

شناسایی واریانتهای ژنتیکی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن *MAP4K4* و ارتباط آنها با صفات کیفی شیر در

گاوهای شیری

شماره صفحات

۲۴-۰۵

احمد رضا جهانتیغ^۱، غلامرضا داشاب^۲، محمد رکوعی^۳ و هادی فرجی آروق^۴^۱، ^۲ و ^۳ گروه علوم دامی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.^۴ استادیار ژنتیک و اصلاح دام، پژوهشگاه زابل، پژوهشکده دامهای خاص، زابل، ایران.نویسنده مسئول: dashab@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۲

چکیده

آگاهی از ساختار و نحوه عملکرد ژن‌ها در گاو می‌تواند ما را در تغییر صفات مطلوب شیر کمک نماید. در این تحقیق واریانتهای ژنتیکی اگزون سوم ژن *MAP4K4* و رابطه آن با صفات کیفی شیر در گاوهای سیستانی، هلستاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های خون از ورید گردنی و شیر در طی یک دوره سه ماهه از ۲۷ رأس گاو (سیستانی ۱۰ رأس، هلستاین ۱۰ رأس و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال ۷ رأس) جمع‌آوری و ترکیبات شیر شامل درصد چربی، پروتئین، لاکتوز و ماده خشک بدون چربی اندازه‌گیری شدند. استخراج DNA به روش نمکی-بهینه‌یافته انجام شد. قطعه ۴۵۷ جفت بازی از اگزون سوم جایگاه ژن *MAP4K4* با یک جفت پرایمر اختصاصی تکثیر و با استفاده از روش سانگر توالی‌یابی شدند. برای شناسایی نواحی چندشکلی و محاسبه ساختارهای ژنتیکی جوامع، از نرم‌افزارهای *MEGA11* و *Dnasp5* استفاده شد و در نهایت ارتباط نواحی چندشکلی با صفات کیفی شیر از مدل تابعیت چندگانه و رویه *GLM* نرم‌افزار *SAS* نسخه ۹/۴ استفاده گردید. نتایج تعداد هفت ناحیه چندشکلی در موقعیت‌های ۱۳، ۲۰، ۲۱، ۲۳، ۱۳۳، ۱۵۸ و ۲۱۸ نشان دادند. در میان این جایگاه چندشکلی، چهار مورد دو واریانتهی منحصربفرد و سه جایگاه دو واریانتهی پارسیمونی بودند. توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژن *MAP4K4* بر اساس کدهای ژنتیکی به توالی آمینواسیدی ترجمه شدند که منجر به تشکیل ۱۲۵ آمینواسید گردید. در بین ۱۲۵ آمینواسیدی، چهار ناحیه چندشکلی *SNP* و دو ناحیه حذف و اضافه (*Indel*) مشخص گردید. در تمام جمعیت‌ها به جز گاوهای هلستاین، جایگزینی انتقالی بیش از تقاطعی بود. بالاترین میزان واگرایی در درون نژادها و جمعیت‌ها مربوط نژاد سیستانی (۰/۰۰۲۴) بود، در جمعیت هلستاین برابر با صفر و در آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال برابر با ۰/۰۰۲۳ جفت باز محاسبه شد. از میزان واگرایی در بین نژادهای مختلف، بالاترین میزان واگرایی بین آمیخته‌ها با سیستانی (۰/۰۰۲۲) و کمترین بین هلستاین با سیستانی (۰/۰۰۰۶۳) بود. ارتباط بین واریانتهای ناحیه *SNP133* با درصد ماده خشک بدون چربی و حذف *Indel218* با درصد پروتئین شیر معنی‌دار بودند، لذا به عنوان نشانگر در انتخاب و ترکیب نژادها می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ترکیب شیر، توالی سانگر، فیلوژنی، گاو بومی، واگرایی.

مقدمه

یکی از چالش‌های عمده در صنعت پرورش گاوهای شیری پرتولید، بروز بیماری ورم پستان می‌باشد. این بیماری با شیوع بالا، یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش عملکرد اقتصادی گله‌ها به‌شمار می‌آید و به دو شکل بالینی و تحت بالینی مشاهده می‌شود. برآوردها نشان می‌دهد به ازای هر مورد بالینی در گله بین ۲۰ تا ۵۰ مورد تحت بالینی رخ می‌دهد که این وضعیت پیامدهای نامطلوبی بر باروری، تولید و کیفیت شیر دارد. پیشرفت ژنتیکی در به‌نژادی مقاومت به ورم پستان به‌دلیل وراثت‌پذیری پایین این بیماری و محدودیت رکوردهای فنوتیپی دقیق، بسیار کند بوده است. از این رو شاخص شمار سلول‌های بدنی که وراثت‌پذیری بالاتری دارد، به عنوان معیار غیرمستقیم و جایگزین مقاومت به بیماری ورم پستان در برنامه‌های اصلاح نژاد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Delpire, 2009). در سال‌های اخیر بهره‌گیری از ابزارهای ژنتیک مولکولی با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدا و واریانت‌های مؤثر بر مقاومت به بیماری ورم پستان مورد توجه قرار گرفته است. در این میان ژن MAP4K4 به عنوان یکی از ژن‌های کاندیدا مطرح شده است (Dror *et al.*, 2007). پروتئین MAP4K4 یکی از اعضای خانواده کینازهای فعال‌کننده مسیر MAP4K4 است که در تنظیم پاسخ‌های التهابی و متابولیسم نقش دارد (Zohn *et al.*, 2000). بسیاری از مطالعات نشان دادند این ژن از طریق مسیر سیگنالی NF-κB در فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی پیش‌التهابی در ماکروفاژها مشارکت می‌کند. بنابراین، تغییر در ساختار یا سطح بیان این ژن می‌تواند بر فرآیندهای التهابی غده پستانی و در نتیجه بر سلامت و ترکیب کیفی شیر اثرگذار باشد (Dror *et al.*, 2007; Karin and Greten, 2005). چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی ذاتی پستان به عنوان نشانگرهای ژنتیکی بالقوه، نقش مهمی در مقاومت و حساسیت به ورم پستان دارند (Chen *et al.*, 2011). ژن MAP4K4 یکی از اجزای کلیدی در آغاز پاسخ ایمنی ذاتی است (Dror *et al.*, 2007). این ژن همراه با ژن‌های IL17R و SOCS7 در مسیر سیگنال‌دهی NF-κB مشارکت دارد؛ مسیری که تنظیم بیان ژن‌های التهابی در ماکروفاژها را کنترل می‌کند (Dror *et al.*, 2007; Karin and Greten, 2005). نقش ژن MAP4K4 در هر دو شاخه سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی گزارش شده و مطالعات انسانی نشان داده است که تنوع ژنتیکی در این ژن می‌تواند حساسیت بدن به عفونت‌های باکتریایی را تغییر دهد (Bouzakri *et al.*, 2009). یافته‌های تحقیقات ژنومی نیز بیانگر آن است که چندشکلی‌های این ژن با شمار سلول‌های بدنی و در نتیجه مقاومت در برابر بیماری ورم پستان در ارتباط هستند (Dror *et al.*, 2007; Karin and Greten, 2005). از این رو غربالگری چندشکلی‌های کشف شده در جایگاه ژن مذکور در روشن شدن تأثیر آنها بر عملکرد سلول‌های ایمنی و انتخاب دام‌های مقاوم با استفاده از روش انتخاب به کمک نشانگرها (MAS) تسهیل خواهد کرد. مطالعات نشان داده است که گاوهای با ژنوتیپ‌های c.2061/G-TG و c.2061/G-GG به طور معنی‌داری شمار سلول‌های بدنی کمتری نسبت به ژنوتیپ TT داشتند. در حالیکه گاوهای با ژنوتیپ c.2196C/T-CC شمار سلول‌های بدنی کمتری نسبت به TT داشتند، این نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های GG، TG و TT با مقاومت به بیماری ورم پستان مرتبط هستند (Bhattarai *et al.*,

(2017). نتایج حاصل از مطالعه ناحیه اگزون ۱۸ جایگاه MAP4K4 در گاوهای هلشتاین دشت مغان نیز بیانگر وجود ۵ ناحیه چندشکل بودند که در نواحی ۱۱۹، ۱۲۲، ۱۷۶، ۲۵۹ و ۴۳۸ توالی نوکلئوتیدی اگزون ۱۸ این ژن قرار داشتند (Mohammadzadeh *et al.*, 2020). این شواهد، فرضیه نقش مؤثر ژن MAP4K4 در مقاومت به ورم پستان و افزایش تولید شیر را تقویت می‌کند. لذا شناسایی واریانت‌های ژنتیکی این ژن در جمعیت‌های مختلف گاوی به ویژه نژادهای بومی نظیر گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمن‌تال و آثار آن در خصوصیات کیفی شیر می‌تواند گامی مؤثر در طراحی استراتژی انتخاب و تلاقی بین نژادها باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در تحقیق حاضر، ۲۷ رأس گاو شامل ۱۰ رأس نژاد خالص سیستانی، ۱۰ رأس هلشتاین و ۷ رأس آمیخته سیستانی×سیمن‌تال از مرکز تحقیقات گاو سیستانی و از گله‌های بومی منطقه سیستان به طور تصادفی انتخاب و خونگیری از ورید گردنی در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون (EDTA ۵ درصد) انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری صفات کیفی شیر به مدت سه ماه و به صورت هفتگی نمونه‌های شیر به میزان ۳۰ میلی‌لیتر در دو نوبت صبح و عصر جمع‌آوری و به آزمایشگاه علوم دامی دانشگاه زابل منتقل و با دستگاه میلکواسکن تمام اتوماتیک، صفات کیفی شیر شامل درصد چربی، پروتئین، لاکتوز و ماده خشک بدون چربی اندازه‌گیری شدند.

استخراج و ارزیابی DNA

استخراج DNA کل خون با استفاده از روش نمکی-بهینه‌یافته شرکت زیست فناوری زند (زیست فناوری زند، شیراز) انجام گرفت. سپس DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۵ درصد الکتروفورز شدند و نمونه‌هایی که کیفیت مناسبی داشتند، برای واکنش تکثیر PCR استفاده شدند. همچنین برای بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ استفاده شد. نمونه‌های در دامنه ۲-۱/۸ مطلوب، کمتر از ۱/۸ نشانه آلودگی پروتئین و بیش از ۲ نشانه RNA زیاد است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۵۷ جفت باز از اگزون سوم ژن MAP4K4 در گاوهای خالص سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمن‌تال از یک جفت آغازگر اختصاصی رفت 5'-GTGTCTGCGTCCTGTTGTG-3' و برگشت 5'-R: GCACTGAAGTGAAGTGGGAC-3' (Bhattarai *et al.*, 2017) در دمای بهینه ۵۶/۶ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. برای واکنش تکثیر ژن از کیت مسترمیکس شرکت زیست‌فن‌آوری زند (شرکت زیست‌فن‌آوری زند، شیراز) در دستگاه ترموسیکلر مدل اپندورف استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA نمونه هدف

(۷۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر، یک میکرولیتر از استوک پرایمر (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر) و ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (۲X) در دستگاه ترموسایکلر مدل اپندروف انجام شد. برنامه گرمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل یک مرحله واسرشت کردن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، در ادامه ۳۵ سیکل شامل واسرشت کردن ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶/۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات تکثیر PCR بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند، نمونه‌هایی که کیفیت باند مطلوب و بدون باند غیرتخصصی بودند برای توالی‌یابی به روش سانگر به شرکت توپاز ژن (توپاز ژن، تهران) ارسال و تعیین توالی شدند. در توالی‌یابی سانگر آداپتورهایی به هر کدام از نوکلئوتیدها متصل شده که در هنگام نمایان‌سازی حساس به پرتونگاری بوده و نتایج نهایی در گراف‌ها به رنگ‌های مشخصی نمایان می‌گردند. از چهار رنگ قرمز، مشکی، آبی و سبز به ترتیب برای تفکیک نوکلئوتیدهای تیمین، گوانین، سیتوزین و آدنین استفاده شده است.

ویرایش و تحلیل توالی‌ها

توالی‌های خام با نرم‌افزار کروماس (Chromas) ویرایش و توالی‌های با کیفیت پایین بویژه در ابتدا و انتهای نمونه‌ها با دستورهای trim low quality سپس با دستور delete timed sequence حذف شدند و مابقی توالی‌های باقیمانده با فرمت FASTA برای انجام آنالیزهای بعدی ذخیره شدند. نرم‌افزار کروماس یکی از نرم‌افزارهای پایه در زمینه پژوهش‌های ژنتیکی است که تشخیص هم‌پوشانی‌های هتروپلاسمی و هموپلاسمی، نمایش خودکار نقاط دارای ابهام برای ویرایش و حذف داده‌های با کیفیت پایین را انجام می‌دهد (Lopez and Bonasora, 2017). با استفاده از ابزار Clastal-W نرم‌افزار MEGA نسخه ۱۱ (Tamura *et al.*, 2021) توالی‌ها هم‌تراز شدند. تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی شامل شناسایی چندشکلی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، درصد انواع جایگزینی انتقالی و تقاطعی با روش حداکثر درست‌نمایی، میزان تفرق و واگرایی در بین و درون جمعیت‌ها، شاخص کیمورا و سایر ساختارهای ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA11 و Dnasp نسخه ۵ (Librado and Rozas, 2009) انجام گرفت. بررسی تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N) نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینه حاصله نداشته‌اند (d_S)، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد. بنابراین، با استفاده از مقدار عددی این نسبت (d_N/d_S) روند انتخاب طبیعی برای ژن MAP4K4 بررسی گردید. مقادیر d_N و d_S به ترتیب با استفاده از روابط ۲ و ۳ محاسبه شدند.

$$d_N = -3/4 \ln(1 - 4/3P_N) \quad \text{رابطه ۱:}$$

$$d_S = -3/4 \ln(1 - 4/3P_S) \quad \text{رابطه ۲:}$$

در روابط بالا، P_N ، نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی غیرمشابه و P_S نیز نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی مشابه می‌باشند. نسبت جهش‌هایی که منجر به تغییر آمینواسید شدند نسبت به جهش‌هایی که تغییری در آمینواسید نداشتند (d_N/d_S) در مقایسه دو به دوی توالی نمونه‌های مختلف گاو سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال با نرم‌افزار SNAP (Korber, 2000) (<https://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/snapv2>) انجام شد.

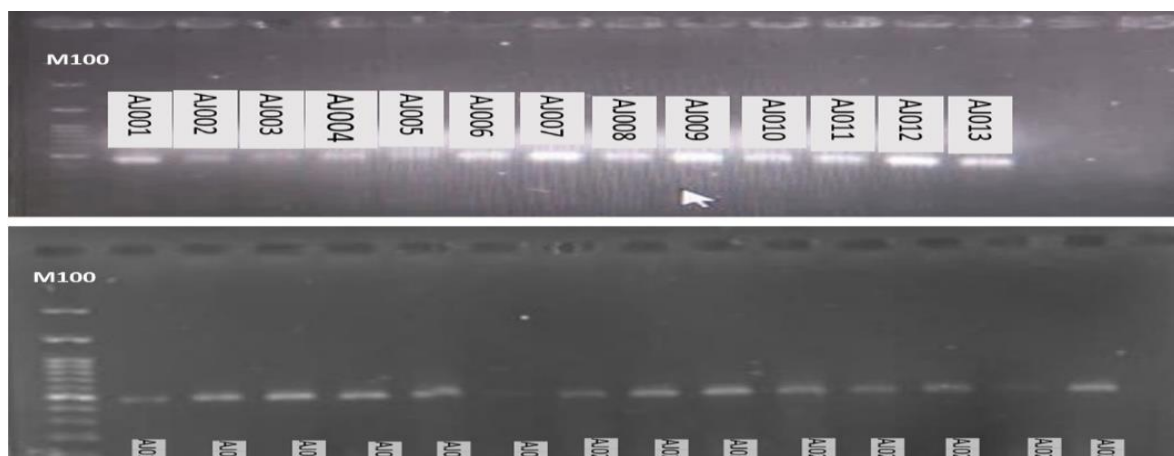
اثرات چندشکلی (SNP) بر صفات کیفی شیر در قالب مدل‌های تابعیت چندگانه چندنشاندگری و رویه GLM نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ (SAS Institute, 2004) مطابق با مدل ریاضی زیر برآورد شدند:

$$Y_{ijk} = M + \text{Breed}_i + \text{SNP}_j + e_{ijk} \quad \text{رابطه ۳:}$$

در معادله بالا، Y_{ijk} رکوردهای مربوط به صفات کیفی شیر شامل درصد چربی، درصد پروتئین، لاکتوز و درصد ماده خشک بدون چربی بودند؛ M میانگین هر صفت؛ Breed_i اثر نژاد شامل سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال و SNP_j اثر واریانت‌های هر جایگاه نشانگر تکنوکلوئیدی و e_{ijk} خطای باقیمانده می‌باشد. مقایسه میانگین گروه‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با روش توکی کرامر انجام شد.

نتایج و بحث

الکتروفورز DNA کل استخراج شده و تکثیر قطعه ۴۵۷ جفت بازی از اگزون سوم جایگاه ژن MAP4K4 بیانگر کمیت و کیفیت مناسب و تکثیر اختصاصی ناحیه هدف، بدون باند غیراختصاصی بود (شکل ۱).

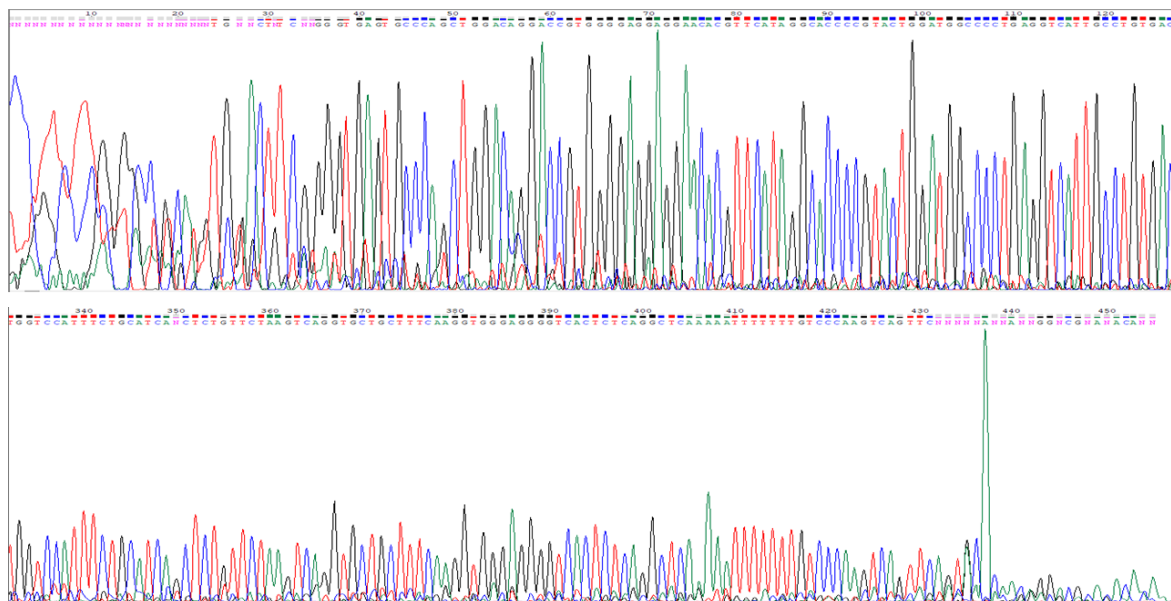


شکل ۱- الکتروفورز محصولات تکثیر ناحیه ۴۵۷ جفت بازی از جایگاه ژن MAP4K4 در نمونه‌های مختلف گاوهای

هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

Figure 1- Electrophoresis of amplification products of the 457 base pair regions of the MAP4K4 locus in different samples of Holstein, Sistani, and Sistani×Simmental crossbred cows

نتایج توالی‌یابی به روش سانگر در شکل ۲ نمایش داده شده است. توالی‌ها در ابتدا و انتها بی‌کیفیت و پیک‌های نامشخص داشتند، که با نرم‌افزار کروماتس نقاط بی‌کیفیت حذف و مابقی توالی‌ها با فرمت fasta ذخیره شدند.



شکل ۲- توالی‌های اولیه جایگاه ژن MAP4K4 در گاوهای خالص سیستانی، هلستاین و آمیخته‌های

سیستانی×سیممنتال که در ناحیه ابتدایی و انتهایی به دلیل عدم وجود پیک‌های مشخص و در هم‌ریخته به عنوان ناحیه بدون کیفیت شناسایی و حذف شدند.

Figure 2- Primary sequences of the MAP4K4 locus in pure Sistani, Holstein, and Sistani×Simmental crossbred cows, which were identified and removed as low-quality regions in the initial and final regions due to the lack of distinct and overlapping peaks.

بعد از ویرایش و تولید کانتیگ توالی‌های منفرد، کلیه نمونه با نرم‌افزار chromas به فرمت FASTA تبدیل و ذخیره شدند

که نتایج مطابق با شکل ۳ می‌باشد. طول حدود ۴۲۰ جفت بازی بدون نواحی بی کیفیت نتیجه نهایی ویرایش کیفی داده‌ها بود.

از ۲۷ نمونه ارسالی جهت تعیین توالی، سه تا از توالی‌های مربوط به گاوهای خالص هلستاین و سیستانی بدلیل کیفیت نامناسب

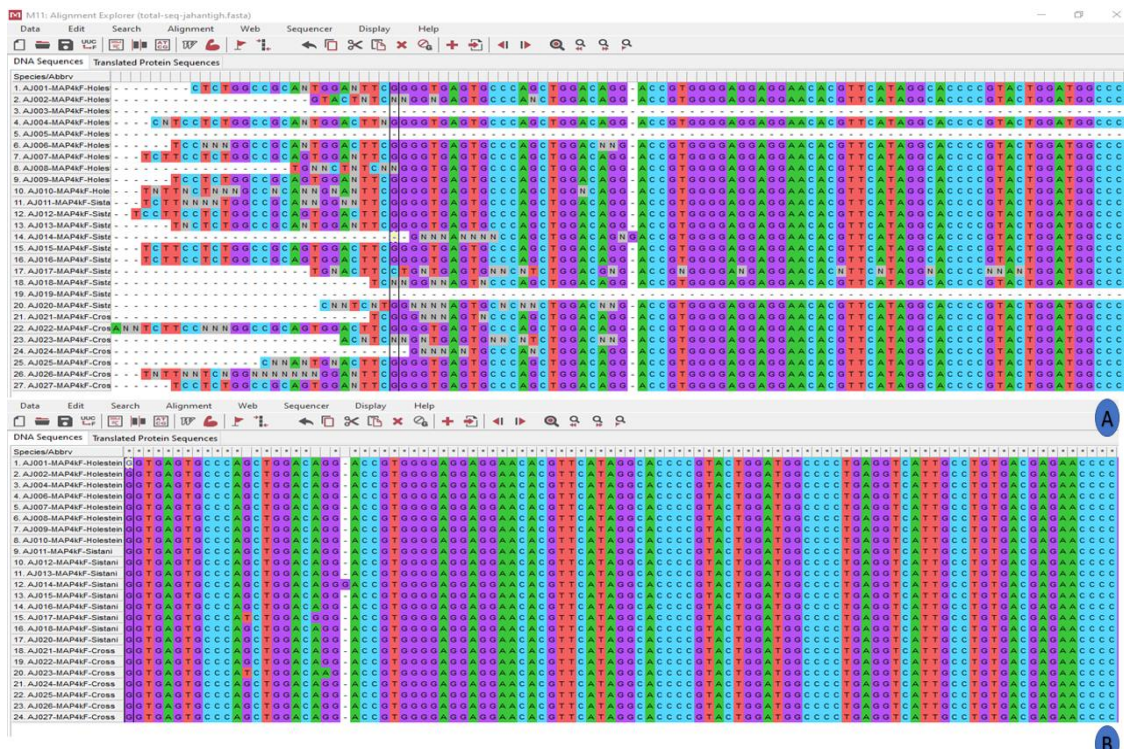
جهت تجزیه‌های بعدی مورد استفاده قرار نگرفت.

```
total-seq-jahantigh.fasta
>AJ001-MAP4kF-Holestein
CTCTGGCCGCANTGGANTTCGGGGTGAGTGCCCAAGCTGGACAGGACCGTGGGGAGGAGGA
ACACGTTTCATAGGCACCCCGTACTGGATGGCCCTGAGGTTCATTGCCTGTGACGAGAACC
CCGACGCCACCTACGATTACAGGGTAAGGTGTCAACAGCCCTGCCTTGTGGGCTCTGCCG
GTCCTGGGCACGGGTTCTGCCCCCATGTCCCCCTCCCTGCTCCAGCGAGGACCGCNGAC
TCCTGCTGTAGGGCACATCTGCCAGGACAGTATTTGAGGCTTTGTGTGTGTGTGTGTGTG
CATTTCTGCATCAGCTCTGTTCTAAGTCAGGTGCTGCTTCAAGGTGGGAGGGGTCACCTC
TCAGGCTCAAAAATTTTTTTGTCCAAAGTCAGTTCAANNNNNNNNCNGG
>AJ002-MAP4kF-Holestein
GTACTNTCNGGNGAGTGCCCANCTGGACAGGACCGTGGGGAGGAGGAACACGTTTCATAG
GCACCCCGTACTGGATGGCCCTGAGGTTCATTGCCTGTGACGAGAACCACGACCCACCT
ACGATTACAGGGTAAGGTGTCAACAGCCCTGCCTTGTGGGCTCTGCNNGTCTGGGCACG
GGTCTGTGCCCCCATGTCCCCCTCCCTGCTCCAGCGAGGACCGCATGGACTCCTGCTGTAG
GGCACATCTGCCAGGACAGTATTTGAGGCTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
CAGTCTGTTCTAAGTCAGGTGCTGCTTCAAGGTGGGAGGGGTCACCTCANGCTCANA
AATTTTTTTGTCCAAAGTCANTTC
>AJ003-MAP4kF-Holestein
TCTTCTCTGGCCGCAGTGGACTTCGGGGTGAGTGCCCAAGCTGGACAGGACCGTGGGGAG
GAGGAACACGTTTCATAGGCACCCCGTACTGGATGGCCCTGAGGTTCATTGCCTGTGACGA
GAACCCGACGCCACCTACGATTACAGGGTAAGGTGTCAACAGCCCTGCCTTGTGGGCTC
TGCCGGTCTGTGGGCACGGGTTCTGCCCCCATGTCCCCCTCCCTGCTCCAGCGAGGACCGC
ATGGACTCCTGTGTAGGGCACATCTGCCAGGACAGTATTTGAGGCTTTGTGTGTGTGTGTG
GTGGTCCATTTCTGCNTCNNCTCTGTTCTAAGTCAGGTGCTGCTTNTAANGNGNNAGGGN
NNNNNCTCAGGNTNANAAATTTTTTTNNNNNCANGTCAGNTNNNG
>AJ004-MAP4kF-Holestein
CNTCTCTGGCCGCANTGGACTTNGGGTGAGTGCCCAAGCTGGACAGGACCGTGGGGAGG
AGGAACACGTTTCATAGGCACCCCGTACTGGATGGCCCTGAGGTTCATTGCCTGTGACGAG
AACCCGACGCCACCTACGATTACAGGGTAAGGTGTCAACAGCCCTGCCTTGTGGGCTCT
GCCGGTCTGTGGGCACGGGTTCTGCCCCCATGTCCCCCTCCCTGCTCCAGCGAGGACCGCN
NGACTCCTGCTGTAGGGCACATCTGCCAGGACAGTATTTGAGGCTTTGTGTGTGTGTGTGTG
GGTCCATTTCTGCATCAGCTCTGTTCTAAGTCAGGTGCTGCTTCAAGGTGGGAGGGGTC
ACTCTCAGGCTCANAAATTTTTTTGTCCAAAGTCAGTTCAANNNA
>AJ005-MAP4kF-Holestein
<
>AJ006-MAP4kF-Holestein
```

شکل ۳- بخشی از فایل FASTA که حاوی کلیه نمونه‌ها به طول تقریبی حدود ۴۲۰ جفت باز می‌باشد.

Figure 3- Part of the FASTA file containing all samples with an approximate length of about 420 base pairs.

نتایج قبل و بعد از همترازی ۲۷ نمونه مربوط به توالی ژن MAP4K4 در نژادهای سیستانی و هلستاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در شکل ۴ نمایش داده شده است. تعداد سه نمونه (۳، ۵ و ۱۹) دلیل نتایج همترازی نامطلوب حذف شدند و تعداد ۲۴ نمونه برای آنالیزهای بعدی ذخیره شدند. با حذف نواحی نامطلوب و غیرهمتراز در ابتدا و انتهای توالی‌ها یک قطعه به طول ۳۷۵ جفت باز برای بررسی ساختارهای ژنتیکی با فرمت mega ذخیره شدند. ستون‌های دارای نوکلئوتیدهای یکسان با رنگ مشابه و ستون‌های دارای نوکلئوتیدهای متفاوت با رنگ‌های متفاوت نمایش داده شدند (شکل ۴).



شکل ۴- نتایج قبل (A) و بعد (B) از همترازی دوتایی و چندگانه با روش Clustal-W برای ژن MAP4K4 در گاوهای هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

Figure 4- Results of before (A) and after (B) pairwise and multiple alignment using the Clustal-W method of the MAP4K4 gene in Holstein, Sistani and Sistani×Simmental crossbred.

شناسایی نواحی چندشکلی

نواحی چندشکلی شناسایی‌شده در توالی ژن MAP4K4 در سه جمعیت گاوی (هلستاین، سیستانی و آمیخته سیستانی×سیمنتال) در جدول ۱ ارائه شده است. جهش‌ها از قبیل جهش‌های نقطه‌ای (تغییر تنها در یک نوکلئوتید) به صورت تفاوت در کاراکترهای یک ستون و جهش‌های حذف و اضافه (Indel) به صورت خط تیره در یک یا چند توالی ظاهر شده‌اند. اختلاف نوکلئوتیدی که در هر ستون دیده می‌شود به دلیل چندشکلی در بین نمونه‌ها می‌باشد. از ۳۷۵ جفت باز در ۲۴ نمونه که متعلق به گاوهای سیستانی، هلستاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال آنها بودند، تعداد ۷ ناحیه نواحی چندشکلی در موقعیت‌های ۱۳، ۲۰، ۲۱، ۲۳، ۱۳۳، ۱۵۸ و ۲۱۸ نمایان گردید. در بین کل نمونه‌ها میزان چندشکلی کم و به میزان ۱/۸۶ درصد مشاهده شد که نشان از محافظت در ناحیه مذکور در طی تبار گذشته است. شناسایی این نواحی چندشکل، پایه‌ای برای مطالعات

بعدی در ارتباط فنوتیپ-ژنوتیپ و تخمین ارزش اصلاحی ژنومی فراهم می‌کند. ترکیب اطلاعات SNP/Indel با داده‌های فنوتیپی می‌تواند پیش‌بینی دقیق‌تری از صفات اقتصادی مهم در گاوها ارائه دهد (Sanchez *et al.*, 2016; 2017).

جدول ۱- توزیع نواحی چندشکل در بین توالی‌های نوکلئوتیدی در طول ۳۷۵ جفت بازی اگزون سه جایگاه ژن MAP4K4 در گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال

Table 1- Distribution of polymorphic regions among nucleotide sequences along 375 base pairs of exon3 of MAP4K4 gene in Sistani, Holstein and Sistani×Simmental crossbred

نواحی چندشکلی و حذف و اضافه (Polymorphism and Inset-Deletion sites)							شماره نمونه (Sample)
Indel218	SNP158	SNP133	Indel23	SNP21	SNP20	SNP13	نژاد (Breed)
-	C	A	-	G	A	G	Holstein
G	.	.	-	.	.	.	Holstein
-	.	.	-	.	.	.	Holstein
G	.	.	-	.	.	.	Holstein
G	.	.	-	.	.	.	Holstein
G	.	.	-	.	.	.	Holstein
G	.	.	-	.	.	.	Holstein
G	.	.	-	.	.	.	Holstein
G	.	.	-	.	.	.	Holstein
G	.	.	-	.	.	.	Sistani
G	.	.	-	.	.	.	Sistani
G	.	.	-	.	.	.	Sistani
G	.	.	G	.	.	.	Sistani
G	.	.	-	.	.	.	Sistani
G	.	.	-	.	.	.	Sistani
G	.	.	-	.	G	T	Sistani
G	T	G	-	.	.	.	Sistani
G	.	.	-	.	.	.	Sistani
G	.	G	-	.	.	.	Crossbred
G	.	.	-	.	.	.	Crossbred
G	.	.	-	A	.	T	Crossbred
G	.	.	-	.	.	.	Crossbred
G	.	.	-	.	.	.	Crossbred
G	.	.	-	.	.	.	Crossbred
G	.	.	-	.	.	.	Crossbred
G	.	.	-	.	.	.	Crossbred

در مطالعه حاضر از میان هفت جایگاه چندشکلی شناسایی شده در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن MAP4K4، چهار جایگاه دارای دو واریانتی منحصربفرد (SNP20، SNP21، SNP58 و Indel23) و سه جایگاه دارای دو واریانتی پارسیمونی (SNP13، SNP133 و Indel218) بودند. این جایگاه‌ها نمایانگر تنوع ژنتیکی بین گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال هستند. در مطالعه‌ای، ۱۹ ناحیه چندشکلی در ژن MAP4K4، گزارش شد که شامل چهار ناحیه در بخش بالادست ۵، هشت ناحیه در اگزون‌ها و ۷ ناحیه در اینترون‌های ژن بود (Bhattarai *et al.*, 2017). مطالعات قبلی نشان دادند که چندشکلی‌های $c.2061T > G$ و $c.2196T > C$ در ژن MAP4K4 بر درصد پروتئین، عملکرد شیر و شمار سلول‌های بدنی تأثیر معنی‌داری دارند (Bhattarai *et al.*, 2017). بنابراین ژن MAP4K4 می‌تواند یک ژن کاندیدا مناسب برای مقاومت به ورم پستان و بهبود عملکرد تولید شیر باشد. همچنین چندشکلی‌های شناسایی شده در مطالعه حاضر می‌توانند به عنوان

چندشکلی آمینواسیدی

در مطالعه حاضر توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژن MAP4K4 بر اساس کدهای ژنتیکی به توالی آمینواسیدی ترجمه شدند که طول ۳۷۵ جفت بازی منجر به تشکیل ۱۲۵ آمینواسید گردید. در توالی‌های آمینواسیدی اگزون ۳ ژن MAP4K4 (۱۲۵ اسید آمینه) در ۲۷ نمونه از گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال، شش جایگاه چندشکلی شناسایی گردید. از این میان، چهار ناحیه چندشکلی SNP و دو ناحیه حذف و اضافه (Indel) بودند و در سایر نواحی بین نمونه‌ها تمایزی یافت نشد. درصد چندشکلی در توالی آمینواسیدی برابر با ۴/۸ درصد بود. موقعیت و نوع تغییرات آمینواسیدی در جدول ۲ ارائه شده است. از جایگاه‌های چندشکلی مذکور، تعداد دو ناحیه ۷ و ۵۳ دو واریانتهی منحصر بفرد و دو جایگاه دو واریانتهی غیرمنحصر بفرد و دو جایگاه حذف و اضافه بودند.

جدول ۲- توزیع نواحی چندشکل در بین توالی‌های آمینواسیدی در طول ۱۲۵ تایی اگزون سه جایگاه ژن MAP4K4 در گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال

Table 2- Distribution of polymorphic regions among amino acid sequences along the 125-amino acids length of the exon3 of the MAP4K4 gene in Sistani, Holstein, and Sistani×Simmental crossbred.

نواحی چندشکلی آمینواسیدی (Amino acids polymorphism sites)						نژاد (Breed)	شماره نمونه (Sample)
Indel73	SNP53	SNP45	Indel8	SNP7	SNP5		
-	P	T	-	Q	A	Holstein	AJ001
G	.	.	-	.	.	Holstein	AJ002
-	.	.	-	.	.	Holstein	AJ004
G	.	.	-	.	.	Holstein	AJ006
G	.	.	-	.	.	Holstein	AJ007
G	.	.	-	.	.	Holstein	AJ008
G	.	.	-	.	.	Holstein	AJ009
G	.	.	-	.	.	Holstein	AJ010
G	.	.	-	.	.	Sistani	AJ011
G	.	.	-	.	.	Sistani	AJ012
G	.	.	-	.	.	Sistani	AJ013
G	.	.	G	.	.	Sistani	AJ014
G	.	.	-	.	.	Sistani	AJ015
G	.	.	-	.	.	Sistani	AJ016
G	.	.	-	R	S	Sistani	AJ017
G	L	A	-	.	.	Sistani	AJ018
G	.	.	-	.	.	Sistani	AJ020
G	.	A	-	.	.	Crossbred	AJ021
G	.	.	-	.	.	Crossbred	AJ022
G	.	.	-	.	S	Crossbred	AJ023
G	.	.	-	.	.	Crossbred	AJ024
G	.	.	-	.	.	Crossbred	AJ025
G	.	.	-	.	.	Crossbred	AJ026
G	.	.	-	.	.	Crossbred	AJ027

نوع تغییرات آمینواسیدی در جایگاه ژن MAP4K4 در گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال در جدول ۳ ارائه شدند. در طول زنجیره پروتئینی فرضی در موقعیت ۵ اسید آمینه آلانین جایگزین سرین، در موقعیت ۷ گلوتامین جایگزین آرژنین، در موقعیت ۴۵ اسید آمینه ترئونین جایگزین آلانین و در موقعیت ۵۳ اسید آمینه پرولین جایگزین لئوسین شدند.

جدول ۳- انواع نواحی چندشکلی آمینواسیدی در توالی اگزون سوم جایگاه ژن MAP4K4 در گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال

Table 3- Types of amino acid polymorphic regions in the third of exon sequence of the MAP4K4 locus in Sistani, Holstein, and Sistani×Simmental crossbred

توضیحات Description	تغییرات Change	موقعیت در طول ۱۲۵ آمینواسیدی Position within 125 amino acids	ردیف Number
Alanine to Serine	A<S	5	1
glutamine to arginine	Q<R	7	2
threonine to alanine	T<A	45	3
proline to leucine	P<L	53	4

در طول ۳۷۵ جفت بازی از اگزون سوم ژن MAP4K4 با توجه به نواحی چندشکلی، حذف و اضافه یک منطقه حفاظت شده به طول ۱۶۸ جفت بازی مشاهده گردید که از تغییرات ناشی از عوامل تکاملی مانند جهش‌ها، حذف و اضافه در امان مانده‌اند (شکل ۴).

===== Conserved Regions =====

Dynamic Defined Parameters given the observed S:
Minimum window length, MWL: 168
Conservation threshold, CT: 1

[Region: Start-End Conservation Homozigosity P-value]

Region_1: 159-375 1/000 1/000 0/0126
GGTCCTGGGCACGGGTTCTGCCCCCATGTCCCCCTCCCTGCTCCAGCGAG
GACCGCATGGACTCCTGCTGTAGGGCACATCTGCCAGGACAGTATTTTGA
GGCTTTGTGTGTGTGTGTGTTCCATTTCTGCATCAGCTCTGTTCTAAGTC
AGGTGCTGCTTTCAAGGTGGGAGGGGTCCTCTCAGGCTCAAAAATTTT
TTGTCCCAAGTCAGTTC

شکل ۴- نواحی حفاظت شده در بین توالی‌های نوکلئوتیدی اگزون سه جایگاه ژن MAP4K4 در گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال

Figure 4- Conserved regions among the nucleotide sequences of the exon3 of the MAP4K4 locus in Sistani, Holstein and Sistani×Simmental crossbred

ماتریس جایگزینی توالی‌ها

ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژن MAP4K4 در بین نمونه‌های مختلف در جدول ۴ ارائه شده است. هر ورودی جدول نشان‌دهنده احتمال جایگزینی (i) از یک باز نوکلئوتیدی (ردیف) به باز دیگر (ستون) است. الگوی جانشینی و نرخ‌ها تحت مدل تامورا-نئی (۱۹۹۳) و با روش حداکثر درست‌نمایی برآورد شدند. برای تخمین مقادیر حداکثر درست‌نمایی، یک توپولوژی درختی به طور خودکار محاسبه می‌گردد. تجزیه و تحلیل شامل ۲۴ نمونه حاوی توالی نوکلئوتیدی بودند. تمام موقعیت‌های حاوی شکاف‌ها و داده‌های از دست رفته حذف شدند. در مجموع ۳۷۵ موقعیت در مجموعه داده نهایی وجود داشت.

نرخ جایگزینی شامل انواع جایگزینی‌های انتقالی و تقاطعی می‌باشند. جایگزینی انتقالی شامل تبدیل یک باز پورین به پورین و پیریمیدین به پیریمیدین می‌باشد و جایگزینی تقاطعی تبدیل یا جانشینی بازهای پورین به پیریمیدین و برعکس را شامل می‌شود. نرخ جانشینی‌های انتقالی مختلف به صورت پررنگ و نرخ جانشینی‌های متقاطع به صورت مورب نشان داده شده است. در بین کل نمونه‌ها درصد جانشینی انتقالی ۷۳/۹۲ درصد و ۲۶/۰۸ درصد جانشینی تقاطعی بودند. فراوانی بالاتر جانشینی انتقالی نسبت به جانشینی تقاطعی با استحکام بیشتر پیوندهای هیدروژنی و محدودیت‌های ساختاری در توالی مرتبط است.

جدول ۴- ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی MAP4K4 در بین کل نمونه‌ها با روش حداکثر درستنمایی

Table 4- Substitution matrix of nucleotide sequences of the MAP4K4 locus among all populations using the maximum likelihood method

	G	C	T	A	
A	38.5	3.69	3.21	-	A
T	3.86	6.88	-	2.27	T
C	3.86	-	5.98	2.27	C
G	-	3.69	3.21	22.56	G

ماتریس جانشینی انتقالی و تقاطعی توالی‌های ژن MAP4K4 در بین گاوهای هلشتاین در جدول ۵ ارائه شده است. اعداد در قطر و پررنگ نشان دهنده جانشینی‌های انتقالی و اعداد خارج قطر و مورب جانشینی‌های تقاطعی را نشان می‌دهند. درصد جانشینی انتقالی برابر با ۳۳/۳۳ درصد و درصد جانشینی تقاطعی ۶۶/۶۷ درصد برآورد گردید. در بین توالی‌ها بالاترین درصد جانشینی انتقالی تبدیل آدنین به گوانین و کمترین درصد جانشینی انتقالی مربوط به گوانین به آدنین بودند. جانشینی‌های تقاطعی در دامنه بین ۵/۸ تا ۹/۸۶ درصد بودند که بیشترین مربوط به تبدیل تیمین و سیتوزین به گوانین و کمترین متعلق به تیمین و سیتوزین به آدنین بودند.

جدول ۵- ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی MAP4K4 در بین گاوهای هلشتاین با روش حداکثر درستنمایی

Table 5- Substitution matrix of nucleotide sequences of the MAP4K4 locus among Holstein cows using the maximum likelihood method

	G	C	T	A	
A	9.86	9.46	8.21	-	A
T	9.86	9.46	-	5.8	T
C	9.86	-	8.20	5.8	C
G	-	9.46	8.21	5.8	G

ماتریس جانشینی انتقالی و تقاطعی توالی‌های ژن MAP4K4 در بین گاوهای سیستانی در جدول ۶ ارائه شده است. اعداد در قطر و پررنگ نشان دهنده جانشینی‌های انتقالی و اعداد خارج قطر و مورب جانشینی‌های تقاطعی را نشان می‌دهند. درصد جانشینی انتقالی برابر با ۷۶/۳۶ درصد و درصد جانشینی تقاطعی ۲۳/۶۴ درصد برآورد گردید. در بین توالی‌ها بالاترین درصد جانشینی انتقالی تبدیل آدنین به گوانین و کمترین درصد جانشینی انتقالی مربوط به سیتوزین به تیمین و بالعکس بودند. جانشینی تقاطعی در دامنه بین ۲/۰۵ تا ۳/۵۱ درصد متغیر بودند.

جدول ۶- ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی MAP4K4 در بین گاوهای سیستانی با روش حداکثر درستنمایی

Table 6- Substitution matrix of nucleotide sequences of the MAP4K4 locus among Sistani cattle using the maximum likelihood method

G	C	T	A	
34.13	3.34	2.92	-	A
3.51	11.91	-	2.05	T
3.51	-	10.39	2.05	C
-	3.34	2.92	19.94	G

ماتریس جانشینی انتقالی و تقاطعی توالی‌های ژن MAP4K4 در بین گاوهای آمیخته سیستانی×سیمنتال در جدول ۷ ارائه شده است. اعداد در قطر و پررنگ نشان دهنده جانشینی‌های انتقالی و اعداد خارج قطر و مورب جانشینی‌های تقاطعی را نشان می‌دهند. درصد جانشینی انتقالی برابر با ۶۹/۶۴ درصد و درصد جانشینی تقاطعی ۳۰/۳۶ درصد برآورد گردید. در بین توالی‌ها بالاترین درصد جانشینی انتقالی تبدیل آدنین به گوانین و کمترین درصد جانشینی انتقالی مربوط به تیمین به سیتوزین و بالعکس بودند. جانشینی تقاطعی در بین گاوهای آمیخته در دامنه ۲/۶۴ تا ۴/۵ درصد بودند.

جدول ۷- ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی MAP4K4 در بین گاوهای آمیخته سیستانی×سیمنتال با روش حداکثر درستنمایی

Table 7- Substitution matrix of nucleotide sequences of the MAP4K4 locus among Sistani×Simmental crossbred cows using the maximum likelihood method

G	C	T	A	
43.9	4.3	3.74	-	A
4.5	0	-	2.64	T
4.5	-	0	2.64	C
-	4.3	3.74	25.74	G

جدول ۸ درصد انواع جایگزینی انتقالی و تقاطعی را در بین جمعیت‌های هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال را در جایگاه ژن MAP4K4 نشان می‌دهد. بالاترین و پایین‌ترین درصد جانشینی انتقالی به ترتیب مربوط به جمعیت سیستانی (۷۶/۳۷٪) و هلشتاین (۳۳/۳۳٪) بودند. برعکس، بیشترین درصد جایگزینی تقاطعی مربوط به جمعیت هلشتاین (۶۶/۶۷٪) و کمترین مربوط به جمعیت سیستانی (۲۳/۶۳٪) بود.

جدول ۸- درصد انواع جایگزینی انتقالی و تقاطعی در بین جمعیت‌های هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جایگاه ژن MAP4K4

Table 8- Percentage of transitional and transversional substitution types among Holstein, Sistani, and Sistani×Simmental crossbred populations at the MAP4K4 locus

درصد جانشینی تقاطعی Transversional substitution	درصد جانشینی انتقالی Transitional substitution	جمعیت Population
23.63	76.37	سیستانی Sistani
66.67	33.33	هلشتاین Holestei
30.36	69.64	آمیخته سیستانی×سیمنتال Sistani×Simmental crossbred
26.08	73.92	کل Total

درصد توالی‌های مختلف جایگاه ژن MAP4K4 در بین جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جدول ۹ آورده شده است. در بین تمام جمعیت‌ها باز آدنین کمترین درصد فراوانی و باز گوانین بیشترین

فراوانی را داشتند. درصد بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در جمعیت‌های سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال با آزمون کای مربع در سطح احتمال ۵ درصد، اختلافات معنی‌دار وجود نداشت ($P>0.05$).

جدول ۹- درصد فراوانی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی MAP4K4 بین گاوهای خالص سیستانی و هلشتاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال با روش حداکثر درست‌نمایی

Table 9- Frequency of nucleotide sequences of the MAP4K4 locus between pure breed of Sistani and Holstein cows and Sistani×Simmental crossbred using the maximum likelihood method

انواع بازها Different nucleotides				جمعیت Population
G	C	T	A	
29.68	28.29	24.69	17.34	سیستانی Sistani
29.58	28.38	24.63	17.4	هلشتاین Holstein
29.64	28.34	24.64	17.38	آمیخته‌ها Crossbred
29.64	28.33	24.65	17.37	کل جمعیت Total population

ضریب شاخص حد خنثی کیمورا در جایگاه ژن MAP4K4 در جمعیت‌های مختلف سیستانی، هلشتاین و آمیخته سیستانی×سیمنتال در جدول ۱۰ ارائه شده است. ضریب نسبت جانشینی انتقالی به تقاطعی (r) بیانگر میزان تغییرات ژنتیکی و اثر انتخاب در تکامل توالی‌ها در طی دوره‌های گذشته است. براساس حد خنثی کیمورا ($R=0.5$) مقادیر بالاتر از ۰/۵ بیانگر نقش انتخاب مثبت در تکامل و مقادیر کمتر از ۰/۵ نشان دهنده عدم دخالت انتخاب و تأثیر سایر عوامل تکاملی مانند مهاجرت و جهش است. در مطالعه حاضر بالاترین ضریب مربوط به جمعیت سیستانی و کمترین ضریب تکامل در جایگاه مذکور متعلق به جمعیت هلشتاین بود که در طی دهه‌های گذشته تحت تأثیر بالاترین انتخاب‌ها در جهت افزایش تولید شیر قرار داشتند (جدول ۱۰).

جدول ۱۰- ضریب جایگزینی انتقالی به تقاطعی در جایگاه ژن MAP4K4 در جمعیت‌های هلشتاین، سیستانی و آمیخته-سیستانی×سیمنتال

Table 10- Transitional and transversional substitution coefficient at the MAP4K4 locus in Holstein, Sistani, and Sistani×Simmental crossbred populations

نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی (R) Transitional to transversional substitution ratio (R)	جمعیت Population
3.01	سیستانی Sistani
0.50	هلشتاین Holstein
2.01	آمیخته سیستانی×سیمنتال Sistani×Simmental crossbred
4.01	کل جمعیت Total population

میانگین فاصله (واگرایی) ژنتیکی (Distance)

میانگین واگرایی تکاملی درون و بین نژادهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جدول ۱۱ ارائه شده است. تجزیه و تحلیل تعداد جایگزینی‌های پایه در هر جفت باز از میانگین‌گیری در تمام جفت‌های دنباله در هر گروه با استفاده

از مدل تامورا-نئی محاسبه گردید. بالاترین میزان واگرایی در درون نژادها و جمعیت‌ها مربوط به سیستانی (۰/۰۰۲۴) و کمترین مربوط به جمعیت هلشتاین بود. واگرایی درون جمعیت آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال برابر با ۰/۰۰۲۳ محاسبه شد. از میزان واگرایی در بین نژادهای مختلف، بالاترین میزان واگرایی بین آمیخته‌ها با سیستانی (۰/۰۰۲۲) و کمترین بین هلشتاین با سیستانی (۰/۰۰۰۶۳) بودند. میانگین واگرایی کل جمعیت برابر با ۰/۰۰۱۵ با خطای استاندارد ۰/۰۰۱ محاسبه شد.

جدول ۱۱- برآورد میانگین واگرایی تکاملی بر روی جفت‌های توالی جایگاه ژن MAP4K4 بین و داخل نژادهای

هلشتاین، سیستانی و آمیخته سیستانی×سیمنتال (اعداد داخل جدول خطای برآورد را نشان می‌دهد)

Table 11 - Estimated average evolutionary divergence on MAP4K4 gene locus sequence pairs between and within Holstein, Sistani, and Sistani×Simmental crossbred

جمعیت	هلشتاین	سیستانی	آمیخته
Population	Holstein	Sistani	Crossbred
هلشتاین	0.000 (0.000)	0.00063	0.0007
سیستانی	0.0012	0.0024 (0.0012)	0.0010
آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال	0.0011	0.0022	0.0023 (0.0013)

اعداد روی قطر میانگین واگرایی بر حسب جفت باز درون نژادها و اعداد خارج از قطر میانگین واگرایی در بین نژادها و جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. تعداد جایگزینی‌های پایه در هر سایت از میانگین‌گیری در تمام جفت‌های دنباله در هر گروه نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از مدل تامورا-نئی (Tamura and Nei, 1993) انجام شد.

میزان تفرق ژنتیکی (Diversity)

نتایج میزان تفرق ژنتیکی در جایگاه ژن MAP4K4 در بین نژادهای مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال و کل جمعیت‌ها در جدول ۱۲ ارائه شده است. تعداد جایگزین‌های پایه در هر سایت از محاسبات میانگین تنوع در زیرجمعیت‌ها محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از مدل حداکثر درستمایی ترکیبی و با روش بوت استرپ (۱۰۰۰۰ تکرار) انجام شد. میانگین تفرق در بین نژادها و جمعیت‌ها محاسبه شدند. ضریب تمایز تکاملی در بین نژادها برابر با ۰/۰۲۳- با خطای استاندارد ۰/۰۴۹ بود که ضریب تمایز بسیار کم در ناحیه مورد مطالعه می‌باشد.

جدول ۱۲- میانگین تفرق ژنتیکی یا تکامل بین جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های

سیستانی×سیمنتال در جایگاه ژن MAP4K4

Table 12 - Average genetic divergence or evolution between different populations of Holstein, Sistani and Sistani×Simmental crossbred at the MAP4K4 locus

خطای استاندارد (s.e)	میانگین تفرق ژنتیکی (d)	
Standard error	Average genetic diversity	
0.00006	-0.0001	میانگین تفرق بین جمعیت‌ها Average diversity between populations
0.0008	0.0016	میانگین تفرق داخل جمعیت‌ها Average diversity within populations
0.0007	0.0015	میانگین تفرق کل جمعیت‌ها Average diversity of all populations
0.049	- 0.023	ضریب تمایز تکاملی Coefficient of evolutionary differentiation

تجزیه نواحی حذف و اضافه در طول ۳۷۵ جفت باز از ژن MAP4K4 در بین نژادهای مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال بیانگر ۴ ناحیه حذف و اضافه بود که ویژگی‌های آنها در جدول ۱۳ ارائه شده است. متوسط طول رویداد حذف و اضافه ۱ جفت باز و متوسط طول ناحیه حذف و اضافه ۱ جفت باز بود. تعداد هاپلوتیپ‌ها و میزان تفرق هاپلوتیپی

بواسطه حذف و اضافه در کل جمعیت‌ها شامل هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال به ترتیب ۴ و ۰/۳۰۸ بودند. همچنین ضریب تفرق حذف و اضافه و تفرق حذف و اضافه به ازای هر سایت به ترتیب ۰/۴۰۹ و ۰/۰۰۱ محاسبه شدند. در نهایت ضریب تاجیما (D) ۱/۶۹- محاسبه شد که در سطح احتمال ۵ درصد غیرمعنی‌دار بود ($P>0.05$). در ضریب تاجیما اگر مثبت باشد، نشان‌دهنده این است که تنوع نوکلئوتیدی بر اساس تعداد آلل‌ها و اندازه نمونه بیشتر از مورد انتظار است. این ممکن است به معنای وجود انتخاب مثبت یا تاریخچه جمعیتی که در آن جفت‌گیری‌ها کمتر بوده است، باشد. اگر مقدار ضریب کمتر از صفر یا منفی باشد، نشان‌دهنده این است که تنوع نوکلئوتیدی کمتر از مورد انتظار است. این می‌تواند به دلیل انتخاب منفی (انتخاب علیه آلل‌های خاص) یا گلوگاه‌های جمعیتی باشد که منجر به کاهش تنوع ژنتیکی شده‌اند. در نهایت اگر ضریب برابر با صفر باشد، نشان‌دهنده این است که تنوع نوکلئوتیدی و تعداد آلل‌ها با هم هماهنگ هستند و به تعادل رسیده‌اند (Zhang *et al.*, 2015).

جدول ۱۳- تجزیه نواحی حذف و اضافه توالی‌های جایگاه ژن MAP4K4 در جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال

Table 13- Analysis of deletion and addition regions of MAP4K4 gene locus sequences in different populations of Holstein, Sistani, and Sistani×Simmental crossbred

تغییرات به واسطه حذف و اضافه	
4	تعداد کل وقوع حذف و اضافه
1	متوسط طول رویداد هر حذف و اضافه
1	متوسط طول ناحیه حذف و اضافه
4	تعداد هاپلوتیپ ناشی از حذف و اضافه
0.308	تفرق هاپلوتیپی ناحیه حذف و اضافه
0.409	تفرق حذف و اضافه (ki) (ki)
0.001	تفرق حذف و اضافه به ازای هر سایت (Pi(i)) (Pi(i))
- 1.69	D تاجیما
0.1 not significant	P-value

نتایج مقایسه دو به دو جمعیت‌های هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جدول ۱۴ ارائه شده است. در مقایسه هلشتاین و سیستانی، نژاد هلشتاین هیچ جایگاه چندشکلی نشان نداد، در حالی که در سیستانی ۴ جایگاه چندشکلی (۴ جهش) مشاهده شد. متوسط تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت بین نژاد هلشتاین و سیستانی به ترتیب ۰/۰۰۰ و ۰/۸۸۹ و میزان تفرق نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۰۰۰ و ۰/۰۰۲ محاسبه شد. مقایسه جایگاه‌های چندشکل نشان داد که تعداد جایگاه‌هایی که در نژاد هلشتاین چندشکل بودند، اما در نژاد سیستانی تک‌شکل بودند برابر با صفر و برعکس تعداد سایت‌هایی که در نژاد سیستانی چندشکل، اما در هلشتاین هم‌شکل و مونومورف بودند، برابر با ۴ موقعیت بودند. جهش مشترک با موقعیت مشابه در دو نژاد مشاهده نشد. در جمعیت نژاد سیستانی و آمیخته‌ها به ترتیب ۴ و ۳ جایگاه چندشکلی در نتیجه به ترتیب ۴ و ۳ جهش مشاهده گردید. متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت در دو نژاد سیستانی و آمیخته‌ها به ترتیب ۰/۸۸۹ و ۰/۸۵۷ و میزان تفرق نوکلئوتیدی

به ترتیب ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۲ جفت باز بود. تعداد سایت‌هایی که جهش‌های چندشکلی در نژاد سیستانی نشان دادند، اما در آمیخته‌ها هم‌شکل بودند برابر با دو موقعیت بود و همچنین تعداد سایت‌هایی که در آمیخته‌ها جهش چندشکلی داشتند، اما در نژاد سیستانی هم‌شکل و هموزیگوت بودند برابر با یک ناحیه بود. تعداد دو جهش چندشکلی در بین هر دو نژاد مشترک بودند. در جمعیت نژاد هلشتاین و آمیخته‌ها به ترتیب ۰ و ۳ جایگاه چندشکلی در نتیجه به ترتیب ۰ و ۳ جهش مشاهده گردید. متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت در دو نژاد هلشتاین و آمیخته‌ها به ترتیب ۰/۰۰ و ۰/۸۵۷ و میزان تفرق نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۰۰ و ۰/۰۰۲ محاسبه شد. تعداد سایت‌هایی که در نژاد هلشتاین چندشکل بودند، اما در آمیخته‌ها هم‌شکل بودند، صفر و همچنین تعداد ۳ سایت در آمیخته‌ها جهش چندشکلی نشان دادند که در نژاد هلشتاین هم‌شکل و هموزیگوت بودند. جهش چندشکلی مشترک در بین هر دو نژاد هم مشاهده نشد.

جدول ۱۴- تجزیه نواحی چندشکلی توالی‌های جایگاه ژن MAP4K4 در مقایسات دو به دوی جمعیت‌های مختلف

هلشتاین، سیستانی و آمیخته سیستانی×سیمنتال

Table 14- Analysis of polymorphic sites of MAP4K4 locus sequences in pairwise comparisons of different populations of Holstein, Sistani, and Sistani×Simmental crossbred

تفرق نوکلئوتیدی Nucleotide diversity	متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت Average number of different nucleotides	تعداد کل جهش‌ها The total number of mutations	تعداد کل ناحیه چندشکل Total number of polymorphic sites	تعداد نمونه Number	جمعیت Population
0.000	0.000	0	0	8	هلشتاین Holstein
0.002	0.889	4	4	9	سیستانی Sistani
0.001	0.471	4	4	17	کل Total
0.002	0.889	4	4	9	سیستانی Sistani
0.002	0.857	3	3	7	آمیخته های سیستانی×سیمنتال Sistani×Simmental crossbred
0.002	0.842	5	5	16	کل Total
0.000	0.000	0	0	8	هلشتاین Holstein
0.002	0.857	3	3	7	آمیخته های سیستانی×سیمنتال Sistani×Simmental crossbred
0.001	0.400	3	3	15	کل Total

شاخص روند انتخاب طبیعی یا نسبت جایگزینی d_N/d_S

نسبتی از جهش‌ها که منجر به تغییر آمینواسید شده‌اند (d_N) نسبت به تغییراتی که تغییری در آمینواسید ایجاد نکرده‌اند (d_S)، شاخصی می‌باشد که نشان دهنده نقش انتخاب طبیعی در روند تکامل جمعیت‌ها نشان می‌دهد. نتایج تجزیه مقایسه دو به دو توالی‌ها در جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته های سیستانی×سیمنتال در جدول ۱۵ آورده شده است. مقادیر این شاخص اگر بزرگتر از یک باشد انتخاب مثبت و اگر کمتر از یک باشد انتخاب خالص و اگر برابر با یک باشد انتخاب خنثی را نشان می‌دهد (Korber, 2000). در نژادهای خالص سیستانی و هلشتاین، ضریب تکاملی عددی بیش از یک داشت که

نشان از دخالت انتخاب طبیعی در طی تکامل در نژادهای مختلف گاو می‌باشد.

جدول ۱۵- شاخص روند انتخاب طبیعی یا نسبت جایگزینی متعارف به غیرمتعارف (d_N/d_S) در مقایسه دو به دو

حیوانات در جمعیت‌های مختلف سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌ها

Table 15 - Natural selection index or synonym and non-synonym replacement ratio (d_N/d_S) in pairwise comparison of animals in different Sistani, Holstein and crossbred populations

d_N/d_S	d_N	d_S	جمعیت Population
1.15	2.65	2.29	هلشتاین Holstein
1.01	2.51	2.48	سیستانی Sistani
0.93	2.67	2.86	آمیخته‌ها Crossbreds
0.95	2.39	2.51	کل جمعیت Total population

نتایج بررسی اثر نژاد و نواحی چندشکل بر صفات کیفی شیر در گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال در جدول ۱۶ ارائه شده است. اثر نژاد بر درصد چربی شیر معنی‌دار بود ($P<0/01$). شیر گاوهای سیستانی بالاترین درصد چربی (۵/۰۵ درصد) و آمیخته‌های سیستانی و سیمنتال کمترین درصد چربی شیر را داشتند. تفاوت درصد چربی بین گاوهای هلشتاین و آمیخته‌های سیستانی×سیمنتال معنی‌دار نبود ($P>0/05$). اثرات جایگزینی آلل‌ها در ناحیه SNP13 بر درصد چربی شیر معنی‌دار نبود، اما از نظر عددی واریانت T با بالاترین درصد چربی (۴/۳۸ درصد) و واریانت G با کمترین درصد چربی (۳/۹۵ درصد) همراه بودند. واریانت T کمترین فراوانی و واریانت G بالاترین فراوانی را در جمعیت‌های مورد مطالعه داشت. اثرات جایگزینی آللی در ناحیه چندشکل SNP133 بر درصد چربی شیر غیرمعنی‌دار بود. واریانت A با بیشترین فراوانی، بالاترین درصد جایگزینی (۴/۰۷ درصد) و واریانت G با کمترین فراوانی، کمترین درصد جایگزینی آللی (۳/۲۹ درصد) را نشان داد. همچنین در ناحیه چندشکلی Indel218 واریانت با بالاترین فراوانی (G) و واریانت با کمترین فراوانی (-) اثرات جایگزینی متفاوتی بر صفت درصد چربی شیر داشتند، اما از نظر آماری اختلافات معنی‌دار نبود. در اینترون ۲۱ جایگاه ژن MAP4K4 در گاوهای هلشتاین چینی دو ناحیه چندشکلی SNP6 و SNP8 گزارش شدند که اثرات معنی‌داری بر درصد چربی شیر داشتند. ژنوتیپ AA در SNP6 و ژنوتیپ GG در SNP8 بالاترین درصد چربی شیر را در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند (Bhattarai *et al.*, 2017). اثرات نژاد و نواحی چندشکلی در ژنوم دام‌ها در ناحیه MAP4K4 بر درصد پروتئین شیر غیرمعنی‌دار بودند ($P>0/05$), هر چند که از نظر عددی تفاوت‌هایی مشاهده می‌گردد. تغییرات بواسطه حذف و اضافه در ناحیه ۲۱۸ اگزون اثرات جایگزینی متفاوت و معنی‌دار بر درصد پروتئین شیر داشت ($P<0/05$) که می‌تواند به عنوان یک نشانگر در انتخاب دام‌ها مورد توجه قرار گیرد. دو ناحیه چندشکلی در اگزون ۱۸ شامل (c.2061T>G) و (c.2196T>C) بر درصد پروتئین و عملکرد تولید شیر در گاوهای هلشتاین چینی مرتبط بودند. بنابراین، ژن MAP4K4 می‌تواند یک ژن کاندیدا مفید برای انتخاب گاوهای شیری

در برابر ورم پستان باشد (Bhattarai *et al.*, 2017). اثر نژاد بر درصد لاکتوز شیر در نژادهای مختلف معنی‌دار بود و شیر گاوهای سیستانی بالاترین درصد لاکتوز و آمیخته‌ها کمترین درصد لاکتوز را داشتند. وجود بالاتر درصد لاکتوز شیر به عنوان تنها قند شیر می‌تواند از نظر تغذیه انسانی و نوزادان حائز اهمیت باشد. اختلاف درصد لاکتوز شیر هلستاین و آمیخته‌ها اختلاف معنی‌دار نداشتند. اثرات واریانت‌های مختلف در دو ناحیه SNP13 و SNP133 بر درصد لاکتوز شیر معنی‌دار نبود ($P>0.05$), هر چند که واریانت G در ناحیه SNP13 و واریانت A در ناحیه SNP133 بالاترین درصد جایگزینی آلی را داشتند. همچنین اثرات جایگزینی واریانت‌ها در ناحیه حذف و اضافه (Indel218) بر درصد لاکتوز شیر معنی‌دار غیرمعنی‌دار بود ($P>0.05$).

درصد ماده خشک در شیر گاوهای سیستانی (۷/۹۲ درصد) بالاتر از گاوهای هلستاین و آمیخته‌ها بود، اما بین هلستاین و آمیخته‌های اختلافات معنی‌داری مشاهده نشد. در جایگاه SNP13 دو واریانت G و T وجود داشتند که میزان اثر آنها بر درصد ماده خشک شیر غیرمعنی‌دار بود ($P>0.05$). همچنین اثرات واریانت‌های مختلف در ناحیه SNP133 بر درصد ماده خشک شیر غیرمعنی‌دار بود ($P>0.05$), اما آلل A اثر بزرگتری (۶/۵۲ درصد) نسبت به آلل G (۶/۰۴ درصد) بر درصد ماده خشک شیر داشت. همچنین اثرات جایگزینی آلل‌ها در ناحیه حذف و اضافه Indel218 بر درصد ماده خشک شیر غیرمعنی‌دار بود، هر چند که باز هم واریانت G اثرات بیشتری نسبت به واریانت (-) بر درصد ماده خشک شیر در جمعیت‌های مورد مطالعه داشت.

جدول ۱۶- میانگین اثرات نژاد و نواحی چندشکل بر درصد چربی شیر در گاوهای هلستاین، سیستانی و آمیخته
سیستانی×سیمنتال (درصد)

Table 16- Average effects of breed and polymorphic regions on milk fat percentage in Holstein, Sistani and Sistani×Simmental crossbred (%)

میانگین صفات کیفی شیر Mean milk quality traits				تعداد	نژاد	منابع تغییرات
ماده خشک بدون چربی Solids non-fat%	لاکتوز Lactose %	پروتئین Protein %	چربی Fat %	Number	Breed	Source of variation
7.92 ^a	4.27 ^a	3.09 ^a	5.05 ^a	9	سیستانی Sistani	اثر نژاد Breed effect
5.44 ^b	2.98 ^{ab}	2.43 ^a	3.20 ^b	10	هلستاین Holstein	
5.04 ^b	2.45 ^b	1.89 ^a	2.84 ^b	5	آمیخته Crossbred	
6.57 ^a	3.53 ^a	2.71 ^a	4.38 ^a	6	T	SNP13
5.55 ^a	3.24 ^a	2.35 ^a	3.95 ^a	18	G	
6.52 ^a	3.55 ^a	2.72 ^a	4.07 ^a	18	A	SNP133
6.04 ^b	3.04 ^a	2.29 ^a	3.29 ^a	6	G	
6.54 ^a	4.47 ^a	4.12 ^a	4.32 ^a	6	-	Idel218
5.87 ^a	3.39 ^a	2.51 ^b	3.96 ^a	18	G	

گروه‌های با حروف غیرمشترک (a, b) بیانگر اختلافات معنی‌دار میانگین‌ها در سطح کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار هستند ($P>0.05$)

نتیجه‌گیری

میزان چندشکلی محدودی در ناحیه ژن MAP4K4 مشاهده شد که با تغییر در رمز ژنتیکی منجر به تغییر آمینواسید در زنجیره پروتئینی گردید. با توجه به ارتباطی که بین برخی از نواحی چندشکل و نواحی حذف و اضافه با صفات شیر مشاهده گردید، می‌تواند به عنوان یک نشانگر مؤثر در بهبود صفات کیفی شیر در گاو مورد توجه قرار گیرد. البته تأکید می‌گردد، این

نتایج مقدماتی بوده و برای تأیید نقش احتمالی MAP4K4 در به‌نژادی گاو، مطالعاتی با نمونه‌های بزرگ‌تر، نژادهای مختلف، تحلیل ژنوتیپی کامل و مدل‌های آماری پیشرفته لازم است. همچنین با توجه به ماهیت ایمنی-محور ژن MAP4K4، احتمال اثر غیرمستقیم یا linkage در مطالعات آینده می‌بایست مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

هزینه پروژه از محل گرنت به شماره IR-UOZ-4398 تامین شده است. نویسندگان مقاله از تمامی مسئولین و همکاران آزمایشگاه مرکزی و مرکز زیست فناوری دانشگاه زابل که شرایط انجام آزمایشات مولکولی را فراهم نمودند، کمال تشکر را دارند.

منابع

Bhattarai, D. and Zhang, S. (2018). Function and mechanism of the map4k4 genes on milk traits and scs between dairy cow and Buffalo (Abstract). *4th International Conference on Biotechnology Applications in Agriculture (ICBAA)*, Benha University, Moshtohor and Hurgada, Egypt.

Bhattarai, D., Chen, X., Rehman, Z., Hao, X., Ullah, F., Dad, R., Talpur, H. S., Kadariya, I., Cui, L., Fan, M. and Zhang, S. (2017). Association of the the MAP4K4 gene single-nucleotide polymorphism with mastitis and milk traits in Chinese Holstein cattle. *Journal of Dairy Research*, 84: 76–79.

Bouzakri, K., Ribaux, P. & Halban, P. A. (2009). Silencing mitogen-activated protein 4 kinase 4 (MAP4K4) protects beta cells from tumor necrosis factor-alpha-induced decrease of IRS-2 and inhibition of glucose-stimulated insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 27892-27898.

Chen, R., Yang, Z., Ji, D., Mao, Y., Chen, Y., Li, Y., Wu, H., Wang, X. & Chang, L. (2011). Polymorphisms of the IL8 gene correlate with milking traits, SCS and mRNA level in Chinese Holstein. *Molecular Biology Reports*, 38: 4083-4088.

Delpire, E. (2009). The mammalian family of sterile 20p-like protein kinases. *Pflugers Archives*, 458: 953–967.

Dror, N., Alter-Koltunoff, M., Azriel, A., Amariglio, N., Jacob-Hirsch, J., Zeligson, S., Morgenstern, A., Tamura, T., Hauser, H., Rechavi, G., Ozato, K. & Levi, B. Z. (2007). Identification of IRF-8 and IRF-1 target genes in activated macrophages. *Molecular Immunology*, 44: 338–346.

Karin, M. and Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, 5: 749–759.

Korber, B. (2000). HIV signature and sequence variation analysis. Computational analysis of HIV molecular sequences, Chapter 4, pages 55-72. Allen G. Rodrigo and Gerald H. Learn, eds. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Librado, P. and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, 25: 1451-1452. doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187.

Lopez, A. and Bonasora, M. G. (2017). Phylogeography, genetic diversity and population structure in a Patagonian endemic plant. *AoB Plants*, 16(4): 275-285.

Mohammadzadeh, K. R., Hedayat-Evrigh, N., Boustan, A., Mirzaei Aghjehgheshlagh, F. and Aghazadeh, L. (2020). Identification of single-nucleotide polymorphism in MAP4K4 related to economic traits in dairy cattle. The Second International Conference and the Sixth National Conference on Organic and Conventional Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili.

Petersen, G. and Seberg, O. (2003). Phylogenetic analyses of the diploid species of *Hordeum* (Poaceae) and a revised classification of the genus. *Systematic Botany*, 28: 293-306. DOI:10.1043/0363-6445-28.2.293.

Sanchez, M. P., Govignon-Gion, A., Ferrand, M., Gelé, M., Pourchet, D., Amigues, Y., Fritz, S., Boussaha, M., Capitan, A. and Rocha, D. (2016). Whole-genome scan to detect quantitative trait loci associated with milk protein composition in 3 French dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 99: 8203–8215. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11437>.

Sanchez, M. P., Govignon-Gion, A., Croiseau, P., Fritz, S., Hozé, C., Miranda, G., Martin, P., Barbat-Leterrier, A., Letaïef, R. and Rocha, D. (2017). Within-breed and multi-breed GWAS on imputed whole-genome sequence variants reveal candidate mutations affecting milk protein composition in dairy cattle. *Genetic Selection Evolution*, 49: 68. doi:10.1186/s12711-017-0344-z.

Tamura K., Stecher G. and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.

Zhang, C., Fan, X., Yu, H. Q., Zhang, H. Q., Wang, X. L. and Zhou, Y. H. (2009). Phylogenetic analysis of questionable tetraploid species in *Roegneria* and *Pseudoroegneria* (Poaceae: Triticeae) inferred from a gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 412-420. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.04.011>.

Zhang, Q., Tyler-Smith, C., Long, Q. (2015). An extended Tajima's D neutrality test incorporating SNP calling and imputation uncertainties. *Stat Interface*, 8(4): 447-456. doi: 10.4310/SII.2015.v8.n4.a4.

Zohn, I. E., Li, Y., Skolnik, E. Y., Anderson, K. V., Han, J. and Niswander, L. (2006). P38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation. *Cell*, 125: 957–969.