

Transcriptomic and differential gene expression analysis using RNA-Seq data in purebred Sistani cattle and its crossbreed with Simmental

هژیر غریبی^۱، جلال رستمزاده^{۲*}، نعمت الله اسدی^{۳*}، محمد رزم کبیر^۴ و محمدحسین بناءبازی^۵

۱. دانشجوی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

۲. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

۳. گروه علوم دامی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج، ایران.

۴. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

۵. گروه علوم دامی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج، ایران.

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
3. Department of Animal Science, Animal Science Research Institute of Iran, Karaj, Iran.
4. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
5. Department of Animal Science, Animal Science Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

Abstract

Background and Objectives: The Sistani cattle, as one of Iran's valuable indigenous breeds, is known for its high resistance to diseases, tolerance to heat and nutritional stress, and excellent adaptation to the harsh climatic and nutritional conditions of the eastern regions of the country. However, its low milk and meat production has limited its commercial utilization. Crossbreeding with high-yielding exotic breeds such as Simmental can create a balance between production efficiency and the preservation of native adaptive traits. Transcriptomic studies using RNA-Seq technology provide a powerful tool to investigate gene expression changes induced by crossbreeding and to identify molecular markers associated with economic and adaptive traits. The aim of this study was to analyze differential gene expression between purebred Sistani cattle and their crosses with the Simmental breed, and to identify the affected biological pathways.

Materials and Methods: Blood samples were collected from the coccygeal vein of purebred Sistani cattle and Sistani × Simmental crossbreds (two biological replicates per treatment) at the Zabol Livestock Breeding Center under identical nutritional, environmental, and management conditions. Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen), and its quality (including RIN score) was assessed with a Bioanalyzer, while purity was evaluated using NanoDrop. Samples were sent to BGI, China, for library construction and sequencing. Initial quality control was performed with FastQC (v0.12.1), and reads were processed using Trimmomatic (version 33/0). High-quality reads were aligned to the cattle reference genome. Transcript assembly and quantification were performed using Cufflinks (FPKM), and differential expression analysis was conducted with Cuffdiff in the R environment. Genes with $q\text{-value} < 0.05$ were identified as differentially expressed genes (DEGs). Gene Ontology (GO) and pathway enrichment analyses were performed using the PANTHER database and Fisher's exact test with FDR correction.

Results: After quality control and alignment, a total of 143 genes showed significant differential expression between the two groups. Data quality was satisfactory, with approximately 74% of forward reads and 73% of reverse reads in the purebred Sistani group, and about 81% and 82% in the crossbred group, uniquely aligned to the reference genome. Among the 20 genes with the greatest expression differences, genes such as *UNC80*, *FBXO16*, *PKHD1*, *SCN10A*, and *RGS16* showed significantly reduced expression, whereas genes such as *BOLA-DQB*, *PRSS2*, *PPP1R1B*, and *BOLA-DQA5* were upregulated. GO and pathway analyses indicated that these genes are mainly involved in processes such as ion transport, regulation of cell growth, response to stimuli, and immune function. Data analysis resulted in the identification of five pathways with a high level of statistical significance ($FDR < 0.05$). These pathways included G Alpha (I) signaling, GPCR downstream signaling, Signaling by GPCR, G Alpha (Q) signaling, and Chemokine receptors bind Chemokines. These pathways are

associated with extracellular signal transduction and responses related to reproduction, milk production, growth, and immune function under stress conditions.

Conclusion: The results indicate that crossbreeding Sistani cattle with the Simmental breed induces profound changes in gene expression profiles and biological pathways, and can be an effective strategy to improve livestock productivity while maintaining adaptation to challenging environments. These findings provide a valuable foundation for marker-assisted breeding programs and targeted selection in indigenous Iranian cattle breeds.

Keywords: Crossbreeding, Differential gene expression, Transcriptome, Sistani cattle, RNA-Seq

تحلیل ترانسکریپتومیک و آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها با استفاده از داده‌های RNA-Seq در گاوهای اصیل سیستانی و آمیخته آن با نژاد سیمنتال

چکیده

سابقه و هدف: گاو سیستانی به‌عنوان یکی از نژادهای بومی ارزشمند ایران، با مقاومت بالا به بیماری‌ها، تحمل تنش‌های گرمایی، سازگاری با شرایط سخت اقلیمی و تغذیه‌ای مناطق شرقی کشور شناخته می‌شود. با این حال، ظرفیت پایین تولید شیر و گوشت، استفاده تجاری از آن را محدود کرده است. آمیخته‌گری با نژادهای پربازده خارجی مانند سیمنتال می‌تواند تعادلی میان بهره‌وری تولیدی و حفظ ویژگی‌های سازگاری بومی ایجاد کند. مطالعات ترانسکریپتومی با فناوری RNA-Seq ابزار قدرتمندی برای بررسی تغییرات بیان ژن ناشی از آمیخته‌گری و شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات اقتصادی و سازگاری فراهم می‌کنند. هدف این مطالعه، تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها بین گاوهای خالص سیستانی و آمیخته‌های آن با نژاد سیمنتال و شناسایی مسیرهای زیستی تحت تأثیر بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خون از سیاهرگ دمی گاوهای نژاد خالص سیستانی و آمیخته سیستانی × سیمنتال (هر تیمار دو تکرار بیولوژیکی) در مرکز اصلاح نژاد دام زابل تحت شرایط تغذیه‌ای، محیطی و مدیریتی یکسان جمع‌آوری شد. RNA کل با کیت RNeasy شرکت Qiagen استخراج و کیفیت آن (شامل شاخص RIN) با دستگاه Bioanalyzer و خلوص با NanoDrop ارزیابی گردید. نمونه‌ها برای ساخت کتابخانه و توالی‌یابی به شرکت BGI در چین ارسال شدند. کنترل کیفیت اولیه با FastQC v0.12.1 انجام شد و خوانش‌ها با Trimmomatic (نسخه ۰/۳۳) ویرایش شدند. خوانش‌های باکیفیت روی ژنوم مرجع گاو همتراز شدند. مونتاژ و کمی‌سازی رونوشت‌ها با Cufflinks (FPKM) و تحلیل بیان افتراقی با Cuffdiff در محیط R صورت گرفت. ژن‌های با $q\text{-value} < 0.05$ به‌عنوان DEG شناسایی شدند. تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) و غنی‌سازی مسیرهای زیستی با پایگاه PANTHER و آزمون فشر دقیق (با تصحیح FDR) انجام شد.

نتایج: پس از کنترل کیفیت و همترازی، در مجموع ۱۴۳ ژن با بیان افتراقی معنی‌دار بین دو گروه شناسایی شد. کیفیت داده‌ها مطلوب بود، بطوریکه در گروه خالص سیستانی حدود ۷۴٪ خوانش‌های پیش‌رو و ۷۳٪ خوانش‌های پس‌رو و در گروه آمیخته حدود ۸۱٪ و ۸۲٪

به طور یکتا بر ژنوم مرجع همتراز شدند. از ۲۰ ژن با بیشترین تفاوت بیان، ژنهای *SCN10A*, *PKHD1*, *FBXO16*, *UNC80* و *RGS16* در آمیخته ها کاهش معنی دار بیان نشان دادند، در حالی که ژنهای *BOLA-DQA5* و *PPP1R1B*, *PRSS2*, *BOLA-DQB* افزایش بیان داشتند. تحلیل GO و مسیرهای زیستی نشان داد این ژن ها عمدتاً در فرآیندهایی مانند انتقال یون، تنظیم رشد سلولی، پاسخ به محرک ها و عملکرد ایمنی نقش دارند. تحلیل داده ها منجر به شناسایی پنج مسیر با سطح معنی داری آماری بالا ($FDR < 0.05$) شد. این مسیرها شامل سیگنالینگ *G Alpha (I)*، سیگنالینگ پایین دستی *GPCR*، سیگنالینگ توسط *GPCR*، سیگنالینگ *G Alpha (Q)* و تعامل گیرنده های کموکاین با کموکاین ها بودند. این مسیرها با انتقال سیگنال های خارج سلولی، پاسخ های مرتبط با تولید مثل، تولید شیر، رشد و عملکرد ایمنی تحت شرایط استرس مرتبط بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد آمیخته گری گاو سیستانی با نژاد سیمنتال تغییرات عمیقی در پروفایل بیان ژن و مسیرهای زیستی ایجاد می کند و می تواند راهبرد مؤثری برای بهبود بهره وری دام در عین حفظ سازگاری با محیط های چالش برانگیز باشد. این یافته ها مبنای ارزشمندی برای برنامه های اصلاحی مبتنی بر نشانگرهای مولکولی و انتخاب هدفمند در نژادهای بومی ایران فراهم می آورد.

کلمات کلیدی: آمیخته گری، بیان افتراقی ژن، ترانسکریپتوم، گاو سیستانی، RNA-Seq

مقدمه

گاو سیستانی، به عنوان یکی از نژادهای بومی ارزشمند کشور شناخته می شود. با این حال، این نژاد به دلیل ظرفیت نسبتاً پایین در تولید شیر، کمتر مورد استفاده تجاری قرار گرفته است. آمیخته گری ژنتیکی گاو سیستانی با نژادهای پرتولید خارجی مانند سیمنتال، که دارای پتانسیل بالایی در رشد و تولید شیر هستند، می تواند به ایجاد توازن مطلوبی میان بهره وری تولیدی و ویژگی های سازگاری منجر شود. این رویکرد نه تنها بهره وری اقتصادی را افزایش می دهد، بلکه به حفظ و استفاده هدفمند از ذخایر ژنتیکی بومی نیز کمک می کند. گاوهای بومی ایران به ویژه نژاد سیستانی به عنوان یکی از منابع ارزشمند ژنتیکی، نقش مهمی دามداری سنتی و روستایی کشور ایفا می کنند. این نژادها که در طی قرن ها به طور طبیعی با شرایط اقلیمی و زیست محیطی ایران سازگار شده اند، ویژگی های منحصر به فردی مانند مقاومت به بیماری ها، تحمل شرایط سخت محیطی و بهره وری اقتصادی نسبی دارند.

گاو نژاد سیمنتال به دلیل عملکرد عالی در تولید شیر و کیفیت لاشه، جایگاه مهمی در بازارهای گوشت و شیر دارند (Xu و همکاران، ۲۰۲۱). علاوه بر این، گاو سیمنتال و دیگر نژادهای دو منظوره نسبت به نژادهای شیری مانند هلشتاین، طول عمر بیشتری به دلیل سخت جانی بیشتر و تاب آوری بهتر در برابر بیماری ها و استرس دارند (Buonaiuto و همکاران، ۲۰۲۴). مطالعات نشان داده اند که آمیخته گری می تواند طول عمر، باروری و تولید شیر را در گاوهای بومی بهبود بخشد. همچنین آمیخته گری با برنامه ریزی دقیق به طور موفقیت آمیزی باعث افزایش تولید چربی و پروتئین شیر، بهبود نرخ تلقیح، نرخ بقا و کاهش تعداد روزهای بدون آبستنی در مقایسه با گاوهای خالص شده اند (Vanraden و Sanders، ۲۰۰۳؛ Hazel و همکاران، ۲۰۱۷).

استفاده از داده های وسیع پساژنومی، به ویژه داده های ترانسکریپتومی، در اصلاح نژاد دام به عنوان منبعی ارزشمند از اطلاعات دقیق و قابل اعتماد شناخته می شود که می تواند نقش مهمی در ارتقای ژنتیکی حیوانات اهلی ایفا کند (بنابازی، ۱۳۹۶). بررسی تفاوت های بیان ژن ها یا ایزوفرم های آن ها میان دو نمونه، امکان شناسایی ژن ها یا ایزوفرم های فعال را فراهم می سازد. داده های حاصل از RNA-Seq ابزار مناسبی برای انجام چنین تحلیل هایی در سطح بیان ژن به شمار می روند (سلیم پور و همکاران، ۱۳۹۵).

برای ارزیابی اثربخشی برنامه های آمیخته گری، معمولاً نیاز به جمع آوری سوابق عملکرد و اندازه گیری شاخص های تطبیقی وجود دارد؛ اما این فرآیند اغلب دشوار، زمان بر و پرهزینه است. در این راستا، تعیین پروفایل ترانسکریپتومی و مقایسه آن بین حیوانات والد خالص و

آمیخته می‌تواند به عنوان روشی جایگزین و کارآمد مورد استفاده قرار گیرد (Moridi و همکاران، ۲۰۱۹). تحلیل ترانسکریپتوم نژادهای مختلف، به‌ویژه نژادهای بومی و آمیخته‌های آن‌ها با نژادهای پرتولید خارجی، می‌تواند به درک بهتر نقش بیان ژن‌ها در شکل‌گیری فنوتیپ حیوان و تفاوت‌های ژنتیکی بین آن‌ها کمک کند. این اطلاعات امکان شناسایی نشانگرهای زیستی مؤثر را برای به‌کارگیری در برنامه‌های اصلاحی فراهم می‌سازد. از طریق مطالعه هم‌زمان بیان کلی ژن‌ها در یک بافت مشخص، می‌توان ژن‌هایی را که به‌طور معنی‌داری دچار تغییر در میزان بیان شده‌اند، شناسایی کرد. سپس با انجام تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (Gene Ontology Analysis)، می‌توان مسیرهای زیستی و ژن‌هایی را که تحت تأثیر آمیخته‌گری قرار گرفته‌اند، مشخص نمود.

بنابراین، هدف کلی این تحقیق، بررسی تأثیر آمیخته‌گری گاوهای سیستانی با نژاد سیمنتال بر پروفایل ترانسکریپتومی گاوهای آمیخته سیستانی × سیمنتال با استفاده از داده‌های RNA-Seq است. این مطالعه با هدف تحلیل تغییرات در سطح بیان ژن‌ها، شناسایی ژن‌های کلیدی و مقایسه الگوهای ترانسکریپتومی بین گاوهای بومی سیستانی و آمیخته‌های حاصل از تلاقی با نژاد سیمنتال انجام شده است. همچنین، از طریق تحلیل هستی‌شناسی ژن، تلاش شده است تا مسیرهای زیستی و فرایندهای سلولی مؤثر در تفاوت‌های بیان ژن‌ها شناسایی شوند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

از سیاهرگ دمی گاوهای نژاد خالص سیستانی و آمیخته‌های آن با نژاد سیمنتال (۲ تیمار و برای هر تیمار ۲ تکرار بیولوژیکی) نمونه‌گیری خون انجام شد. نمونه‌های خون بلافاصله در لوله‌های حاوی ضد انعقاد جمع‌آوری گردیدند. شایان ذکر است که تمامی دام‌ها در مرکز اصلاح نژاد دام زابل (واقع در زهک، زابل، استان سیستان و بلوچستان، ایران) و تحت شرایط یکنواخت تغذیه‌ای، محیطی و مدیریتی نگهداری می‌شدند و همچنین فاقد هرگونه بیماری بودند.

استخراج و توالی‌یابی RNA

استخراج RNA کل با بهره‌گیری از کیت RNeasy شرکت Qiagen (والنسیا، کالیفرنیا، ایالات متحده آمریکا) و بر اساس دستورالعمل‌های ارائه‌شده توسط سازنده انجام شد. مقدار و کیفیت RNA استخراج‌شده، شامل شاخص یکپارچگی RNA (RIN)، با استفاده از دستگاه Bioanalyzer (Agilent Technologies) ارزیابی گردید. همچنین خلوص و غلظت RNA به‌وسیله دستگاه NanoDrop ND-1000 سنجیده شد و نسبت جذب A260/A280 در بازه ۱/۹ تا ۲/۱ قرار داشت. در مرحله نهایی، نمونه‌های RNA جهت تهیه کتابخانه‌های cDNA و انجام توالی‌یابی به شرکت BGI درشنژن^۱، چین ارسال شدند.

کنترل کیفیت و جمع‌آوری رونوشت‌ها

برای ارزیابی کیفیت اولیه داده‌های توالی‌یابی، از نرم‌افزار FastQC v0.12.1 (نسخه ۰/۱۲/۱) استفاده شد (Andrews، ۲۰۱۰). فرآیند ویرایش خوانش‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Trimmomatic (نسخه ۰/۳۳) انجام گرفت (Bolger و همکاران، ۲۰۱۴). در این مرحله، آداپتورها حذف شده و خوانش‌هایی با کیفیت پایین یا طول نامناسب ویرایش یا حذف شدند. فهرست آداپتورهای مورد استفاده در طی ساخت کتابخانه‌ها و توالی‌یابی، بر اساس تنظیمات پیش‌فرض نرم‌افزار و نوع دستگاه تعیین گردید. حداقل طول قابل قبول برای خوانش‌ها

¹ Shenzhen, China

پس از فیلترینگ، ۵۰ جفت‌باز در نظر گرفته شد (با توجه به اینکه طول اولیه تمام خوانش‌ها ۷۵ جفت‌باز بود). در پایان، برای هر نمونه دو فایل خروجی فشرده تولید شد. فایل اول شامل خوانش‌های ویرایش‌شده (جفت‌شده یا جفت‌نشده) که در آنالیزهای پایین‌دستی مورد استفاده قرار گرفت و فایل دوم شامل خوانش‌های حذف‌شده به دلیل کیفیت پایین بود.

در ادامه، شمارش و کمی‌سازی رونوشت‌ها با استفاده از نرم‌افزار Cufflinks (نسخه ۲/۲/۱) و در حالت تنظیمات پیش‌فرض انجام شد (Tarpnell و همکاران، ۲۰۱۰). میزان فراوانی رونوشت‌ها به صورت FPKM (تعداد قطعات در هر کیلوباز از رونوشت در هر میلیون قطعه توالی‌یابی‌شده)^۲ محاسبه گردید. سپس داده‌های به‌دست‌آمده در نرم‌افزار Cuffdiff (نسخه ۲/۲/۱) برای نرمال‌سازی و تحلیل سطح بیان ژن‌ها به کار گرفته شد.

شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEG)

پس از انجام مونتاژ رونوشت‌ها، از نرم‌افزار Cuffdiff (نسخه ۲/۲/۱) در محیط R جهت شناسایی ژن‌ها و رونوشت‌های دارای بیان افتراقی بین گاوهای نژاد سیستانی و آمیخته‌های آن استفاده شد. ژن‌هایی که مقدار q-value آن‌ها (که نشان‌دهنده‌ی مقادیر P اصلاح‌شده بر اساس نرخ کشف نادرست) کمتر از ۰/۰۵ بود، به‌عنوان ژن‌های با بیان متفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

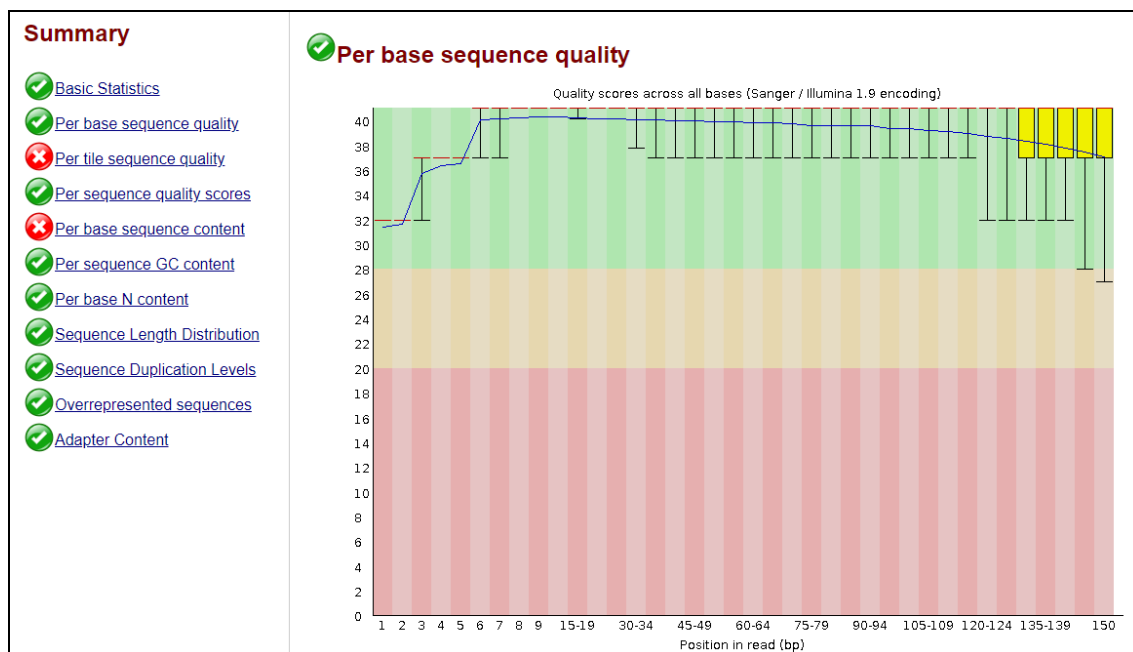
برای نمایش گرافیکی الگوهای بیان ژن، از بسته‌ی نرم‌افزاری cummeRbund (نسخه ۲/۴۸) استفاده گردید (Goff و همکاران، ۲۰۲۴). به منظور تحلیل زیستی دقیق‌تر و بررسی عملکرد ژن‌های دارای بیان متفاوت، از پایگاه داده‌ی PANTHER (<http://www.pantherdb.org>) در ماه مارچ ۲۰۲۵ بهره گرفته شد. در این مرحله، فهرست ژن‌های شناسایی‌شده به پایگاه مذکور وارد شد و طبقه‌بندی عملکردی آن‌ها بر اساس سیستم Gene Ontology (GO) انجام گرفت.

در ادامه، آزمون غنای عملکردی (Functional Enrichment Analysis) با استفاده از آزمون دقیق فیشر و به‌کارگیری تصحیح نرخ کشف خطا (FDR) انجام شد تا از شناسایی نتایج کاذب جلوگیری شود. در نهایت، اصطلاحات GO که مقدار p-value آن‌ها کمتر از حد آستانه ($p < 0.05$) بود، به‌عنوان دسته‌های عملکردی غنی‌شده در نظر گرفته شدند و برای تفسیر بیولوژیکی نتایج بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج

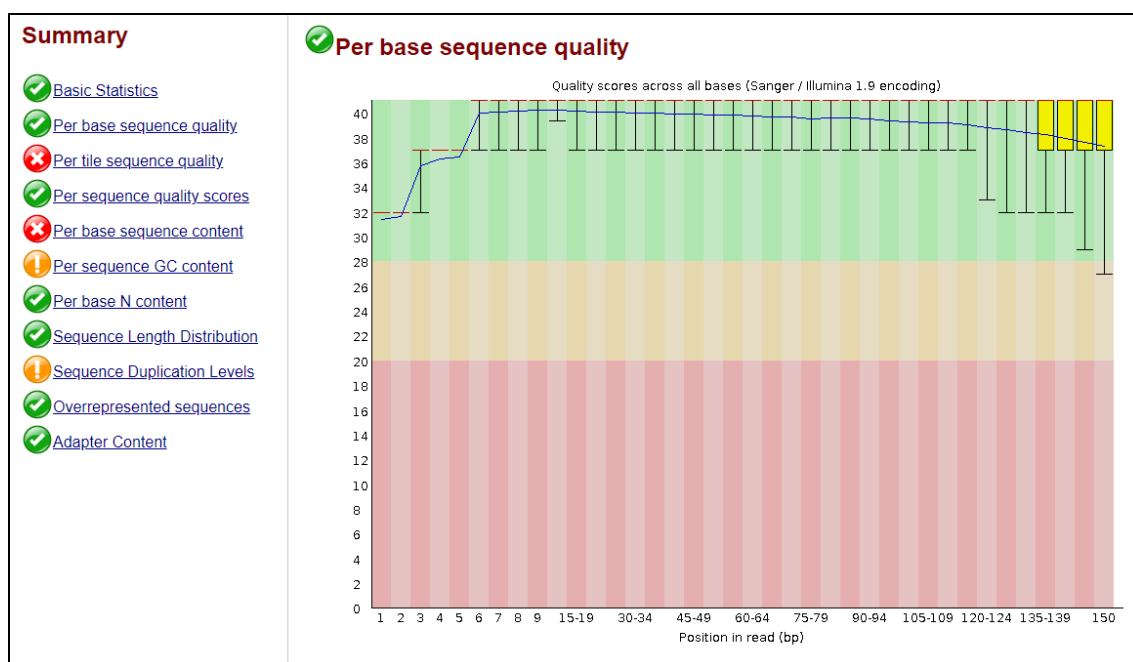
پس از تبدیل فرمت خوانش‌های RNA-Seq به fastq، کنترل کیفیت اولیه داده‌ها به‌عنوان نخستین و مهم‌ترین گام در مسیر آنالیز بیوانفورماتیکی انجام شد. در این مرحله، نرم‌افزار FastQC با نمونه‌گیری تصادفی از کل خوانش‌ها، شاخص‌های مختلف کیفیت را ارزیابی کرده و نتایج را به صورت میانگین برای کل داده‌ها گزارش می‌کند. این نرم‌افزار مجموعه‌ای از آزمون‌های ده‌گانه سنجش کیفیت را شامل می‌شود. این آزمون‌ها مواردی از جمله کیفیت توالی به ازای هر باز، محتوا و توزیع نوکلئوتیدی، درصد GC، وجود آداپتورها، توالی‌های تکراری و سایر شاخص‌های کلیدی را در بر می‌گیرند. خلاصه نتایج مربوط به وضعیت قبولی، هشدار یا رد آزمون‌های کیفی، به همراه نمودارهای گرافیکی کیفیت هر نوکلئوتید، برای خوانش‌های پیش‌رو نمونه‌های دو گروه نژادی شامل سیستانی خالص و آمیخته سیستانی × سیمنتال، به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. این ارزیابی اولیه، تضمین‌کننده صحت و اعتبار داده‌ها برای مراحل بعدی تحلیل، از جمله هم‌ترازی با ژنوم مرجع و آنالیز بیان ژن‌ها خواهد بود.

² Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments



شکل ۱- خلاصه نتایج آزمون‌های ده‌گانه سنجش کیفیت و آزمون کیفیت انفرادی نوکلئوتیدهای خوانش‌های پیش‌رو برای نژاد خالص سیستانی

Figure 1. Summary of Results from the Ten Quality Assessment Tests and Individual Nucleotide Quality Test for Forward Reads in Purebred Sistani Breed



شکل ۲- خلاصه نتایج آزمون‌های ده‌گانه سنجش کیفیت و آزمون کیفیت انفرادی نوکلئوتیدهای خوانش‌های پیش‌رو برای آمیخته سیستانی × سیمنتال

Figure 2. Summary of Results from the Ten Quality Assessment Tests and Individual Nucleotide Quality Test for Forward Reads in Sistani × Simmental Crossbred

هم‌ردیفی و مکان‌یابی خوانش‌ها روی ژنوم مرجع

از مجموع ۵۵,۱۳۴,۸۸۴ خوانش پیش‌رو و ۶۶,۰۱۶,۲۹۲ خوانش پس‌رو به‌دست‌آمده پس از ویرایش در نمونه‌های نژاد خالص سیستانی، به‌ترتیب ۷۴/۱۵٪ و ۷۴/۶٪ از خوانش‌ها به‌طور دقیق بر ژنوم مرجع هم‌تراز (مکان‌یابی) شدند. علاوه بر این، بیش از پنج درصد از کل خوانش‌ها دارای هم‌ردیفی چندگانه بودند، به این معنا که با چندین ناحیه متفاوت از ژنوم به‌طور همزمان تطابق داشتند. در میان این خوانش‌های چندمکانی، بیش از ۲۱ هزار خوانش شناسایی شد. در نمونه‌های آمیخته سیستانی × سیمنتال، پس از ویرایش ۸۷,۹۱۸,۶۱۴ خوانش پیش‌رو و ۹۷,۶۳۰,۵۹۶ خوانش پس‌رو، به‌ترتیب ۸۱/۳۵ درصد و ۸۲/۶۵ درصد از خوانش‌ها به‌درستی بر روی ژنوم مرجع (UMD3.1 ویرایش ۸۲) مکان‌یابی شدند. کمتر از چهار درصد از خوانش‌ها دارای هم‌ردیفی در چندین موقعیت ژنومی بودند و به عبارتی هم‌ردیفی چندگانه نشان دادند. از میان این خوانش‌ها، بیش از ۸۹ هزار خوانش با بیش از ۲۰ ناحیه مختلف ژنومی هم‌ردیف گردیدند.

جدول ۱- نتایج کنترل کیفیت و آمار خوانش‌های توالی‌یابی RNA-Seq در گاوهای سیستانی و آمیخته‌های سیستانی × سیمنتال

Table 1 — Results of Quality Control and Statistics of RNA-Seq Sequencing Reads in Sistani Cattle and Sistani × Simmental Crossbreeds

گروه	تعداد کل خوانش‌های خام (پیش‌رو + پس‌رو)	تعداد خوانش‌ها پس از ویرایش (پیش‌رو + پس‌رو)	خوانش‌های پیش‌رو	خوانش‌های پس‌رو	تعداد خوانش‌های حذف‌شده	درصد Q30	درصد GC
سیستانی	۱۲۹۹۹۰۵۳۲	۱۲۱۱۵۱۱۷۶	۵۵,۱۳۴,۸۸۴	۶۶,۰۱۶,۲۹۲	۸۸۴۸۸۲۴	۹۱/۴	۴۴
سیستانی-سیمنتال	۱۹۹۸۵۲۳۶۶	۱۸۵۵۴۹۲۱۰	۸۷,۹۱۸,۶۱۴	۹۷,۶۳۰,۵۹۶	۱۴۱۵۲۱۲۰	۹۰/۹	۵۳

به‌طور کلی، نتایج حاصل از هم‌ردیفی و مکان‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع نشان‌دهنده‌ی کیفیت مطلوب داده‌های RNA-Seq در نمونه‌های مورد مطالعه بود. درصد بالای مکان‌یابی یکتا در هر دو گروه (نژاد خالص سیستانی و آمیخته سیستانی × سیمنتال) حاکی از کیفیت خوب استخراج RNA، آماده‌سازی کتابخانه و انجام توالی‌یابی است. اگرچه در تمامی نمونه‌ها بخشی از خوانش‌ها دارای هم‌ردیفی چندگانه بودند، این میزان در محدوده‌ی قابل قبول برای مطالعات ژنومی قرار داشت. هم‌ردیفی چندگانه‌ی مشاهده‌شده، به‌ویژه در خوانش‌هایی که با بیش از ۲۰ موقعیت ژنومی انطباق یافته‌اند، می‌تواند ناشی از وجود نواحی تکراری، توالی‌های همولوگ یا بخش‌های با شباهت زیاد در ژنوم باشد.

ژن‌های دارای بیان افتراقی بین گروه‌های نژادی مورد مطالعه

جدول ۲- ژن‌های با بیان افتراقی در گاوهای آمیخته سیستانی × سیمنتال نسبت به نژاد سیستانی خالص

Table ۲. Differentially Expressed Genes in Simmental Crossbred Cattle Compared to Purebred Sistani Cattle

ژن	مکان ژن	مقدار p تصحیح شده	لگاریتم تغییر بیان ژن (fold change)
UNC80	2: 97594468-97825038	0.01039	-4.91
FBXO16	8: 10241809-10316186	0.01091	-4.33
PKHD1	23: 24071283-24512957	0.01039	-4.19
SCN10A	22: 12103623-12196624	0.01039	-4.19
LRP2	2: 26854365-27031117	0.00618	-4.09

-4.06	0.01039	X: 88031783-88044256	DGKK
-4.03	0.00178	16: 12697340-12701441	RGS16
-3.99	0.01091	16: 18892333-19815906	USH2A
-3.93	0.01091	21: 58036110-58335936	UNC79
-3.91	0.01039	23: 12560570-12888873	DNAH8
-3.59	0.00642	6: 88946394-88948465	CXCL2
-3.50	0.00908	10: 1518392-1814679	EPB41L4A
-3.38	4.14E-06	16: 12697340-12701441	RGS1
-2.90	0.00020	2: 61250149-61253862	CXCR4
3.71	0.00041	29: 49726614-49736576	IFITM1
4.03	1.73E-06	11: 49225782-49228238	LOC104968634
4.43	0.00019	23: 25631958-25643878	BOLA-DQA5
4.73	5.58E-10	19: 40006493-40015037	PPP1R1B
4.91	7.28E-13	4: 106071891-106075636	PRSS2
9.18	6.22E-20	23: 25607507-25620857	BOLA-DQB

در جدول لگاریتم تغییر بیان ژن (Fold Change)، علامت "+" نشان‌دهنده افزایش بیان ژن و علامت "-" نشان‌دهنده کاهش بیان ژن در آمیخته‌ها نسبت به سیستمی است.

در این مطالعه، مجموعاً ۱۴۳ ژن به‌عنوان ژن‌های با تفاوت بیان معنی‌دار میان گاوهای خالص سیستمی و آمیخته‌های سیستمی × سیمنتال شناسایی شدند. جدول ۲ فهرستی از ۲۰ ژن را ارائه می‌دهد که بالاترین میزان تفاوت در سطح بیان را بین گاوهای اصیل سیستمی و آمیخته‌های حاصل از تلاقی آن با نژاد سیمنتال نشان داده‌اند. این ژن‌ها با بیشترین مقادیر تغییر بیان بیشترین مقادیر مثبت و منفی (Fold Change) انتخاب شده‌اند.

آنالیز غنی‌سازی هستی‌شناسی و مسیر ژن

جدول ۳ نتایج حاصل از تحلیل غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن^۳ (GO) و مسیرهای زیستی (Pathway Analysis) را برای ژن‌های با بیان متفاوت میان نژاد خالص سیستمی و آمیخته‌های آن با نژاد سیمنتال ارائه می‌دهد. این تحلیل نشان داد که پنج مسیر زیستی به‌طور معنی‌داری غنی شده‌اند ($FDR\ P < 0.05$) و تفاوت‌های بارزی در سطح عملکرد بیولوژیکی ژن‌ها میان این دو گروه وجود دارد. مسیرهای شناسایی شده عمدتاً درگیر در فرآیندهای تنظیم رشد سلولی، انتقال سیگنال، پاسخ به محرک‌های محیطی و عملکردهای مرتبط با ایمنی بوده‌اند که می‌توانند نقشی کلیدی در سازگاری یا تفاوت‌های عملکردی ناشی از آمیخته‌گری ایفا کنند.

جدول ۳- نتایج آنالیز غنی‌سازی هستی‌شناسی و مسیر ژن‌های متفاوت بیان شده بین دو نژاد خالص سیستمی و سیستمی × سیمنتال

Table ۳. Results of Gene Ontology Enrichment Analysis and Pathway Analysis for Differentially Expressed

Genes Between Purebred Sistani and Sistani × Simmental

مسیر	ژن	مقدار P تصحیح شده
------	----	-------------------

³ Gene Ontology (GO)

0.001	<i>RGS1, RGS16, PPP1R1B, CXCR4, CXCL2</i>	G Alpha (I) signaling events
0.001	<i>RGS1, RGS16, PPP1R1B, CXCR4, DGKK, CXCL2</i>	GPCR downstream signaling
0.001	<i>RGS1, RGS16, PPP1R1B, CXCR4, DGKK, CXCL2</i>	Signaling by GPCR
0.019	<i>RGS1, RGS16, DGKK</i>	G Alpha (Q) signaling events
0.019	<i>CXCR4, CXCL2</i>	Chemokine receptors bind Chemokines

بحث

آمیخته‌گری بین نژادهای بومی گاو با نژادهای خارجی با تولید بالا می‌تواند روشی مناسب برای افزایش سطح تولید در نژادهای دورگه حاصل باشد. در ایران حداقل شش جمعیت گاو بومی شامل سرابی، گلپایگانی، سیستانی، دشتیاری، نجدی و تالشی وجود دارد (Kamalzadeh et al. 2008). این جمعیت‌های بومی مقاومت خوبی در برابر بیماری‌ها داشته و با شرایط نامساعد محیطی سازگار هستند، اما تولید شیر این نژادها در مقایسه با نژادهای خارجی پایین است. از سوی دیگر، استفاده از روش‌های اصلاحی مانند انتخاب درون نژادی نیازمند زمانی طولانی است تا عملکرد جمعیت نهایی به یک سطح مطلوب برسد (Moridi et al. 2019). بنابراین، یکی از برنامه‌های اصلاحی برای بهبود تولید در نژادهای بومی، آمیخته‌گری این نژادها با نژادهای خارجی با عملکرد بالا برای ترکیب ویژگی‌های مطلوب هر دو نژاد است.

نتایج این پژوهش منجر به شناسایی ۱۴۳ ژن با بیان افتراقی معنادار بین گاوهای اصیل سیستانی و آمیخته‌های سیستانی × سیمنتال شد. این ژن‌ها دارای الگوهای متفاوتی از افزایش یا کاهش بیان بودند که می‌تواند بازتاب‌دهنده تفاوت‌های زیستی و فیزیولوژیکی میان این دو گروه ژنتیکی باشد. تحلیل این ژن‌ها زمینه را برای درک بهتر سازوکارهای مولکولی مرتبط با رشد، ایمنی، متابولیسم و سازگاری با شرایط محیطی فراهم می‌سازد و می‌تواند در شناسایی مارکرهای مولکولی مؤثر برای به‌نژادی دام مورد استفاده قرار گیرد.

در جدول ۲، چهارده ژن دارای کاهش معنی‌دار بیان در آمیخته‌ها نسبت به نژاد سیستانی هستند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به *UNC80*، *FBXO16*، *PKHD1* و *RGS1* اشاره کرد. این ژن‌ها عمدتاً در مسیرهای سیگنال دهی، انتقال یونی، تنظیم رشد سلولی و پاسخ به محرک‌ها نقش دارند و کاهش بیان آن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت در کارکردهای فیزیولوژیک و متابولیک بین نژاد خالص و آمیخته باشد (Stray-Pedersen و همکاران، ۲۰۱۶؛ Sharp و همکاران، ۲۰۰۵). در مقابل، ۶ ژن از جمله *PPP1R1B*، *BOLA-DQB* و *IFITM1* افزایش بیان معنی‌داری در آمیخته‌ها نشان داده‌اند. افزایش چشمگیر بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی نظیر *BOLA-DQB* (با بیشترین میزان تغییر بیان معادل ۹/۱۸) نشان‌دهنده فعالیت قوی‌تر ایمنی در آمیخته‌هاست (Hendam و همکاران، ۲۰۲۳). ژن *PPP1R1B* که افزایش بیان داشت، با فرآیندهای مرتبط با تنظیم رشد و کیفیت گوشت در ارتباط است (Casamayor and Arino, 2020). این یافته‌ها بیانگر تفاوت‌های بارز در تنظیم ژنتیکی مسیرهای ایمنی، متابولیک و رشدی بین دو گروه ژنتیکی مورد بررسی است و می‌تواند مبنای مناسبی برای مطالعات کاربردی در زمینه به‌نژادی و اصلاح دام فراهم سازد.

ژن *PPP1R1B* نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی مختلف دارد. این ژن پروتئینی را کد می‌کند که به عنوان یک مهار کننده پروتئین فسفاتاز ۱ (PP1) عمل می‌کند، آنزیمی که در فرآیندهای دفسفوریلاسیون بسیار مهم است. مشابه عملکرد آن در گونه‌های دیگر، *PPP1R1B* احتمالاً در انتقال عصبی در گاو نقش دارد. این ژن با مسیرهای سیگنال‌دهی دوپامینرژیک مرتبط است که برای فرآیندهای عصبی مختلف از جمله رفتار، شناخت و پاسخ به محرک‌ها ضروری است. در گاو، *PPP1R1B* ممکن است در عملکرد عضلانی نیز نقش داشته باشد، زیرا مسیر PP1 در انقباض و آرامش عضلانی نقش دارد که می‌تواند بر صفات مربوط به کیفیت گوشت، مانند تردی اثر داشته باشد. همچنین از طریق نقش تنظیمی خود در سیگنال‌دهی سلولی ممکن است بر رشد و نمو تأثیر بگذارد. از دیگر فعالیت‌های این ژن می‌توان به فرآیندهایی مانند رشد سلولی، تمایز و متابولیسم اشاره کرد (Casamayor and Arino, 2020).

در زمینه بررسی جایگاه‌های SNP و ارتباط آن با بیان ژن، نتایج ما با گزارش‌های فرزانه دیزج و همکاران (۱۴۰۱) که بر روی نژادهای سیستمی و سیمتال کار کرده بودند، همخوانی دارد. آن‌ها نشان دادند که درصد بالایی از SNP‌های شناسایی شده در نژادهای آمیخته سیستمی از نوع عملکردی و ایمنی بودند.

ژن *UNC80* بخشی از یک مجموعه بزرگتر است که با تنظیم کانال‌های یونی در ارتباط است. *UNC80* یک جزء حیاتی از کانال NALCN است که یک مجموعه پروتئینی که کانال نشن سدیم (NALCN) را تنظیم می‌کند. این کانال نقش مهمی در حفظ پتانسیل غشای استراحت و تحریک‌پذیری عصبی با اجازه دادن به نشن اندک و ثابت یون‌های سدیم به داخل سلول ایفا می‌کند (Lear و همکاران، ۲۰۱۳). اگرچه مطالعات دقیق این ژن در گاو محدود است، اما در گونه‌های دیگر مانند انسان و موش، *UNC80* برای عملکرد صحیح نورون‌ها حیاتی شناخته شده است. این ژن به تنظیم تحریک‌پذیری عصبی کمک می‌کند و بر فرآیندهایی مانند تنفس ریتمیک و سایر عملکردهای خودمختار تأثیر می‌گذارد (Chen و همکاران، ۲۰۲۴).

علاوه بر ژن‌های *BOLA-DQB* و *PPP1R1B* که به عملکرد آن‌ها اشاره شد، ژن *PRSS2* دارای بیان متفاوت بالایی در آمیخته‌ها بود. ژن *PRSS2* در گاو، پروتئینی به نام تریپسین-۲ را کد می‌کند که عضوی از خانواده سرین مرتبط با پروتئازهای تریپسین است. این آنزیم‌ها با شکستن پیوندهای پپتیدی در تجزیه پروتئین‌ها نقش دارند. تریپسین-۲، آنزیمی که توسط ژن *PRSS2* تولید می‌شود، با تجزیه پروتئین‌های رژیم غذایی به پپتیدهای کوچک‌تر که می‌توانند بیشتر هضم شده و به عنوان اسیدهای آمینه جذب شوند، نقش مهمی در فرآیند گوارش ایفا می‌کند. تریپسین-۲ همچنین به فعال شدن سایر آنزیم‌های گوارشی از پیش‌سازهای غیرفعال آن‌ها (زیموژن‌ها) کمک می‌کند. به عنوان مثال، کیموتریپسینوژن را به کیموتریپسین فعال می‌کند که به هضم پروتئین کمک می‌کند. در گاو، مانند سایر پستانداران، عملکرد مناسب ژن *PRSS2* برای هضم کارآمد و سلامت کلی دستگاه گوارش ضروری است (Lu و همکاران، ۲۰۲۴؛ Abo-Ismael و همکاران، ۲۰۱۳).

در این مطالعه، ژن‌های با بیان افتراقی در گاوهای سیستمی خالص و آمیخته‌های آن با نژاد سیمتال در ۵ مسیر بیولوژیکی بطور معنی‌دار درگیر بودند. از میان این مسیرها، رویدادهای سیگنال‌دهی G آلفا I (*G Alpha (I) signaling events*) دارای بیشترین معنی‌داری بود. این مسیر بیولوژیکی بخشی از مجموعه وسیع‌تری از مکانیسم‌های سیگنالینگ است که شامل پروتئین‌های G است که سوئیچ‌های مولکولی درون سلول‌ها هستند. این پروتئین‌ها نقش مهمی در انتقال سیگنال‌ها از بیرون سلول به داخل آن دارند و به سلول اجازه می‌دهند به محیط خود پاسخ دهد. سیگنالینگ G آلفا I (*I*) نقش مهمی در تنظیم هورمون‌های تولید مثل دارد (McCudden و همکاران، ۲۰۰۵). به عنوان مثال، پاسخ سلول‌ها به گنادوتروپین‌ها را که برای عملکرد تخمدان‌ها و بیضه‌ها ضروری هستند، تعدیل می‌کند. سیگنال‌دهی مناسب از طریق این مسیر برای باروری طبیعی و تأثیر بر فرآیندهایی مانند بلوغ تخمک، تخمک‌گذاری و تولید اسپرم بسیار مهم است (Bernard و همکاران، ۲۰۱۹). این مسیر همچنین با کنترل عملکرد هورمون‌هایی مانند انسولین به تنظیم متابولیسم انرژی کمک می‌کند. سیگنال‌دهی انسولین شامل مسیرهای G آلفا I (*I*) است که بر جذب گلوکز و تعادل انرژی تأثیر می‌گذارد که برای حفظ رشد و تولید شیر بسیار مهم است. این مسیر همچنین بر عملکرد سلول‌های ایمنی تأثیر می‌گذارد. پاسخ به سیتوکین‌ها و کموکین‌های مختلف را تعدیل می‌کند و در توانایی سیستم ایمنی برای پاسخ به عفونت‌ها و التهاب نقش دارد. علاوه بر این، عملکرد مناسب این مسیر برای حفظ هموستاز تحت استرس مهم است (Tuteja، ۲۰۰۹؛ Blumer و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین مطالعه McCabe و همکاران (2012) بر کبد گاوهای گوشتی نشان داد که تغییرات بیان ژن بر متابولیسم و تعادل انرژی تأثیرگذار است. یافته‌های ما که در آن مسیرهای انرژی، رشد و استرس فعال شده‌اند نیز نشان‌دهنده همین پویایی هستند. همچنین، بیان بالاتر ژن‌های *BOLA-DQB* و *PPP1R1B* در آمیخته‌ها نشان‌دهنده تقویت مسیرهای ایمنی و پاسخ به استرس است؛ یافته‌ای که با نتایج Aida و Takeshima (2006) مطابقت دارد.

در یک مطالعه، Moridi و همکاران (۲۰۱۹) تفاوت‌های پنج جمعیت گاو را در یک برنامه آمیخته‌گری با استفاده از فناوری توالی‌یابی RNA برای توصیف ترانسکریپتوم آن‌ها مطالعه کردند. در این برنامه آمیخته‌گری، گاوهای خالص هلشتاین و تالشی با آمیخته‌های خود از جمله ۵۰٪ پدر تالشی و مادر هلشتاین، ۵۰٪ پدر هلشتاین و مادر تالشی و ۷۵٪ هلشتاین مقایسه شدند. این محققان ۲۲۶۲ ژن با بیانی افتراقی را شناسایی کردند که از میان آن‌ها ۲۵۱ ژن به طور منحصربه‌فرد در نژادهای خالص یا آمیخته‌ها بیان می‌شدند. تجزیه و تحلیل

عملکردی این ژن‌ها نشان داد که پاسخ ایمنی و التهابی بیشترین تأثیر را در مسیرها و عملکردها دارند. مطالعات پیشین در زمینه تحلیل ترانسکریپتوم در دام‌های بومی مانند ساهیوال (Das et al., 2018) و کلیستانی (بنا‌بازی و همکاران، ۱۳۹۶؛ سلیم‌پور و همکاران، ۱۳۹۵) نیز بر نقش بیان افتراقی ژن‌ها در پاسخ به محیط و استرس تأکید داشتند. در پژوهش ما، افزایش بیان ژن‌های ایمنی با نتایج آن‌ها هماهنگ است و تأیید می‌کند که نژادهای بومی به‌طور طبیعی در برابر بیماری‌ها مقاوم‌تر هستند. مسیرهای شناسایی شده در این آنالیز، از جمله مسیرهای سیگنال دهی GPCR و مسیر اتصال گیرنده‌های کموکین به کموکین‌ها، ارتباط تنگاتنگی با فرآیندهای کلیدی مرتبط با پاسخ ایمنی، تنظیم التهاب، و مقاومت بدن در برابر عوامل بیماری‌زا دارند. این مسیرها نشان می‌دهند که تفاوت‌های بیان ژنی مشاهده شده بین دو نژاد سیستانی و سیستانی × سیمنتال، ممکن است بر توانایی سیستم ایمنی و پاسخ به استرس تأثیر بگذارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که آمیخته‌گری بین نژاد بومی سیستانی و نژادهای پرتولید خارجی مانند سیمنتال می‌تواند نه تنها بر صفات ظاهری و عملکردی، بلکه به‌طور عمیق‌تری بر الگوهای بیان ژن‌ها و مسیرهای بیولوژیکی اثرگذار باشد. شناسایی ۱۴۳ ژن با بیان افتراقی معنادار بین گاوهای خالص سیستانی و آمیخته‌های سیستانی × سیمنتال، تفاوت‌های اساسی در تنظیم مسیرهای فیزیولوژیکی کلیدی مانند سیستم ایمنی، متابولیسم، رشد و عملکرد عصبی را نشان داد. به‌ویژه، افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی و کاهش بیان برخی ژن‌های مرتبط با مسیرهای سیگنال‌دهی و گوارش در آن‌ها نسبت به نژاد سیستانی، حاکی از تفاوت‌های بنیادین در نحوه سازگاری با محیط و تنظیم عملکردهای زیستی است. علاوه بر این، مسیر سیگنال‌دهی G آلفا (I) به‌عنوان مهم‌ترین مسیر تغییر یافته در اثر آمیخته‌گری شناسایی شد؛ مسیری که در تنظیم تولیدمثل، متابولیسم انرژی و عملکرد ایمنی نقش کلیدی دارد. این یافته‌ها نه تنها درک دقیق‌تری از اثرات مولکولی آمیخته‌گری فراهم می‌کنند، بلکه می‌توانند در طراحی برنامه‌های اصلاح نژاد مبتنی بر نشانگرهای ژنتیکی برای بهینه‌سازی صفات عملکردی و سازگاری نژادهای بومی مورد استفاده قرار گیرند. در مجموع، نتایج حاصل پتانسیل ارزشمند آمیخته‌گری هدفمند در ارتقای عملکرد تولید دام‌های بومی ایران را نشان می‌دهد، مشروط بر آنکه تفاوت‌های ژنتیکی و زیستی به‌خوبی در فرایند اصلاح نژاد لحاظ شوند.

سپاسگزاری

نگارنده بر خود لازم می‌داند مراتب سپاس و قدردانی صمیمانه خود را از مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور به‌دلیل فراهم‌آوردن داده‌ها و امکانات لازم برای انجام این پژوهش ابراز دارد. شایان ذکر است بخشی از مراحل آزمایشگاهی این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام شده است که بدین‌وسیله از همراهی، راهنمایی‌ها و حمایت‌های علمی و فنی ایشان صمیمانه تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

از همکاران محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل و ایستگاه اختصاصی گاو بومی سیستانی نیز به سبب همکاری در فرآیند نمونه‌گیری خون دام‌ها و فراهم‌سازی شرایط اجرای بخش میدانی پژوهش، نهایت سپاس و قدردانی به‌عمل می‌آید.

در پایان، نگارنده از دانشگاه علوم کشاورزی اوپسالای سوئد (Swedish University of Agricultural Sciences - SLU) و جناب آقای دکتر سرتن آندونوف (Seten Andonov) به‌واسطه‌ی صدور دعوت‌نامه، اختصاص فضای کاری و فراهم‌سازی دسترسی به زیرساخت‌های محاسباتی که زمینه انجام تحلیل‌های داده‌ای این پژوهش را فراهم ساختند، تشکر و امتنان فراوان دارد.

References

بنابازی، م.ح.، نجاتی جورامی، ا.، ایمومورین، ا.گ.، قادری زفرهای، م.، میرایی آشتیانی، س.ر. ۱۳۹۶. توجیه واریانس ژنتیکی صفت باقیمانده مصرف خوراک با چند شکلیهای تک نوکلئوتیدی کشف شده بر روی ترانسکریپتوم گاو هلشتاین. نشریه علوم دامی. شماره ۱۱۴: ۱۸۲-۱۶۹.

سلیمپور، م.، میرائی آشتیانی، س.ر.، بنابازی، م.ح. ۱۳۹۸. بیان افتراقی ژن گاوهای بوس تاروس (هلشتاین) و بوس ایندیکوس (کلیستانی) با استفاده از داده‌های RNA-Seq. مجله علوم دامی ایران، ۵۰(۱)، ۴۷-۵۵.

فرزانه دیزج، ر.، امین افشار، م.، اسماعیل خانیان، س.، امام جمعه کاشان، ن.، بنابازی، م.ح. ۱۴۰۱. شناسایی چندشکلیهای تک نوکلئوتیدی بر روی ترانسکریپتوم گاو نژادخالص سیستانی و آمیخته سیستانی با گاوهای هلشتاین، سیمتال و مونت بیلارد. نشریه پژوهشهای تولیدات دامی. شماره ۳۵: ۱۴۹-۱۵۷.

Abo-Ismael, M.K., Kelly, M.J., Squires, E.J., Swanson, K.C., Bauck, S. & Miller, S.P. (2013). Identification of single nucleotide polymorphisms in genes involved in digestive and metabolic processes associated with feed efficiency and performance traits in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 91(6): 2512–2529.

Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online] Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Bernard, D., Li, Y., Toufaily, C. & Schang, G. (2019). Regulation of gonadotropins. Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.01372>

Blumer, J.B., Smrcka, A.V. & Lanier, S.M. (2007) Mechanistic pathways and biological roles for receptor-independent activators of G-protein signaling. *Pharmacology & Therapeutics*, 113(3): 488-506.

Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114-2120.

Buonaiuto, G., Visentin, G., Costa, A., Niero, G., Degano, L. & Cavallini, D. (2024). The effect of first-lactation calving season milk production and morphology on the survival of Simmental cows. *Animal*, 18: 101128 doi:10.1016/j.animal.2024.101128.

Casamayor, A., & Ariño, J. (2020). Chapter Eight – Controlling Ser/Thr protein phosphatase PP1 activity and function through interaction with regulatory subunits. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 122, 231-288.

Das, R., Gupta, I. D., Verma, A., Chaudhari, M. V., & Singh, L. S. S. (2018). Identification of SNPs in ATP1A1 gene and their association with heat tolerance in Sahiwal and Karan Fries (Bos taurus × Bos indicus) cattle under tropical climatic condition. *Indian J Dairy Sci*, 71(4), 409-415.

Hendam, B., Ghanem, H., Marghani, B.H., Ismail, U. & Ateya, A. (2023). Gene expression of immune growth and lipogenic markers in Holstein Simmental and Brown Swiss calves. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 76(1).

Chen, H.W., Ma, C.P., Chin, E., Chen, Y.T., Wang, T.C., Kuo, Y.P., Su, C.H., Huang, P.J. & Tan, B.C.M. (2014). Imbalance in Unc80 RNA Editing Disrupts Dynamic Neuronal Activity and Olfactory Perception. *International Journal of Molecular Science*, 25: 5985.

Goff, L., Trapnell, C. & Kelley, D. (2024). cummeRbund: Analysis exploration manipulation and visualization of Cufflinks high-throughput sequencing data (R package version 2480) <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/cummeRbund.html>

Hazel, A.R., Heins, B.J. & Hansen, L.B. (2017). Fertility survival and conformation of Montbéliarde× Holstein and Viking Red× Holstein crossbred cows compared with pure Holstein cows during first lactation in 8 commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100(11): 9447-9458.

Kamalzadeh, A.M., Rajabbaigy, A. & Kiasat. (2008). Livestock production systems and trends in livestock industry in Iran. *Journal of Agriculture and Social Sciences*, 4: 183-188.

- Lear, B.C., Darrah, E.J., Aldrich, B.T., Gebre, S. & Scott, R.L. (2013). UNC79 and UNC80 Putative Auxiliary Subunits of the NARROW ABDOMEN Ion Channel Are Indispensable for Robust Circadian Locomotor Rhythms in *Drosophila*. *PLOS ONE*, 8(11): e78147.
- Lu, H., Zhao, Z., Yu, H., Iqbal, A. & Jiang, P. (2024). The serine protease 2 gene regulates lipid metabolism through the LEP/ampk α 1/SREBP1 pathway in bovine mammary epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 698: 149558.
- McCabe, M., Waters, S., Morris, D., Kenny, D., Lynn, D., & Creevey, C. (2012). RNAseq analysis of differential gene expression in liver from lactating dairy cows divergent in negative energy balance. *BMC genomics*, 13(1), 1-11.
- McCudden, C.R., Hains, M.D., & Kimple, R.J. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 551–577.
- Moridi, M., Hosseini Moghaddam, S.H., Mirhoseini, S.Z. & Bionaz, M. (2019). Transcriptome analysis showed differences of two purebred cattle and their crossbreds. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1): 70-79.
- Sharp, A., Messiaen, L., Page, G., Antignac, C., Gubler, M., Onuchic, L., Somlo, S., Germino, G. & Guay-Woodford, L. (2005). Comprehensive genomic analysis of PKHD1 mutations in ARPKD cohorts. *Journal of Medical Genetics*, 42(4): 336–349.
- Stray-Pedersen, A., Cobben, J.M., Prescott, T., Lee, S., Cang, C., Aranda, K., Ahmed, S., Alders, M., Gerstner, T., Aslaksen, K., Tetreault, M., Qin, W., Hartley, T., Jhangiani, S.N., Muzny, D.M., Tarailo-Graovac, M., van Karnebeek, C.D.M., Lupski, J.R., Ren, D. & Yoon, G. (2016). Biallelic mutations in UNC80 cause persistent hypotonia encephalopathy growth retardation and severe intellectual disability. *American Journal of Human Genetics*, 98(1): 202–209.
- Takeshima, S.N., & Aida, Y. (2006), Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal*, 77: 138-150.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J. & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28: (5)511.
- Tuteja, N. (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signaling & Behavior*, 4(10): 942–947.
- VanRaden, P.M. & Sanders, A.H. (2003). Economic merit of crossbred and purebred US dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86(3): 1036-1044.
- Xu, L., Niu, Q., Chen, Y., Wang, Z., Li, H. & Xu, L. (2021). Validation of the prediction accuracy for 13 traits in Chinese simmental beef cattle using a preselected low-density SNP panel. *Animals*, 11: 1890.