



بررسی فاز عدم تعادل لینکاژی بر روی کروموزوم شماره ۶ گاوهای نژاد هلشتاین

مریم نصرتی^{۱*}، مجتبی طهمورث پور^۲، لوکا فونتاززی^۳، محمدرضا نصیری^۲

^۱ استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

^۲ استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

^۳ استاد دانشکده کشاورزی- غذا و مرکز ژنومیک دانشگاه بلونیا، ایتالیا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۲۲

چکیده

در مطالعات ارتباطی و انتخاب ژنومی تعیین وسعت عدم تعادل لینکاژی، در تشخیص میزان نشانگر مورد نیاز و اندازه نمونه، اهمیت دارد. در این پژوهش از ۱۰۸۹ گاو نر هلشتاین نمونه خون و اسپرم تهیه شد و با استفاده از بسته نشانگری ۵۰K شرکت ایلومینا ژنوتیپ ۲۰۳۰ نشانگر بر روی کروموزوم شماره ۶ بر مبنای اسمبلی UMD3.1 ژنوم گاو تعیین شد. داده‌ها برای جهش تک‌نوکلئوتیدی نادرست و افراد با ژنوتیپ‌های نامشخص با استفاده از نرم‌افزار Plink تصحیح شد. پس از تصحیح ۱۶۰۶ نشانگر (۷۹٪) باقی ماند. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۳۷ بود و ۸۰٪ نشانگرها حداقل فراوانی آلی بالاتر از ۰/۲ داشتند. عدم تعادل لینکاژی با محاسبه دو پارامتر D' و r^2 از طریق نرم‌افزار Haploview محاسبه شد. در این مطالعه وسعت عدم تعادل لینکاژی ۴۰kb ($r^2=0/3$) برآورد شد و مقدار r^2 در ۸۰kb به ۰/۲ (سطح متوسط) و در ۳۰۰kb به ۰/۱ (سطح پایه) کاهش یافت. اندازه موثر جمعیت در ۱۰ نسل قبل حدود ۱۰۰ راس بود. علاوه بر این، ۴۹ بلوک هاپلوتیپی با دامنه ۱۸-۴۷۲kb و پوشش ۱۰/۶ Mb از کل کروموزوم شناسایی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که بطور تقریبی بین ۷۰۰۰۰-۴۰۰۰۰۰ نشانگر یا یک نشانگر به ازاء هر ۴۰-۷۵ kb برای مطالعات ارتباطی کل ژنوم در این جمعیت مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: عدم تعادل لینکاژی، گاو هلشتاین، کروموزوم ۶، اندازه موثر جمعیت.

مقدمه

بطور متداول عدم تعادل لینکاژی با دو پارامتر r^2 و D' اندازه‌گیری می‌شود. اولین مطالعه بر روی عدم تعادل لینکاژی ژنوم گاو توسط Farnir *et al.* (2000) صورت گرفت. آنها با استفاده از ۲۴۸ نشانگر میکروساتلایت سطح بالای از عدم تعادل لینکاژی را در فاصله ۴۰ cM بر روی گاوهای سیاه-سفید هلندی شناسایی کردند. بسیار از مطالعات دیگر با استفاده از نشانگر میکروساتلایت سطح بالای از عدم تعادل لینکاژی در وسعت زیاد گزارش کردند (Vallejo *et al.*, 2003; Tenesa *et al.*, 2003; Varilo *et al.*, 2003; odani *et al.*, 2006). اولین مطالعه با استفاده از نشانگر دو آللی، جهش تک‌نوکلئوتیدی توسط Khatkar *et al.* (2006) و با استفاده از ۲۲۰ جهش تک-نوکلئوتیدی بر روی کروموزوم شماره ۶ در ۴۳۳ گاو هلشتاین استرالیایی انجام شد. آنها دریافتند که میزان D' در وسعتی معادل ۲۰ cM تا سطح پایه کاهش می‌یابد، علاوه بر این، آنها نشان دادند که کاهش وسعت عدم تعادل لینکاژی در نشانگر جهش تک‌نوکلئوتیدی سریعتر از نشانگر میکروساتلایت است. مطالعات متعددی با استفاده از جهش تک‌نوکلئوتیدی نتایج آنها را تایید کرد (Khtakar *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2008,). McKay *et al.*, 2007). تراکم بالای جهش تک-نوکلئوتیدی و توارث‌پذیری پایین جهش‌ها، منجر به تشخیص بلوک‌های هاپلوتیپی اجدادی و احتمال یکسان اجدادی بودن آن می‌شود (Vignal *et al.*, 2002). مطالعات اخیر بر روی عدم تعادل لینکاژی با استفاده از بسته نشانگری ۵۰K شرکت

در سال‌های اخیر علاقمندی به استفاده از داده‌های جهش تک‌نوکلئوتیدی در برنامه‌های اصلاح‌نژادی دام افزایش یافته است. از جمله این مطالعات که اخیراً بطور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است محاسبه عدم تعادل لینکاژی با استفاده از نشانگرهای همباز دوآللی، جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی، می‌باشد. عدم تعادل لینکاژی یا عدم تعادل فاز گامتی به ارتباط غیرتصادفی آلل-های دو لوکاس مختلف بر روی یک کروموزوم در یک گامت گفته می‌شود (Lewontin & Kojima, 1960). تهیه نقشه‌های عدم تعادل لینکاژی ژنوم در انجام صحیح مطالعات ارتباطی، انتخاب ژنومی و نقشه‌یابی جایگاه صفات کمی مفید است (Meuwissen *et al.*, 2001; Gautier *et al.*, 2007). اساس انتخاب ژنومی بر مبنای پایداری فاز عدم تعادل لینکاژی بین نشانگر و جایگاه صفت کمی در خلال نسل‌ها است. گاهی نشانگر و جایگاه صفت کمی در یک جمعیت در عدم تعادل لینکاژی هستند اما در جمعیت دیگر یا در نسل‌های دیگر در عدم تعادل نیستند. علت این اختلاف می‌تواند در اشتقاق جمعیت‌ها در سال‌های خیلی قبل، تغییر در اندازه موثر جمعیت و/یا فاصله بزرگ بین نشانگر و جایگاه صفت کمی باشد که منجر به شکستن عدم تعادل لینکاژی جمعیت اولیه و تغییر آن در زیر جمعیت‌های حاصله می‌شود (Hill & Robertson, 1968; De Ross *et al.*, 2008).

پژوهش تنها کروموزوم ۶ مورد مطالعه قرار گرفت. مضاف بر این تاکنون مطالعاتی از این قبیل در کشور صورت نگرفته است، لذا با وجود این که دامهای مورد استفاده در این تحقیق بومی کشور ایتالیا بوده است اما انتشار نحوه انجام پژوهش و نتایج آن زمینه را برای آشنایی علاقمندان به اینگونه موضوعات فراهم خواهد کرد.

مواد و روشها

نمونه‌گیری و تعیین ژنوتیپ

به‌طور کلی ۱۰۸۹ نمونه اسپرم و خون از گاوهای نر هلشتاین دارای شجره از موسسه^۱ ANAFI ایتالیا تهیه شد. روابط شجره در غالب پدریزرگ پدری، پدر و پسران پدر بود. در آنالیزهای انجام شده شجره منظور نشد زیرا براساس مطالعات موجود اعمال شجره با برآورد بیش از واقعیت عدم تعادل لینکاژی همراه خواهد بود (Marques *et al.*, 2008; Bohmanova *et al.*, 2010). استخراج DNA از خون و اسپرم با استفاده از کیت استخراج DNA پرومگا Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega Corporation, Madison, WI) در آزمایشگاه ژنتیک مرکز ژنومیک حیوانات اهلی، دانشگاه بولونیا کشور ایتالیا انجام شد.

در این پژوهش از بسته نشانگری K^{۵۰۲} شرکت ایلومینا (نوع یک) برای تعیین ژنوتیپ

ایلومینا منجر به شناسایی سطح بالای عدم تعادل لینکاژی اما در مسافت‌های کوتاه شده است (Sargolzaei *et al.*, 2008; Qanbari *et al.*, 2009; Bohmanova *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2012).

کروموزم شماره ۶ گاو با طول حدود ۱۲۳ Mb تاکنون موضوع بسیاری از مطالعات جایگاه صفت کمی مانند سخت زایی (Olsen *et al.*, 2008)، تولید شیر (Olsen *et al.*, 2004; Freyer *et al.*, 2002)، درصد چربی شیر (Schnabel *et al.* 2005)، درصد پروتئین شیر (Freyer *et al.*, 2002) در پژوهشی (Lee *et al.* (2008) سه جایگاه صفت کمی برای ضخامت چربی پشت، افزایش وزن روزانه و وزن نهایی در فواصل ۰، ۳۵ و ۶۳ سانتی‌مورگان در گاوهای گوشتی هانوو کره را شناسایی کردند. با وجود شناسایی تعداد قابل توجهی جایگاه صفت کمی بر روی این کروموزوم به نظر می‌رسد هنوز تعداد قابل توجهی جایگاه باقی مانده است که به دلایل مختلف شناسایی نشده است. با توجه به تراکم بالای نشانگر برای این کروموزوم در بسته نشانگری ۵۰k، شناسایی تعداد بیشتری از این جایگاه‌ها امکان پذیر خواهد بود. از این رو به نظر می‌رسد بررسی وسعت و سطح عدم تعادل لینکاژی کروموزوم ۶ برای تعیین تراکم نشانگر مورد نیاز در مطالعات نقشه‌یابی جایگاه صفات کمی جمعیت مورد مطالعه مفید است. علاوه بر این انجام چنین مطالعاتی برای همگی کروموزوم‌های اتوزوم گاو مستلزم صرف وقت و انجام محاسبات پیچیده و طولانی است. لذا در این

^۱ National Association of Italian Holstein Breeders

^۲ Illumina Bovine SNP50K BeadChip

پس از این مرحله DNA الگو توسط محلول فرمامید ۹۵٪ بر ۱ میکرومول EDTA حذف شد. چیپ با استفاده از iScanReader تحت لیزر قرار گرفته تا فلورسنس تک باز انتهایی پرایمرهای بسط داده شده در آرایه دانه برانگیخته شود. نور ساطع شده ثبت شد و داده‌ها بدست آمده از این تصویر با Illumina's BeadStudio v1.0 تصحیح شد. بر اساس مطالعات (Disken *et al* (2008) گاهی در هنگام هیبریداسیون بدلیل نوسان در غلظت DNA نمونه‌های مختلف و محتوی سیتوزین و گوانین متفاوت اتصال پروب‌ها بطور یکنواخت صورت نمی‌گیرد این پدیده را امواج ژنومیکی^۲ می‌نامند که بر بازخوانی ژنوتیپ‌ها اثر می‌گذارد. بدین منظور ژن کال اسکور (GenCall Score) نمونه‌ها بررسی شد. این یک کمیت متریک برای نشان دادن واقعیت‌پذیری ژنوتیپ-های خوانده شده است که حد آستانه آن ۰/۱۵ است. ژنوتیپ‌ها با ژن کال اسکور کمتر از ۰/۱۵ بدلیل عدم اطمینان در تعیین ژنوتیپ صحیح حذف شد.

تصحیح داده‌ها

فایل ایجاد شده از نرم‌افزار BeadStudio بصورت یک فایل ردیفی داده است. با استفاده از برنامه نویسی به زبان پایتون فرمت ورودی نرم‌افزار Plink در قالب دو فایل Ped و Map تهیه شد. فایل Ped حاوی ژنوتیپ-های هر فرد در تمامی لوکاس‌های مورد نظر و

۲۰۳۰ جهش تک‌نوکلئوتیدی در سراسر کروموزوم شماره ۶ استفاده شد. نمونه‌های DNA با غلظت (ng/ml) ۴۰۰-۲۰۰ با محلول ۰/۱ نرمال سود دناتوره شده و سپس با محلول MA2 (کیت ایلومینا) خنثی شده تا برای تکثیر آماده شود. در مرحله بعد محلول^۱ MSM که حاوی مستر میکس است به DNA اضافه شده و سپس پلیت در آون هیبریداسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴-۲۰ ساعت انکوبه شد تا تکثیر صورت گیرد. این روش موجب تکثیر DNA بطور یکنواخت تا چندین برابر و بدون خطا خواهد شد. DNA تکثیر شده توسط سیستم آنزیمی تحت کنترل به قطعات کوچک‌تر بریده شد. DNA هضم شده با ۲-پروپانول ۱۰۰٪ مخلوط و با سانتیفیوژ در دمای ۴ درجه سانتیگراد رسوب داده شد و دوباره با محلول بافر هیبریداسیون سوسپانسیون شد. در مرحله بعد نمونه‌های DNA بر روی چیپ قرار داده شد و به مدت ۲۴-۱۶ در دمای ۴۸ در آون هیبریداسیون نگهداری شد. در این مرحله از طریق سیستم مویرگی موجود در اطراف چیپ و تزریق محلول‌های هیبریداسیون، ابتدا DNA دناتوره شده و سپس هیبرید می‌شود. پس از هیبریداسیون، شستشو چیپ برای حذف DNA هیبرید نشده انجام شد. نمونه‌ها برای بسط تک بازی و رنگ آمیزی آماده شد و محلول TEM در اطراف چیپ رها شده تا با استفاده از نوکلئوتید-های نشاندار (فلورسنس) تکثیر صورت گیرد.

² Genomic wave

¹Multi-Sample Amplification Master Mix

$$r^2 = \frac{D_{AB}^2}{P_A(1-P_A)P_B(1-P_B)} \quad (2)$$

که D_{AB}^2 همان مربع مقدار عدم تعادل لینکاژی در دو لوکاس مجاور A و B است. P_A و P_B فراوانی آلی در لوکاس A و B است. هر دو پارامتر توسط نرم افزار Haploview محاسبه شد. سپس جفت نشانگرها بر اساس فاصله از کم به زیاد مرتب شد و به فاصله‌های متعدد تا مسافت 5 Mb تقسیم شد. برای هر فاصله متوسط و میانه پارامترهای r^2 و D' محاسبه شد.

ساختار بلوک‌های هاپلوتیپی و الگوی آنها در ژنوم برای مطالعات ارتباطی در انسان و دام مفید است (Barrett et al., 2004; Qanbari et al., 2009). لذا، در این پژوهش ساختار بلوک‌های هاپلوتیپی با استفاده از Haploview بررسی شد. بر اساس تعریف Gabriele et al (2002) بلوک هاپلوتیپی به ناحیه‌ای از ژنوم اطلاق می‌شود که مقدار D' با حدود اطمینان ۹۵٪ بین ۰/۷۰-۰/۹۸ باشد.

محاسبه اندازه موثر جمعیت

در یک جمعیت ایده‌آل به تعداد افرادی که مقدار مشخصی از پرورش خویشاوندی را نشان می‌دهند اندازه موثر جمعیت می‌گیند (Wright et al., 1938). در خلال نسل‌ها عدم تعادل لینکاژی توسط نوترکیبی در فواصل بلند شکسته می‌شود. بنابراین عدم تعادل لینکاژی در فواصل بلند می‌تواند منعکس کننده اندازه موثر جمعیت در نسل‌های اخیر و عدم تعادل

فایل Map شامل محل و موقعیت این نشانگرها روی کروموزوم شماره ۶ بر اساس اسمبلی UMD3.1 ژنوم گاو بود. نشانگرها با حداقل فراوانی آلی بیشتر از ۵٪ و نرخ تعیین ژنوتیپ بیش از ۹۰٪ برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. افراد با بیش از ۱۰٪ ژنوتیپ از دست رفته از آنالیزها حذف شد. پس از تصحیح ۱۶۰۶ نشانگر در غالب ۱۰۷۴ فرد باقی ماند. فایل‌ها پس از تصحیح به فرمت ورودی نرم افزار Haploview تبدیل شد. کلیه گراف‌ها با R ترسیم شد.

اندازه‌گیری عدم تعادل لینکاژی و تعیین ساختار بلوک‌های هاپلوتیپی

دو پارامتر D' (فرمول ۱) و r^2 (فرمول ۲) برای اندازه‌گیری عدم تعادل لینکاژی وجود دارد. پارامتر D' که در سال ۱۹۶۴ ارائه شد (Lewontin, 1964) از فرمول زیر بدست می‌آید به میزان زیادی وابسته به فراوانی آلی می‌باشد.

$$D'_{AB} = \frac{|d|}{D_{Max}} \quad (1)$$

D اختلاف حاصلضرب فراوانی گامت‌های جفتی از حاصلضرب فراوانی گامت‌های دفعی است و D_{Max} حداکثر مقدار D در فراوانی آلی داده شده است. D'_{AB} میزان عدم تعادل لینکاژی در دو لوکاس مجاور A و B است. بدلیل وابستگی پارامتر D'_{AB} به فراوانی آلی، در مطالعات سالهای اخیر کمتر از این پارامتر استفاده می‌شود. پارامتر r^2 در قالب فرمول زیر محاسبه شد:

مطالعات مختلف پارامترهای D' و r^2 متاثر از فراوانی آللی پایین هستند (Pritchard & Przeworski, 2001; Sargolzaei et al., 2008). شکل ۱ توزیع حداقل فراوانی آللی را در گروه-های مختلف نشان می‌دهد. بیش از ۸۰٪ از جهش‌های تکنوکلوئوتیدی فراوانی بالاتر از ۰/۲ داشتند. این مقدار نشان دهنده تاثیر پایین حداقل فراوانی آللی در محاسبه عدم تعادل لینکاژی است.

روند عدم تعادل لینکاژی

روند تغییرات عدم تعادل لینکاژی با افزایش فاصله بر روی کروموزوم ۶ در شکل ۲ نشان داده شده است. بطور کلی با افزایش فاصله جفت نشانگرها مقدار عدم تعادل لینکاژی کاهش یافت و بالاترین مقادیر در فواصل کوتاه مشاهده شد. این کاهش در r^2 به شکل نمایی بود و شیب کاهش در r^2 بیشتر از D' بود. سطح پایه (۰/۱ = r^2)، متوسط (۰/۲ = r^2) و مفید (۰/۳ = r^2) عدم تعادل لینکاژی در فاصله به ترتیب ۳۰۰-۲۰۰ kb، ۸۰-۶۰ kb و ۴۰-۲۰ kb مشاهده شد (جدول ۲). در مطالعه Sargolzaei et al (2008) با استفاده از پانل ۱۰ K شرکت افی متریکس با ۵۵۶۲ نشانگر پس از تصحیح، سطح مفید عدم تعادل لینکاژی در کمتر از ۱۰۰ kb مشاهده شد.

لینکاژی در فواصل کوتاه منعکس کننده اندازه موثر جمعیت در نسل‌های دور خواهد بود (Hayes et al 2003). در این مطالعه اندازه موثر جمعیت از رابطه زیر بدست آمد:

$$E(r^2) \approx \frac{1}{(\alpha + 4N_e c) + 1/n} \quad (3)$$

که $E(r^2)$ متوسط عدم تعادل لینکاژی در فاصله مورد نظر است، α میزان نرخ جهش، n اندازه نمونه و c نرخ نوترکیبی است. پارامتر α در زمان عدم حضور جهش ۱ و در حضور جهش ۲ در نظر گرفته می‌شود (Sved, 1971). سن اندازه موثر جمعیت برای هر فاصله از رابطه $1/2c$ محاسبه می‌شود. فاصله فیزیکی بین جهش‌های تکنوکلوئوتیدی از طریق رابطه $1 \text{ Mb} = 1 \text{ cM}$ محاسبه شد. در این مطالعه بر اساس فواصل موجود، اندازه موثر جمعیت تا ۲۵۰۰ نسل قبل محاسبه شد.

نتایج و بحث

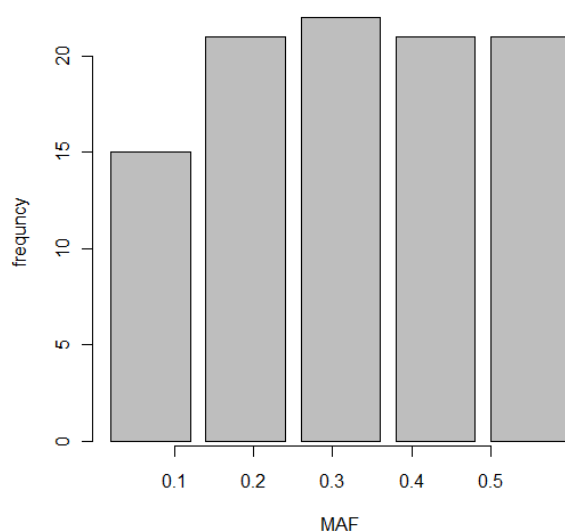
هتروزیگوسیتی و مشخصات نشانگری جمعیت

جدول ۱ تعداد افراد و مشخصات نشانگرها را برای کروموزوم ۶ نشان می‌دهد. متوسط فاصله بین نشانگرها حدود ۶۳ kb بود که مشابه نتایج Bohmanova et al (2010) (۶۴ kb) بود. میانگین حداقل فراوانی آللی ۰/۲۸ بود که کمی بیشتر از مقدار گزارش شده برای پانل ۵۰K بود (۰/۲۵) (Gibbs et al., 2009). بر اساس

جدول ۱- مشخصات نشانگری کروموزم ۶.

Table 1- Marker characteristic on chromosome 6.

کروموزوم	طول کروموزوم	تعداد دام	هتروزیگوستی	تعداد SNP قبل/بعد	میانگین	میانگین فاصله	$r^2 \pm SD$
Chr	Chr. Length(Mb)	No. individual	مشاهده شده Obs. Heterozygosity	تصحیح SNP No. before/ after correction	MAF Mean MAF	Mean distances(kb)	Mean $r^2 \pm SD$
BTA6	122.5	1074	0.37	2030/1606	0.28	62.67	0.006±0.096



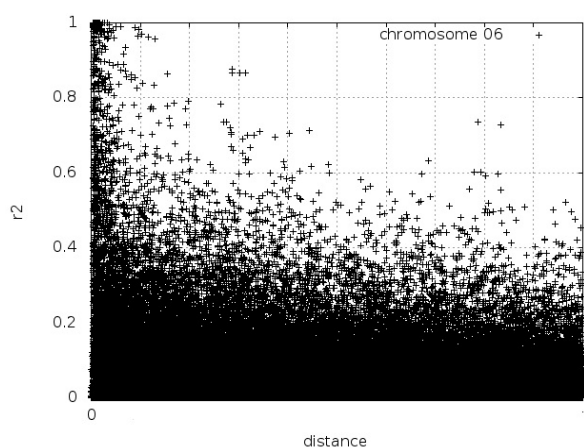
شکل ۱- هیستوگرام توزیع فراوانی آلی کوچک.

Figure 1- Minor allele frequency histogram.

تنوع در مقدار و وسعت عدم تعادل لینکاژی در نواحی مختلف ژنوم شود (Arias *et al.* 2009). در مطالعه‌ای دیگر بر روی گاوهای هلستاین آلمان با استفاده از پانل ۵۰ K شرکت ایلومینا، $r^2 = 0.3$ در فاصله کمتر از ۲۵ kb و $r^2 = 0.2$ را در فاصله ۵۰-۷۵ kb مشاهده شد که تقریباً با نتایج این پژوهش مطابقت داشت (Qanbari *et al.*, 2010). در پژوهش Bohmanova *et al.* (2010) سطح متوسط عدم تعادل لینکاژی در گاوهای هلستاین کانادا در فاصله کمتر از ۶۰ kb مشاهده شد که مشابه مقدار گزارش شده در این

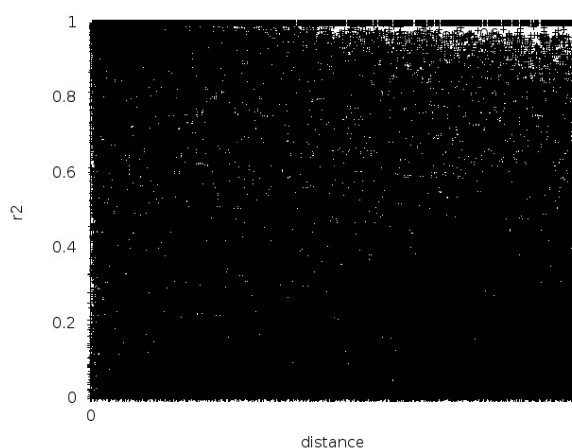
اختلاف مشاهده شده می‌تواند ناشی از این موضوع باشد که مقدار گزارش شده توسط Sargolzaei *et al.* (2008) در فاصله مورد نظر برای کل ژنوم برای ۵۵۶۲ نشانگر بوده است، در حالی که مقدار گزارش شده در این مطالعه فقط برای کروموزوم شماره شش و با ۱۶۰۶ نشانگر پس از تصحیح بود. بر اساس مطالعات مختلف نرخ نوترکیبی در کروموزوم‌های مختلف متفاوت است، بعلاوه بر روی یک کروموزوم نیز نرخ نوترکیبی از ناحیه سانترومیک به ناحیه تلومریک افزایش می‌یابد. این موضوع می‌تواند منجر به

انتقال همراه، آلل‌ها دور از هم که بر صفت موثرند در خلال نسل‌ها منجر به تاثیر اثر اپیستاتیک در افزایش عدم تعادل لینکاژی می‌گردد (Farnir *et al* 2000). با توجه به حضور جایگاه صفت کمی موثر بر تولید شیر در کروموزوم شماره ۶ وجود جفت نشانگرها با r^2 بالا در فواصل نه چندان نزدیک مورد انتظار است. شکل ۲(b) نرخ کاهش D' با افزایش فاصله تا ۵ Mb را نشان می‌دهد. با افزایش فاصله میزان D' کاهش می‌یابد اما تا انتهای ۵ Mb نرخ کاهش نسبتاً کند است و تعداد قابل توجهی نشانگر یافت می‌شود که D' نزدیک به ۱ دارد. در فاصله ۴۰-۲۰ kb میانگین D' تقریباً ۷۷٪ است و پس از آن در فاصله ۱ Mb - ۵۰۰ kb به نزدیک ۵۰٪ می‌رسد (جدول ۲). میانگین مقدار D' در کمتر از ۲۰ kb برابر با ۰/۸۷ بود که با نتایج Khatkar *et al* (2008) مطابقت داشت. همچنین در فاصله ۶۰-۴۰ مقدار گزارش شده (۰/۷۳) با نتایج Bohmanova *et al* (2010) مطابقت داشت.



(a)

مطالعه است ولی سطح پایه در فاصله ۵۰۰ kb مشاهده گردید. علاوه بر این در مطالعه عدم تعادل لینکاژی در سه نژاد آنگوس، کارولایز (Charolais) و C با پانل K ۵۰ به ترتیب سطح ۰/۲۹، ۰/۲۲ و ۰/۲۱ در فاصله کمتر از ۳۰ kb گزارش گردید که کمتر از نتایج این پژوهش بود (Lu *et al.*, 2012). علت آن می‌تواند در اختلاف نژاد باشد، زیرا نژادهای گوشتی مورد مطالعه در پژوهش (Lu *et al* 2012) کمتر تحت انتخاب بوده و در نتیجه سطح عدم تعادل لینکاژی پایین‌تری در مقایسه هلشتاین دارند. برخی نقاط در تصویر ۲ مشاهده می‌شود که حتی با فاصله بیش از ۲ Mb دارای r^2 بالایی هستند در حالی که وسعت عدم تعادل لینکاژی پایه در این مطالعه ۳۰۰-۲۰۰ است یعنی بایستی در دورتر از این فاصله r^2 کمتر از ۰/۱ باشد. دلیل آن می‌تواند ناشی از انتخاب برای صفات مهم اقتصادی مانند تولید شیر در نژاد هلشتاین باشد که منجر به انتخاب نشانگرهای موثر بر این صفات می‌گردد،



(b)

شکل ۲- روند کاهش مقدار r^2 (a) و D' (b) با افزایش فاصله.

Figure 2- the trend of decay in r^2 (a) and D' (b) with increasing distance.

جدول ۲- مقادیر پارامترهای r^2 و D' در فواصل مختلف بر روی کروموزوم ۶.

Table 2- The r^2 and D' value in different distance on chromosome 6.

فاصله	جفت های	میانگین فاصله	میان D'	میانگین D'	میان r^2	میانگین r^2	تعداد نشانگر
Distance (Mb)	نشانگری Markers pair	Average distance (Mb)	Median D'	$\pm SD$ Mean $D' \pm SD$	Median r^2	$r^2 \pm SD$ Mean $r^2 \pm SD$	با $r^2 > 0.3$ Marker number with $r^2 > 0.3$
<0.02	261	6.07	1	0.82±0.42	0.22	0.42±0.35	126
0.02-0.04	629	29.6	0.99	0.77±0.33	0.17	0.30±0.33	224
0.04-0.06	419	49.4	0.92	0.73±0.32	0.09	0.22±0.26	97
0.06-0.08	457	69.6	0.84	0.71±0.31	0.10	0.19±0.23	96
0.08-0.1	459	89.98	0.73	0.65±0.34	0.07	0.15±0.21	62
0.1-0.2	2199	149.6	0.60	0.60±0.34	0.06	0.13±0.18	181
0.2-0.3	2230	250.1	0.60	0.56±0.34	0.05	0.1±0.14	174
0.3-0.4	2154	349.7	0.53	0.53±0.33	0.05	0.09±0.12	135
0.4-0.5	2156	449.9	0.47	0.51±0.33	0.04	0.08±0.11	110
0.5-1	10550	750.3	0.46	0.50±0.33	0.04	0.08±0.11	469
1-3	39200	1992.5	0.4	0.33±0.29	0.03	0.06±0.08	965
3-5	39311	3990.2	0.33	0.40±0.27	0.02	0.04±0.06	377

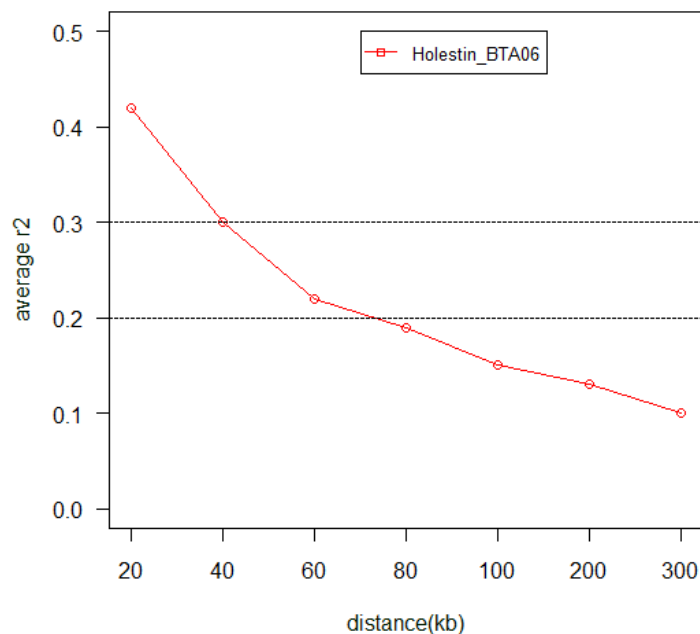
سطح مفید عدم تعادل لینکاژی در مطالعات ارتباطی

غالب صفات کمی تحت کنترل تعداد زیادی ژن (جایگاه صفت کمی) هستند که یافتن نشانگرهای پیوسته به این ژن‌ها در مطالعات ارتباطی اهمیت فوق العاده‌ای دارد. بدین منظور تعیین سطح مفید عدم تعادل لینکاژی برای محاسبه تراکم مناسب نشانگر در این مطالعات ضروری است (Zhao et al., 2005; Ardlie et al., 2002). سطح مفید عدم تعادل لینکاژی در واقع میزان تنوع جایگاه صفت کمی است که در نشانگر مشاهده می‌شود. (Meuwissen et al., 2000) گزارش کردند برای افزایش صحت برآورد ارزش ارثی ژنومی تا ۰/۸۵ مقدار عدم

تعادل لینکاژی (r^2) حداقل بایستی ۰/۲ باشد. از طرفی اندازه نمونه با میزان r^2 رابطه معکوس دارد. یعنی اندازه نمونه بایستی بر اساس $1/r^2$ افزایش یابد تا قدرت تعیین جایگاه صفت کمی برابر زمانی شود که بصورت مستقیم برآورد می‌شود (Pritchard and Przeworski 2001). بنابراین، r^2 تعیین‌کننده قدرت آماری مطالعات ارتباطی است (Sargolzaei et al 2008). سطح مفید عدم تعادل لینکاژی بر مبنای محدودیت در افزایش اندازه نمونه تعیین می‌شود. در اغلب مطالعات $r^2 > 0.3$ بعنوان سطح مفید عدم تعادل لینکاژی در نظر گرفته شده است (Sargolzaei et al, 2008; Lu et al 2012; De Ross et al, 2008; Ardlie et al., 2002). لذا، اگر سطح مفید عدم تعادل لینکاژی ۰/۳ در نظر گرفته شد. بر این

صورتی که سطح مفید عدم تعادل لینکاژی ۰/۲ r^2 در نظر گرفته شود این مقدار به یک نشانگر به ازاء هر ۷۵ kb و ۴۰۰۰۰ نشانگر برای پوشش کل ژنوم کاهش می یابد، اما اندازه نمونه بایستی به ۵ برابر افزایش یابد (شکل ۳).

اساس، سه برابر افزایش در اندازه نمونه نسبت به حالت شناسایی مستقیم جایگاه صفات کمی و ۷۰۰۰۰ نشانگر برای پوشش کل ژنوم یعنی یک نشانگر به ازاء هر ۴۰ kb برای مطالعات ارتباطی و انتخاب ژنومی مورد نیاز است (شکل ۳).



شکل ۳- تعیین سطح مفید عدم تعادل لینکاژی در نمودار روند کاهش r^2 با افزایش فاصله.

Figure 3- Useful level of LD in r^2 decay with increasing distance.

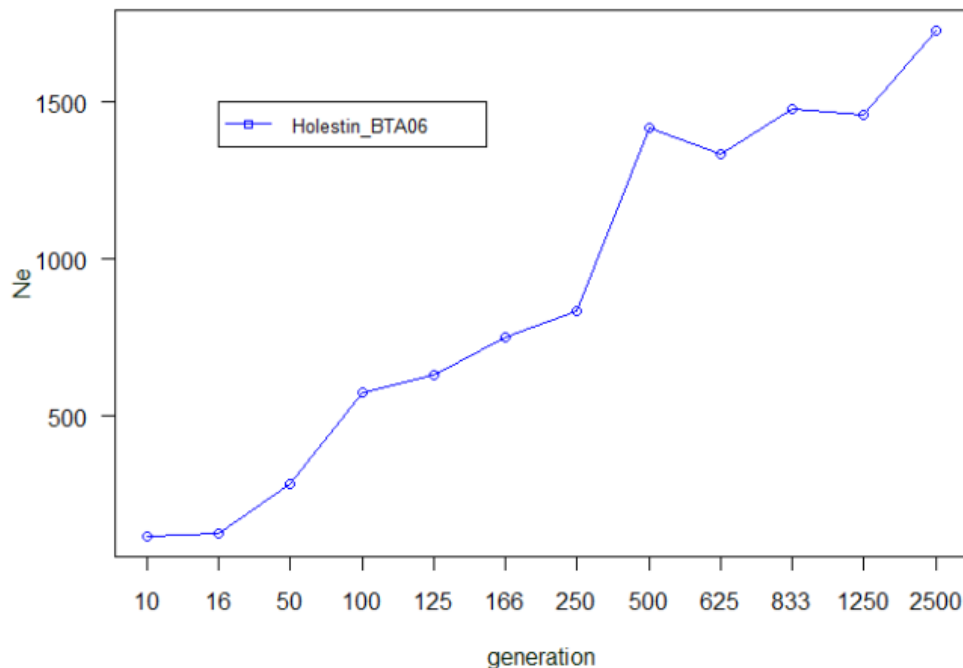
اندازه موثر جمعیت (al., 2009) و اندازه موثر جمعیت آنها در حدود ده هزار نسل قبل به چندین هزار راس کاهش یافته است. تشکیل نژادها و اصلاح ژنتیکی آنها منجر شد این مقدار به چند صد راس در ۵۰ نسل قبل برسد (De Roos et al., 2008). شکل ۴ روند کاهشی اندازه موثر جمعیت از ۲۵۰۰ تا ۱۰ نسل قبل را نشان می دهد. اندازه موثر جمعیت در ۲۵۰۰ نسل قبل در حدود ۱۷۰۰ راس بوده است که این مقدار در ۱۰۰۰ نسل قبل به ۱۴۰۰ راس

اندازه موثر جمعیت

تشخیص اندازه موثر جمعیت در جوامع مختلف در شناسایی ساختار صفات پیچیده اهمیت دارد (Reich & Lander 2001). گاو سیتارتیوداکتیل (Cetartiodactyla) است که حدود ۶۰ میلیون سال قبل پیدایش یافته است. گاوهای اهلی امروز، در حدود ۲۵۰ هزار سال پیش از اجداد مشترکی اشتقاق یافته اند (Burt et

کاهش می‌یابد. مقادیر گزارش شده برای اندازه موثر جمعیت بصورت تقریبی صحیح می‌باشد زیرا در معادله فرض می‌شود که اندازه N_{e_t} ثابت است در صورتی که در حقیقت متغیر است. اما اگر N_{e_t} بصورت خطی تغییر کند نتایج بطور تقریبی صحیح است.

رسیده است و در حدود ۱۰ نسل قبل به حدود ۱۰۰ راس کاهش یافته است که با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد (Qanbari *et al.* 2009; Sargolzaei *et al.* 2008; Bohmanova *et al.*, 2010; De Ross *et al.* 2008). این محاسبات در عدم حضور جهش است در صورتی که $\alpha=2$ در معادله لحاظ شود این مقدار به کمتر از ۱۰۰ راس



شکل ۴- اندازه موثر جمعیت در نژاد هلشتاین.

Figure 4- effective population size in Holstein population.

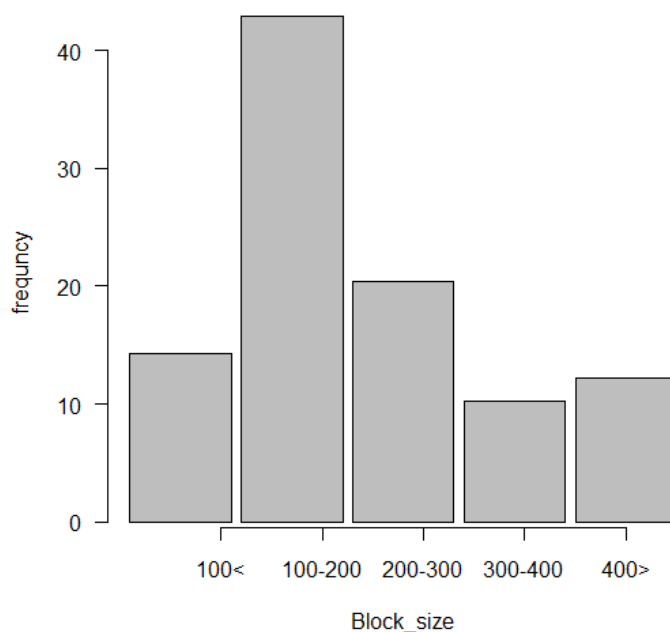
کروموزم ۶ یافت شد. کوتاه‌ترین بلوک ۱۸ kb و بلندترین آن‌ها ۴۷۶ kb طول داشت. بیشتر بلوک-ها طولی در حدود ۱۰۰-۲۰۰ kb داشتند (۴۲/۸۶٪) و کمترین میزان مربوط به بلوک‌های با طول بیش از ۴۰۰ kb و کمتر از ۱۰۰ kb بود (شکل ۵). بطور کلی بدلیل انتخاب در نژاد هلشتاین تشکیل تعداد قابل توجهی بلوک هاپلویتی قابل پیش بینی است. انتخاب از چند

ساختار بلوک‌های هاپلویتی

مطالعات ارتباطی برپایه هاپلویت‌ها، روش قدرتمندی در شناسایی ژنهای موثر بر بیماری‌ها(انسان) و صفات کمی (حیوانات اهلی) است. در این پژوهش بلوک‌های هاپلویتی بر اساس روش Gabriel *et al.* (2002) با استفاده از نرم‌افزار Haploview مشخص گردید. در حدود ۴۹ بلوک هاپلویتی با طول ۱۰/۶ Mb در سرتاسر

2000). علاوه بر این، انتخاب از طریق اثر اپیستاتیک بین آلل‌های لوکاس‌های دور از هم منجر به افزایش عدم تعادل لینکازی بین نشانگر-های روی یک کروموزوم می‌شود، میزان عدم تعادل لینکازی ایجاد شده بستگی به شدت انتخاب و فاصله نسلی دارد (Ardlie *et al.*, 2002).

طریق منجر به افزایش موضعی عدم تعادل لینکازی و تشکیل بلوک‌های هاپلوتیپی می‌شود. بدین ترتیب که انتخاب برای آلل‌های مطلوب و حذف آلل‌های نامطلوب باعث می‌شود آلل‌های لوکاس‌های مجاور نیز، انتخاب و یا حذف شوند این پدیده را انتخاب همراه (Hitchhiking) می‌نامند که منجر به ایجاد عدم تعادل لینکازی در ناحیه تحت انتخاب می‌شود (Farnir *et al.*).



شکل ۵- پراکنش بلوک‌های هاپلوتیپی بر روی کروموزوم ۶.

Figure 5- distribution of haplotype blocks in chromosome 6.

نتیجه‌گیری
در این پژوهش عدم تعادل لینکازی بر روی کروموزوم شماره ۶ گاوی مورد بررسی قرار گرفت و وسعت عدم تعادل لینکازی ۴۰kb در سطح $r^2=0/3$ مشاهده شد. بر این اساس اگر

سطح مفید عدم تعادل لینکازی را ۰/۳ در نظر بگیریم ۷۰۰۰۰ نشانگر برای پوشش کل ژنوم در مطالعات ارتباطی مورد نیاز است. تعداد و وسعت بلوک‌ها هاپلوتیپی نشان می‌دهد که بدلیل حضور جایگاه صفات کمی متعدد در سطح کروموزوم

نتیجه‌گیری
در این پژوهش عدم تعادل لینکازی بر روی کروموزوم شماره ۶ گاوی مورد بررسی قرار گرفت و وسعت عدم تعادل لینکازی ۴۰kb در سطح $r^2=0/3$ مشاهده شد. بر این اساس اگر

در مطالعات ارتباطی، انتخاب ژنومی و نقشه یابی جایگاه صفت کمی می‌باشد. لذا تهیه نقشه عدم تعادل لینکاژی جمعیت‌ها برای افزایش صحت و دقت در مطالعات فوق امری اجتناب ناپذیر است.

شماره ۶، اثر انتخاب منجر به تشکیل بلوک‌های با سطح بالای عدم تعادل لینکاژی شده است که Mb ۱۰/۶ کل کروموزم یعنی ۱۲٪ آن را پوشش می‌دهد. نتایج مطالعات عدم تعادل لینکاژی اولین قدم در تعیین تراکم نشانگر و اندازه نمونه مناسب

منابع

- Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M (2002). Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics* 3: 299–309.
- Arias JA, Keehan M, Fisher P, Coppieters W, Spelman R (2009). A high density linkage map of the bovine genome. *BMC Genetics* 10: 18-30.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-265.
- Bohmanova J, Sargolzaei M, Schenkel FS (2010). Characteristics of linkage disequilibrium in North American Holsteins. *BMC Genomics* 11: 421-435
- Burt DW (2009). The cattle genome reveals its secrets. *BMC Biology* 8: 36
- De Roos AP, Hayes BJ, Spelman RJ, and Goddard ME (2008). Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. *Genetics* 179: 1503–1512
- Diskin SJ, Li M, Hou C, Yang S, Glessner J, Hakonarson H, Bucan M, Maris JM, Wang K (2008). Adjustment of genomic waves in signal intensities from whole-genome SNP genotyping platforms. *Nucleic Acids Research* 36: e126.
- Farnir F, Coppieters W, Arranz JJ, Berzi P, Cambisano N, Grisart B, Karim L, Marcq F, Moreau L, Mni M (2000). Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Research* 10: 220-227.
- Freyer G, Kuhn C, Weikard R, Zhang Q, Mayer M, Hoeschele I (2002). Multiple QTL on Chromosome six in Dairy Cattle affecting Yield and Content Traits. *Journal of Animal Breeding and Genetic* 119: 69–82
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296: 2225–2229.
- Gautier M, Faraut T, Moazami-Goudarzi K (2007). Genetic and haplotypic structure in 14 European and African cattle breeds. *Genetics* 177: 59–70
- Gibbs RA, Taylor JF, Van Tassell CP, Barendse W, Eversole KA, Gill CA, Green RD, Hamernik DL, Kappes SM, Lien S (2009). Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science* 324: 528-532.
- Hayes B, Visscher PM, McPartlan HC, Goddard ME (2003). Novel multi-locus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome Research* 13: 635–643.
- Hill WG, Robertson A (1968). Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics* 38: 226–231.
- Khatkar MS, Collins A, Cavanagh JAL. *et al* (2006). A first generation metric linkage disequilibrium map of bovine chromosome 6. *Genetics* 174: 79–85.
- Khatkar MS, Nicholas FW, Collins AR, Zenger KR, Cavanagh JA, Barris W, Schnabel RD, Taylor JF, Raadsma HW (2008). Extent of genome-wide linkage disequilibrium in

- Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. *BMC Genomics* 9: 187-205.
- Lee YM, Lee YS, Han CM, Lee JH, Yeo JS, Kim JJ (2008). Detection of Quantitative Trait Loci for Growth and Carcass Traits on BTA6 in a Hanwoo Population. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 23: 287 – 291
- Lewontin RC (1964). The interaction of selection and linkage I. General considerations, heterotic models. *Genetics* 49: 49–67.
- Lewontin RC, Kojima K (1960). The Evolutionary Dynamics of Complex Polymorphisms. *Evolution* 14: 458-472.
- Lu U, Sargolzaei M, Kelly M, Li C, Vander Voort G, Wang Z, Plastow G, Moore S, Miller SP (2012). Linkage disequilibrium in Angus, Charolais, and Crossbred beef cattle. *Frontiers in Genetics* 3: 1- 10
- Marques E, Schnabel RD, Stothard P, Kolbehdari D, Wang Z, Taylor JF, Moore SS (2008). High density linkage disequilibrium maps of chromosome 14 in Holstein and Angus cattle. *BMC Genetic* 9: 45-64.
- McKay SD, Schnabel RD, Murdoch BM, Matukumalli LK, Aerts J, Coppieters W, Crews D, Dias Neto E, Gill C A., Gao C (2007). Whole genome linkage disequilibrium maps in cattle. *BMC Genetic* 8: 74-87
- Meuwissen, THE, Hayes BJ, Goddard ME (2001). Prediction of total genetic value using genome wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819–1829
- Odani M, Narita A, Watanabe T, Yokouchi K, Sugimoto Y, Fujita T, Oguni T, Matsumoto M, Sasaki Y (2006). Genome-wide linkage disequilibrium in two Japanese beef cattle breeds. *Animal Genetic* 37: 139–144.
- Olsen HG, Lien S, Svendsen M, Nilsen H, Roseth A, Aasland Opsal M Meuwissen TH (2004). Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. *Journal of Dairy Science* 87(3): 690-698.
- Olsen HG, Meuwissen THE, Nilsen H, Svendsen M, Lien S (2008). Fine Mapping of Quantitative Trait Loci on Bovine Chromosome 6 Affecting Calving Difficulty. *Journal of Dairy Science* 91: 4312–4322
- Pritchard JK, Przeworski M (2001). Linkage disequilibrium in humans: Models and data. *American Journal of Human Genetic* 69: 1–14.
- Qanbari S, Pimentel ECG, Tetens J, Thaller G, Lichtner P, Sharifi AR, Simianer H (2010). The pattern of linkage disequilibrium in German Holstein cattle. *Animal Genetics*.41: 346–356
- Reich DE, Lander ES (2001). On the allelic spectrum of human disease. *Trends in Genetics*, 17: 502–510
- Schnabel RD, Kim JJ, Ashwell MS, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Connor EE, Taylor JF (2005). Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: Analysis of the bovine osteopontin gene 102: 6896 – 6901
- Sargolzaei M, Schenkel FS, Jansen GB, Schaeffer LR (2008). Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America. *Journal of Dairy Science* 91: 2106–2117
- Sved, JA (1971). Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theoretical Population Biology* 2: 125–141.
- Tenesa A, Knott SA, Ward D, Smith D, Williams JL, Visscher PM (2003). Estimation of linkage disequilibrium in a sample of the United Kingdom dairy cattle population using unphased genotypes. *Journal of Animal Science* 81: 617-623.
- Vallejo RL, Li YL, Rogers GW, Ashwell MS (2003). Genetic diversity and background linkage disequilibrium in the North American Holstein cattle population. *Journal of Dairy Science* 86: 4137-4147.

- Varilo T, Paunio T, Parker A, Perola M, Meyer J, Terwilliger JD, Peltonen L (2003). The interval of linkage disequilibrium (LD) detected with microsatellite and SNP markers in chromosomes of Finnish populations with different histories. *Human Molecular Genetics* 12: 51–59
- Vignal A, Milan M, Sancristobal M, Eggen A (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34: 275-305
- Wright S (1938). Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science* (Wash DC) 87: 430–431.
- Zhao H, Nettleton D, Soller M, Dekkers JCM (2005). Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between markers and QTL. *Genetics Research* 86: 77–87.

Investigations of linkage disequilibrium phase in chromosome 6 of Holstein breed

Nosrati M.^{*1}, Tahmoorespur M.², Fontanesi L.³, Nassiry, M.R.²

¹ Assistant Professor, Department of agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.

² Professor, Department of animal science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

³ Professor, Department of Agri-Food Science and Technology, University of Bologna, Bologna, Italy.

Abstract

In whole genome association study, genomic selection, Determining of extent and level of linkage disequilibrium (LD) is important in sample size and marker density. In this experiment, the blood and sperm samples were collected from 1089 Holstein bulls and 2030 markers on chromosome 6 were genotyped by using Illumina Bovine SNP50K BeadChip based on UMD3.1 genome assembly. Data were corrected for missing genotyped SNP and individual with unknown genotype by Plink. After correction 1606 markers remained (79%). The average observed heterozygosity was 0.37 and 80% of the markers had minor allele frequency more than 0.2. The LD was calculated with r^2 and D' by Haploview v4.2. The extent of LD in this study was 40 kb with $r^2=0.3$. The r^2 value was decreasing to 0.2 (moderate level) in 80kb and 0.1 (background level) in 300 kb. The effective population size has been decreased to 100 individual in 10 generations ago. The 49 haplotype blocks with range 18-472 kb were detected that covering the 10.6 Mb of whole chromosome. These results showed that between 4000-70000 markers or one marker per 40-75 kb will be need for whole genome association study in this Holstein population.

Keywords: *Holstein, linkage disequilibrium, chromosome 6, N_e .*

* Corresponding Author: Nosrati M.

Tel: 09153860827

Email: Mehraveh58@yahoo.com