie et al., 2002; Lu et al., 2012). در ۸۱۰ راس گاو هلشتاین-فریزین آلمانی با استفاده از ۴۰۸۵۴ SNP، میانگین LD در فاصله کمتر ۲۵ کیلو جفت باز میان جفت SNP ها ۰/۳۰ گزارش شد (Qanbari et al., 2010). تراکم SNP و اندازه نمونه در میزان r^2 محاسبه‌شده نقش به‌سزایی دارند. در نتایج بررسی دیگری کاهش LD به‌عنوان تابعی از فاصله فیزیکی گزارش شد (Qanbari et al., 2010) و در این بررسی با افزایش فاصله فیزیکی کاهش LD و تنوع LD بین ناحیه‌های ژنگانی و کروموزوم‌ها را نشان داد. این تنوع احتمال دارد به دلیل نرخ متفاوت نوترکیبی میان و درون کروموزوم، ناخالصی (هتروزیگوسیتی)، رانش ژنتیکی و اثر انتخاب باشد. نتایج LD در این بررسی همسان به ارزیابی (Lu et al., 2012) در جمعیت آنگوس، شاروله و آمیخته است. مقدار نامتعادلی پیوستگی به ترتیب در فواصل ۰-۳۰ کیلو جفت باز، ۳۰-۷۰ کیلو جفت باز و ۷۰-۱۰۰ کیلو جفت باز در آنگوس از ۰/۲۹ به ۰/۲۳ و به ۰/۱۹، در شاروله از ۰/۲۲ به ۰/۱۶ و به ۰/۱۲ و در دوره از ۰/۲۱ به ۰/۱۵ و به ۰/۱۱ کاهش پیدا کرد. در گاومیش‌های جمعیت آذربایجانی در فاصله کمتر از ۱۰ کیلو جفت باز، تنوع LD در میان نواحی کروموزومی ۱۱، ۱۸، ۲۹ مشاهده شد. در نواحی دیگر کروموزومی تنوع LD در این فاصله مشاهده نشد. در کروموزوم ۱۱ افزایش LD و در کروموزوم‌های ۱۸ و ۲۹ کاهش LD مشاهده شد. این تغییرپذیری‌ها را می‌توان به عامل‌های بسیاری، مانند تفاوت در نرخ نوترکیبی میان و درون کروموزوم‌ها، ناخالصی، اثرگذاری انتخاب و رانش ژنتیکی نسبت داد (Hedrick, 2005).

شناسایی و تحلیل نتایج تعیین بلوک‌های تک‌جوری، باعث پی‌بردن با درستی بالا در زمینه تاریخچه جمعیت، نرخ نوترکیبی و جهش، شواهد انتخاب مثبت و

اطلاعات بسیار از ژن بررسی‌های پویش بیماری را فراهم می‌کند. آشکارسازی ساختار بلوک تک‌جوری باعث تجمع نتایج چند SNP شده و کاهش تراکم SNP یک راهکار مهم در بررسی‌های پویش ژنگان و انتخاب ژنگانی است (Villa-Angulo et al., 2009). بسیاری از بررسی‌های منتشرشده در زمینه LD و بلوک تک‌جور در گاو، در بسیاری از جنبه‌ها (نژادهای انتخابی، نوع نشانگر، تراکم نشانگر و مناطق کروموزومی) با هم متفاوت‌اند. نقشه اولیه LD کل ژنگان بر پایه یک پانل ۹۱۹۵ SNP طراحی شد که، ۷۲۷ بلوک با شمار سه یا بیشتر SNP در هر بلوک (میانگین طول = ۶۹/۷ کیلو جفت باز) و پوشش ۲/۱۸ درصد ژنگان گزارش شد (Khatkar et al., 2007). در نتایج یک بررسی همسان، ویژگی‌های LD کروموزوم ۱۴ در گاو هلشتاین و آنگوس را با هم مقایسه و ۶۴ بلوک (از ۳۳ جفت باز تا ۱۱۲۶ کیلو جفت باز) گزارش کردند (Marques et al., 2008). در نتایج بررسی دیگری که در گاو هلشتاین صورت گرفت که ۱۱۹ بلوک تک‌جوری (با بیش از ۴ SNP در هر بلوک) و میانگین طول بلوک ۲۶/۲ کیلو جفت باز گزارش شد (Kim & Kirkpatrick, 2009). بلوک‌های بزرگ‌تر مشاهده‌شده در گاوهای هلشتاین نسبت به انسان دلالت بر LD بیشتر گاو نسبت به جمعیت‌های انسانی دارد (Qanbari et al., 2010). هرچه شمار نشانگر افزایش یابد شمار بلوک‌های تک‌جور بیشتری شناسایی می‌شود (Villa-Angulo et al., 2009).

در این بررسی ۱۱ درصد از کل SNP‌ها درون بلوک‌های تک‌جوری خوشه‌بندی شده (میانگین هر ۴ SNP درون هر بلوک)، و ۸ درصد (۳/۴±۲۰۲) مگاجفت باز) از ژنگان اتوزومی را بلوک تک‌جور پوشش می‌دهد، که در مقایسه با نتایج بررسی‌های دیگر مقادیر پایین‌تری را نشان می‌دهد که این می‌تواند به دلیل شمار نشانگر و شمار نمونه استفاده‌شده باشد. ممکن است نوترکیبی، گلوگاه جمعیتی و انتخاب طبیعی نقش پررنگ‌تری در ساختار بلوک‌های تک‌جوری نژاد آذربایجانی داشته باشند.

اطلاعاتی از تاریخچه تکاملی جمعیت می‌تواند با استفاده از نامتعادلی پیوستگی به دست آید. تاریخچه

پیش احتمال دارد به دلیل رخ دادن یک گلوگاه در این جمعیت باشد که این رخداد باعث افزایش LD شده است. از سویی افزایش اندازه مؤثر جمعیت از ۲۰۰ تا ۱۶ سال پیش ممکن است به دلیل انتخاب طبیعی و استفاده نکردن از تلقیح مصنوعی در گاو میش‌های آذربایجانی باشد. مورد دیگری که در نمودار اندازه مؤثر جمعیت گاو میش آذربایجانی مشاهده شد، کاهش سریع اندازه مؤثر جمعیت از حدود ۱۶ تا ۱/۸ نسل پیش است که علت آن احتمال دارد به دلیل تغییر در نوع نظام پرورشی باشد، با توجه به بیشینه پرورش گاو میش در ایران این احتمال وجود دارد که پرورش از نظام سنتی روستایی به سمت نیمه سنتی و در پی آن انتخاب و کنترل جفت‌گیری در بین پرورشدهندگان رواج یافته باشد.

نتیجه‌گیری

تحلیل ساختار بلوک تک‌جوری در کل ژنگان گاو میش آذربایجانی نشان داد، تراکم چهار نشانگر را در هر بلوک و میانگین طول کل بلوک‌های تک‌جوری ۱۱۹/۴ کیلو جفت باز بود. نامتعادلی پیوستگی از فاصله ۱۰۰ کیلو جفت باز به بعد کاهش شدیدی را نشان داد. سطح LD به دست آمده در این بررسی ($R^2 > 0.20$) نشان می‌دهد، این میزان برای انتخاب ژنگانی و شناسایی QTL‌های مناسب قابل اجرا است همچنین اندازه مؤثر جمعیت حدود دو نسل پیش نزدیک به ۴۲۲ برآورد شد.

اندازه مؤثر جمعیت در دام‌های اهلی می‌تواند برای بررسی راهبردهای اصلاح نژاد و اطلاعاتی از سطح همخوانی در جمعیت‌های دارای شجره ناقص یا غیر قابل دسترس فراهم کنند (Corbin et al., 2002). در نتایج بررسی‌های دیگر گزارش شده است، در جمعیت نژاد اسب تربورد یک گلوگاه رخ داده است و باعث ایجاد یک قله در نمودار اندازه مؤثر این نژاد شده است. در نمودار اندازه مؤثر جمعیت نژاد تربورد پایین‌ترین نقطه منحنی اندازه مؤثر جمعیت هنگامی است که این نژاد شکل گرفته است، این زمان به طور میانگین در حدود ۲۱/۵ نسل پیش یعنی در سال ۱۹۶۰ میلادی است (Mahon et al., 1982). نرخ پایین تولیدمثل مادیا و ممنوعیت استفاده از تلقیح مصنوعی، به احتمال فراوان اندازه جمعیت را افزایش می‌دهد (Corbin et al., 2010). در چند دهه گذشته خوک تجاری غربی برای تولید بالا تحت انتخاب مصنوعی شدید قرار گرفته است و در نتیجه این انتخاب، اندازه مؤثر جمعیت کم شده است. همچنین خوک وحشی اروپایی در نتیجه انقراضی که در جزایر بریتانیا و در بخش‌هایی از شمال اروپا رخ داده بود، دچار کاهش چشمگیری در اندازه جمعیت شد که نشان‌دهنده رخ دادن گلوگاه جمعیت در این مناطق بوده است (Amaral et al., 2008). کاهش اندازه مؤثر جمعیت گاو میش آذربایجانی از ۲۲۰۰ تا ۱۰۰ سال

REFERENCES

1. Alberts, C., Ribeiro-Paes, J., Aranda-Selverio, G., Cursino-Santos, J., Moreno-Cotulio, V., Oliveira, A., Porchia, B., Santos, W. & Souza, E.B. (2010). DNA extraction from hair shafts of wild Brazilian felids and canids. *Genetics and Molecular Research*, 9(4), 2429-2435.
2. Amaral, A. J., Megens, H. J., Crooijmans, R. A., Heuven, H. M. & Groenen, M. M. (2008). Linkage disequilibrium decay and haplotype block structure in the pig. *Genetics*, 179(1), 569-579.
3. Ardlie, K. G., Kruglyak, L. & Seielstad, M. (2002). Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 3, 299-309.
4. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), 263-265.
5. Browning, S. R. & Browning, B. L. (2007). Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. *The American Journal of Human Genetics*, 81, 1084-1097.
6. 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, 8-15.
7. De La Vega, F. M., Dailey, D., Ziegler, J., Williams, J., Madden, D. & Gilbert, D. A. (2002). New generation pharmacogenomic tools: a SNP linkage disequilibrium Map, validated SNP assay resource, and high-throughput instrumentation system for large-scale genetic studies. *Biotechniques*, 48(50), 52-54.

8. Espigolan, R., Baldi, F., Boligon, A. A., Souza, F. R., Gordo, D. G., Tonussi, R. L., Cardoso, D. F., Oliveira, H. N., Tonhati, H., Sargolzaei, M., Schenkel, F. S., Carvalheiro, R., Ferro, J. A. & Albuquerque, L. G. (2013). Study of whole genome linkage disequilibrium in Nelore cattle. *BMC Genomics*, 14, 305-313.
9. Farnir, F., Coppieters, W., Arranz, J., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Mni, M., Nezer, C., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D. & Georges, M. (2000). Extensive Genome-wide Linkage Disequilibrium in Cattle. *Genome Research*, 10, 220-227.
10. Furrer, R., Nychka, D. & Sain, S. (2009). Fields: Tools for spatial data. *R package version*, 6(11).
11. Gabriel, S. B., Schaffner, S. F., Nguyen, H., Moore, J. M., Roy, J. & Blumenstiel, B. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 296(5576), 2225-2229.
12. Hedrick, P. W. (2005). Genetics Of Populations. Jones and Bartlett Publishers. *Biological Science (Jones and Bartlett) Series*.
13. Khatkar, M. S., Collins, A. & Cavanagh, J. A. L. (2006). A first generation metric linkage disequilibrium map of bovine chromosome 6. *Genetics*, 174, 79-85.
14. Khatkar, M. S., Zenger, K. R. & Hobbs, M. (2007). A primary assembly of a bovine haplotype block map based on a 15,036 single nucleotide polymorphism panel genotyped in Holstein Friesian cattle. *Genetics*, 176, 763-772.
15. Kim, E. S. & Kirkpatrick, B. W. (2009). Linkage disequilibrium in the North American Holstein population. *Animal Genetics*, 40, 279-88.
16. Lu, D., Sargolzaei, M., Kelly, M., Li, C., Vander Voort, G., Wang, Z., Plastow, G., Moore, S. & Miller, S. P. (2012). Linkage disequilibrium in Angus, Charolais, and Crossbred beef cattle. *Frontiers in Genetics*, 3(152), 3389-3399.
17. Mahon, G. A. T. & Cunningham, E. P. (1982). Inbreeding and the inheritance of fertility in the thoroughbred mare. *Livestock Production Science*, 9, 743-54.
18. Marques, E., Schnabel, R. & Stothard, P. (2008). High density linkage disequilibrium maps of chromosome 14 in Holstein and Angus cattle. *BMC Genetics*, 9, 45-57.
19. Mokhber, M. (2015). *Genome-wide survey of signature of positive selection in Khuzestani and Mazandrani buffalo breeds*. Ph.D. thesis. Faculty of Agriculture Tehran University, Iran. (In Farsi).
20. Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds, K. G. & McEwan, J. (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), 1186-1201.
21. Mokry, F. B., Buzanskas, M., de-Alvarenga, M. & Sargolzaei, M. (2014). Linkage disequilibrium and haplotype block structure in a composite beef cattle breed. *BMC Genomics*, 10, 1186-1197.
22. Patil, N., Berno, A. J., Hinds, D. A., Barrett, W. A., Doshi, J. M., Hacker, C. R., Kautzer, C. R., Lee, D. H., Thomas, D. J., Trulson, M. O., Vyas, K. R., Frazer, K. A., Fodor, S. P. & Cox, D. R. (2001). Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science*, 294(5547), 1719-1723.
23. 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, 346-356.
24. Rahmaninia, J. (2015). *Population structure analysis within Iranian Buffalo breeds Using dense SNP markers*. Ph.D. thesis. Faculty of Agriculture Tehran University, Iran. (in Farsi)
25. Villa-Angulo, R., Matukumalli, L. K., Gill, C. A., Choi, J., Van Tassell, C. P. & Grefenstette, J. J. (2009). High-resolution haplotype block structure in the cattle genome. *BMC Genetic*, 10(19), 1471-2156.