

بررسی تنوع ساختاری ژنگان سگ و گرگ بومی ایران با روش توالی‌یابی کل ژنوم

زینب امیری قنات سامان^۱، علی اسمعیلی زاده کشکونه^{۲*} و مسعود اسدی فوزی^۳

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نژاد دام، بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان،

کرمان، ایران و عضو انجمن پژوهشگران جوان، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲ و ۳. استاد و دانشیار، بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۲۸)

چکیده

در این پژوهش، از سه قلاده سگ و سه قلاده گرگ بومی ایران نمونه‌گیری شد. توالی‌یابی کل ژنگان (ژنوم) برای هر نمونه سگ و گرگ با استفاده از روش توالی‌یابی نسل جدید انجام شد. داده‌ها توسط برنامه BWA با ژنگان مرجع (رفرنس) هم‌ردیف شدند. چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک ژنگان با برنامه GATK شناسایی شدند. تغییرپذیری (واریانت)‌های ساختاری با برنامه BreakDancer-1.1 تعیین شدند. مستندسازی چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک ژنگان با برنامه SnpEff انجام شد. مقادیر تنوع نوکلئوتیدی در نمونه‌های سگ و گرگ با VCFtools محاسبه شدند. در این پژوهش ۱۲۴۵۹۶۵۱ چندریختی تک نوکلئوتیدی به دست آمد که ۷۸۱۹۷۸۹ و ۱۰۴۵۴۹۹۴ به ترتیب مربوط به نمونه‌های سگ و گرگ بودند. از شمار کل چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی ۵۳/۵۷، ۳۱/۹۸۹ و ۰/۸۱۱ درصد به ترتیب در ناحیه بین ژنی، اینترون و اگزون قرار گرفتند. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تنوع ساختاری در ژنگان گرگ بیشتر از سگ است.

واژه‌های کلیدی: تغییرپذیری ساختاری، حذف و اضافه کوچک، چندریختی تک نوکلئوتیدی.

مقدمه

از دیدگاه تکاملی، اهلی شدن سگ رویداد مهمی در توسعه تمدن بشری است که زمان و مکان رخداد این رویداد مورد بحث است و اطلاعات کمی درباره تغییرپذیری‌های ژنتیکی همراه با تغییر شکل اجداد گرگ‌ها به سگ‌های اهلی موجود است. به طوری که ادعا شده است، فسیل‌هایی از سگ با قدمت ۳۳۰۰۰ سال در کوه‌های آلتایی در سیبری مشاهده شده است (Ovodov et al., 2011). این در حالی است که فسیل‌های دیگری با قدمت ۱۲۰۰۰-۱۱۰۰۰ سال، همراه با انسان در فلسطین اشغالی یافت شده که نشان‌دهنده نخستین شواهدی از وجود و نگهداری

سگ هستند (Davis & Valla, 1978). الگوهایی از تغییرپذیری ژنتیکی نشان می‌دهد که اهلی شدن سگ دست‌کم ۱۰۰۰۰ سال پیش (Skoglund et al., 2011) در جنوب شرقی آسیا (Pang et al., 2009) یا آسیای میانه (Pollinger et al., 2010) آغاز شده است. این مسئله که چرا و چگونه سگ اهلی شده است، ناشناخته است. دو فرضیه در ارتباط با اهلی شدن سگ وجود دارد. فرض اول این است که انسان‌ها ممکن است از نوزادان گرگ برای نگهداری و شکار استفاده کرده باشند و در نتیجه منجر به انتخاب صفات مهمی برای این وظایف شده است. فرض دوم این است که هم‌زمان با تغییر زندگی انسان از عشایری به

چندی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید توسط پژوهشگران انجام شده است که می‌توان به پژوهش Wang *et al.* (2013) اشاره کرد. Wang *et al.* (2013) در رابطه با شناسایی ژن‌های مشترک بین انسان و سگ در فرآیند تکامل، گزارش کردند که شماری از ژن‌های مرتبط با هضم، فرآیندهای عصبی و سرطان در هر دو تحت انتخاب بوده‌اند. در یک پژوهش دیگر Stothard *et al.* (2011) با بررسی ژنگان گاوهای هولشتاین و آنگوس گزارش کردند تفاوت‌های ژنتیکی عمده‌ای بین ژنگان این دو نژاد وجود دارد. سگ و گرگ بومی ایران از منابع ارزشمند کشور هستند. به دلیل اینکه تابه‌حال بررسی ژنگانی (ژنومیک) کاملی روی ژنگان سگ و گرگ بومی ایران صورت نگرفته است. لذا در این پژوهش، ژنگان سگ و گرگ بومی ایران به‌منظور بررسی ساختار آن و مقایسه تنوع‌های ساختاری آن‌ها، با پوشش‌دهی بالا توالی‌یابی و بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از بافت و خون سه قلاده گرگ از استان‌های تهران، کرمان و همدان، و سه قلاده سگ یکی از شهرستان گلپایگان (بوم‌جور قدرجان) و دو قلاده دیگر از شهرستان‌های بیجار و سنندج (سگ تازی یا سالوکی) نمونه‌گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱. محل نمونه‌گیری و نوع بوم‌جور

Table 1. Sampling location and ecotypes

Sample	Location	Type of ecotype	ID Sample
Dog	Sanandaj	Tazi or Saluki	YPi2849
Dog	Bijar	Tazi or Saluki	YPi2860
Dog	Esfahan	Qahderijan	YPi2776
Wolf	Hamadan		YPi2985
Wolf	Tehran		YPi3649
Wolf	Kerman		YPi3656

استخراج DNA از نمونه‌های خون با روش استخراج نمکی و از نمونه‌های بافت با روش کلروفورم ایزوآمیل انجام شد. توالی‌یابی کل ژنگان به‌صورت Paired-End توسط شرکت ایلومینا Hiseq 2500 در کشور چین انجام شد (www.berrygenomics.com). کیفیت داده‌ها توسط برنامه fastqc (<http://www.bioinformatics>).

روستایی، گرگ‌ها به سمت زباله‌های نزدیک به محل سکونت انسان‌ها جذب شده و به‌تدریج با منابع غذایی جدید سازگار شده‌اند (Coppinger & Coppinger, 2002). با توجه به اینکه سگ‌های مدرن از نظر ویژگی‌های مانند کاهش رفتار تهاجمی و قابلیت‌های شناخت اجتماعی تغییر یافته‌اند، از گرگ‌ها متفاوت‌اند. بنابراین به‌احتمال تغییرپذیری رفتاری از جمله هدف‌های اولیه فرآیند اهلی‌شدن بوده‌اند (Hare & Wrangham, 2012). بررسی بیان شمار محدودی ژن در هیپوتالاموس سگ و گرگ نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در سگ و گرگ متفاوت است (Saetre *et al.*, 2004). فرآیند اهلی‌شدن از راه انتخاب مصنوعی و طبیعی سبب تغییر فراوانی ژن‌ها بین گونه‌های اهلی و وحشی شده است. به‌طوری‌که با انجام انتخاب مصنوعی برای صفت دوستی در روباه نقره‌ای، فراوانی ژن‌های مرتبط با صفات ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) و رفتاری تغییر کرد (Hare & wrangham, 2012). همچنین در جانوران ژن‌هایی وجود دارد که باعث جدایی جور (تیپ)‌های وحشی از اهلی می‌شوند. ازجمله می‌توان به ژن MC1R^۱ (مسئول تنوع‌های پوشش رنگی) در خوک (Fang *et al.*, 2009) و ژن TSHR^۲ (ژن مؤثر در تولیدمثل فصلی) در مرغ (Rubin *et al.*, 2010) اشاره کرد. ژنگان (ژنوم) در برگرفته تنوع‌های ژنتیکی پرشماری ازجمله، چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs)^۳، حذف و اضافه‌های کوچک (Indels)^۴ و تغییرپذیری (واریانت)‌های ساختاری (حذف، اضافه، معکوس و جابه‌جایی) است. در بسیاری از پژوهش‌ها از تنوع‌های ژنتیکی برای بررسی روابط تکاملی و شناسایی نژادهای مختلف استفاده می‌شود. در دهه‌های اخیر روش‌های پرشماری در راستای تعیین تنوع ساختار ژنتیکی به یاری متخصصان آمده‌اند که از میان آن‌ها می‌توان به روش توالی‌یابی نسل جدید (NGS)^۵ اشاره کرد. این روش توانایی و دقت شناسایی بالایی دارد. پژوهش‌های

1. Melanocortin 1 receptor
2. Thyroid Stimulating Hormone Receptor
3. Single Nucleotide Polymorphisms
4. Small Insertions and Deletions
5. Next Generation Sequencing

چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک نیز با برنامه SnpSift محاسبه شدند.

نتایج و بحث

نتایج کنترل کیفیت داده‌ها نشان داد که Reads Short کیفیت بالا و بدون آلودگی اولیه (پرایمری) داشتند. طول Short Reads برای همه داده‌ها ۱۲۵ بود. درصد همردیفی برای چهار نمونه بالای ۹۶ درصد و دو نمونه دیگر بالای ۷۰ درصد بود. که نشان‌دهنده کیفیت بالای همردیفی با ژنگان مرجع است (جدول ۲). میزان پوشش‌دهی در نمونه‌های توالی‌یابی‌شده بین ۱۴/۵۱X تا ۱۷/۱۵X بود.

در این پژوهش شمار ۱۲۴۵۹۶۵۱ چندریختی تک نوکلئوتیدی به دست آمد که ۷۸۱۹۷۸۹ چندریختی تک نوکلئوتیدی در نمونه‌های سگ و ۱۰۴۵۴۹۹۴ چندریختی تک نوکلئوتیدی در نمونه‌های گرگ دیده شد (جدول ۳). همچنین شمار کل حذف و اضافه‌های کوچک ۳۴۸۷۳۴۲ بود که ۲۳۹۸۹۹۸ و ۳۰۳۳۴۱۶ به ترتیب مربوط به نمونه‌های سگ و گرگ بودند. این نتایج نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بیشتر در ژنگان گرگ نسبت به سگ است. *wang et al.* (2013) با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل ژنگان، ۱۳۹۲۳۲۲۳ چندریختی تک نوکلئوتیدی را در یازده نمونه سگ و گرگ گزارش نمودند، به طوری که ۱۰۷۴۰۳۷۷، ۷۱۶۴۱۳۶ و ۶۹۵۸۲۸۶ به ترتیب در چهار نمونه گرگ، سه نمونه سگ بومی چین و چهار نمونه سگ با نژاد مشخص دیده شدند.

شمار چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک ناخالصی در مقایسه به خالصی در همه نمونه‌ها بیشتر بود (جدول ۴). با تجزیه و تحلیل بیشتر چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی مشخص شد که شمار جهش‌های از نوع جابه‌جایی دو برابر شمار جهش‌های از نوع معکوس است (جدول ۴). به علت سازوکارهای مولکولی ایجادکننده جهش‌ها در مولکول DNA، شمار چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی که توسط جهش‌های جابه‌جایی تولید می‌شوند، در مقایسه با چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی که توسط جهش‌های معکوس ایجاد می‌شوند، نزدیک به دو برابر

بررسی شد. برای همردیفی^۱ Short reads با ژنگان مرجع^۲ (<http://ftp.ensembl.org/pub/release-82/fasta/>) (3.1) (http://ftp.ensembl.org/pub/release-82/fasta/canis_familiaris/dna/) از الگوریتم MEM در برنامه BWA (Li & Durbin, 2009)^۳ استفاده شد. SAM^۴ فایل‌های تولیدشده توسط برنامه Samtools (*Li et al.*, 2009) به BAM^۵ فایل تبدیل شدند. سپس BAM فایل‌ها بر پایه موقعیت ژنگانی مرتب و نمایه (ایندکس)^۶ شدند. کیفیت BAM فایل‌ها توسط دو فراسنجه^۷ (درصد همردیفی^۷ Short reads با ژنگان مرجع و پوشش‌دهی^۸) بررسی شدند. خطاهای PCR^۹ با برنامه

picard (<https://github.com/broadinstitute/picard>) حذف و چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) و حذف و اضافه‌های کوچک (Small Indels) توسط برنامه GATK3.4-46- (*Mckenna et al.*, 2010) ^{۱۰} gbc02625 شناسایی و بنا بر پیش‌فرض این برنامه پالایش شدند. تغییرپذیری‌های ساختاری (حذف، اضافه، معکوس، جابه‌جایی‌های درون و بین کروموزومی) توسط برنامه BreakDancer-1.1 (*Chen et al.*, 2009) تعیین شدند. مستندسازی^{۱۱} چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی با برنامه Cingolani (*et al.*, 2012) انجام شد. تنوع نوکلئوتیدی برای ۳۸ کروموزوم اتوزومی در نمونه‌های سگ و گرگ با برنامه vcftools (*Danecek et al.*, 2011) محاسبه شد (window size 50 kb). شمار جهش‌های جابه‌جایی^{۱۲} و معکوس^{۱۳} در چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی با برنامه SnpSift (*Cingolani et al.*, 2012) محاسبه شدند. شمار خالصی (هموزیگوس)ها و ناخالصی (هتروزیگوس)ها در

1. Alignment
2. Genome Reference
3. Burrows-Wheeler Aligner
4. Sequence Alingment MAP
5. Binary Alingment MAP
6. Index
7. Alignment
8. Coverage
9. Mark duplicates
10. Genome Analysis Toolkit
11. Annotation
12. Transition
13. Transversion

است (Collins & Jukes, 1994). یکی از سازوکارهای عمده ایجادکننده جهش (موتاسیون)های جابه‌جایی دی آمیناسیون آکسیداتیو^۱ است. ۵ متیل^۲ سیتوزین در دی نوکلئوتیدهای CPG متیله‌شده، به علت دی آمیناسیون خودبه‌خودی بیشتر مستعد به سیتوزین غیر متیله و در نهایت سبب تبدیل سیتوزین به تیمین می‌شود. همین دلیل نادر بودن جزایر CPG^۳ در ژنگان است (Ebersberger *et al.*, 2002).

میانگین و میانه تنوع نوکلئوتیدی در ۳۸ کروموزوم اتوزومی درون نمونه‌های سگ ۰/۰۰۱۳۰۵ و ۰/۰۰۱۲۲۸ و درون نمونه‌های گرگ ۰/۰۰۱۷۰۴ و ۰/۰۰۱۶۳۹ بود. Wang *et al.* (2013) روند کاهشی برای تنوع ژنتیکی به ازای هر نوکلئوتید از نمونه‌های گرگ به نمونه‌های سگ (نژاد مشخص مانند ژرمن شفر) گزارش کردند. نتایج مستندسازی نشان داد که بیشتر چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی بین ژن‌ها و درون اینترون‌ها قرار دارند (جدول ۵). Stothard *et al.* (2011) نیز نتایج یکسانی را با استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید گاوهای نژاد هولشتاین و آنگوس گزارش کردند.

جدول ۲. خروجی توالی‌یابی برای شش نمونه

Table 2. Sequencing output for six samples

ID Sample	Total number of short reads	Short reads length	Total number of short reads aligned	Mean depth or coverage
Ypi2849	300830756	125	299566646	15.02X
Ypi2860	321722012	125	320224240	16.24X
Ypi2776	327604955	125	326163070	16.82X
Ypi2985	285864970	125	284280842	14.51X
Ypi3649	334497849	125	332944929	17.15X
Ypi3656	313534286	125	311172864	16.03X

جدول ۳. شمار چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و حذف و اضافه‌های کوچک برای شش نمونه پیش و پس از پالایش کردن

Table 3. Number of single nucleotide polymorphisms and small insertions and deletions for 6 samples before and after filtering

Sample	ID sample	Raw or filtered	Number of SNPs	Number of Indels
dog	Ypi2849	raw	5060098	1285825
dog	Ypi2849	filtered	4658554	1282911
dog	Ypi2860	raw	5043139	1268977
dog	Ypi2860	filtered	4624244	1266491
dog	Ypi2776	raw	5144922	1347439
dog	Ypi2776	filtered	4741165	1344338
wolf	Ypi2985	raw	6876898	1776196
wolf	Ypi2985	filtered	6360953	1773198
wolf	Ypi3649	raw	6916727	1794569
wolf	Ypi3649	filtered	6430171	1790888
wolf	Ypi3656	raw	6921297	1772691
wolf	Ypi3656	filtered	6467804	1769908
total raw		raw	13519228	3497597
total filtered		filtered	12459651	3487342

جدول ۴. شمار جابه‌جایی، معکوس و خالصی و ناخالصی

Table 4. The number of transition, transversion and homozygous, heterozygous

Sample	ID sample	The number of homozygous / heterozygous in SNP	The number of homozygous / heterozygous in indel	The number of transition in SNP	The number of transversions in SNP	Transition/transversion ratio in SNP
dog	Ypi2849	1873778/2784776	624450/658461	3108871	1549683	2.0061
dog	Ypi2860	1849780/2774464	606987/659504	3083331	1540913	2.0009
dog	Ypi2776	1768009/2973156	612488/731850	3156044	1585121	1.991
wolf	Ypi2985	2712589/3648364	872036/901162	4283743	2077210	2.0622
wolf	Ypi3649	2534357/3895814	836374/954514	4328066	2102105	2.0589
wolf	Ypi3656	2637476/3830328	850707/919201	4362918	2104886	2.0727

1. Oxidative deamination
2. 5-Methylcytosine
3. CPG islands

جدول ۵. شمار اثرگذاری‌های چندریختی تک نوکلئوتیدی در نواحی مختلف ژنگان

Table 5. Number of SNP effects in different regions of genome

Sample	Down stream	Exon	Inter genic	Intron	None	Splice_ site_ acceptor	Splice_ Site_ donor	Splice_ site_ region	Transcript	Upstream	Utr_3_ prime	Utr_5_ prime
Dog	429701	76811	4895571	2909718	328247	243	193	6722	62	446942	40668	12115
Wolf	607610	105255	7053895	4166631	421329	334	289	9172	94	642810	56747	17714
Total	702305	122896	8121058	4849376	533853	336	282	10828	90	732293	66712	19332
	(4.633)%	(0.811)%	(53.57)%	(31.989)%	(3.522)%	(0.002)%	(0.002)%	(0.071)%	(0.001)%	(4.831)%	(0.44)%	(0.127)%

ژنی، اینترون، بالادست ژن‌ها، پایین دست ژن‌ها، 3' UTR و 5' UTR در ژنگان قرار گرفتند. همچنین ۰/۶۶ و ۰/۶۳ درصد از چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی به ترتیب غیرهم معنی و هم معنی بودند.

در این پژوهش شمار کل تغییرپذیری‌های ساختاری از نوع حذف، اضافه، معکوس، جابه‌جایی‌های درون کروموزومی و جابه‌جایی‌های بیرون کروموزومی به ترتیب ۲۹۴۳۳، ۳۶۳۰، ۱۲۱۲، ۱۶۰۸ و ۳۸۷۶ به دست آمد. شمار کل تغییرپذیری‌های ساختاری به جز نوع اضافه در نمونه‌های گرگ بالاتر از سگ است (جدول ۷). به‌طور کلی نتایج نشان داد که تنوع ساختاری ژنگان گرگ بیشتر از سگ است و بالاتر بودن تنوع ساختاری در ژنگان گرگ تأییدکننده رابطه اجدادی بین سگ و گرگ است. نتایج همسانی در پژوهش *Freedman et al.* (2014) نیز گزارش شد. *Atanur* (2013) شمار ۷۱۹۹۲۹ تغییرپذیری ساختاری را در ژنگان ۲۶ سویه موش توالی‌یابی شده توسط پلات‌فرم ایلومینا گزارش کرد. *Varki* (2005) در پژوهشی تفاوت بین ژنگان انسان و شامپانزه را حدود ۴ درصد گزارش کرد که ۳۵ میلیون چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی و ۹۰ مگابایت حذف و اضافه‌ها را شامل می‌شد.

از شمار کل چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی ۴/۶۳۳، ۴/۸۳۱، ۵۳/۵۷، ۳۱/۹۸۹ و ۰/۸۱۱ درصد به ترتیب درون نواحی پایین دست ژن، بالادست ژن، بین ژنی، اینترون و اگزون یافت شدند (جدول ۵). همچنین از شمار کل ۱۲۲۸۹۶ چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی واقع شده در ناحیه اگزون، ۵۹/۵۵۶، ۰/۴۲۳ و ۴۰/۰۲۱ درصد از آن‌ها به ترتیب از نوع جهش‌های خاموش، بی معنی و بدمعنی بودند (جدول ۶). *Atanur et al.* (2013) در پژوهش روی ژنگان ۲۶ سویه موش ۹۶۶۵۳۴۰ چندریختی تک نوکلئوتیدی گزارش کردند به طوری که از شمار ۶۷۶۱۶ چندریختی واقع شده در توالی رمزکننده پروتئین، ۲۹۱۳۱ و ۳۸۴۸۵ به ترتیب غیر هم معنی و هم معنی بودند. *Stenson et al.* (2003) در پژوهش معرفی پایگاه جهش انسان (HGMD)^۱ گزارش کردند که شمار زیادی از فنوتیپ‌ها (هردوی مندلی و کمی) در انسان و دیگر حیوانات با چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی غیر هم معنی مرتبط هستند. *da Silva et al.* (2015) با بررسی تغییرپذیری‌های ژنگانی در ژنگان گاو نلور گزارش کردند که از شمار کل چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی ۶۴/۹۷، ۲۳/۵۹، ۵/۲، ۴/۴ و ۰/۲۸ و ۰/۰۹ درصد به ترتیب درون نواحی بین

جدول ۶. شمار اثرگذاری‌های چندریختی تک نوکلئوتیدی با دسته عملکردی

Table 6. Number of SNP effects by functional class

Sample	Missense (Percent)	Nonsense (Percent)	Silent (Percent)
Dog	29309 (40.521%)	290 (0.401%)	42732 (59.078%)
Wolf	40771 (41.212%)	447 (0.452%)	57712 (58.336%)
Total	46300 (40.021%)	489 (0.423%)	68899 (59.556%)

جدول ۷. شمار تغییرپذیری‌های ساختاری در نمونه‌های سگ و گرگ

Table 7. Number of structural variants in samples of dog and wol

Sample	Deletion	Insertion	Inversions	Inter chromosomal Translocations	Intra chromosomal Translocations
Dog	23063	3255	800	1048	2535
Wolf	32065	1163	1020	1269	3125
Total	29433	3630	1212	1608	3876

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش برای بررسی تنوع ساختار ژنگان سگ و گرگ، کل ژنگان شش نمونه سگ و گرگ بومی ایران توسط روش توالی‌یابی نسل جدید، به صورت Paired-End با پوشش‌دهی بالا توالی‌یابی و بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی نسل جدید تفاوت‌های ساختاری بین ژنگان سگ و گرگ را به خوبی نشان داد. تفاوت بین ژنگان سگ و گرگ به عنوان نشانه‌هایی برای تخصیص دادن تفاوت‌های ژنتیکی به صفات فیزیکی، رفتاری و همچنین بیماری هستند و بیانگر تغییر ژنگان گرگ در طی فرآیند اهلی شدن همراه با ایجاد صفات جدید در سگ

هستند. سگ به عنوان مدل حیوانی در بسیاری از تحقیقات است. بنابراین اطلاعات به دست آمده از این پژوهش برای مقایسه‌های بین گونه‌ای سودمند خواهند بود.

سپاسگزاری

از مسئولان اداره کل محیط‌زیست استان تهران و همه افرادی که در روند نمونه‌گیری همکاری لازم را داشته‌اند، قدردانی می‌شود. نمونه‌گیری برای اجرای این پژوهش با دریافت مجوز از اداره کل محیط‌زیست استان تهران با شماره ۹۳/۳۴۰۸۹ مورخ ۱۳۹۳/۰۷/۲۲ صورت پذیرفت.

REFERENCES

- Atanur, S. S., Diaz, A. G., Maratou, K., Sarkis, A., Rotival, M., Game, L. & Keane, T. M. (2013). Genome sequencing reveals loci under artificial selection that underlie disease phenotypes in the laboratory rat. *Cell*, 154(3), 691-703.
- Chen, K., Wallis, J. W., McLellan, M. D., Larson, D. E., Kalicki, J. M., Pohl, C. S. & Mardis, E. R. (2009). BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation. *Nature methods*, 6(9), 677-681.
- Cingolani, P., Patel, V. M., Coon, M., Nguyen, T., Land, S. J., Ruden, D. M. & Lu, X. (2012). Using *Drosophila melanogaster* as a model for genotoxic chemical mutational studies with a new program, snpsift. In *Toxicogenomics in non-mammalian species*, (Vol. 3, P. 35). Frontiers E-books.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L. & Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, snpeff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, 6(2), 80-92.
- Collins, D. W. & Jukes, T. H. (1994). Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics*, 20(3), 386-396.
- Coppinger, R. & Coppinger, L. (2002). Dogs: a new understanding of canine origin, behavior and evolution. *University of Chicago Press*.
- da Silva, J. M., Giachetto, P. F., da Silva, L. O. C., Cintra, L. C., Paiva, S. R., Caetano, A. R. & Yamagishi, M. E. B. (2015). Genomic variants revealed by invariably missing genotypes in nelore cattle. *Plos one*, 10(8), e0136035.
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A. & Durbin, R. (2011). The variant call format and vcfutils. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158.
- Davis, S. J. & Valla, F. R. (1978). Evidence for domestication of the dog 12,000 years ago in the Natufian of Israel. *Nature*, 276, 608-610.
- Ebersberger, I., Metzler, D., Schwarz, C. & Pääbo, S. (2002). Genomewide comparison of DNA sequences between humans and chimpanzees. *The American Journal of Human Genetics*, 70(6), 1490-1497.
- Fang, M., Larson, G., Ribeiro, H. S., Li, N. & Andersson, L. (2009). Contrasting mode of evolution at a coat color locus in wild and domestic pigs. *PLoS Genet*, 5(1), e1000341.
- Freedman, A. H., Gronau, I., Schweizer, R. M., Ortega-Del Vecchyo, D., Han, E., Silva, P. M. & Beale, H. (2014). Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genetics*, 10(1), e1004016.
- Hare, B., Wobber, V. & Wrangham, R. (2012). The self-domestication hypothesis: evolution of bonobo psychology is due to selection against aggression. *Animal Behaviour*, 83(3), 573-585.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N. & Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and sam tools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Li, H. & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.

16. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A. & DePristo, M. A. (2010). The genome analysis toolkit: a mapreduce frame work for analyzing next-generation dna sequencing data. *Genome research*, 20(9), 1297-1303.
17. McLaren, W., Pritchard, B., Rios, D., Chen, Y., Flicek, P. & Cunningham, F. (2010). Deriving the consequences of genomic variants with the ensembl api and snp effect predictor. *Bioinformatics*, 26(16), 2069-2070.
18. Ovodov, N. D., Crockford, S. J., Kuzmin, Y. V., Higham, T. F., Hodgins, G. W. & van der Plicht, J. (2011). A 33,000-year-old incipient dog from the altai mountains of Siberia: evidence of the earliest domestication disrupted by the last glacial maximum. *PLoS One*, 6 (7), e22821.
19. Pang, J. F., Kluetsch, C., Zou, X. J., Zhang, A. B., Luo, L. Y., Angleby, H. & Savolainen, P. (2009). MtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze river, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular biology and evolution*, 26(12), 2849-2864.
20. Pollinger, J. P., Lohmueller, K. E., Han, E., Parker, H. G., Quignon, P., Degenhardt, J. D. & Wayne, R. K. (2010). Genome-wide snp and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*, 464(7290), 898-902.
21. Skoglund, P., Götherström, A. & Jakobsson, M. (2011). Estimation of population divergence times from non-overlapping genomic sequences: examples from dogs and wolves. *Molecular biology and evolution*, 28(4), 1505-1517.
22. Rubin, C. J., Zody, M. C., Eriksson, J., Meadows, J. R., Sherwood, E., Webster, M. T. & Andersson, L. (2010). Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication. *Nature*, 464(7288), 587-591.
23. Saetre, P., Lindberg, J., Leonard, J. A., Olsson, K., Pettersson, U., Ellegren, H. & Jazin, E. (2004). From wild wolf to domestic dog: gene expression changes in the brain. *Molecular Brain Research*, 126(2), 198-206.
24. Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S. & Cooper, D. N. (2003). Human gene mutation database (HGMD®): update. *Human mutation*, 21(6), 577-581.
25. Stothard, P., Choi, J. W., Basu, U., Sumner-Thomson, J. M., Meng, Y., Liao, X. & Moore, S. S. (2011). Whole genome resequencing of black angus and holstein cattle for snp and cnv discovery. *BMC genomics*, 12(1), 559.
26. Varki, A. & Altheide, T. K. (2005). Comparing the human and chimpanzee genomes: searching for needles in a haystack. *Genome research*, 15(12), 1746-1758.
27. Wang, G. D., Zhai, W., Yang, H. C., Fan, R. X., Cao, X., Zhong, L. & Zhang, Y. P. (2013). The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. *Nature communications*, 4, 1860.

Study of structural diversity of genome Iranian native dog and wolf with the method whole genome sequencing

Zeinab Amiri Ghanatsaman¹, Ali Esmailzadeh Koshkoiyeh^{2*} and Masood Asadi Fozi³

1. Ph.D. Student of Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran and Yang Reseachers Society, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2, 3. Professor and Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

(Received: Jan. 26, 2016 - Accepted: May 17, 2016)

ABSTRACT

In this research, samples were collected from three Iranian native dogs and three wolves. Whole-genome sequencing for each individual was performed using next-generation sequencing technology. All short reads were aligned to the reference genome using BWA tool. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and small insertions and deletions (Indels) were detected using the genome analysis toolkit (GATK). Structural variants were predicted using the BreakDancer software. Annotating single-nucleotide polymorphisms and small insertions and deletions was done using SnpEff Software. Nucleotide diversity values in dogs and wolves samples were calculated using VCFtools. In current research, 12459651 SNPs were detected that 7819789 and 10454994 were for dog and wolf, respectively. Of the total number of Single-nucleotide polymorphisms, 53.57%, 31.989% and 0.811% were located within intergenic, introns and exon regions. The results showed that structural diversity of wolf genome is higher than that in dog.

Keywords: Single-nucleotide polymorphism, small insertions and deletions, structural variant.

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

Tel: +98 936 2889629