

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی
شهید مطهری یاسوج

عنوان:

**بررسی صفت سن بلوغ در پیش مولدین قزل آلا ی رنگین کمان
در مزارع پرورشی به روش مولکولی و بیوانفورماتیک**

مجری مسئول:

سجاد نظری

شماره ثبت

۶۷۶۷۵

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید
مطهری یاسوج

عنوان طرح/پروژه: بررسی صفت سن بلوغ در پیش مولدین قزل آرای رنگین کمان در مزارع پرورشی به روش
مولکولی و بیوانفورماتیک

کد مصوب: ۹۹۰۴۹-۰۵۱-۱۲-۸۸-۰۱۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: سجاد نظری

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد) : سجاد نظری

نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان استانی: -

نام و نام خانوادگی همکار(ان): -

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): مصطفی قادری زفره ای

محل اجرا: استان کهگیلویه و بویراحمد

تاریخ شروع: ۱۳۹۹/۰۷/۰۱

مدت اجرا: ۱ سال و ۹ ماه

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۴

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: بررسی صفت سن بلوغ در پیش مولدین قزل آلا
رنگین کمان در مزارع پرورشی به روش مولکولی و بیوانفورماتیک
کد مصوب: ۰۱۴-۸۸-۱۲-۰۵۱-۹۹۰۴۹

شماره ثبت (فروست): ۶۷۶۷۵ تاریخ: ۱۴۰۴/۰۵/۰۱
با مسئولیت اجرایی جناب آقای سجاد نظری دارای مدرک تحصیلی
دکتری تخصصی در رشته شیلات (ژنتیک آبزیان) است.
پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فراوری آبزیان در
تاریخ ۱۴۰۴/۰۴/۲۲ مورد ارزیابی و بارتبه عالی تأیید گردید.
در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد ☐ پژوهشکده ☐ مرکز ☒ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد
ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده.....		۱
۱-مقدمه.....		۳
۱-۱-پلت فرم های توالی یابی.....		۷
۱-۲-روش های توالی یابی برای شناسایی SNP ها.....		۸
۱-۴-مطالعات گسترده ژنوم، نقشه های پیوستگی و QTLs.....		۱۱
۱-۵-مطالعات در زمینه ژنتیک جمعیت.....		۱۳
۱-۶-ژنتیک صفات کمی.....		۱۵
۱-۷-بلوغ جنسی در ماهیان.....		۱۶
۱-۸-هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH).....		۱۷
۱-۹-ساختار خانواده GnRH.....		۱۸
۱-۱۰-آندروژن ها.....		۱۹
۱-۱۰-۱-نقش فیزیولوژیک آندروژن ها در بلوغ جنسی.....		۲۱
۱-۱۱-ژنتیک مولکولی و برنامه اصلاح نژاد.....		۲۲
۱-۱۱-۱-بهبود ژنتیکی.....		۲۳
۱-۱۲-جایگاه های صفات کمی (QTL).....		۲۳
۱-۱۳-ژن های کاندیدا.....		۲۵
۱-۱۴-منابع ژنومی ماهی قزل الای رنگین کمان.....		۲۵
۱-۱۵-ثبت ارزیابی های فنوتیپی صفات.....		۲۶
۱-۱۶-ارزیابی ژنوتیپی جمعیت با استفاده از نشانگرهای پس زمینه ای یا نشانگرهای پیوسته احتمالی به ژن.....		۲۷
۱-۱۶-۱-نقشه یابی ارتباطی در سطح کل ژنوم.....		۲۷
۱-۱۶-۲-نقشه یابی ارتباطی ژن کاندید.....		۲۷
۱-۱۶-۳-کنترل ژنومی.....		۲۸
۱-۱۶-۴-روش ارتباط ساختاری.....		۲۸
۱-۱۶-۵-مطالعات ارتباطی صفت کمی.....		۲۸
۱-۱۷-فن آوری های پیشرفته ژنومی.....		۲۹
۱-۱۷-۱-روش های توالی یابی.....		۳۰
۱-۱۸-انتخاب به کمک نشانگر (MAS).....		۳۰

۱۹-۱	سوابق تحقیق در داخل و خارج از کشور با تاکید بر نتایج آنها.....	۳۱
۲۰-۱	اهداف و فرضیات.....	۴۲
۲۰-۱-۱	فرضیات پروژه.....	۴۲
۲۰-۲-۱	اهداف پروژه.....	۴۳
۲-	مواد و روش ها.....	۴۴
۲-۱	نمونه برداری.....	۴۴
۲-۲	استخراج RNA از نمونه های بافت ماهیان.....	۴۵
۲-۲-۱	تعیین کیفیت RNA و کمیت RNA نمونه ها.....	۴۶
۲-۳	روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها.....	۴۷
۲-۳-۱	تجزیه و تحلیل آماری و بیوانفورماتیک.....	۴۷
۲-۳-۲	تهیه کتابخانه های مربوط به داده های RNA-seq.....	۴۸
۲-۳-۳-۱	تجزیه و تحلیل داده های RNA-Seq.....	۴۸
۳-۳-۲	شناسایی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی (SNPs).....	۵۰
۳-۳-۲-۴	استخراج داده ها ریز آرایه DNA.....	۵۰
۳-۳-۵	ORF و ترجمه توالی های بدون پروتئین.....	۵۱
۳-۳-۶	طبقه بندی و مطالعات فیلوژنتیک.....	۵۱
۳-۳-۷	پژوهش آندروژن.....	۵۱
۳-۳-۷-۱	استخراج داده ها.....	۵۱
۳-۴	داده های ریز آرایه GSE16030.....	۵۲
۳-۵	شرح کلی داده های مورد استفاده.....	۵۲
۳-۶	شناسایی ژن های متفاوت بیان شده.....	۵۲
۳-۷	نگاشت اسامی کاوشگری به اسامی ژنی.....	۵۳
۳-۸	هستی شناسی و غنی سازی مجموعه ژنی.....	۵۳
۳-۹	بازسازی شبکه تعاملی پروتئینی.....	۵۳
۳-۱۰	بازسازی شبکه بیزی.....	۵۴
۳-۱۱	شناسایی ژن های علی.....	۵۴
۳-	نتایج.....	۵۶
۳-۱	چندشکلی های تک نوکلئوتیدی.....	۵۶
۳-۲	توزیع جایگاههای صفات کمی.....	۵۸

۳-۳	نتایج ریز آرایه DNA.....	۶۱
۳-۴	شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده.....	۶۸
۳-۵	بازسازی شبکه تعاملی پروتئینی.....	۷۲
۴-۴	بحث و نتیجه گیری.....	۷۴
۴-۱	بررسی فیلوژنی.....	۷۴
۴-۲	مسیرهای متابولیک و غنی‌سازی ژن‌های متفاوت بیان شده.....	۷۷
۴-۳	بازسازی شبکه بیزی.....	۷۸
۴-۴	شناسایی ژن‌های هاب.....	۸۲
۴-۵	نقش عملکردی ژن‌های علی.....	۸۲
۴-۶	ژنتیک صفت بلوغ جنسی.....	۸۴
۵-	نتیجه گیری.....	۹۱
	پیشنهادها.....	۹۴
	منابع.....	۹۵
	چکیده انگلیسی.....	۱۰۵

چکیده

زمینه مطالعاتی نقشه یابی ارتباطی اخیراً توجه زیادی را برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی در بسیاری از گونه های آبریان مهم به خود جلب کرده است. دسترسی به فناوریهای نسل جدید توالی یابی، حجم بالایی داده های فوتویی و تنوع زیاد ابزارهای آماری موجب شده است که مطالعات نقشه یابی ارتباطی در آبریان بتواند موفقیت‌های فراوانی را در شناسایی مکانهای ژنی کنترل کننده صفات کمی به همراه داشته باشد. صفت بلوغ جنسی فرایند زیستی پیچیده ای است که توسط مجموعه ای از ژنهای مرتبط به هم کنترل می شوند و با عوامل محیطی برهم کنش دارند و یکی از صفات مهم اقتصادی در آزاد ماهیان و دیگر حیوانات به شمار می رود. مهمترین سازه های (Factors) محیطی که بر صفت بلوغ جنسی تاثیر می گذارند شامل کیفیت و کمیت غذا، تغییرات فصلی و رقابت درون گونه ای و نژاد می باشد. در فصل تکثیر نمونه های کبد و مغز مولدین نر و ماده بالغ دو نژاد اسپانیایی و ایرانی قزل آلای رنگین کمان جهت استخراج RNA ازت مایع نگهداری (۱۹۶-) و به آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج RNA از نمونه ها با روش TRIzol (invitrogen) انجام و در ادامه کیفیت و کمیت RNA با روشهای ژل آگارز و اسپکتروفتومتری بررسی شدند. سپس کتابخانه cDNA ایجاد و توالی یابی از کل ترانسکرپتوم و تجزیه و تحلیل‌های مولکولی و آماری از توالی های بدست آمده با استفاده از بسته های نرم افزاری Cufflinks ۰.۲ و Cuffmerge ۱.۲.۱، SOAPdenovo ۰.۳ انجام گرفتند. این نرم افزارها میزان بیان کلیه ژنهای موجود در ترانسکرپتوم به همراه رونوشت های آنها را برآورد می نمایند. در نهایت، ژنهایی که بین دو گروه از نظر آماری تفاوت معنی داری در میزان بیان نشان داده اند با استفاده از نرم افزار CummeRbund ۰.۲ مصورسازی شد. از ابزار برخط WEBGSAULT برای شناسایی مجموعه های ژنی غنی شده در سه دسته فرایندهای زیستی، اجزای سلولی و فعالیت های مولکولی استفاده گردید. بازسازی شبکه تعاملی پروتئینی با استفاده از پایگاه STRINdb صورت گرفت و ماژول های پروتئینی با استفاده از افزونه MCODE شناسایی شدند. بازسازی شبکه و بالطبع شناسایی ژنهای علی موثر بر بلوغ جنسی در دو سطح (استفاده از اطلاعات ژنهای متفاوت بیان شده و استفاده از ژن های متفاوت بیان شده + میرنا + اسنیپ شناسایی شده از ژنهای علی مرحله قبل) صورت گرفت. پارامترهای شبکه بیزی از بسته نرم افزاری Bnlearn و با استفاده از سه دسته الگوریتم محدودیت گرا (GS، IAMB، FDR، PC، MMPC، HPC)، نمره گرا (HC و TABU) و ترکیبی (RSMAX2، MMHC) برآورد شدند. غنی سازی مجموعه ژنهای متفاوت بیان شده در دسته اجزای سلولی نشان داد اکثر این ژنها در اجزای مجتمع حاوی پروتئین، غشاء و هسته سلولی وجود دارند. در سطح اول بازسازی شبکه (فقط استفاده از اطلاعات ژنهای متفاوت بیان شده) ژنهای NBC، S10I، C4، GNPTG، GA45B و LOC101268926 به عنوان ژن علی موثر بر بلوغ جنسی در بافت بیضه شناسایی شدند. در مرحله دوم بازسازی شبکه با وارد نمودن اطلاعات میرنا و اسنیپ های موثر بر ژنهای علی شناسایی شده از مرحله اول بازسازی شبکه ژنهای NRK2، CYP17A1، GNPTG، NBC، CXCL14، LOC101268926 به عنوان ژن علی نهایی موثر بر بلوغ جنسی در بافت بیضه ماهیان قزل آلا شناسایی شدند. اطلاعات حاصل از بازسازی شبکه تعاملی پروتئینی نشان داد ژنهای درون ماژولی HSD3B، CYP11C1،

CYP17A1، *DMRT1* و *STAR* بر روی صفت بلوغ جنسی حائز اهمیت می‌باشند. در نهایت با تلفیق اطلاعات ژن‌های علی‌الحصول از ۲ روش بازسازی شبکه و ژن‌های درون ماژولی حاصل از پرازش شبکه تعاملی پروتئینی، ژن‌های *S10I*، *NBC*، *GNPTG*، *HSD3B1*، *STAR*، *LOC101268926*، *CYP11C1* و *C4* به عنوان ژن بالادستی و موثر بر بلوغ جنسی بر سایر ژن‌ها در بیضه شناخته شدند. نتایج نشان داد ژن‌های متفاوت بیان شده، امکان درج آنها بطور مجزا در اهداف اصلاح نژادی برای هر گروه مورد مطالعه وجود خواهد داشت. با توجه به اینکه فن آوری جدید RNA - Seq جهت محاسبه بیان ژن‌های مرتبط با صفت بلوغ جنسی در گروه‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در کشور تاکنون انجام پذیرفته است، نتایج نشان داد که QTL‌های هم مکان برای صفات مورد مطالعه وجود دارد که وجود چنین حالتی می‌تواند باعث افزایش کارایی انتخاب به کمک نشانگر و پیشبرد برنامه‌های به نژادی در قزل‌آلای رنگین‌کمان گردد. نتایج پروژه حاضر در زمینه شناسایی ژن‌های مرتبط با صفت بلوغ جنسی و همچنین سازوکارهای مولکولی کنترل کننده این صفت برای این گونه پرورشی بسیار ارزشمند خواهد بود.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، ژنتیک صفات کمی؛ ترانسکریپتوم، توالی یابی نسل جدید، ژنومیکس، ریز

آرایه DNA