

مقاله پژوهشی:

شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی در ژنوم اکوتیپ‌های مرغ شاخدار ایران برای مطالعه روابط فیلوژنتیکی و میزان همخونی

رعنا پدر^۱، علی اسمعیلی زاده کشکوئیه^{۲*}، احمد آیت‌اللهی مهرگردی^۳، حجت اسدالله پور نعنایی^۴ و حامد خراتی کوپایی^۵
۱، ۲، ۳ و ۴. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد، دانشیار و دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۵. دانش‌آموخته دکتری تخصصی زیست‌فناوری، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۷)

چکیده

هدف از انجام این پژوهش شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی به منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف مرغ گینه‌ای (مرغ شاخدار) در ایران می‌باشد. داده‌های ژنومی ۱۸ قطعه مرغ گینه‌ای مربوط به شش اکوتیپ مختلف ایران، شامل اکوتیپ‌های تبریز (آبی و خاکستری)، رشت، تبریز (سفید)، تلافی رشت و تبریز (آبی و خاکستری)، شیراز و لار تهیه شد. توالی‌یابی کل ژنوم نمونه‌های مرغ گینه‌ای به صورت Paired-End با طول خوانش ۱۲۵ جفت باز انجام شد. واکاوی فیلوژنی بر پایه روش‌های اتصال مجاورین و حداکثر درست‌نمایی انجام شد. میزان همخونی ژنومی با نرم افزار PLINK برای اکوتیپ‌ها با طول‌های مختلف از ژنوم برای شناسایی قطعات هموزایگوس به کار گرفته شد. تعداد ۱۴/۴۸ میلیون چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی شناسایی شد. نتایج واکاوی فیلوژنتیکی با استفاده از هر دو روش نشان داد که دو اکوتیپ شیراز و لار بیشترین مشابهت ژنتیکی را دارند و سایر اکوتیپ‌ها در گروه‌های جداگانه‌ای قرار می‌گیرند. نتایج همخونی در سطح ژنوم نشان داد که اکوتیپ تبریز (سفید) دارای بیشترین و اکوتیپ تبریز (آبی و خاکستری) دارای کمترین میزان همخونی هستند. نتایج این پژوهش می‌تواند درک بهتری را از ساختار ژنتیکی اکوتیپ‌های مرغان شاخدار برای توسعه برنامه‌های بهنژادی ارائه نماید.

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنی، چندشکلی ژنتیکی، مرغ گینه‌ای.

Identification of single nucleotide polymorphism in Iranian Helmeted Guinea fowl ecotypes to study the phylogenetic relationships and inbreeding

Rana Pedar¹, Ali Esmailizadeh^{2*}, Ahmad Ayatollahi Mehrgardi³, Hojjat Asadollahpour Nanaei⁴
and Hamed Kharrati-Koopae⁵

1, 2, 3, 4. M.Sc. Graduate, Professor, Associate Professor and Ph.D. Graduate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

5. Ph.D. Graduate, Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran

(Received: Apr. 27, 2021 - Accepted: Dec. 28, 2021)

ABSTRACT

The Helmeted Guinea fowls were originated from West Africa and spread widely across the world, due to their ability to adapt to different environmental conditions. The main goal of this investigation was to identify the single nucleotide variations (SNVs) in order to explain the genetic structure of Helmeted Guinea fowl in Iran. The whole genome of six Guinea fowl ecotypes (18 samples) including Tabriz (blue and grey), Rasht, Tabriz (white), Rasht×Tabriz cross, Shiraz and Lar were sequenced. Paired-end libraries with 125 bp of Guinea fowl samples were sequenced by whole genome Illumina platform. The phylogenetic tree analysis based on the maximum likelihood and neighbor joining was constructed. Runs of homozygosity (ROHs) were detected across all individual genomes by PLINK software. In the current study, around 14.48 million SNVs were detected. To evaluate the phylogenetic relationships among all Guinea fowl ecotypes, we applied two different phylogenetic methods based on neighbor-joining and maximum-likelihood methods. Similar results were reported by these methods, all Helmeted Guinea fowl ecotypes were classified separately except Shiraz and Lar ecotypes, which showed the most amount of genetic similarities. The results of runs of homozygosity (ROH) analysis indicated that the highest level of inbreeding at all levels of ROH were observed in the white Tabriz ecotype, in contrast Tabriz (blue and grey) ecotype showed the lowest level of inbreeding at all levels of ROH. These findings can provide new insight into genetic structure of Helmeted Guinea fowl ecotypes in order to develop the breeding programs.

Keywords: Helmeted Guinea fowls, genetic variants, phylogenetic analysis.

* Corresponding author E-mail: aliesmaili@uk.ac.ir

مقدمه

مطالعه تنوع و ساختار ژنتیکی یک جمعیت می‌تواند نشان‌دهنده پتانسیل پهن‌زادی و نحوه اجرای برنامه‌های حفاظت ژنتیکی باشد. عوامل گوناگونی می‌توانند بر ساختار ژنتیکی یک جمعیت تأثیرگذار باشند. محیط به‌عنوان یکی از عوامل مهم می‌تواند سرمنشا تغییرات ژنومی باشد. گونه‌ها در طول زمان با تغییرات زیست محیطی مانند تغییر اقلیم، آلودگی‌های محیطی و بیماری‌ها مواجه هستند. ساختار ژنتیکی به‌عنوان یک ابزار قدرتمند می‌تواند برای سازگاری جمعیت‌ها مفید واقع شود (Frankham *et al.*, 2002). با توجه به پویا بودن DNA، ژنوم قادر است برای تغییرات گوناگون محیطی پاسخ مناسبی در جهت سازگاری جاندار با محیط ایجاد نماید. در این راستا، فناوری‌های نسل جدید توالی‌یابی، دستاوردهای قابل توجهی مانند شناسایی نواحی تحت انتخاب را جهت درک بهتر عملکرد ژنوم ارایه نموده است (Kharrati-Koopae *et al.*, 2019).

اولین گام برای فهم ساختار ژنوم انجام نقشه‌یابی آن است. در این فرآیند مکان‌های فیزیکی نسبی ژن‌ها و جهش‌ها بر روی کروموزوم‌ها شناسایی می‌شوند. همچنین در ساده‌ترین حالت، می‌توان ترتیب و فواصل نسبی نشانگرهای ژنتیکی را روی کروموزوم‌ها تشریح کرد (Gupta *et al.*, 1999). اولین نقشه‌ی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی در مرغ براساس استفاده از واکای داده‌های توالی EST^۱ ایجاد شد (Liu, 2011). با تکمیل موفقیت‌آمیز پروژه‌های توالی‌یابی و پیشرفت‌های شگرف در تعیین کردن ژنوتیپ چندشکلی‌های سطح ژنوم، این امکان فراهم شده است که از چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی^۲ (SNVs) در یک مقیاس ژنومی بتوان برای مطالعه ساختار ژنتیکی یک جمعیت استفاده نمود (Hiendleder *et al.*, 2005). علاوه بر این، ژنوم در برگزیده تغییرات مختلف دیگری از جمله چندشکلی‌های ساختاری، حذف و اضافه‌های کوچک و تغییرات چند نوکلئوتیدی^۳ (MNV) می‌باشد. در این میان چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی از اهمیت زیادی در

مطالعات ژنومی برخوردار هستند. این چندشکلی‌ها نشان‌دهنده تغییرات تک‌نوکلئوتیدی در سطح ژنوم هستند که به دلایل گوناگونی مانند فراوانی و توزیع گسترده در سطح ژنوم و وراثت‌پذیر بودن مورد توجه پژوهشگران می‌باشند (Koopae & Koshkoiyeh, 2014). مرغ گینه‌ای (*Numida meleagris*) پرنده بومی قاره آفریقا می‌باشد و تولید آن به سرعت در سراسر جهان در حال افزایش است. نام اولیه این پرنده (مرغ گینه‌ای) می‌تواند معرف منشاء و زادگاه اصلی آن به حساب آید. این مرغ تحت عنوان مرغ شاخدار یا مرغ مروراید نیز شناخته می‌شود (Crawford, 1990). مرغ گینه‌ای می‌تواند به خوبی تحت شرایط نیمه‌فشرده با کمترین هزینه پرورش یابد و به همین دلیل در سال‌های اخیر، مرغ شاخدار به عنوان یک پرنده جایگزین برای تولید گوشت و تخم مرغ اهمیت داده شده است (Sarica *et al.*, 2007). تاکنون مطالعاتی برای بررسی ساختار ژنتیکی و میزان همخونی مرغ گینه‌ای در دنیا صورت گرفته است. در پژوهشی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تنوع ژنتیکی پنج جمعیت مرغ شاخدار در کشور سودان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که میزان هتروزیگوسیتی برابر با ۰/۴۹-۰/۳۶ می‌باشد و تنوع ژنتیکی قابل توجهی در جمعیت مورد مطالعه وجود دارد. علاوه بر این، نتایج آنالیز فیلوژنی نشان داد که جمعیت‌های وحشی مرغ شاخدار با جمعیت‌های اهلی شده در محیط‌های پرورش، از نظر ساختار ژنتیکی متفاوت می‌باشند (Weimann *et al.*, 2016). پژوهش مشابه دیگری در کشور غنا با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره روی جمعیت‌های متفاوت از مرغ شاخدار، شامل سه جمعیت از کشور غنا، یک جمعیت از کشور بنین (Benin) در غرب آفریقا و دو جمعیت از کشور ژاپن انجام گرفت. نتایج حاصل نشان داد که جمعیت‌های متعلق به کشورهای غنا و بنین دارای مشابهت ژنتیکی بیشتری هستند و با جمعیت‌های مربوط به کشور ژاپن کمترین شباهت ژنتیکی را دارا می‌باشند (Kayang *et al.*, 2010).

در مطالعه دیگری ساختار ژنتیکی دو جمعیت از مرغ شاخدار که از نظر پوشش رنگ پر (سیاه و سفید) متفاوت بودند، با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد مطالعه قرار

1. Expressed sequence tag
2. Single nucleotide variation
3. Multi nucleotide variation

مزیت‌های متعدد این گونه برای پرورش در ایران متاسفانه تاکنون پژوهش کاملی در سطح ژنوم برای شناسایی ساختار و پتانسیل ژنتیکی این گونه ارزشمند انجام نگرفته است. مطالعات در مورد تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت داخل و بین گونه‌ها نه تنها فرآیند های تکاملی را نشان می‌دهد بلکه اطلاعات مفیدی را برای بهنژادی و اجرای برنامه‌های حفاظت ژنتیکی گونه‌های اهلی، می‌تواند فراهم کند (Adeola et al., 2015). مطالعه حاضر اولین پژوهش برای مطالعه ساختار ژنتیکی مرغ شاختار ایران در سطح ژنوم به منظور بهره برداری بهتر از این گونه در جهت افزایش تولید می‌باشد.

مواد و روش ها

نمونه گیری، استخراج DNA و توالی‌یابی

در پژوهش حاضر به منظور ارزیابی ساختار ژنتیکی و توالی‌یابی ژنوم مرغ شاختار، از تعداد ۱۸ قطعه از اکوتیپ‌های مختلف مرغ شاختار در مناطق مختلف شامل استان فارس (شیراز و لار)، استان آذربایجان شرقی (تبریز)، استان گیلان (رشت) و جوجه های حاصل از تلاقی تبریز (آبی و خاکستری) و رشت خونگیری انجام شد. (جدول ۱). در این مرحله مقدار ۱/۵ تا ۲ سی سی خون در داخل لوله‌های ضدانعقاد حاوی EDTA^۲ تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شد.

جدول ۱. مناطق نمونه‌گیری اکوتیپ‌های مرغ شاختار ایران

Table 1. Information of sampling regions of guineafowls ecotypes

| Provinces and ecotypes | Number of birds | Latitude | Longitude |
|------------------------|-----------------|----------|-----------|
| Fars (Shiraz) | 2 | 29°61'N | 55°53'E |
| Fars (Lar) | 3 | 27°40'N | 54°14'E |
| Guilan (Rasht) | 2 | 37°20'N | 49°40'E |
| Tabriz | 9 | 38°7'N | 46°20'E |
| Tabriz×Rasht | 2 | 38°7'N | 46°20'E |
| Total | 18 | | |

استخراج DNA با روش استخراج نمکی در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام گرفت. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و

گرفت. میزان مشابهت ژنتیکی در بین دو جمعیت برابر با ۰/۷۶ برآورد گردید. همچنین میزان شباهت ژنتیکی در داخل جمعیت سفید و سیاه رنگ به ترتیب برابر با ۰/۷۸ و ۰/۷۳ محاسبه شد (Haddad, 2020).

افت ناشی از همخونی، پدیده ای مضر در حیوانات اهلی است که ناشی از آمیزش خویشاوندی است. پرورش خویشاوندی تلاقی‌های متوالی بین دو فرد است که رابطه خویشاوندی آنها بیش از میانگین جامعه است و منجر به کاهش شایستگی فرزندان و کاهش تنوع ژنتیکی در جامعه می‌شود. ROH^۱ مناطق هموزایگوت ژنومی هستند که در آن محل دارای یکسانی اجدادی هستند. فراوانی قطعات ROH با طول کوتاه نشان‌دهنده سطح همخونی در زمان های گذشته است و فراوانی قطعات ROH با طول بلند، معیاری جهت سنجش سطح همخونی در سال‌های نه‌چندان دور می‌باشد (Nanaei et al., 2021). محاسبه میزان هم خونی با استفاده از داده‌های نسل جدید توالی‌یابی می‌تواند تا حدودی اشکالات محاسبه همخونی بر پایه اطلاعات شجره را تصحیح نماید. خطاهای احتمالی در ثبت شجره ها و نیز عمق شجره، دو عامل تأثیرگذار بر روی محاسبه میزان همخونی در روش ثبت شجره محسوب می‌شوند (Al-Mamun et al., 2015).

زیستگاه این مرغ در ایران، بیشتر در مناطق جغرافیایی غرب و شمال غرب کشور است. تراکم جمعیت این گونه در استان آذربایجان شرقی و اردبیل بیشتر از سایر مناطق بوده و به رنگ‌های خاکستری، خاکستری مایل به آبی و به ندرت سفید مشاهده می‌شود. مرغ شاختار قادر به رشد در نواحی گرم و خشک می‌باشد و از این جهت با شرایط اقلیمی ایران سازگاری مناسبی را نشان می‌دهد. از طرف دیگر نسبت به بیشتر بیماری‌های متداول در طیور صنعتی مقاوم بوده و تولید آن حتی در شرایط نامناسب مدیریت کمتر تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به دلیل مقاومت در برابر بیماری‌ها در این گونه از واکسن ها و داروها کمتر استفاده می‌شود و به همین دلیل علاوه بر کاهش هزینه‌های تولید، می‌تواند به‌عنوان یک محصول پروتئینی نزدیک به ارگانیک در نظر گرفته شود. با وجود

2. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

1. Run of homozygosity

UnifiedGenotyper در برنامه GATK گزارش شدند (McKenna *et al.*, 2010). قابل ذکر است که کنترل کیفی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی بدست آمده با استفاده از نرم افزارهای Vcftools و PLINK انجام شد (Purcell *et al.*, 2007; Danecek *et al.*, 2011).

واکای فیلوژنی و میزان همخونی ژنومی

بررسی روابط فیلوژنی بین افراد می‌تواند به عنوان معیاری جهت سنجش میزان آمیختگی و خلوص نژادی مورد استفاده قرار گیرد. در این پژوهش به منظور بررسی روابط فیلوژنی بین افراد مورد مطالعه از دو روش اتصال مجاورین^۲ و حداکثر درست نمایی^۳ استفاده شد. روش اول با استفاده از نرم افزار مگا (MEGA) (Tamura *et al.*, 2013) تحت سیستم عامل لینوکس انجام شد. برای رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار فوق، ۱۰۰۰۰ تکرار بوت استراپ جهت ارزیابی درخت تشکیل شده به کار گرفته شد. همچنین در روش دوم از نرم‌افزار FastTere2 (Price *et al.*, 2010) تحت محیط لینوکس استفاده شد.

به‌منظور مطالعه سطح همخونی در جمعیت‌های موردبررسی از نرم‌افزار PLINK (Purcell *et al.*, 2007) و دامنه‌های مختلفی شامل: ۱۰۰ کیلو باز، ۲۰۰ کیلو باز، ۳۰۰ کیلو باز و ۴۰۰ کیلو باز استفاده شد (Nosrati, 2017).

$$F_{ROH} = \sum_k \text{Length}(ROH_k)/L$$

در این رابطه F میزان همخونی بر اساس ROH، k نشان‌دهنده تعداد قطعات ROH شناسایی شده برای هر فرد و L برابر با طول کل ژنوم می‌باشد (Zanella *et al.*, 2018)

نتایج و بحث

کیفیت DNA استخراج شده و فایل‌های توالی‌یابی کیفیت DNA استخراج شده با وجود باندهای کاملاً واضح و بدون کشیدگی تایید گردید. عدم وجود کشیدگی در فاصله بین چاهک و باند DNA حاکی از عدم وجود آلودگی پروتئینی و نبودن وجود باند اضافی

۲۶۰/۲۳۰ دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد تعیین گردید (Esfandiari *et al.*, 2020). توالی‌یابی کل ژنوم نمونه‌های مرغ گینه‌ای به صورت Paired-End با طول خوانش ۱۲۵ جفت باز توسط شرکت ایلومینا و پلت فرم Hiseq2500 انجام شد (Shen *et al.*, 2021).

همردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع و شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی

برای انجام همردیفی توالی‌های کوتاه با ژنوم مرجع، از ژنوم مرجع مرغ گینه‌ای (HGFv1) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_014595935.1) استفاده شد. این ژنوم مرجع شامل ۷۴ عدد کروموزوم اتوزومی، کروموزوم Z، ژنوم میتوکندری و نیز قطعات کوچک ناشناخته ژنوم می‌باشد. در این پژوهش جهت همردیفی خروجی‌های توالی‌یابی با ژنوم مرجع از برنامه BWA^۱ استفاده شد (Esmailizadeh *et al.*, 2021). پس از انجام همردیفی، کیفیت این مرحله با دو پارامتر درصد همردیفی خوانش‌ها با ژنوم مرجع و coverage بررسی شد. به منظور محاسبه درصد همردیفی با ژنوم مرجع و coverage از دستورات flagstat و depth به کار برده شده در نرم‌افزار Samtools استفاده شد (Li & Durbin, 2009).

ابتدا فایل‌های حاصل از همردیفی با پسوند bam به‌وسیله دستور Sort در برنامه Samtools بر اساس موقعیت ژنومیک مرتب گردیدند (Li *et al.*, 2009). سپس حذف PCR duplicates با استفاده از پکیج MarkDuplicates.jar از مجموعه پکیج‌های picard انجام گرفت (www.github.com/broadinstitute/picard). در مرحله بعد با انجام همردیفی مجدد خطاهای احتمالی مرحله همردیفی تصحیح گردید. کالیبره کردن نمره‌های کیفیت باز به منظور تصحیح خطاهای توالی‌یابی و دیگر خطاهای مربوط به آزمایش با استفاده از ابزار BaseRecalibrator در برنامه GATK، انجام گرفت. در نهایت چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی با استفاده از ابزار

2. Neighbor joining
3. Maximum likelihood

1. Burrows-Wheeler Aligner

در این مطالعه تعداد ۱۴/۴۸ میلیون چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی برای ۱۸ نمونه مرغ شاخدار مربوط به ۶ اکوتیپ به دست آمد (جدول ۳).

جدول ۳. تعداد چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی برای اکوتیپ‌های مورد مطالعه مرغ شاخدار در حالت قبل و بعد از فیلتر کردن

Table 3. The count of filtered and non-filtered SNVs for studied Guinea fowl ecotypes

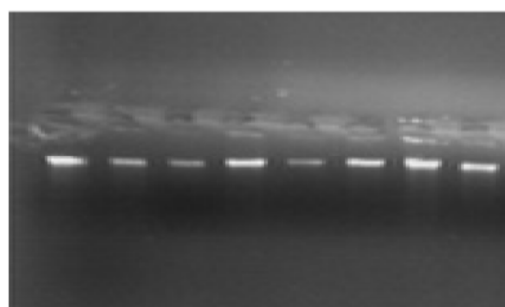
| Ecotype | Count of filtered SNVs | Count of non-filtered SNVs |
|------------------------------|------------------------|----------------------------|
| Shiraz | 12722087 | 13584712 |
| Lar | 12258117 | 13956743 |
| Tabriz (white) | 13304171 | 14489657 |
| Tabriz (Blue and grey) | 1048546 | 1096325 |
| Rasht | 11193835 | 12004215 |
| Tabriz (Blue and grey)*Rasht | 8744096 | 9326985 |
| Total variants | 11858963 | 14489657 |

نتایج درخت فیلوژنی و میزان همخوانی در سطح ژنوم
درخت‌های فیلوژنی جهت نمایش ارتباطات میان جمعیت‌ها بر پایه دو روش، اتصال مجاورین و نیز حداکثر درست‌نمایی رسم شدند. نتایج واکاوی فیلوژنی حاصل از روش اتصال مجاورین نشان داد که تمام اکوتیپ‌های مورد بررسی به جز اکوتیپ‌های شیراز و لار از نظر ژنتیکی با یکدیگر متفاوت هستند و در دسته‌های جداگانه‌ای قرار می‌گیرند. دو اکوتیپ لار و شیراز، بیشترین شباهت ژنتیکی را در بین اکوتیپ‌ها نشان دادند، که البته با توجه به خاستگاه پراکنش جغرافیایی این دو اکوتیپ (شیراز و لار) دور از انتظار نبود. شکل ۲، نتایج حاصل از واکاوی فیلوژنی به روش اتصال مجاورین را برای اکوتیپ‌های مرغ شاخدار نشان می‌دهد.

یافته‌های حاصل از واکاوی فیلوژنی مبنی بر روش حداکثر درست‌نمایی، تایید کننده نتایج روش اتصال مجاورین بود به شکلی که تفکیک جمعیت‌های مختلف در این روش نیز به وضوح قابل مشاهده بود. در این روش نیز اکوتیپ‌های لاری، تبریز (سفید)، شیراز و رشت در یک ریشه درخت فیلوژنی قرار گرفتند. به شکلی که اکوتیپ شیراز و لار مانند یافته‌های روش اتصال مجاورین بیشترین شباهت ژنتیکی را نشان دادند. اکوتیپ تبریز (آبی و خاکستری) و اکوتیپ حاصل از تلاقی مرغ شاخدار

در پایین ژل نشان‌دهنده عدم وجود ناخالصی مربوط به RNA در نمونه‌ها بود (شکل ۱). همچنین میانگین نسبت‌های طول موج ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ برای نمونه‌های DNA استخراج شده به میزان $1/87 \pm 0/03$ و $2/05 \pm 0/04$ برآورد شد.

کنترل کیفیت داده‌های توالی‌یابی ژنومی (خوانش‌های کوتاه) برای پارامترهای مختلفی مانند طول خوانش‌ها، محتوای CG، شاخص Phred، میزان coverage، بازهای خوانده نشده و آلودگی آداپتور انجام گرفت.



شکل ۱. کنترل کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد

Figure 1. Quality control of DNA extraction on agarose gel 1%

بررسی نتایج مرحله همردیفی و شناسایی چندشکلی‌ها
میانگین درصد همردیفی خوانش‌ها برای تمام اکوتیپ‌ها بالای ۹۸ درصد گزارش گردید که نشان‌دهنده کیفیت بالای همردیفی با ژنوم مرجع می‌باشد. همچنین میزان coverage در نمونه‌های توالی‌یابی شده بین $17/05 - 23/59$ تعیین شد (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج حاصل از مرحله همردیفی برای اکوتیپ‌های مرغ شاخدار مورد مطالعه

Table 2. The results of mapping for studied Guinea fowl ecotypes

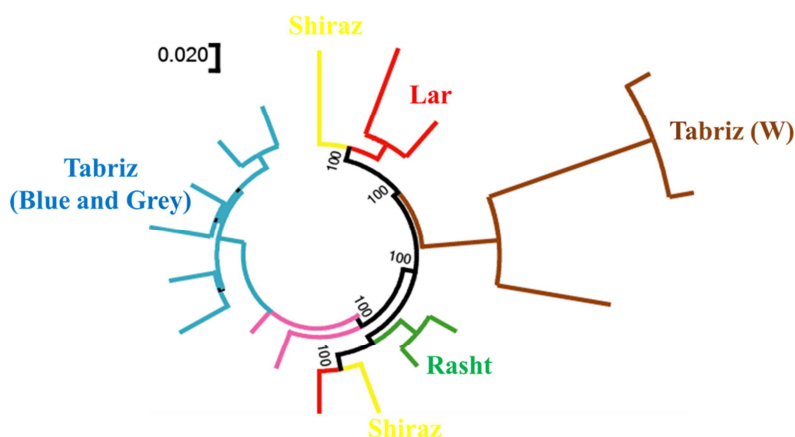
| Ecotype | Average of coverage | Average of mapping | Count of short reads |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| Shiraz | 17.84 | 99.52 | 31774097 |
| Lar | 20.93 | 99.01 | 33174157 |
| Tabriz (white) | 20.89 | 98.92 | 35894097 |
| Tabriz (Blue and grey) | 20.96 | 99.73 | 32778124 |
| Rasht | 22.13 | 99.56 | 32724634 |
| Rash*Tabriz (Blue and grey) | 23.59 | 99.19 | 33892047 |

اساس نواحی حفاظت شده ژنوم میتوکندری انجام شده است (Alphen-Stahl, 2005). در هر دو روش حداکثر درست‌نمایی و اتصال مجاورین، نمونه‌های تبریز (سفید) و تبریز(خاکستری و آبی) با وجود اینکه از یک منطقه جغرافیایی نمونه‌گیری شده بودند، ولی به شکل متمایزی طبقه‌بندی شدند.

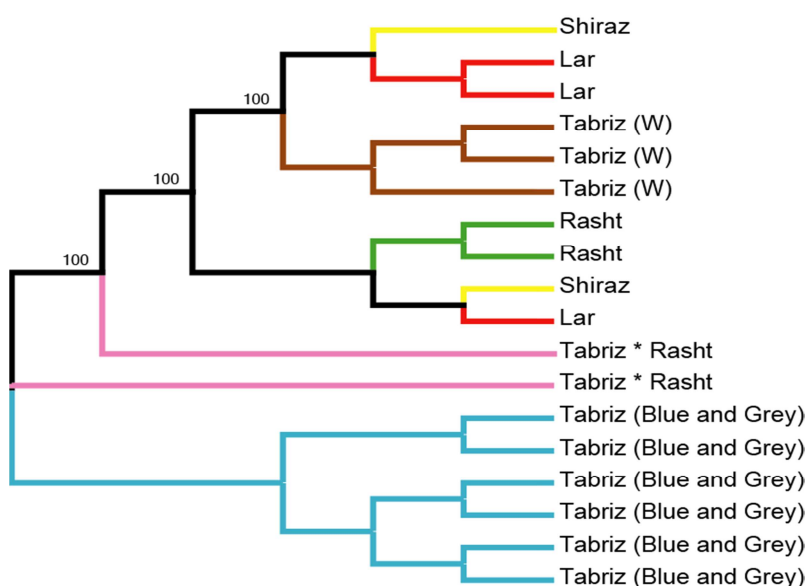
به منظور بررسی همخوانی در سطح ژنوم اکوتیپ‌های مورد بررسی، چهار طول مختلف از ژنوم برای شناسایی قطعات هموزایگوس (ROH) به کار گرفته شد، که طول آن‌ها به ترتیب بلندتر از ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ کیلوگفت باز می‌باشد (شکل ۴).

تبریز (آبی و خاکستری) و رشت نیز ریشه‌های دیگر این درخت فیلوژنی را تشکیل دادند. (شکل ۳).

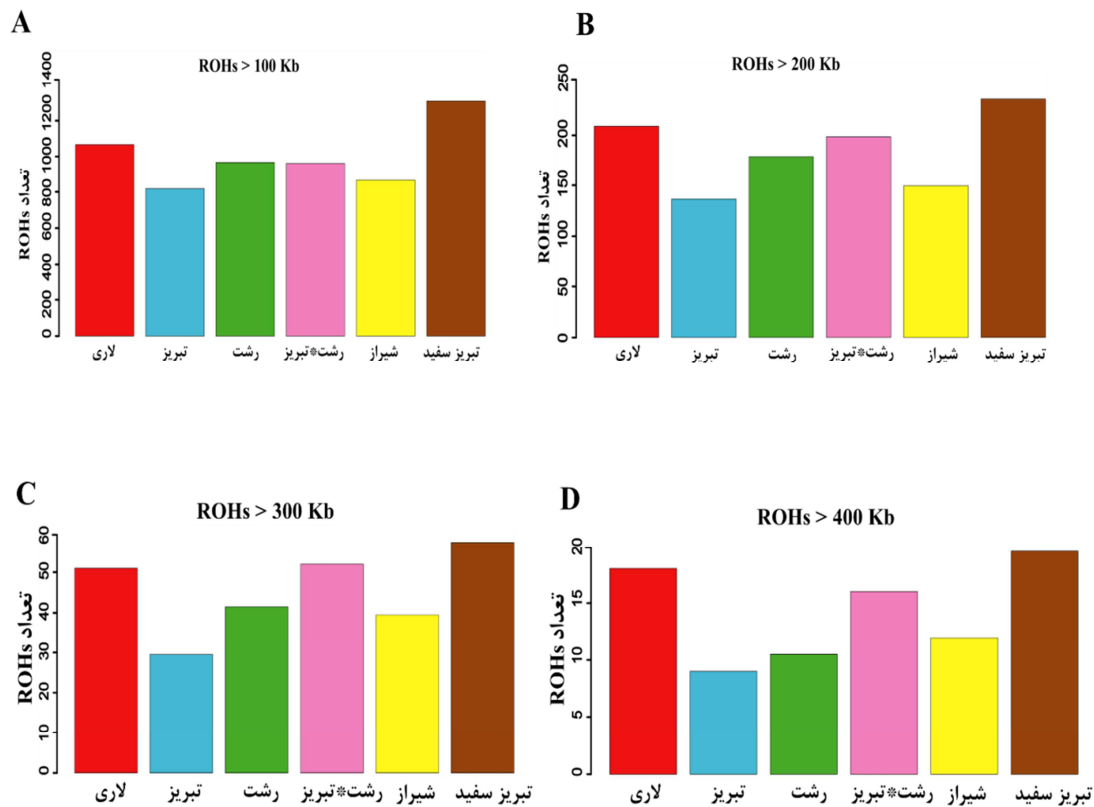
تاکنون ساختار ژنتیکی مرغ گینه‌ای با استفاده از تکنیک نسل جدید توالی‌یابی مورد مطالعه قرار نگرفته است و تنها مطالعاتی بوسیله نشانگرهای ریزماهواره برای بررسی ساختار ژنتیکی مرغ گینه‌ای در دسترس می‌باشد. برای نمونه، در آفریقا با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره برای بررسی روابط فیلوژنی ۵ سویه مرغ شاخدار سفید، خاکستری، سیاه، سینه سفید و تخم‌گذار مورد بررسی قرار گرفته است (Umar, 2016). به‌طور مشابه مطالعاتی برای بررسی روابط فیلوژنی ۶ زیرگونه از مرغ شاخدار بر



شکل ۲. نمایش ارتباط ژنتیکی اکوتیپ‌های مرغ شاخدار با استفاده از روش اتصال مجاورین
Figure 2. Presentation of genetic relation of Guineafowls ecotypes by neighborhood joining method



شکل ۳. واکاوی فیلوژنی اکوتیپ‌های مرغ شاخدار با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی
Figure 3. Phylogenetic analysis of Guineafowls ecotypes by maximum likelihood method



شکل ۴. بررسی میزان همخونی در سطح ژنوم با طول‌های متفاوت قطعات هموزایگوس (ROH) برای اکوتیپ‌های مرغ شاخدار. A: طول قطعات هموزایگوس بیشتر از ۱۰۰ کیلو باز، B: طول قطعات هموزایگوس بیشتر از ۲۰۰ کیلو باز، C: طول قطعات هموزایگوس بیشتر از ۳۰۰ کیلو باز و D: طول قطعات هموزایگوس بیشتر از ۴۰۰ کیلو باز

Figure 4. The results of ROH analysis with different length of homozygous segments for Guineafowl ecotypes. A: The count of homozygous fragments with length of more than 100 kb B: The count of homozygous fragments with length of more than 200 kb. C: The count of homozygous fragments with length of more than 300 kb. D: The count of homozygous fragments with length of more than 400 kb

مربوط به اکوتیپ تبریز (خاکستری و آبی) می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود که این اکوتیپ تحت برنامه‌های بهنژادی و انتخاب مصنوعی قرار نگرفته باشد. همچنین در تمام سطوح ROH بعد از اکوتیپ تبریزی سفید بیشترین میزان همخونی مربوط به اکوتیپ لاری است و تقریباً توزیع سایر اکوتیپ‌ها مابین اکوتیپ‌های تبریز (سفید) و لاری گزارش گردید. افزایش سطح هموزیگوسیتی در سطح ژنوم در ارتباط با کاهش اندازه مؤثر جمعیت بوده، که این پارامتر معیاری جهت تعیین میزان تنوع در داخل جمعیت به‌شمار می‌آید. امروزه اطلاعات حاصل از این پارامتر را می‌توان به‌عنوان ابزاری در جهت تعیین سطح همخونی و میزان کاهش تنوع ژنتیکی استفاده کرد (Howrigan *et al.*, 2011). همچنین طول و فراوانی

تعداد قطعات ROH بیانگر سطح همخونی در یک جمعیت می‌باشند (Asadollahpour Nanaei *et al.*, 2022)، بدین ترتیب همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در تمام سطوح ROH بیشترین میزان هم خونی مربوط اکوتیپ تبریز (سفید) می‌باشد. در مطالعاتی که الگوی تعداد قطعات ROH را در سطح ژنوم مورد بررسی قرار داده اند، نشان داده شده است که انتخاب ژنتیکی ممکن است نقش مهمی در توزیع تعداد این قطعات در سطح ژنوم داشته باشد (Nosrati, 2017). در نتیجه احتمال می‌رود که مرغان گینه‌ای تبریز (سفید) بیشتر تحت تاثیر انتخاب درون جمعیتی بوده اند و نیز تلاقی‌های بین جمعیتی کمتری نسبت به سایر اکوتیپ‌های موجود در ایران داشته اند. در مقابل کمترین میزان همخونی در تمام سطوح ROH

را دارند و سایر اکوتیپ‌ها در گروه‌های جداگانه‌ای قرار می‌گیرند. نتایج همخوانی ژنومی در سطح ژنوم نشان داد که اکوتیپ تبریز (سفید) دارای بیشترین و اکوتیپ تبریز (آبی و خاکستری) دارای کمترین میزان طول قطعات نوکلئوتیدی هموزیگوت است. می‌توان بیان کرد که راهبردهای شدید انتخابی در ارتباط با اکوتیپ تبریز (سفید)، باعث افزایش همخوانی گردیده است که این حالت در مورد اکوتیپ تبریز (آبی و خاکستری) صدق نمی‌کند و بنابراین تحت انتخاب مصنوعی برای اهداف خاص اصلاح نژادی نبوده است. در نهایت مطالعه ژنومی گسترده‌تر در خصوص سایر اکوتیپ‌های بومی مرغ گینه‌ای می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه روند اهلی‌سازی و خصوصیات دقیق‌تر ژنوم ارائه نماید.

قطعات ROH می‌تواند تاریخچه، گلوگاه ژنتیکی و نیز نشانه‌های انتخاب را در جامعه تعیین کند. فراوانی قطعات ROH با طول کوتاه نشان‌دهنده سطح همخوانی در زمان‌های گذشته است و فراوانی قطعات ROH با طول بلند، معیاری جهت سنجش سطح همخوانی در سال‌های نه‌چندان دور می‌باشد (Asadollahpour Nanaei *et al.*, 2021).

نتیجه‌گیری کلی

توصیف ژنومی گونه‌ها می‌تواند به‌عنوان ابزاری مهم در تعیین اهداف و روش برنامه‌های به‌نژادی کارگشا باشد. نتایج واکاوی فیلوژنتیکی اکوتیپ‌های مرغ گینه‌ای نشان داد که دو اکوتیپ شیراز و لار بیشترین مشابهت ژنتیکی

REFERENCES

1. Adeola, A. C., Ommeh, S. C., Murphy, R. W., Wu, S. F., Peng, M. S., & Zhang, Y. P. (2015). Mitochondrial DNA variation of Nigerian domestic helmeted guinea fowl. *Animal Genetics*, 46(5), 576-579.
2. Al-Mamun, H. A., Clark, S. A., Kwan, P., & Gondro, C. (2015). Genome-wide linkage disequilibrium and genetic diversity in five populations of Australian domestic sheep. *Genetics Selection Evolution*, 47(1), 1-14.
3. Alphen-Stahl, V. (2005). *Molecular systematics and phylogeography of the Helmeted Guinea fowl (Numida meleagris)*. Ph.D. Thesis. University of Cape Town. 22-23.
4. Asadollahpour Nanaei, H., Kharrati-Koopae, H., & Esmailzadeh, A. (2022). Genetic diversity and signatures of selection for heat tolerance and immune response in Iranian native chickens. *BMC genomics*, 23(1), 1-13.
5. Crawford, R. D. (1990). Origin and history of poultry species. *Poultry Breeding and Genetics*, 1-41.
6. Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A. & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158.
7. Esfandiari, P., Dadpasand, M., Kharrati-Koopae, H., Atashi, H., Gharghi, A., & Niazi, A. (2020). Bioinformatics, phylogenetic and variant association analysis of Ovocalyxin-32 gene reveals its contribution to egg production traits in native chickens. *Animal Gene*, 17, 200108.
8. Esmailzadeh, A., Kharrati-Koopae, H., & Nanaei, H. A. (2021). Whole genome resequencing data for rock pigeon (*Columba livia*). *BMC Research Notes*, 14(1), 1-4.
9. Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press. 56-63.
10. Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C., & Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding*, 118 (5), 369-390.
11. Haddad, H. S. (2020). Genetic Similarity of two different color Local Guinea Fowl (*Numida Meleagris*) By Using RAPD-PCR Technique. *Zanco Journal of Pure and Applied Sciences*, 32(2), 140-144.
12. Hiendleder, S., Bauersachs, S., Boulesteix, A., Blum, H., Arnold, G. J., Frohlich, T., & Wolf, E. (2005). Functional genomics: tools for improving farm animal health and welfare. *Revue Scientifique Et Technique-Office International des Epizooties*, 24(1), 355.
13. Howrigan, D. P., Simonson, M. A., & Keller, M. C. (2011). Detecting autozygosity through runs of homozygosity: a comparison of three autozygosity detection algorithms. *BMC genomics*, 12(1), 460.
14. Kayang, B. B., Youssao, I., Inoue, E., Naazie, A., Abe, H., Ito, S. I., & Inoue-Murayama, M. (2010). Genetic diversity of helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) based on microsatellite analysis. *The journal of poultry science*, 1001160040-1001160040.
15. Kharrati-Koopae, H., Ebrahimie, E., Dadpasand, M., Niazi, A., & Esmailzadeh, A. (2019). Genomic analysis reveals variant association with high altitude adaptation in native chickens. *Scientific Reports*, 9(1), 1-22.

16. Koopae, H. K., & Koshkoiyeh, A. E. (2014). SNPs Genotyping technologies and their applications in farm animals breeding programs. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 87-95.
17. Li, H. & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics*, 25 (14), 1754-1760.
18. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N. & Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
19. Liu, Z. J. (2011). Genomic Variations and Marker Technologies for Genome-Based Selection. *Next generation sequencing and whole genome selection in aquaculture*. (pp. 3-19). Wiley Press.
20. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernysky, A. & DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297-1303.
21. Asadollahpour Nanaei, H., Esmailizadeh, A., & Kharrati-Koopae, H. (2021). Comparative genomics of Pony and Hanoverian horses versus different breeds of horses for identifying candidate genes associated with body size and athletic performance. *Modern Genetics*, 16(3), 2649-2661.
22. Nosrati, M. (2017). Run of Homozygosity a Procedure to Detecting Inbreeding in Farm Animals. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 7(4), 533-541.
23. Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS One*, 5(3), e9490.
24. 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.
25. Sarica M, Camcı Ö, Selçuk E (2007). *Quail, pheasant, pigeon, guinea fowl, and Ostrich Farming*. Faculty of Agriculture Book. (pp.129-144). Ondokuz Mayıs University Press.
26. Shen, Q. K., Peng, M. S., Adeola, A. C., Kui, L., Duan, S., Miao, Y. W et al. (2021). Genomic analyses unveil helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) domestication in West Africa. *Genome biology and evolution*, 13(6), evab090.
27. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
28. Umar, A. U. (2016). *Genetic Evaluation of Helmeted Guineafowl (Numida meleagris galeata Pallas) in Nigeria Using Microsatellite Marker*. Ph.D. Thesis. Department of Animal Sciences, Ahmadu Bello University.
29. Weimann, C., Eltayeb, N. M., Brandt, H., Yousif, I. S., Abdel Hamid, M. M., & Erhardt, G. (2016). Genetic diversity of domesticated and wild Sudanese guinea fowl (*Numida meleagris*) based on microsatellite markers. *Archives Animal Breeding*, 59(1), 59-64.
30. Zanella, R., Lago, L. V., Da Silva, A. N., Pértille, F., De Carvalho, N. S., do Carmo Panetto, J. C & Da Silva, M. V. G. (2018). Genetic characterization of Indubrasil cattle breed population. *Veterinary sciences*, 5(4), 98.
31. Zhu, M., Zhu, B., Wang, Y. H., Wu, Y., Xu, L., Guo, L. P., Xu, S. Z. (2013). Linkage disequilibrium estimation of Chinese beef Simmental cattle using high-density SNP panels. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(6), 772.