

نگاهی بسیار ساده بر شاخص‌های ژنتیک تکاملی در ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* بلدرچین ژاپنی شاخص‌های ژنتیک تکاملی در ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* بلدرچین ژاپنی و سایر گونه‌ها

خدیجه مرادی^۱، مصطفی قادری زفره‌ای^{۲*}، فرهاد صمدیان^۳ و محمد فروغی^۴

شماره صفحات
۲۹-۴۷

- (۱) دانشجوی ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج، ایران.
(۲) دانشیار ژنتیک و بیوانفورماتیک، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج، ایران.
(۳) استادیار، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج، ایران.
(۴) دانش‌آموخته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج، ایران.

نویسنده مسئول: mosmos741@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۸

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، بررسی تکاملی توالی نوکلئوتیدی ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* در جمعیت‌هایی از بلدرچین ژاپنی ($N=9$)، بررسی میزان تنوع ژنتیکی در این جمعیت‌ها و ترسیم رابطه تبارزایی آن‌ها با برخی گونه‌های دیگر بود. این ژن‌ها زیرمجموعه‌ای از پروتئازهای خانواده کالپاین هستند که طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژی را تنظیم می‌کنند. بدین منظور، توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* بلدرچین ژاپنی به همراه توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه با توالی این دو ژن از برخی گونه‌های دیگر ($N=62$) از بانک ژن جهانی (NCBI) استخراج شدند و از نرم‌افزارهای DnaSP و MEGA برای تحلیل این توالی‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که چند شکلی ژن *CAPN2* بیشتر از ژن *CAPN3* در بلدرچین ژاپنی بوده و در نتیجه مناطق حفاظت‌شده در ژن *CAPN3* در مقایسه با ژن *CAPN2* بیشتر بود. مقدار عددی نسبت dN/dS برای بلدرچین ژاپنی در ژن *CAPN3* (۰/۹۴) و در ژن *CAPN2* (۰/۶۸) برآورد شد که به ترتیب، نشان دهنده انتخاب خنثی و انتخاب خالص بر روی این دو ژن در طول تکامل می‌باشند. نتایج آزمون تکامل خنثی ($Tajima's D$) در برای ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* در همه گونه‌های مورد بحث مثبت و بیشتر از یک برآورد شد که نشان دهنده انتخاب مثبت برای این ژن‌ها در همه گونه‌های مورد بررسی می‌باشد. نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌تواند در ردیابی مناطق ژنگاه‌های *CAPN2* و *CAPN3* مرتبط با صفات فنوتیپی متمایزکننده گونه‌های مورد بررسی به کار رود. نتایج آنالیز تبارزایی نشان داد که ژن‌های مورد بررسی در مسیر تکاملی، بسته به گونه‌ی مورد بررسی، پاسخ‌های تکاملی متفاوتی را از خود نشان داده‌اند که نشان‌دهنده پیچیدگی پاسخ این دو ژن به فرایند تکامل است؛ گرچه این دو ژن از نظر هستی‌شناسی ژنی و حاشیه‌نویسی متابولیکی در یک گروه و خانواده قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی: بلدرچین ژاپنی، آنالیز تبارزایی، ژن *CAPN3*، ژن *CAPN2* و شاخص‌های ژنتیک تکاملی.

مقدمه

کالپین‌ها^۱ مسؤول فرآیندهای پروتئولیزی پس از مرگ در بافت ماهیچه‌ای هستند (Goll *et al.*, 2003; White *et al.*, 2013; Rasouli *et al.*, 2005). در پستانداران، کالپین‌های m و μ به طور فراگیری در بدن بیان می‌شوند و به وسیله غلظت یون کلسیم مورد نیاز برای فعالیت پروتئاز از هم متمایز می‌شوند (Sorimachi and Suzuki, 2001). هر دو کالپین μ و کالپین m مولکول‌های هترودیمیتریکی هستند که از زیرواحدهای بزرگ مجزایی (به ترتیب $CAPN1$ و $CAPN2$) تشکیل می‌یابند. بیان ژن‌های $CAPN1$ ، $CAPN2$ و $CAPN3$ در طیور مشخص شده است (Okumura *et al.*, 2006; Okumura *et al.*, 2005). ساختار ژن $CAPN1$ در پستانداران با ژن $CAPN2$ در طیور شباهت بالایی دارد و $CAPN2$ در پستانداران مشابه با $CAPN1$ در طیور می‌باشد. کالپین ۱ در طیور فعال‌تر از کالپین ۲ می‌باشد، ولی نشان داده شده است که هر دو کالپین در طیور، بیشتر پروتئین‌های میوفیبریلی شامل اکتین و میوزین را تجزیه می‌کنند (Beltrán *et al.*, 1997). همچنین، نشان داده شده است که کالپین‌ها در تجزیه اسکلت سلولی نیز نقش دارند (Goldberg *et al.*, 1997). ژن $CAPN3$ به عنوان یک ژن بزرگ‌اثر در دیستروفی عضلانی و رشد عضلانی دخالت داشته و از نقش مهمی در یکپارچگی میوفیبریلی برخوردار است (Zhang *et al.*, 2009; Poussard *et al.*, 1996). نشان داده شده است که در ماهیچه‌های اسکلتی یک لاین منتخب از بلدرچین ژاپنی برای وزن‌های بدنی پایین، فعالیت کالپینی بیشتری وجود دارد (Maeda, 1991). در این راستا گزارش شده است که در جوجه‌های تخم‌گذار نرخ فعالیت m -کالپین و نرخ رویگرد^۲ پروتئین ماهیچه‌ای در مقایسه با جوجه‌های گوشتی بالاتر است (Johari *et al.*, 1993). بنابراین، تغییرات در نرخ تجزیه پروتئینی به عنوان عامل اصلی تأثیرگذار بر رشد عضلانی در جوجه‌ها عنوان شده است (Goll and Szpacenko, 1989; Zhang *et al.*, 2009). چندشکلی‌های متعددی از DNA (SNPs) برای ژن‌های مختلف، به عنوان ابزاری بالقوه برای انتخاب به منظور بهبود کیفیت گوشت مورد بررسی قرار می‌گیرند (Brookes, 1999). در بسیاری از حیوانات اهلی از جمله طیور، پژوهش‌های متعددی به منظور شناسایی منشأ ژنتیکی تغییرات قابل مشاهده در ساختار و تنوع پروتئین‌های بدن انجام شده است و وجود چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) به عنوان یک عامل مهم تأثیرگذار عنوان شده است. چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) مختلفی برای ژن‌های کالپینی در جمعیت‌های مختلفی از بلدرچین ژاپنی (Palmer *et al.*, 1999)، گونه‌های مختلفی از طیور (Solé *et al.*, 2016) و همچنین، پستانداران (Page *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008) نشان داده شده است. تاکنون پژوهش‌های بسیاری نیز بر روی توالی زیر واحد تنظیمی ژن $CAPN2$ انجام گرفته است که همگی چندشکل بودن این ناحیه را تأیید می‌کنند. گزارش

^۱ Calpains^۲ Turnover

شده است که SNP‌های ژن *CAPN1* در بلدرچین ژاپنی در تولید و تردی گوشت اثر دارند (Işik, 2019). بلدرچین به عنوان یک منبع عالی پروتئینی از گوشت طیور محسوب می‌شود و بنابراین، بررسی این گونه از نظر پتانسیل بهبود کیفیت گوشت آن با روش‌های تکاملی، مهم به نظر می‌رسد چرا که با مقایسه روند تکاملی این دو ژن در گونه‌های مختلف، می‌توان از ظرفیت ژنتیکی هر گونه در درک ساختار ژنتیکی بلدرچین ژاپنی از نظر تکامل داروینی یا خنثی استفاده کرد. تکامل داروینی بیانگر این حقیقت است که اگر تغییری در سطح DNA موجودی روی دهد و این تغییر منتج به ایجاد پروتئین و در نهایت فنوتیپ خاصی گردد، یا می‌تواند این تغییر در جمعیت پذیرفته شود یا این که حذف گردد. بنابراین، انتظار این است که فراوانی موجودات حاصل از این تغییرات، یا در جمعیت زیاد و یا کاهش یابند. در برابر این نظریه، موتو کیمورا^۱، نظریه تکامل خنثی را پایه‌گذاری کرد که نشان می‌دهد جمعیتی می‌تواند تغییرات ژنتیکی زیادی را تجربه کند بدون این که محیط روی آن اثر انتخابی خود را نشان دهد.

هدف از پژوهش حاضر بررسی میزان تنوع ژنتیکی ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* در طول تکامل در بلدرچین ژاپنی و ترسیم رابطه تبارزایی بین بلدرچین ژاپنی و برخی گونه‌های دیگر بر مبنای بررسی توالی‌های DNA ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* بود. در این راستا، با نگرشی از دیدگاه تکاملی به این ژن‌ها و بررسی میزان پاسخ آن‌ها به انتخاب‌های طبیعی و خنثی، بتوان به درک بهتری از روند تکاملی این ژن‌ها رسید.

مواد و روش‌ها

در ابتدا، توالی‌های مربوط به ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* (N=9) بلدرچین ژاپنی برای مقایسه‌های درون‌نژادی از بانک جهانی ژن (NCBI) استخراج شدند و در قسمت Nucleotide BLAST، هم‌ردیف^۲ شدند و میزان تشابه توالی‌ها با سایر توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد مقایسه قرار گرفت. در مرحله بعد، برای مقایسه این دو ژن در بلدرچین با سایر گونه‌های موجود در NCBI، توالی‌های مربوط به گونه‌های دیگر استخراج شدند. شاخص‌های تنوع ملکولی از قبیل تعداد و جهش‌ها، تعداد هاپلوتیپ‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، مکان‌های چندشکلی، چندشکلی اضافه و حذف، نواحی حفاظت شده، میزان عدم تعادل پیوستگی، نواحی تبدیل ژنی، تعداد جایگاه‌هایی که در آن جایگزینی مشابه اتفاق افتاده با استفاده از نرم‌افزار Dnasp به دست آمدند (Rozas *et al.*, 2003). آزمون تکاملی D تاجیما^۳، به منظور شناسایی هرگونه انحراف از فرضیه صفر (یعنی تکامل خنثی) و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر ژن‌های مورد بررسی در جمعیت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت (Tajima, 1989; Tamura, 2004; Kumar *et al.*, 2004). برای

^۱ Motoo Kimura

^۲ Blast

^۳ Tajima's D

کمی سازی این دو دیدگاه، آماره‌های تکاملی ژنتیکی زیاد توسعه یافته‌اند (به جداول پیوست رجوع شود). در اینجا برای این که خواننده از درک بهتری برخوردار شود، به بررسی آزمون آماری تکاملی D می‌پردازیم. آزمون تکاملی D به صورت زیر بیان می‌شود:

$$D = \frac{\theta_{\pi} - \theta_w}{\sqrt{\text{var}(\theta_{\pi} - \theta_w)}} = \frac{d}{\sqrt{\hat{V}(d)}} = \frac{d}{\sqrt{e_1 S + e_2 S(S-1)}}$$

$$e_1 = \frac{c_1}{a_1}, e_2 = \frac{c_2}{a_1^2 + a_2}, c_1 = b_1 - \frac{1}{a_1}, c_2 = b_2 - \frac{n+2}{a_1 n} + \frac{a_2}{a_1^2}, a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}, a_2 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i^2}, b_1 = \frac{n+1}{3(n-1)},$$

$$b_2 = \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)}, M = \frac{S}{a_1}$$

حال درک اجزای این فرمول، فرض شود که تعداد هشت توالی از یک ژن از هشت سازواره را داریم که بعد از همترازی، نتایج آن به شکل زیر باشد:

Seq1 AACTGTGCACTGCATGATGA
 Seq2 AACTGTGCACTGCATGATGA
 Seq3 AAGTGTGCACTGCCTGATGA
 Seq4 AAGTGTGCACTGCCTGATGA
 Seq5 AACTGTGCACTGCATGATGA
 Seq6 AACTGTGCACTGCATGATGA
 Seq7 AACTGTGCACTGCATGCTGA
 Seq8 AACTGTGCACTGCATGATGA

با توجه به موارد بالا مقدار D بصورت زیر به دست خواهد آمد.

$$D = \frac{\theta_{\pi} - \theta_w}{\sqrt{\text{var}(\theta_{\pi} - \theta_w)}} = \frac{d}{\sqrt{\hat{V}(d)}} = \frac{d}{\sqrt{e_1 S + e_2 S(S-1)}}$$

$$e_1 = \frac{c_1}{a_1}$$

$$e_2 = \frac{c_2}{a_1^2 + a_2}$$

$$c_1 = b_1 - \frac{1}{a_1}$$

$$c_2 = b_2 - \frac{n+2}{a_1 n} + \frac{a_2}{a_1^2}$$

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$$

$$a_2 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i^2}$$

$$b_1 = \frac{n+1}{3(n-1)}$$

$$b_2 = \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)}$$

$$M = \frac{S}{a_1}$$

$$D = \frac{d}{\sqrt{e_1 S + e_2 S(S-1)}} = \frac{d}{\sqrt{0.016544 * 3 + 0.004906 * 3 * 2}} = \frac{-0.121311}{0.281190} = -0.431420$$

$$e_1 = \frac{c_1}{a_1} = 0.016544$$

$$e_2 = \frac{c_2}{a_1^2 + a_2} = 0.004906$$

$$c_1 = b_1 - \frac{1}{a_1} = 0.042896$$

$$c_2 = b_2 - \frac{n+2}{a_1 n} + \frac{a_2}{a_1^2} = 0.040398$$

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i} = 2.592857$$

$$a_2 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i^2} = 1.511797$$

$$b_1 = \frac{n+1}{3(n-1)} = 0.428571$$

$$b_2 = \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)} = 0.297619$$

$$M = \frac{S}{a_1} = \frac{3}{2.592857} = 1.157025$$

حال امکان محاسبه d به صورت تعداد متوسط چند شکلی‌ها منهای M وجود دارد: $\frac{29}{28} - 1.157025 = -0.121311$ که در نهایت:

$$D = \frac{d}{\sqrt{e_1 S + e_2 S(S-1)}} = \frac{-0.121311}{\sqrt{0.016544 * 3 + 0.004906 * 3 * 2}} = \frac{-0.121311}{0.281190} = -0.431420$$

اگر مقدار D کمتر از ۱ و منفی به دست آمد، نشان می‌دهد که داده مورد بررسی تا حدی تحت انتخاب طبیعی منفی است. طبق قرارداد هرگاه مقدار D برابر ۱ به دست آمد نشانگر انتخاب خنثی می‌باشد. در این پژوهش آزمون تکاملی dN/dS نیز با استفاده از تارگه www.hiv.lanl.gov/content/index استفاده شد. آزمون dN/dS اغلب برای نمونه‌هایی از یک جمعیت مشخص استفاده می‌شود و روشی سودمند و بسیار کارآمد برای تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد. استفاده از ارزیابی dN/dS به منظور پی‌بردن به فشار انتخاب در نمونه‌های یک جمعیت مشخص مهم می‌باشد (Nei and Kumar, 2000). نسبت dN/dS معیار مفیدی برای قدرت و حالت انتخاب طبیعی است که بر روی ژن‌های کدکننده پروتئین عمل می‌کند. این نسبت به طور گسترده‌ای برای بررسی الگوهای انتخاب بر روی ژن‌های کدکننده پروتئینی در مقیاس ژنومی (از ژنوم‌های کوچک ویروس‌ها، باکتری‌ها و یوکاریوت‌های انگلی گرفته تا بزرگترین ژنوم‌های یوکاریوتی) استفاده می‌شود.

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های $CAPN2$ و $CAPN3$ استخراج شده NCBI در گونه‌های مختلف

Table 1- Nucleotide sequences of CAPN2 and CAPN3 genes extracted from NCBI in different species

Species name	Scientific name	CAPN2	CAPN3
Goat	<i>Capra hircus</i>		X
Turkey	<i>Meleagris gallopavo</i>		X
Hen	<i>Gallus gallus</i>	X	X
Camel	<i>Camelus dromedarius</i>		X
Humped cattle	<i>Bos indicus</i>	X	X
	<i>Chiroptera</i>		X
European cattle	<i>Bos taurus</i>	X	X
Horse	<i>Equus caballus</i>		X
Dog	<i>Canis familiaris</i>		X
Human	<i>Homo Sapiens</i>	X	
House mouse	<i>Mus musculus</i>	X	
Sheep	<i>Ovis aries</i>	X	

در ادامه از نرم‌افزار MEGA6 (<https://www.megasoftware.net>) برای ترسیم درخت‌های تبارزایی توالی‌های

DNA استخراج شده از ژن‌های مورد نظر استفاده شد که در این راستا، از روش 'NJ و میزان داده چرخانی^۲ ۱۰۰۰۰ تکرار استفاده گردید (Tamura et al., 2013). همچنین، فراوانی اسید آمینه‌ای توالی‌های مورد پژوهش با استفاده از تارگاه <https://web.expasy.org/protparam> برآورد گردید.

نتایج و بحث

در بسیاری از رایانش‌های ایجاد درخت تبارزایی، فرض می‌شود که بین همه مجموعه‌های ورودی از توالی‌ها یک رابطه‌ی تکاملی وجود دارد و همه آن‌ها از یک جد مشترک ایجاد شده‌اند. در این پژوهش با استفاده از الگوریتم ClustalW در نرم‌افزار MEGA6 هم‌ردیفی انجام شد. اطلاعات مربوط به جایگاه ژن مذکور و گونه‌های مختلف در جدول ۱ آورده شده است. در تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی در ژن *CAPN3* بلدرچین ژاپنی، بیشترین و کمترین فراوانی نوکلئوتیدی به ترتیب مربوط به باز آدنین و سیتوزین بود. در بین گونه‌ها، بیشترین و کمترین فراوانی نوکلئوتید آدنین، به ترتیب مربوط به خفاش و شتر یافت شد و بیشترین و کمترین فراوانی نوکلئوتید تیمین نیز به ترتیب مربوط به بوقلمون و خفاش بود. بیشترین فراوانی نوکلئوتیدهای سیتوزین و گوانین مربوط به بز و بوقلمون و کمترین فراوانی این بازها مربوط به مرغ و بز بود. در مقایسه بین دو ژن مورد بررسی در بلدرچین ژاپنی، فراوانی نوکلئوتیدی آدنین و فراوانی مجموع بازهای نوکلئوتیدی سیتوزین و گوانین در ژن *CAPN2* از ژن *CAPN3* کمتر بود، ولی فراوانی مجموع نوکلئوتیدهای آدنین و تیمین در ژن *CAPN3* از ژن *CAPN2* کمتر بود (جدول ۲).

جدول ۲- فراوانی نوکلئوتیدهای ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* در بلدرچین ژاپنی

Table 2- Frequency of nucleotides of *CAPN3* and *CAPN2* Genes in Japanese quail

Gene name	Nucleotide frequency			
	A	T	C	G
<i>CAPN3</i> (N=9)	29.93	27.46	19.21	21.42
<i>CAPN3</i> (N=9)	23.97	23.79	24.29	27.96

در بررسی ژن *CAPN2* در سایر گونه‌ها، انسان و مرغ به ترتیب دارای بیشترین و کمترین فراوانی از نوکلئوتیدهای آدنین و تیمین بودند. همچنین انسان و مرغ به ترتیب کمترین و بیشترین فراوانی از نوکلئوتیدهای سیتوزین و گوانین ژن *CAPN2* را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). بالا بودن نرخ جایگزینی آدنین و تیمین با بازهای دیگر در مرغ شاید موجب متمایز بودن نرخ تغییر تنوع ژنتیکی این ژن در این گونه شده و یکی از دلایل بالا بودن نرخ جهش در جایگاه مذکور باشد. در کل دو نوع جایگزینی نوکلئوتیدی وجود دارد: جایگزینی نوع اول، که در آن نوکلئوتیدهای پورینی با یکدیگر و نوکلئوتیدهای پیریمیدینی جایگزین

^۱ Neighbor-Joining

^۲ Bootstrap

یکدیگر می‌شوند. جایگزینی نوع دوم که در آن نوکلئوتیدهای پورینی جایگزین نوکلئوتیدهای پیریمیدینی می‌شوند و برعکس. نتایج حاصل حاکی از این است که جانشینی نوع اول در همه گونه‌ها بیشتر بوده است. در بلدرچین ژاپنی مقدار جایگزینی نوکلئوتیدهای پورینی گوانین به آدنین ۹/۷۶ درصد و آدنین به گوانین ۱۱/۴۳ درصد بود و این مقدار برای جایگزینی نوکلئوتیدهای پیریمیدینی سیتوزین به تیمین ۱۶/۰۳ درصد و تیمین به سیتوزین ۱۳/۲۶ درصد بود. درصد جایگزینی نوکلئوتیدهای پیریمیدینی در سایر گونه‌ها بیشتر بود. در بررسی جانشینی نوکلئوتیدی در بلدرچین و همچنین سایر گونه‌ها مشخص شد که برای ژن‌های مورد بررسی، درصد جهش‌های انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) بیشتر از جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) بود. با این حال، درصد جایگزینی بازهای پورینی به همدیگر در بلدرچین ژاپنی در مقایسه با سایر گونه‌ها بیشتر بود.

میزان جانشینی‌های نوکلئوتیدی در بلدرچین ژاپنی برای ژن *CAPN3* برای نوکلئوتیدهای پورینی گوانین به آدنین ۱۸/۷۴ درصد و آدنین به گوانین ۱۳/۴۲ درصد بود؛ در حالیکه این مقدار برای تبدیل باز پیریمیدینی سیتوزین به تیمین ۱۴/۹۳ درصد و تیمین به سیتوزین ۱۱/۵۲ درصد بود. الگوی جایگزینی در ژن *CAPN2* مشابه ژن *CAPN3* بود (جدول ۴). به دلیل این که تعداد جایگاه‌های چندشکلی وابسته به تعداد نمونه می‌باشد، لذا از فراسنجه دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید استفاده شد که بطول *DNA* و اندازه نمونه بستگی ندارد (Nei and kumar, 2000). در بررسی شاخص‌های ژنتیکی در بلدرچین ژاپنی برای ژن *CAPN3*، تعداد کل جهش‌ها ۱۳ برآورد شد که توزیع آن در طول ژنوم متفاوت بود. همچنین تعداد هاپلوتایپ و تنوع نوکلئوتیدی در بلدرچین ژاپنی برای ژن *CAPN3* به ترتیب ۳ و ۰/۳۲۷۸ برآورد شد.

جدول ۳- فراوانی نوکلئوتیدهای ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* در سایر گونه‌ها

Table 3- Nucleotides frequency of *CAPN3* and *CAPN2* Genes in other species

Gene	Species	Number of samples	Nucleotide frequency (%)			
			A	T	C	G
CAPN2	Humped cattle	4	26.33	22.92	24.72	26.03
	European cattle	3	24.97	22.45	26.50	26.08
	Hen	4	23.31	18.83	26.58	28.28
	Human	3	30.37	28.98	20.12	20.53
	Sheep	3	27.53	21.15	21.58	74.24
	House mouse	3	26.91	21.78	24.07	24.27
CAPN3	Horse	5	25.87	21.63	25.63	26.81
	Goat	5	28.18	21.56	32.94	17.32
	Camel	5	24.74	22.96	26.76	25.54
	Bat	5	26.60	19.52	25.39	28.50
	Turkey	5	32.08	26.88	26.61	18.43
	Dog	5	25.41	21.53	25.98	27.08
	Humped cattle	4	27.03	23.43	25.38	24.17
	Fowl	4	31.33	21.84	22.56	24.28
	European cattle	4	24.81	22.61	26.20	26.38

جدول ۴- جانیشینی‌های نوکلئوتیدی در ژن *CAPN2* و *CAPN3* در بلدرچین ژاپنی و سایر گونه‌هاTable 4- Nucleotide substitutions in *CAPN2* and *CAPN3* genes in Japanese quail and other species

Gene	G	C	T	A	From/To
<i>CAPN3</i> gene in Japanese quail	13.42	4.38	5.68	-	A
	4.43	11.52	-	4.19	T
	4.43	-	14.93	4.19	C
	-	4.38	5.68	18.74	G
<i>CAPN2</i> gene in Japanese quail	17.25	5.07	4.97	-	A
	5.84	13.24	-	5	T
	5.84	-	12.97	5.00	C
	-	5.07	4.97	14.78	G
<i>CAPN3</i> gene in other species	15.36	5.08	5.08	-	A
	5.77	12.88	-	5.83	T
	5.77	-	11.94	5.83	C
	-	5.47	5.08	15.53	G
<i>CAPN2</i> gene in other species	11.43	5.46	6.83	-	A
	6.62	13.26	-	5.65	T
	6.26	-	16.03	5.65	C
	-	5.46	6.38	9.76	G

جدول ۵- شاخص‌های تنوع ژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* در بلدرچین ژاپنی و گونه‌های دیگرTable 5- Indices of genetic diversity of nucleotide sequence of *CAPN2* and *CAPN3* genes in Japanese quail and other species

Gene	Species	S	H	Hd	Pi	Eta
<i>CAPN3</i>	Japanese quail	13	3	0.556	0.32780	13
<i>CAPN2</i>	Japanese quail	236	3	1.000	0.59317	239
<i>CAPN2</i>	Humped cattle	144	2	0.228	0.04498	148
	European cattle	179	4	1.000	0.37865	188
	Fowl	271	3	0.833	0.38115	272
	Human	490	2	0.667	0.36787	490
	Sheep	471	2	0.667	0.38765	471
	Home mouse	150	3	1.000	0.04014	153
<i>CAPN3</i>	Dog	162	2	0.400	0.03229	162
	Fowl	41	3	0.833	0.01051	41
	Horse	9	4	0.900	0.00182	10
	Camel	4	3	0.700	0.00064	4
	Bat	222	3	0.700	0.04768	225
	Turkey	133	4	0.900	0.25920	135
	Goat	185	3	1.000	0.39821	185
	European cattle	4	4	0.400	0.00060	4
Humped cattle	92	4	1.000	0.9795	104	

S تعداد جایگاه چندشکلی، H: تعداد هاپلوتایپ‌ها، Pi: تنوع نوکلئوتیدی، Eta: تعداد کل جهش، Hd، هتروزیگوستی

برای ناحیه ژنی *CAPN2* نتایج به دست آمده حاکی از سطح بسیار بالای تنوع ژنتیکی و عدم وجود مناطق حفاظت شده در

بلدرچین ژاپنی حکایت داشت. در این گونه همچنین میزان جهش، چندشکلی و تنوع نوکلئوتیدی در ژن *CAPN2* بیشتر از ژن

CAPN3 بود. در بررسی جانیشینی نوکلئوتیدی در ژن *CAPN2* و *CAPN3* در سایر گونه‌ها نیز (به جز اسب، شتر و گاو اروپایی)

به دلیل پایین بودن مجموع سیتوزین و گوانین میزان بالایی از جهش مشاهده شد که در بررسی شاخص‌های ژنتیکی آن‌ها بدان تأکید شد. با بالا بودن میزان سیتوزین و گوانین به دلیل داشتن پیوند هیدرژنی بیشتر، تا حدی از جهش کاسته می‌شود (جدول ۵). برای ژن *CAPN3* در بین گونه‌های مورد بررسی، اسب، گاو اروپایی و شتر دارای کمترین جهش کل و جایگاه چندشکلی بودند، در حالی که خفاش دارای بیشترین آماره از این شاخص‌ها بود (جدول ۵). همچنین، برای ژن *CAPN3* در بین گونه‌ها، سگ کمترین تعداد هاپلوتایپ را به خود اختصاص داد. در بین گونه‌های مورد بررسی برای ژن *CAPN2*، انسان و موش دارای بیشترین چندشکلی و گاو اروپایی دارای بیشترین هاپلوتایپ بود.

جدول ۶- مناطق حفاظت شده ژن *CAPN2* و *CAPN3* در بلدرچین ژاپنی و سایر گونه‌ها
Table 6- *CAPN3* and *CAPN2* gene conservation regions in Japanese quail and other species

Gene	Population	C	MWL	CT
<i>CAPN3</i>	Japanese quail	0.262	59	0.29
	Goat	0.738	70	0.83
	Horse	0.997	908	1
	Camel	0.999	1705	1
	Turkey	0.804	58	0.99
	Bat	0.965	77	0.90
	Fowl	0.985	191	1
	European cattle	0.999	1786	1
	Humped cattle	0.738	70	0.83
	Dog	0.831	52	0.93
	<i>CAPN2</i>	Japanese quail	0.191	70
Fowl		0.408	80	0.50
Sheep		0.776	61	0.87
Human		0.850	40	0.95
European cattle		0.425	87	0.52
Humped cattle		0.768	25	0.50
Home mouse		0.949	58	1

C: حفاظت توالی، MWL: کمینه طول حفاظت، CT: حد آستانه حفاظت.

برای مناطق حفاظت شده ژن *CAPN3* در بلدرچین ژاپنی، حد آستانه حفاظت برابر با ۰/۲۹ و کمینه طول حفاظت آن‌ها ۵۹ باز بود (جدول ۶). نواحی حفاظت شده که دارای کمترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی هستند، تنها بخشی از توالی این ژن (*CAPN3*) را به خود اختصاص دادند. در بلدرچین ژاپنی نواحی حفاظت شده در ژن *CAPN2* از نواحی حفاظت شده در ژن *CAPN3* بیشتر بود (جدول ۶). نتایج این پژوهش نشان داد که برای ژن *CAPN3*، مقادیر آزمون تکاملی در گونه‌های مرغ، گاو کوهان دار، اسب، بوقلمون، خفاش و گاو اروپایی منفی و معنی دار بود ($P < 0.05$). نتایج آزمون تکامل خنثی (D) برای ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3* در همه گونه‌های مورد بحث مثبت و بیشتر از یک برآورد شد که نشان دهنده انتخاب مثبت برای این ژن‌ها

در همه گونه‌های مورد بررسی می‌باشد (جدول ۷). زمانی که ژن‌ها تحت فشار انتخاب مثبت قرار گیرند، عملکردهای متفاوتی پیدا خواهند کرد. فشار انتخابی مثبت منجر به بروز کنش‌های متفاوت در آنزیم‌ها شده یا باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. انتخاب مثبت ژن‌ها همچنین امکان افزایش بیان ژن در بافت‌ها در زمان رشد و نمو را فراهم می‌آورد. آزمون‌های تکامل خنثی شامل آزمون تکاملی D به منظور، شناسایی هرگونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر ژن‌ها محاسبه می‌شوند. جمعیت‌هایی که اخیراً دچار گسترش و یا افزایش معنی‌دار در اندازه جمعیت مؤثر شده باشند و یا انتخاب جهت‌دار بر روی آنها عمل کرده باشد، مقادیر D منفی و معنی‌دار تولید می‌کنند، در حالی که مقادیر مثبت و معنی‌دار D نشان‌دهنده اثرات مربوط به رانش ژنتیکی، تنگنای ژنتیکی و یا اثر متعادل‌کننده در طول تاریخ تکاملی جمعیت است. آزمون تکاملی D برای بررسی فشار انتخاب بر روی ژن‌ها به کار برده می‌شود. این آزمون تفاوت بین توالی‌هایی را مشخص می‌سازد که به کمک فرآیند تصادفی و یا غیرتصادفی تکامل یافته‌اند. هدف آزمون تکاملی D، شناسایی توالی‌هایی است که تحت تئوری خنثی بوده تکامل می‌یابند و تعادلی بین جهش و رانش ژنتیکی در آن جمعیت وجود داشته باشد. زمانی که در آزمون تکاملی D مثبت و معنی‌دار باشد، حاکی از آن است که انتخاب متعادل رخ داده است و آلل نادر با فراوانی کم در توالی‌های مربوطه وجود داشته است. نتیجه این آزمون برای هر دو ژن در بلدرچین ژاپنی، مثبت برآورد شد که مقادیر مثبت و معنی‌دار آزمون تکاملی D نشان‌دهنده اثرات مربوط به رانش ژنتیکی، تنگنای ژنتیکی و یا اثر متعادل‌کننده در طول تاریخ تکاملی جمعیت است (جدول ۷). در جدول ۷ مشخص است که در پژوهش حاضر مقادیر آزمون تکاملی D، مثبت بدست آمده‌اند. مقدار مثبت آزمون تکاملی D معمولاً با انتخاب ژنتیکی مثبت مرتبط است، در حالی که مقدار D منفی تاجیما با انتخاب منفی یا تصفیه‌کننده مرتبط است. وقتی آزمون تکاملی D مثبت باشد، پیامدهای زیر را در انتخاب ژنتیکی مثبت نشان می‌دهد. انتخاب متعادل^۱: مقادیر مثبت آزمون تکاملی D می‌تواند نشان‌دهنده تعادل انتخاب باشد. انتخاب متعادل زمانی اتفاق می‌افتد که چندین آلل در یک جمعیت در طول زمان حفظ شوند، که اغلب به دلیل مزیت هتروزیگوت یا انتخاب وابسته به فراوانی است. این منجر به بیش از حد انواع فراوانی متوسط در مقایسه با آنچه که در تکامل خنثی انتظار می‌رود، منجر می‌شود و در نتیجه مقدار D تاجیما مثبت است؛ انتخاب فوق‌غالبیت^۲: انتخاب فوق‌غالبیت که به عنوان مزیت هتروزیگوت یا انتخاب متعادل نیز شناخته می‌شود، می‌تواند به مقدار مثبت آزمون تکاملی D منجر شود. در این حالت، افراد هتروزیگوت برای یک مکان ژنتیکی خاص در مقایسه با افراد هموزیگوت برای هر یک از آلل‌ها، برآزش بالاتری دارند. این مزیت با حمایت از بقا و تولیدمثل هتروزیگوت‌ها، تنوع ژنتیکی را حفظ می‌کند و در نتیجه مقدار آزمون تکاملی D مثبت است؛ انتخاب درهم‌گسیخته^۳: مقادیر مثبت آزمون تکاملی D را می‌توان در موارد انتخاب درهم‌گسیخته یا جهت‌دار نیز مشاهده کرد. انتخاب درهم‌گسیخته زمانی اتفاق می‌افتد که آلل‌های مختلف در محیط‌های مختلف یا تحت فشارهای انتخابی

^۱ Balancing selection^۲ Overdominant selection^۳ Diversifying selection

متفاوت مورد انتخاب قرار گیرند. این فرآیند می‌تواند منجر به افزایش انواع نادر و افزایش کلی تنوع ژنتیکی شود که در نتیجه مقدار مثبت آزمون تکاملی D است؛ اختلاط جمعیت^۱: مقادیر مثبت آزمون تکاملی D ممکن است به دلیل اختلاط جمعیت ایجاد شود، جایی که جمعیت‌های ژنتیکی متمایز با هم ادغام می‌شوند و منجر به افزایش تنوع ژنتیکی می‌شود. انتخاب مختلط می‌تواند گونه‌های ژنتیکی جدیدی را معرفی کند و فراوانی آلل‌های نادر را افزایش دهد و در نتیجه مقدار آزمون تکاملی D مثبت شود؛ انتخاب گسترش دهنده جمعیت^۲: اگر جمعیتی اخیراً تحت یک گسترش سریع همراه با انتخاب مثبت قرار گرفته باشد، می‌تواند به مقدار مثبت آزمون تکاملی D منجر شود. در طول گسترش، جهش‌های جدید ایجاد می‌شوند و گسترش می‌یابند، و اگر برخی از این جهش‌ها به طور مثبت انتخاب شوند، می‌توانند به افزونی واریانت‌های با فراوانی متوسط و افزایش کلی تنوع ژنتیکی منجر شوند. در این پژوهش دقیقاً مشخص نیست که کدام از این تفسیرها روی داده‌های مورد بررسی در طول دوره تکامل قابل نقد و بررسی است. مهم است که مقادیر آزمون تکاملی D را در ارتباط با سایر تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی جمعیت تفسیر کنیم و عوامل جمعیت‌شناختی و انتخابی خاص را در نظر بگیریم تا درک جامعی از فرآیندهای تکاملی تأثیرگذار بر جمعیت به دست آوریم.

در جدول ۷ مشخص است که آماره‌های تکاملی D و dN/dS بزرگ‌تر از ۱ بدست آمده‌اند. این نشان می‌دهد که داده‌های توالی DNA مورد بررسی، تحت انتخاب مثبت در حال تکامل است. این بدان معناست که جهش‌های ناهمسان که توالی اسید آمینه پروتئین را تغییر می‌دهند با سرعت بیشتری نسبت به جهش‌های مترادف که توالی اسید آمینه را تغییر نمی‌دهند، در جمعیت پذیرفته و ثابت می‌شوند. این پژوهش می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که جمعیت مورد بررسی در حال سازگاری با یک محیط جدید یا مزیت انتخابی برای داشتن جهش‌های خاص است. با این حال، توجه به این نکته مهم است که تفسیر نتایج آزمون‌های تکاملی D و dN/dS باید در چارچوب طرح مطالعه، حجم نمونه و سایر عوامل مرتبط انجام شود.

جدول ۷- نتایج حاصل از آزمون Tajima's D برای ژن $CAPN3$ و $CAPN2$ و تعیین روند انتخاب طبیعی این ژن‌ها در

بلدرچین ژاپنی در مقایسه با سایر گونه‌ها

Table 7- Results of Tajima's D test for $CAPN3$ and $CAPN2$ genes and determination of natural selection process of these genes in Japanese quail compared to other species

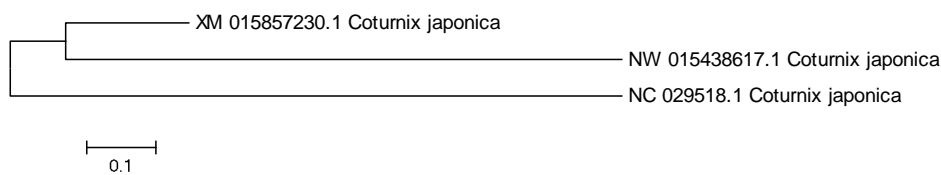
*dN/dS	dN	dS	D	Gene
1.02	3.8451	3.7349	0.527892	CAPN3
1.17	3.9460	3.3442	0.31900	CAPN2

روش‌های مختلف روی داده‌های مشابه ممکن است که جواب‌های متفاوتی را ارائه نمایند. این می‌تواند به دلیل ساختار الگوریتمی یا رویه‌ایی باشد که در روش‌های مختلف به کار رفته است. این روش‌ها همچنین بر اساس نوع داده و فرض‌های زیستی مورد بررسی در گروه‌های مختلف گروه بندی شده‌اند. در این پژوهش سعی شد که فهرستی از این روال یا نرم‌افزارها جمع آوری

^۱ Population admixture

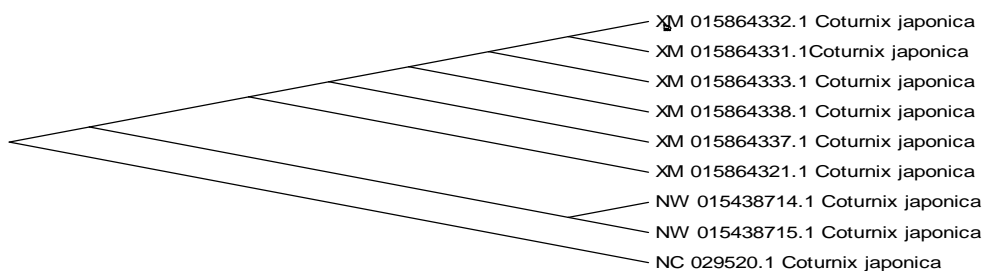
^۲ Population expansion with selection

شود. جداول ۱ و ۲ پیوست روال‌ها و الگوریتم‌های مختلف را نشان می‌دهد. نگاهی به این جداول نشان می‌دهد که نوع فرض مورد بررسی در یک پژوهش روال رایانشی خاصی را شامل می‌شود. بنابراین صرف داشتن و داده نوکلئوتیدی و نرم‌افزار، مفید به فایده نیست وقتی پژوهشگر آگاه نباشد که دنبال چه پدیده ژنتیکی باید بگردد. در این پژوهش، فرض شد که داده‌های نوکلئوتیدی مورد استفاده در تعادل رانش ژنتیکی و جهش می‌باشند. این یکی از مفروضات مهم آزمون تکاملی D است. درخت تبارزایی^۱ بیان کننده روابط تکاملی میان گروهی از خصوصیات توالی‌های همولوگ است. انتخاب و بررسی توالی‌های همولوگ به ما نشان می‌دهد که در بسیاری از موارد، هموپلازی باعث به وجود آمدن صفات مشابه بدون جد مشترک شده است که عوامل محیطی عامل اصلی به وجود آمدن آنها هستند (Hall, 2003). تجزیه و تحلیل‌های درخت تبارزایی تخمینی هستند از این که چگونه اعضای یک خانواده می‌توانند در طی علم تکامل از هم اشتقاق پیدا کنند. این روابط به وسیله بررسی جهش‌های جایگزینی، حذف، ازدیاد توأم با بازآرایی‌های مجدد تعیین می‌شوند که سپس در معرض انتخاب طبیعی قرار می‌گیرند (Claverie and Notredame, 2006). نتایج ترسیم درخت تبارزایی نشان داد که ۹ توالی برگرفته از بانک جهانی ژنی مربوط به بلدرچین ژاپنی، به دو شاخه مجزا تقسیم شدند که ۸ عدد از توالی‌ها دارای سر منشا مشترک بوده و فقط یکی از آن‌ها در گروه مجزایی قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- درخت تبارزایی ژن *CAPN2* در بلدرچین ژاپنی بر اساس روش NJ (۰/۰۱ نرخ جایگزینی نوکلئوتیدها در هر جایگاه)

Figure 1- Phylogenetic tree of *CAPN2* gene in Japanese quail based on NJ method (nucleotide replacement rate per site equal to 0.01)



شکل ۲- درخت تبارزایی ژن *CAPN3* در بلدرچین ژاپنی بر اساس روش NJ (۰/۰۱ نرخ جایگزینی نوکلئوتیدها در هر جایگاه)

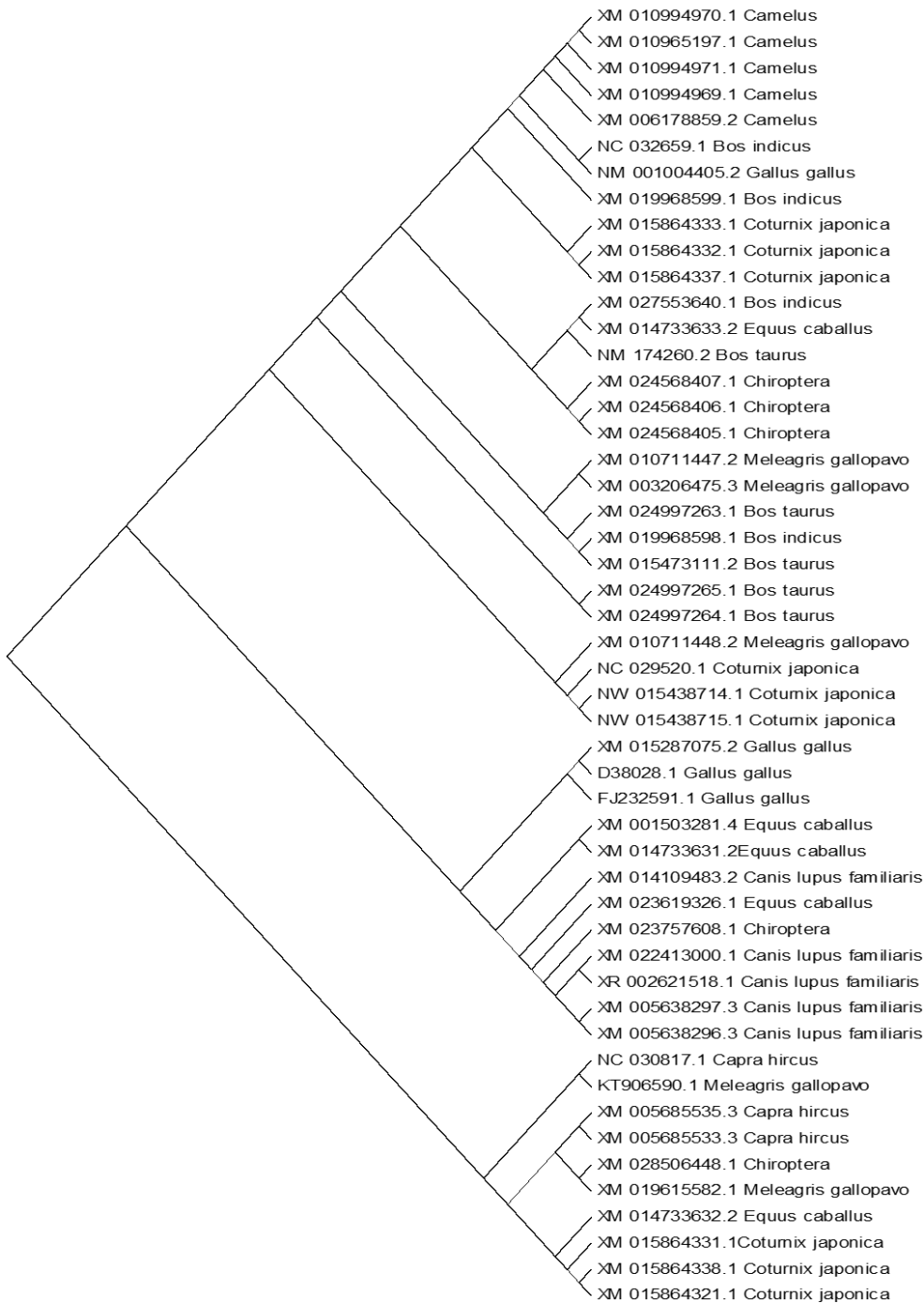
Figure 2- Phylogenetic tree of *CAPN3* gene in Japanese quail based on NJ method (nucleotide replacement rate per site equal to 0.01)

^۱ Phylogenetic tree

در پژوهش‌های تکاملی، طبقه‌بندی بر اساس تعیین روابط تبارزایی صورت می‌گیرد (Mayr and Bock, 2002). وجود تعداد بیشتر شاخه‌های درخت نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالاست. تنوع ژنتیکی نزدیک بیان‌گر منشأ مشترک، وجود جریان ژنی و یا شرایط زیست‌گاهی مشابه در بین جمعیت‌ها می‌باشد. درخت ترسیم شده برای گونه‌های مختلف دارای شاخه‌های متعددی بود که هر گونه تقریباً در شاخه‌ی مجزایی قرار گرفت. در درخت تبارزایی ترسیم شده برای ژن *CAPN3* چند توالی خفاش با بوقلمون و توالی‌هایی از سگ با اسب و بز در شاخه یکسانی قرار گرفت (شکل ۳). معمولاً، اولین مرحله در آنالیز توالی‌های هم‌ردیف شده‌ی نوکلئوتیدی یا آمینواسیدی، محاسبه‌ی فاصله ژنتیکی (فاصله تکاملی) میان توالی‌ها است، زیرا نیروهای متعدد تکاملی بر روی توالی‌های DNA عمل می‌کنند و در نتیجه، توالی ظرف مدتی دگرگون می‌شود. بنابراین، هر دو توالی که به طور مستقل از یک جد مشترک تکامل می‌یابند، سرانجام از یکدیگر دور می‌شوند. اندازه‌ی این واگرایی، فاصله‌ی ژنتیکی نامیده می‌شود (Huson and Steel, 2004) که با استفاده از ترسیم فاصله ژنتیکی، محاسبه ضریب تشابه بین نمونه‌ها و نسبت تفاوت‌های نوکلئوتیدی بین هر جفت توالی قابل برآورد است (Nassaj Hoseini and Shamsbakhsh, 2010). در این ارتباط روش‌های ML و NJ انعطاف‌پذیری و عملکرد بهتری دارند (Huson and Steel, 2004). اگر در جایگزینی، یک پورین به یک پیریمیدین یا برعکس تغییر کند ($G \leftrightarrow T, C \leftrightarrow G, A \leftrightarrow T, A \leftrightarrow C$)، جهش تقاطعی^۱ نامیده می‌شود؛ سایر جایگزینی‌ها که میان نوکلئوتیدهای دارای ساختار مشابه رخ می‌دهد، جهش انتقالی^۲ نام دارد. با این که احتمال رخ دادن تقاطعی دو برابر انتقالی است، ولی معمولاً انتقالی دو برابر نسبت به تقاطعی بیشتر دیده می‌شود. این تمایل به انتقالی را می‌توان به طور واضح در برخی مولکول‌ها به ویژه DNA میتوکندریایی مشخص کرد. این گرایش به انتقالی به این علت است که جهش نوکلئوتید مشابه، نسبت به نوکلئوتید نامشابه پایدارتر است. در هر حال، بیشتر زمان‌هایی که جایگزینی تقاطعی رخ می‌دهد به دگرگونی پروتئین رمز شده می‌انجامد. تشخیص میان جایگزینی‌های جهش انتقالی در پورین یا پیریمیدین‌ها امکان‌پذیر است: جهش انتقالی در پورین ($A \leftrightarrow G$) با TSR نمایش داده شده و در پیریمیدین ($C \leftrightarrow T$) به صورت TSY نشان داده می‌شود (Nassaj Hoseini and Shamsbakhsh, 2010). همچنین، از روش حداکثر درست‌نمایی برای به دست آوردن میزان جانشینی به جایگزینی نوکلئوتیدها در بازهای پورینی و پیریمیدینی استفاده می‌شود.

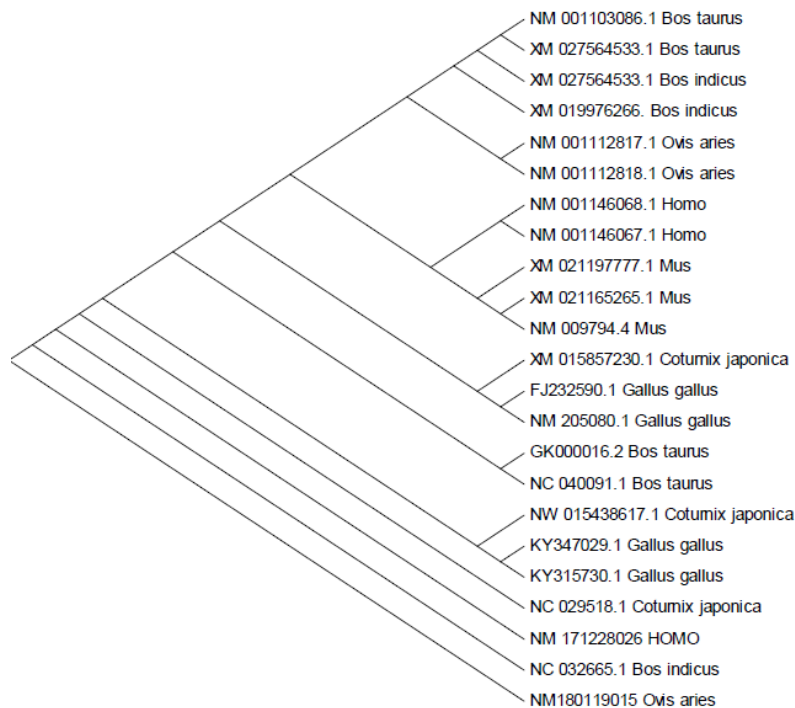
^۱ Transversion

^۲ Transition



شکل ۳- درخت تبارزایی مربوط به ژن CAPN3 در سایر گونه‌ها

Figure 3- Phylogenetic tree for CAPN3 gene in other speices



شکل ۴- درخت تبارزایی مربوط به ژن *CAPN2* در سایر گونه‌های حیوانی
 Figure 4- Phylogenetic tree for *CAPN2* gene in other animal species

بررسی تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N) نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدهای آمینه حاصله نداشته‌اند (d_S)، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد. تعداد جهش‌یافته‌ها در یک جمعیت با جهش‌های ایجاد شده در ژنوم افراد ایجاد می‌شود. جهش ممکن است از نوع جایگزینی، حذف و اضافه باشد. میان جهش‌ها، جهش‌های جایگزینی از فراوان‌ترین و مهم‌ترین عوامل ایجاد افراد جهش یافته محسوب می‌شوند. هنگامی که جهش‌های جایگزینی زیاد شوند، فراوانی نسبی آن‌ها در جمعیت و در طول نسل‌های بعدی دگرگون می‌شود. جایگزینی نوکلئوتیدها با نرخ تجمع می‌یابد که اصولاً با رانش ژنتیکی تصادفی و انتخاب طبیعی تعیین می‌شود. به طور کلی، اگر سازگاری نسبی یک جهش یافته‌ی خاص مشابه متوسط جمعیت باشد، انتظار این است که نرخ جایگزینی نوکلئوتیدی مشابه نرخ جهش خنثی باشد. با این حال، اگر سازگاری جهش یافته‌ی خاص بیشتر و کمتر از متوسط جمعیت باشد، انتظار بر این است که نرخ جایگزینی نوکلئوتیدی هم به ترتیب بیشتر و کمتر از نرخ جهش خنثی باشد که در حالت اول ساز و کار تکاملی انتخاب مثبت و در حالت دوم انتخاب منفی نامیده می‌شود (Graur and Martin, 2004). به طور معمول در هر جدول کدونی برخی آمینواسیدها با بیش از یک کدون رمزگردانی می‌شوند. به علت این چندحالتی بودن، جایگزینی نوکلئوتیدی در نواحی کدکنده‌ی پروتئین به دو

دسته تقسیم می‌شود: جایگزینی همانام^۱ و غیرهمنام^۲. جایگزینی همانام، جایگزینی یک نوکلئوتید است که دگرگونی در رمز کردن پروتئین ایجاد نمی‌کند؛ یک جایگزینی غیرهمنام، جایگزینی یک نوکلئوتید است که آمینواسید رمز شده را عوض می‌کند. نرخ جایگزینی همانام (Γ_S) ممکن است بیشتر یا کمتر از جهش خنثی (Γ_N) باشد، در حالی که نرخ جایگزینی‌های غیرهمنام (Γ_N) ممکن است بسته به نوع و قدرت انتخاب طبیعی متفاوت باشد. اگر انتخاب منفی عمل کند، پس Γ_N کندتر از Γ_S خواهد بود. بنابراین، انتخاب طبیعی که در سطح توالی آمینواسیدی عمل می‌کند با مقایسه‌ی با Γ_S قابل ردیابی است. بزرگ‌تر بودن Γ_N از Γ_S ($\Gamma_N > \Gamma_S$) یک شاخصی برای انتخاب مثبت بوده و $\Gamma_N < \Gamma_S$ یک شاخص برای انتخاب منفی است. هر دو Γ_N و Γ_S با مقایسه دو توالی نوکلئوتیدی قابل محاسبه هستند. نخست، تعداد جایگزینی‌های همانام در هر موقعیت (d_S) و جایگزینی‌های غیرهمنام در هر موقعیت (d_N) میان دو توالی شمارش می‌شود و سپس d_N و d_S به دو برابر زمان انشعاب توالی‌ها تقسیم می‌شوند؛ یعنی: $d_N = d_N/2t$ و $d_S = d_S/2t$. با این حال، معمولاً t برای توالی‌های مورد نظر ناشناخته است. حتی در چنین شرایطی، انتخاب طبیعی را می‌توان با مقایسه‌ی d_N و d_S به جای Γ_N و Γ_S ردیابی کرد (Nassaj Hoseini and Shamsbakhsh, 2010). بیشتر بودن معنی‌دار d_N نسبت به d_S نشان‌دهنده‌ی انتخاب مثبت است، در حالی که عکس آن نشان‌دهنده‌ی انتخاب منفی است. آزمون LRT^۳ در روش مدل کدنی^۴ نیز می‌تواند برای تعیین خنثی بودن جایگزینی اسیدآمینه‌ای به کار رود که در آن یک الگوی تکاملی با یک محدودیت $\Gamma_N = \Gamma_S$ و با یک الگوی بدون چنین محدودیتی مقایسه می‌شود. موقعیت‌های مختلف اسید آمینه‌ای ممکن است عملکردهای متفاوتی در پروتئین داشته باشند؛ بنابراین، انتخاب طبیعی به طور یکسان روی همه‌ی موقعیت‌های اسید آمینه‌ای عمل نمی‌کند. ردیابی انتخاب طبیعی که تنها در نواحی محدودی از یک پروتئین عمل می‌کند، تنها با مقایسه‌ی d_N و d_S (هنگامی که آن‌ها به صورت متوسط تعداد در طول همه‌ی موقعیت‌های کدونی در یک ناحیه‌ی کدکننده‌ی پروتئین محاسبه می‌شوند) مشکل است. آنالیز پنجره‌ای برای ردیابی انتخاب طبیعی عمل‌کننده روی یک ناحیه‌ی محدود از پروتئین به کار می‌رود (Graur and Martin, 2004). آنالیز پنجره‌ای با تنظیم محدوده‌ای از موقعیت‌های کدونی پیاپی در انتهای 5' از یک هم‌ردیفی دو توالی کدکننده‌ی پروتئین مورد نظر شروع می‌شود. این محدوده (پنجره) در هر مرحله، یک موقعیت کدونی در طول هم‌ردیفی به سمت 3' حرکت می‌کند. در هر مرحله، d_S و d_N درون پنجره و در دو بعد محاسبه می‌شود که در طول نشان‌دهنده‌ی موقعیت کدونی و در عرض نشان‌دهنده‌ی هر دو d_N و d_S به طور جداگانه است. هر چند هیچ آزمون آماری برای آزمودن تفاوت میان d_N و d_S درون پنجره توسعه نیافته

^۱ Synonymous

^۲ Non-synonymous

^۳ Likelihood-ratio test

^۴ Codon model

است، ولی این روش می‌تواند درباره‌ی انتخاب طبیعی عمل‌کننده روی پروتئین آگاهی نسبی به ما دهد (Nassaj & Hoseini and Shamsbakhsh, 2010).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که همه گونه‌های مورد پژوهش در ناحیه *CAPN3* دارای جهش و تفاوت‌های نوکلوتیدی می‌باشند. بلدرچین دارای ۱۳ جایگاه چندشکلی بود. در بین گونه‌های مورد بررسی در مقایسه با بلدرچین ژاپنی، بز دارای بیشترین جایگاه چند شکلی و گاو اروپایی دارای کمترین جایگاه چند شکلی بود. در بررسی مناطق حفاظت شده *CAPN3* در سایر گونه‌ها مشخص شد که گاو اروپایی بیشترین و بز کمترین جفت‌باز حفاظت شده و حفاظت طول توالی را به خود اختصاص داد. در این پژوهش برای رسم درخت تبارزایی بین گونه‌های مختلف، از داده‌های توالی ژنی (ژن‌های *CAPN2* و *CAPN3*) مستخرج از NCBI استفاده شد؛ درخت تبارزایی ترسیم شده دارای شاخه‌های متعددی بود و هر گونه تقریباً در شاخه‌های مجزایی قرار می‌گرفت. با توجه به توالی‌ها خفاش با بوقلمون و سگ با اسب و بز دارای شاخه یکسانی بودند. مقدار عددی نسبت dN/dS برای بلدرچین ژاپنی کمتر از یک برآورد شد که می‌تواند نشان‌دهنده انتخاب خالص بر روی این ژن در طول تکامل باشد. مقدار عددی نسبت dN/dS برای سایر گونه‌ها بیشتر از یک برآورد شد که نشان‌دهنده انتخاب مثبت این ژن در سایر گونه‌ها می‌باشد. در تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی در ژن *CAPN3* در بلدرچین ژاپنی، بیشترین فراوانی مربوط به باز آدنین و کمترین فراوانی مربوط به باز سیتوزین بود. در بررسی فراوانی نوکلئوتیدی در سایر گونه‌ها، بیشترین و کمترین فراوانی باز آدنین به ترتیب مربوط به خفاش و شتر بود؛ در باز تیمین نیز بیشترین و کمترین فراوانی به ترتیب مربوط به بوقلمون و خفاش بود. بیشترین فراوانی بازهای سیتوزین و گوانین در بز و بوقلمون و کمترین فراوانی این بازها در مرغ و بز بود. میزان چندشکلی‌ها و جهش‌ها در ژن *CAPN2* در مقایسه با ژن *CAPN3* بیشتر برآورد شد.

منابع

- Beltrán, J.A., Jaime, I., Santolaria, P., Sanudo, C., Alberti, P. & Roncalés, P. (1997). Effect of stress-induced high post-mortem pH on protease activity and tenderness of beef. *Meat Science* 45(2): 201-207.
- Brookes, A.J. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186.
- Claverie, J. M., & Notredame, C. (2006). *Bioinformatics for dummies*. John Wiley & Sons.
- Goldberg, A. L., Akopian, T.N., Kisselev, A. F., Lee, D. H. & Rohrwild, M. (1997). New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. *Journal of Biological Chemistry* 378: 131-140.
- Goll, D. E., Kleese, W. C. & Szpacenko, A. (1989). Skeletal muscle proteases and protein turnover. In *Animal growth regulation* (pp. 141-183). Springer, Boston, MA.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. E. I. & Cong, J. (2003). The calpain system.

Physiological Reviews 83: 731-801.

Graur, D. & Martin, W. (2004). Reading the entrails of chickens: molecular timescales of evolution and the illusion of precision. *Trend in Genetics* 20: 80-86.

Hall, B.K. (2003). Descent with modification: the unity underlying homology and homoplasy as seen through an analysis of development and evolution. *Biological Reviews* 78(3): 409-433.

Huson, D.H. & Steel, M. (2004). Phylogenetic trees based on gene content. *Bioinformatics* 20: 2044-2049.

Işık, R. (2019). The Identification of Novel Single Nucleotide Polymorphisms in Calpain 1 (CAPN1) Gene of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Hayvansal Üretim* 60: 25-29.

Johari, S., Maeda, Y., Okamoto, S. & Hashiguchi, T. (1993). Comparison of calpain and calpastatin activities in skeletal muscle of broiler and layer chickens. *British Poultry Science* 34(4): 819-824.

Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* 5: 150-163.

Maeda, Y., Okamoto, S., Okano, K., Tomita, T. & Hashiguchi, T. (1990). The comparison of muscle protein turnover rate among the egg type, meat type and Japanese native chicken stocks. *Japanese Journal of Zootechnical Science* 61: 701-706.

Maeda, Y. (1991). Genetical studies on muscle protein turnover rate and calcium activated neutral protease activity in the skeletal muscle of the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Animal Science and Technology* 62: 813-821.

Mayr, E., & Bock, W. J. (2002). Classifications and other ordering systems. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 40(4), 169-194.

Nassaj Hoseini, M. & Shamsbakhsh, M. (2010) Phylogenetic analysis methods. Haghshenass publication, Rasht, pp, 5.

Nei, M. & Kumar, S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford university press. USA.

Okumura, F., Shimogiri, T., Shinbo, Y., Yoshizawa, K., Kawabe, K., Mannen, H., Okamoto, S., Cheng, H.H. & Maeda, Y. (2005). Linkage mapping of four chicken calpain genes. *Journal of Animal Science* 76: 121-127.

Okumura, F., Shimogiri, T., Kawabe, K. & Okamoto, S. (2006). Gene constitution of South-East Asian native chickens, commercial chickens and Jungle fowl using polymorphisms of four calpain genes. *Animal Science* 77: 188-195.

Page, B. T., Casas, E., Quaas, R. L., Thallman, R. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., White, S. N., Bennett, G. L., Keele, J. W. & Dikeman, M. E. (2004). Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *Journal of Animal Science* 82: 3474-3481.

Palmer, B. R., Robert, N. & Kent, M. P. (1999). A candidate gene approach to animal quality traits. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 57: 294-296.

Poussard, S., Duvert, M., Balcerzak, D. & Ramassamy, S. (1996). Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity. *Cell Growth and Differentiation* 7: 1461-1469.

Rasouli, Z., Zerehdaran, S., Azari, M.A. & Shargh, M.S. (2013). Genetic polymorphism of the CAPN1 gene is associated with meat quality traits in Japanese quail. *British Poultry Science* 54: 171-175.

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

Solé, M., Negro, S., Membrillo, A., Peña, F., Domenech, V., Verona, J.C., Rubí, M., Valera, M. & Molina, A. (2016). Association analysis of g. 68G→ A SNP in CAPN1 gene with carcass and meat quality traits in goose raised in organic dehesa. *Archives Animal Breeding* 59(4): 423-428.

Sorimachi, H. & Suzuki, K. (2001). The structure of calpain. *The Journal of Biochemistry* 129: 653-664.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Tamura, M.N., Yamashita, J., Fuse, S. & Haraguchi, M. (2004). Molecular phylogeny of monocotyledons inferred from combined analysis of plastid matK and rbcL gene sequences. *Journal of Plant Research* 117: 109-120.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

White, S.N., Casas, E., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., Chase Jr, C.C., Johnson, D.D., Keele, J.D., & Smith, T.P.L. (2005). A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal of Animal Science* 83: 2001-2008.

Zhang, Z.R., Liu, Y.P., Jiang, X., Du, H.R. & Zhu, Q. (2008). Study on association of single nucleotide polymorphism of CAPN1 gene with muscle fibre and carcass traits in quality chicken populations. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 125: 258-264.

Zhang, Z.R., Liu, Y.P., Yao, Y.G., Jiang, X.S., Du, H.R. & Zhu, Q. (2009). Identification and association of the single nucleotide polymorphisms in calpain3 (CAPN3) gene with carcass traits in chickens. *BMC genetics* 10: 1-7.