

تحلیل ترانسکریپتومیک و شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی در گاو اصیل سیستانی و آمیخته‌های سیستانی-هلستاین با بهره‌گیری از داده‌های RNA-Seq

هژیر غریبی^۱، جلال رستم‌زاده^{۲*}، نعمت‌الله اسدی^{۳*}، محمد رزم‌کبیر^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. رایانامه:

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

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

(DOI) شناسه دیجیتال

10.22092/ASJ.2026.371355.2522

Transcriptomic Analysis and Identification of Differentially Expressed Genes in Purebred Sistani Cattle and Sistani-Holstein Crosses Using RNA-Seq Data

By: Hazhir Gharibi¹, Jalal Rostamzadeh^{2*}, Nematollah Asadi^{3*}, Mohammad Razmkabir⁴, Mohammad Hossein Banabazi⁵

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.

تحلیل ترانسکریپتومیک و شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی در گاو اصیل سیستانی و آمیخته‌های سیستانی-هلشتاین با استفاده از داده‌های RNA-Seq

چکیده

مطالعات ترانسکریپتومیک ابزاری توانمند برای شناسایی مسیرهای زیستی و نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با صفات اقتصادی و مقاومت به بیماری در دام هستند. هدف این پژوهش، شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی میان گاو اصیل سیستانی و آمیخته‌های آن با هلشتاین به وسیله تحلیل ترانسکریپتوم خون بود. نمونه‌های خون از دو گروه (گاو خالص سیستانی و آمیخته سیستانی-هلشتاین؛ هر گروه با دو تکرار بیولوژیکی) جمع‌آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از کنترل کیفیت خوانش‌ها، داده‌ها با ابزارهای Cufflinks پیش‌پردازش و هم‌ترازسازی شدند. تحلیل بیان افتراقی با استفاده از نرم‌افزار Cuffdiff انجام گرفت و تفاوت بیان ژن‌ها بر اساس معیار $FDR < 0.05$ ارزیابی شد. برای ارزیابی غنای مسیرهای زیستی و دسته‌بندی عملکردی ژن‌ها نیز از پایگاه داده PANTHER و آزمون دقیق فیشر با تصحیح FDR استفاده گردید. تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها نشان داد که در مجموع ۱۹۴ ژن بین دو گروه تفاوت معناداری دارند. تحلیل عملکردی این ژن‌ها بیانگر نقش آن‌ها در مسیرهای مرتبط با پاسخ ایمنی، متابولیسم گونه‌های اکسیژن و اکشن‌پذیر (ROS) و انتقال سیگنال‌های سلولی بود. کاهش بیان ژن‌های مرتبط با انتقال اکسیژن (*HBA* و *HBB*) و افزایش بیان ژن‌های خانواده MHC (*BOLA-DQB*) در آمیخته‌ها، ممکن است نشان‌دهنده‌ی سازش‌های فیزیولوژیکی ناشی از تلاقی دو نژاد باشد. همچنین، تغییرات در ژن‌های چرخه سلولی (*p21*) و پاسخ به استرس (*DDIT4*) تأثیر آمیخته‌گری بر مکانیسم‌های محافظتی سلولی را آشکار ساخت. یافته‌های حاضر بیانگر آن است که تلاقی گاو سیستانی با نژاد هلشتاین می‌تواند ضمن حفظ بخشی از مزایای مقاومت نژاد بومی، به بهبود صفات تولیدی منجر شود.

کلیدواژه‌ها: ترانسکریپتوم، RNA-Seq، گاو سیستانی، آمیخته‌گری، بیان افتراقی ژن

آمیخته‌گری نژادهای بومی با نژادهای پرتولید خارجی به منظور افزایش کارایی و حفظ ویژگی‌های مقاومت محیطی، از راهبردهای مؤثر اصلاح ژنتیکی دام در مناطق گرمسیری است. گاو سیستانی (*Bos indicus*) یکی از مهم‌ترین نژادهای گوشتی شناخته‌شده در ایران، توانایی بالایی در تحمل تنش‌های محیطی و مقاومت به بیماری‌ها دارد، اما از نظر نرخ رشد و تولید گوشت در سیستم‌های پرورشی استاندارد عملکردی پایین‌تر از نژادهای تجاری دارد (Moridi et al., 2019). در سال‌های اخیر، به دلیل کاهش چرای آزاد و جایگزینی آن با تغذیه کنسانتره که از نظر اقتصادی برای دامداران مقرون به صرفه نیست، تمایل به پرورش نژاد خالص سیستانی کاهش یافته و گرایش به تلاقی آن با نژادهای خارجی پرتولید مانند هلشتاین و سیمنتال افزایش یافته است (Kamalzadeh et al., 2008). آمیخته‌گری به‌ویژه در مناطق گرمسیری و شرایط نامطلوب محیطی به عنوان روشی اصلاحی برای افزایش تولید شیر و گوشت بدون کاهش چشمگیر مقاومت و سازگاری دام‌ها کاربرد دارد (Favero et al., 2019; Kebede et al., 2018). این حال، ارزیابی دقیق این برنامه‌ها مستلزم ثبت سوابق عملکردی و شاخص‌های فیزیولوژیک است که اغلب هزینه‌بر و دشوار می‌باشد. در این راستا، شناخت مولکولی تغییرات ناشی از آمیخته‌گری می‌تواند با بهره‌گیری از فناوری‌های نوین ترانسکریپتومیک مورد بررسی قرار گیرد (Moridi et al., 2019). ترانسکریپتومیکس یکی از رویکردهای مهمی است که در سطح مولکولی استفاده شده است. این روش به طور موفقیت‌آمیزی و در طیف وسیعی به کار گرفته شده است (Astuti et al, 2025). تحلیل ترانسکریپتوم یک تکنیک ارزشمند برای شناسایی مولکول‌ها و تنظیم‌کننده‌های حیاتی بر اساس الگوهای بیان ژن است (Nayan et al., 2022).

استفاده از داده‌های گسترده پساژنومی، به‌ویژه اطلاعات ترانسکریپتومی، در اصلاح نژاد دام به عنوان منبعی ارزشمند از داده‌های دقیق و باکیفیت است که می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر بهبود ژنتیکی حیوانات اهلی داشته باشد (بناءزی، ۱۳۹۶). با تعیین تغییرات بیان ژن‌ها یا ایزوفرم‌های آن‌ها بین دو نمونه، انجام تجزیه و تحلیل‌های بیان ژن می‌تواند برای شناسایی ژن‌ها یا ایزوفرم‌های بیان شده ممکن شود. داده‌های RNA-Seq می‌توانند برای تجزیه و تحلیل‌های بیان ژن استفاده شوند (سلیم پور و همکاران، ۱۳۹۵). مطالعات ترانسکریپتومیک با استفاده از فناوری RNA-Seq امکان شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی و مسیرهای زیستی مرتبط با صفات تولیدی، مقاومت به بیماری و سازگاری محیطی را فراهم می‌کند. درک تفاوت‌های موجود در بیان ژن‌ها میان نژادهای بومی و تلاقی‌یافته می‌تواند منجر به شناسایی نشانگرهای زیستی ارزشمند و طراحی برنامه‌های اصلاح نژادی دقیق‌تر گردد. با وجود مطالعات محدود بر ترانسکریپتوم گاوهای بومی ایران، تاکنون پژوهش جامعی بر پایه داده‌های RNA-Seq در نژاد سیستانی و آمیخته‌های آن با هلشتاین انجام نشده است. این پژوهش درصدد است این خلأ را با تحلیل الگوی بیان ژن در سطح ترانسکریپتوم برطرف سازد.

هدف این پژوهش بررسی بیان افتراقی ژن‌های سلول‌های خونی گاوهای سیستانی و آمیخته‌های سیستانی-هلشتاین و شناسایی ژن‌های کلیدی مؤثر بر سازگاری و تولید بود. انتظار می‌رود نتایج این پژوهش علاوه بر روشن ساختن تفاوت‌های بیولوژیکی میان دو گروه، ژن‌های کلیدی مؤثر بر تولید و سازگاری را شناسایی کرده و مبنایی برای طراحی برنامه‌های آمیخته‌گری هدفمند در شرایط اقلیمی ایران فراهم سازد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

خونگیری از سیاهرگ دمی نژادهای خالص سیستانی و آمیخته آن با هلشتاین (۵۰ درصد سیستانی - ۵۰ درصد هلشتاین) انجام شد. هر تیمار شامل دو تکرار بیولوژیکی مستقل بود و نمونه‌ها به صورت pooled جمع‌آوری شدند. نمونه‌های خون به لوله‌های حاوی ضد انعقاد انتقال یافتند. لازم به ذکر است که خونگیری از دام‌هایی صورت گرفت که تحت شرایط یکسان تغذیه، محیطی و مدیریتی واقع در مرکز اصلاح نژاد دام زابل (زهک، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران) قرار داشتند.

استخراج و توالی‌یابی RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت RNAeasy شرکت Qiagen (کیاژن، والنسیا، کالیفرنیا، آمریکا) و مطابق دستورالعمل‌های سازنده انجام گرفت.

غلظت کل RNA و کیفیت mRNA (مقدار RIN) با استفاده از دستگاه Bioanalyzer ساخت شرکت Agilent Technologies تعیین شد. کیفیت و خلوص RNA با استفاده از نانودراپ (NanoDrop ND-1000) ارزیابی شد. غلظت RNA استخراج شده ۷۵-۱۲۰ ng/μl، نسبت A260/A280 بین ۱/۹-۲/۱ و نسبت A260/A230 بین ۲/۳-۲/۰ بود. در نهایت به منظور تولید کتابخانه cDNA و توالی‌یابی، نمونه‌ها به شرکت BGI چین (Shenzhen, China) ارسال شدند.

کنترل کیفیت و جمع‌آوری رونوشت‌ها

توالی‌یابی با استفاده از پلتفرم Illumina NextSeq 2000 به صورت paired-end 150 bp انجام شد. برای هم‌ترازسازی خوانش‌ها از ژنوم مرجع *Bos taurus* ARS-UCD1.2 استفاده گردید. کنترل کیفیت داده‌های توالی‌یابی شده با استفاده از نرم‌افزار FastQC v0.12.1 انجام شد (Andrews, 2010). از نرم‌افزار Cufflinks v2.2.1 با تنظیمات پیش فرض برای جمع‌آوری رونوشت‌ها استفاده شد. فراوانی رونوشت‌ها به عنوان "قطعات در هر کیلو باز رونوشت در هر میلیون قطعه توالی‌یابی شده" توسط Cufflinks گزارش شد. سپس، این داده‌ها در Cuffdiff v2.2.1.0 به عنوان سطح بیان نرمال شده، مورد استفاده قرار گرفت (Trapnell et al., 2010).

در این مطالعه ویرایش خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic v0.33 (Bolger et al. 2014) انجام شد. این مرحله شامل حذف آداپتورها و حذف یا ویرایش خوانش‌های بی کیفیت می‌باشد. فهرست آداپتورهای به کار رفته در هنگام انجام توالی‌یابی و تشکیل کتابخانه‌های مورد نیاز و با توجه به دستگاه مورد استفاده برای توالی‌یابی به صورت پیش فرض در برنامه قرار داده شدند. پارامترهای مورد استفاده شامل ILLUMINACLIP:2:30:10، LEADING:3، TRAILING:3، SLIDINGWINDOW:4:20 و MINLEN:50 بودند. نتیجه ایجاد دو فایل خروجی فشرده (جفت شده یا ویرایش شده و جفت نشده) برای هر یک از فایل‌های حاوی خوانش‌های رفت و برگشتی است که فایل ویرایش شده برای تجزیه‌های پایین دستی مورد استفاده قرار گرفت و فایل حاوی خوانش‌های بی کیفیت و جفت نشده حذف شدند.

همچنین هم‌ردیفی خوانش‌های کوتاه بر روی ژنوم مرجع با استفاده از نرم‌افزار TopHat v2.1.1 انجام شد. این نرم‌افزار به‌طور پیش‌فرض از Bowtie2 به‌عنوان ابزار هم‌ردیف‌کننده بهره می‌گیرد (Langmead and Salzberg, 2012).

شناسایی ژن‌های دارای بیان افتراقی^۱ (DEG)

پس از جمع‌آوری رونوشت‌ها، از نرم‌افزار R و Cuffdiff v2.2.1.0 برای شناسایی ژن‌ها و رونوشت‌های متفاوت بیان شده بین گاوهای سیستمی و آمیخته مورد استفاده قرار گرفت. برای تحلیل بیان افتراقی، مقادیر FPKM تولیدشده توسط Cufflinks به Cuffdiff وارد شد. اگر مقدار q (مقادیر P تصحیح شده نرخ کشف نادرست) کمتر از 0.05 بود، تفاوت در بیان ژن‌ها معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای بررسی دقیق‌تر ماهیت بیولوژیکی ژن‌های دارای بیان متفاوت و هستی‌شناسی ژن‌ها از پایگاه داده‌ی PANTHER (<http://www.pantherdb.org>) استفاده شد. ابتدا اسامی ژن‌های مورد نظر به این پایگاه داده وارد شد و دسته‌بندی عملکردی آن‌ها بر اساس سامانه‌ی Gene Ontology انجام گرفت. سپس آزمون غنای عملکردی (enrichment analysis) برای شناسایی دسته‌هایی انجام شد که نسبت به انتظار آماری به‌طور معنی‌داری بیشتر حضور داشتند. این آزمون با استفاده از روش آزمون دقیق فشر^۲ و با اعمال تصحیح نرخ کشف خطا (FDR^۳) صورت گرفت تا از نتایج کاذب جلوگیری شود. در نهایت، اصطلاحات عملکردی^۴ که دارای مقدار p کمتر از حد آستانه بودند، به عنوان اصطلاحات غنی‌شده^۵ معرفی شدند و برای تفسیر بیولوژیکی داده‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج و بحث

سنجش کیفیت داده‌ها

داده‌های بدست آمده بیانگر کیفیت انفرادی نوکلئوتیدی خوانش‌های پیش‌رو می‌باشد (شکل‌های ۱ و ۲).

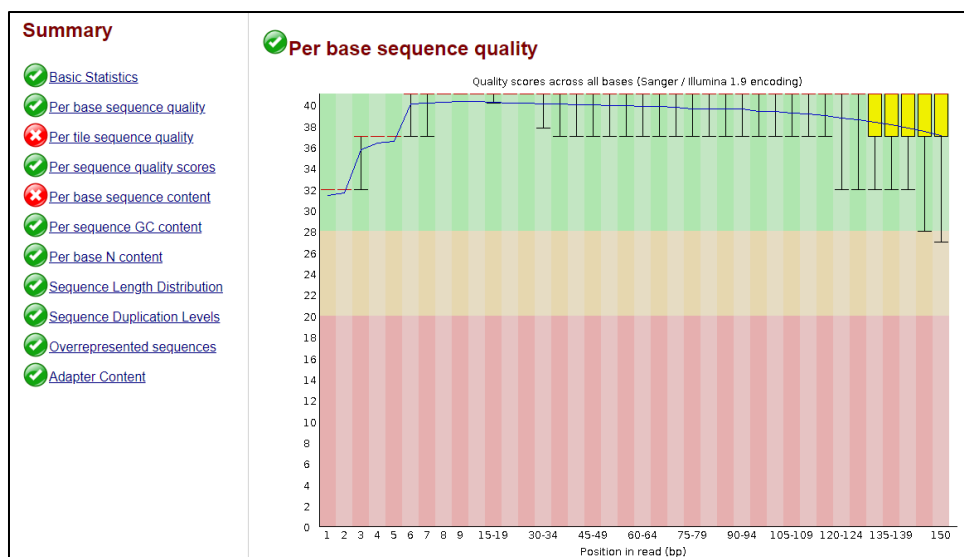
^۱ Differentially Expressed Genes

^۲ Fisher's Exact Test

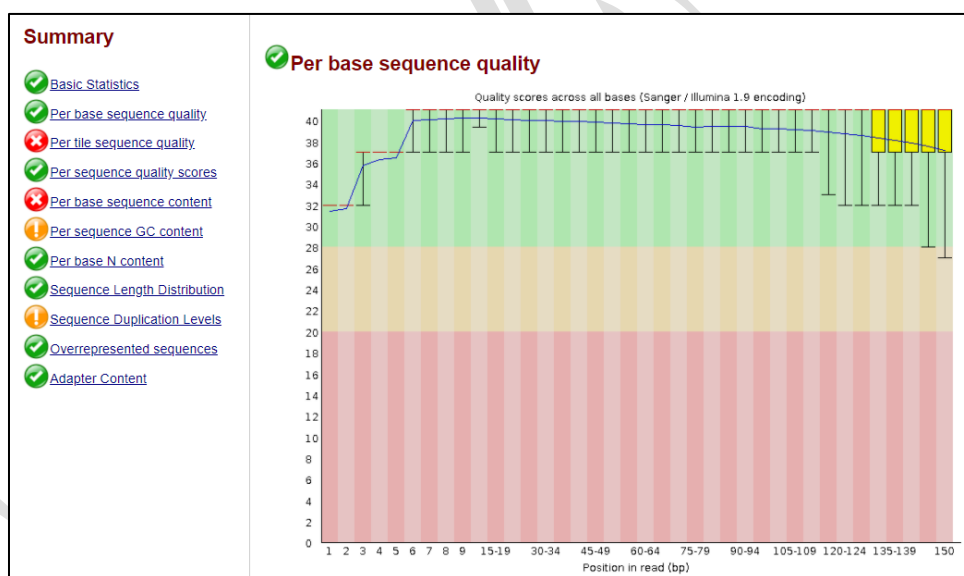
^۳ False Discovery Rate

^۴ Functional Terms

^۵ Enriched Terms



شکل ۱: خلاصه نتایج آزمون‌های ده گانه سنجش کیفیت و آزمون کیفیت انفرادی نوکلئوتیدهای خوانش‌های پیش‌رو برای نژاد خالص سیستانی



شکل ۲: خلاصه نتایج آزمون‌های ده گانه سنجش کیفیت و آزمون کیفیت انفرادی نوکلئوتیدهای خوانش‌های پیش‌رو برای آمیخته سیستانی-هلشتاین

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها

تحلیل ترنسکرپتوم خون رویکردی غیرتهاجمی برای بررسی الگوهای بیان ژن و شناسایی نشانگرهای زیستی مرتبط با سلامت فراهم می‌کند. شواهد پژوهشی نشان می‌دهند که RNA استخراج شده از خون کامل می‌تواند به عنوان

منبعی از نشانگرهای زیستی بیان ژنی مرتبط با سلامت متابولیکی و تغذیه استفاده شود، به گونه‌ای که در برخی موارد با بیان ژن در سایر بافت‌ها قابل مقایسه است (Petrov et al., 2016).

نتایج مربوط به کنترل کیفیت نشان دادند که کیفیت توالی‌یابی در هر دو گروه نژادی سیستانی و آمیخته سیستانی-هلشتاین در بیشتر طول خوانش‌ها در سطح بالایی قرار دارد (شکل‌های ۱ و ۲). اگرچه در ابتدای خوانش‌ها نوساناتی در کیفیت مشاهده شد، اما به طور کلی کیفیت از باز ۱۰ به بعد ثابت و در محدوده قابل قبول باقی ماند. با این وجود، در انتهای خوانش‌ها (پس از باز ۱۳۰)، افت نسبی در کیفیت مشاهده می‌شود که این پدیده در هر دو گروه تیمار به طور مشابه دیده شد. این کاهش کیفیت در انتهای خوانش‌ها می‌تواند ناشی از محدودیت‌های فنی در فرآیند توالی‌یابی باشد.

ارزیابی محتوای GC خوانش‌ها نشان داد که میانگین این شاخص در آمیخته سیستانی-هلشتاین ۵۴ درصد و در نژاد خالص سیستانی ۴۴ درصد است. محتوای GC که به درصد بازهای گوانین (G) و سیتوزین (C) در توالی DNA اشاره دارد، یکی از شاخص‌های مهم ترکیبات ژنومی است که می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله گونه، نژاد و ناحیه ژنومی قرار گیرد. این تفاوت در محتوای GC می‌تواند به عنوان یکی از عوامل زیربنایی در تفاوت‌های ترانسکریپتومی بین این دو نژاد عمل کند. محتوای GC می‌تواند بر ساختار کروماتین، چگالی ژن‌ها و الگوهای بیان ژن تأثیر مستقیم بگذارد. مطالعات نشان داده‌اند که نواحی با محتوای GC بالا معمولاً دارای چگالی ژن بالاتر و فعالیت رونویسی بیشتری هستند (Rao et al., 2013; Barahimipour et al., 2015). بنابراین، تفاوت مشاهده شده در محتوای GC بین نژاد سیستانی و آمیخته سیستانی-هلشتاین می‌تواند یکی از مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با تفاوت‌های ترانسکریپتومی بین این دو نژاد باشد. این تفاوت‌ها می‌توانند ناشی از فرآیندهای تکاملی و سازگاری‌های محیطی باشند که در طول زمان در نژاد سیستانی شکل گرفته‌اند و می‌تواند بخشی از پایه ژنتیکی تفاوت‌های فنوتیپی مشاهده شده بین این نژادها را تشکیل دهد.

نتایج مربوط به کنترل کیفیت داده‌ها نشان دادند که کیفیت توالی‌یابی در هر دو گروه نژادی سیستانی و آمیخته سیستانی-هلشتاین در بیشتر طول خوانش‌ها در سطح بالایی قرار دارد (شکل‌های ۱ و ۲). اگرچه در ابتدای خوانش‌ها نوساناتی در کیفیت مشاهده شد، اما از باز ۱۰ به بعد کیفیت خوانش‌ها پایدار و در محدوده قابل قبول باقی ماند. با این وجود، در انتهای خوانش‌ها (پس از باز ۱۳۰) افت نسبی در کیفیت مشاهده گردید که در هر دو گروه به‌طور مشابه دیده شد. این کاهش کیفیت در انتهای خوانش‌ها می‌تواند ناشی از محدودیت‌های فنی فرآیند توالی‌یابی باشد.

همردیفی و مکان‌یابی خوانش‌ها روی ژنوم مرجع

نتایج کنترل کیفیت (QC) و آمار خوانش‌های توالی‌یابی RNA-Seq در نمونه‌های خون گاوهای سیستمی و آمیخته در جدول ۱ آمده است. از مجموع ۵۵,۱۳۴,۸۸۴ خوانش پیش‌رو و ۶۶,۰۱۶,۲۹۲ خوانش پس‌رو که پس از ویرایش نمونه‌های نژاد خالص سیستمی به‌دست آمد، به ترتیب ۷۴/۶ درصد و ۷۳/۱۵ درصد از خوانش‌ها به‌طور دقیق بر روی ژنوم مرجع مکان‌یابی شدند. علاوه بر این، بیش از پنج درصد از کل خوانش‌ها دارای هم‌ردیفی چندگانه بودند و با چندین ناحیه مختلف از ژنوم هم‌راستا شدند. به بیان دیگر، این خوانش‌ها به‌طور هم‌زمان با بیش از یک مکان ژنومی تطابق داشتند. در میان این خوانش‌های چندمکانی، بیش از ۲۱ هزار خوانش شناسایی شد که هر یک با بیش از ۲۰ ناحیه مختلف ژنومی هم‌ردیف شده بودند. در نمونه‌های آمیخته سیستمی-هلشتاین، پس از ویرایش ۶۰,۱۹۸,۵۹۸ خوانش پیش‌رو و ۷۷,۹۳۵,۳۶۸ خوانش پس‌رو، به ترتیب ۷۶/۴۵ درصد و ۷۷/۵۰ درصد از خوانش‌ها به‌طور دقیق بر روی ژنوم مرجع مکان‌یابی شدند. در این نمونه‌ها، بیش از شش درصد از خوانش‌ها با چندین موقعیت ژنومی انطباق نشان دادند و دارای هم‌ردیفی چندگانه بودند. از میان این خوانش‌های چندمکانی، بیش از ۲۲ هزار خوانش شناسایی شد که با بیش از ۲۰ موقعیت مختلف در ژنوم هم‌ردیف گردیدند. این میزان از هم‌ردیفی چندگانه می‌تواند نشان‌دهنده وجود نواحی تکراری یا شباهت‌های توالی در ژنوم مورد مطالعه باشد. هم‌ردیفی چندگانه مورد اشاره می‌تواند مربوط به نواحی تکراری ژنومی، خانواده‌های ژنی با شباهت توالی بالا و عناصر تکرارشونده ساختاری مانند LINE، SINE و LTR در ژنوم گاو باشد (Adelson et al., 2009). به‌طور خاص، خانواده‌هایی نظیر ژن‌های ریوزومی (rRNA)، ژن‌های گیرنده بویایی^۱، ژن‌های کراتین و پروتئین‌های حاوی zinc finger دارای نسخه‌های متعدد و توالی‌های مشابه در نقاط مختلف ژنوم هستند که موجب ایجاد این هم‌ردیفی‌ها می‌شوند (Elsik et al., 2009; Zimin et al., 2009). همچنین، برخی از این نواحی تکراری ممکن است شامل RNAهای غیرکدکننده بلند (lncRNAs) باشند که در بافت‌های خاصی از بدن مانند بافت‌های ایمنی، تولیدمثلی و اپی‌تلیال بیان می‌شوند (Statello et al., 2021).

به‌طور کلی، نتایج حاصل از هم‌ردیفی و مکان‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع نشان‌دهنده کیفیت مطلوب داده‌های RNA-Seq در نمونه‌های مورد مطالعه بود. درصد بالای مکان‌یابی یکتا در هر دو گروه (نژاد خالص سیستمی و آمیخته سیستمی-هلشتاین) 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 محدوده قابل قبول برای مطالعات ژنومی قرار داشت (Conesa et al., 2016). 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.

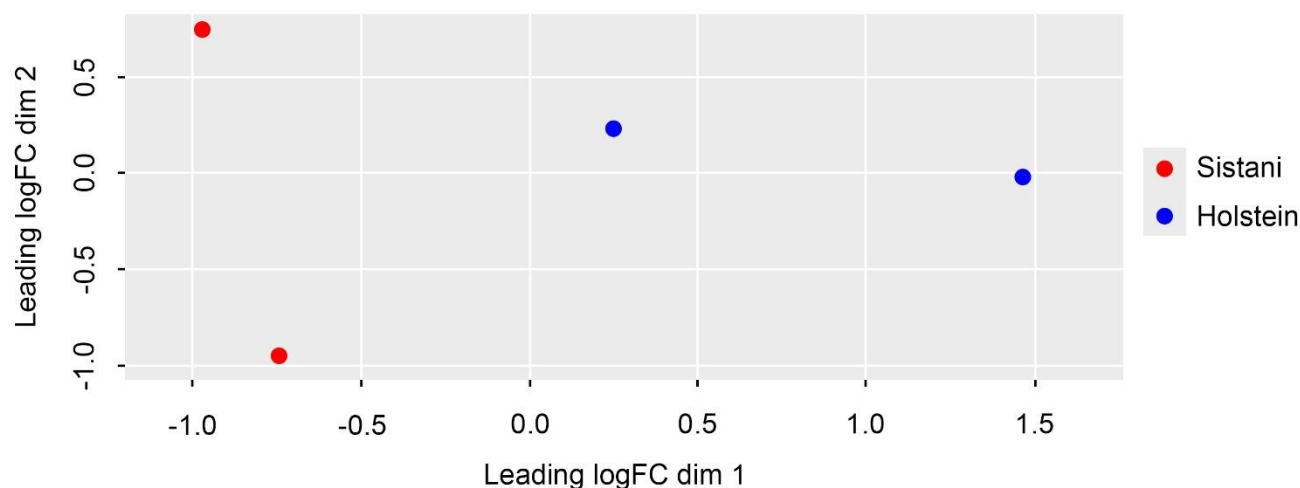
^۱ olfactory receptors

جدول ۱- نتایج کنترل کیفیت (QC) و آمار خوانش های توالی یابی RNA-Seq در نمونه های خون گاوهای سیستمی و آمیخته

گروه	تعداد کل خوانش های خام (پیش رو + پس رو)	تعداد خوانش ها پس از ویرایش (پیش رو + پس رو)	درصد حذف	درصد حذف خوانش های کم کیفیت	تعداد خوانش های حذف شده	درصد GC	درصد Q30
سیستمی	۱۲۹۹۹۰۵۳۲	۱۲۱۱۵۱۱۷۶	۵/۰	۳/۰	۸۸۴۸۸۲۴	۴۴	۹۱/۴
سیستمی-هلاشتاین	۱۴۹۸۹۲۵۹۱	۱۳۸۱۳۳۹۶۶	۴/۵	۳/۵	۱۱۸۶۶۰۳۴	۵۴	۹۲/۲

ژن های دارای بیان افتراقی بین نژادهای مورد مطالعه

شکل ۳ تمایز ژنتیکی بین نژاد سیستمی و آمیخته های سیستمی-هلاشتاین را بر اساس نمودار Multidimensional Scaling (MDS) نشان می دهد. همان طور که در نمودار مشاهده می شود، فاصله قابل توجهی بین نقاط دو گروه وجود دارد که نشان دهنده تفاوت های ژنتیکی و تغییرات معنی دار در بیان ژن ها در بین این دو نژاد است. در مجموع، ۱۹۴ ژن با بیان متفاوت معنی دار بین نژاد خالص سیستمی و آمیخته های آن با نژادهای هلاشتاین شناسایی شد. جدول ۲ حاوی نام ۲۰ ژن با بیشترین تفاوت بیان بین نژاد سیستمی و آمیخته های آن با نژادهای هلاشتاین می باشد. این تفاوت ها بیانگر آن است که ورود ژن های نژاد هلاشتاین به گاوهای سیستمی موجب تغییر در الگوهای بیان ژنی شده و می تواند بر فرآیندهای زیستی مختلفی تأثیر گذار باشد.



شکل ۳: تجزیه و تحلیل MDS تفاوت‌های ژنتیکی نژاد سیستانی و آمیخته سیستانی-هلستاین

جدول ۲- ژن‌های دارای بیان افتراقی بین گاو خالص سیستانی و آمیخته‌های آن با نژاد هلستاین

ژن	مکان ژن	مقدار p تصحیح شده	لگاریتم تغییر بیان ژن (fold change)
<i>HBA</i>	25: 216496-217264	3.21E-22	-6.72
<i>HBB</i>	15: 48362354-48363996	8.62E-14	-4.58
<i>CRYGS</i>	1: 80690735-80696503	6.10E-10	-3.73
<i>ALAS2</i>	X: 92485200-92512358	1.79E-08	-2.93
<i>PHLDA1</i>	5: 5573898-5575874	1.87E-05	-2.91
<i>SNAI1</i>	13: 78036445-78042572	6.06E-05	-2.86
<i>MTCL1</i>	24: 41135600-41249107	4.90E-06	-2.83
<i>HES1</i>	1: 73362774-73365254	2.10E-06	-2.56
<i>IFITM10</i>	29: 49726614-49736576	6.06E-05	-2.50
<i>RGS1</i>	16: 12697340-12701441	8.17E-05	-2.25
<i>CXCR4</i>	2: 61250149-61253862	6.97E-10	-2.22
<i>NR4A1</i>	5: 27822914-27839673	8.17E-05	-2.13
<i>DDIT4</i>	28: 28323892-28325923	4.44E-06	-2.09
<i>COL11A2</i>	23: 7349362-7378844	1.87E-05	-1.87
<i>p21</i>	23: 10573389-10590591	5.66E-05	-1.79
<i>PTGR1</i>	8: 100963668-100994111	3.23E-05	1.94

2.01	4.99E-06	-	TNFRSF10D
3.49	5.02E-23	23: 25631958-25643878	BOLA-DQA5
3.91	1.78E-27	19: 40006493-40015037	PPP1R1B
8.03	2.13E-39	23: 25607507-25620857	BOLA-DQB

آنالیز غنی سازی هستی شناسی و مسیر ژن

جدول ۳ نتایج آنالیز غنی سازی هستی شناسی ژن های متفاوت بیان شده بین نژاد خالص سیستانی و آمیخته های آن با هلشتاین را نشان می دهد. نتایج این آنالیز ۱۱ مسیر غنی شده را بین نژاد خالص سیستانی و آمیخته های آن با هلشتاین نشان داد ($FDR\ p < 0.05$).

جدول ۳- نتایج آنالیز غنی سازی هستی شناسی و مسیر ژن های متفاوت بیان شده بین دو نژاد خالص سیستانی و سیستانی × هلشتاین

مسیر	ژن	مقدار P تصحیح شده
Reactive oxygen species metabolic process (GO:0072593) فرآیندهای متابولیکی مرتبط با گونه های فعال اکسیژن	<i>HBA, HBB, DDIT4, p21</i>	0.002
Positive regulation of lymphocyte activation (GO:0051251) تنظیم مثبت فعال سازی لنفوسیت ها	<i>HES1, p21, BOLA-DQB, BOLA-DQA5</i>	0.006
Positive regulation of leukocyte activation (GO:0002696) تنظیم مثبت فعال سازی لکوسیت ها	<i>HES1, p21, BOLA-DQB, BOLA-DQA5</i>	0.009
Positive regulation of cell activation (GO:0050867) تنظیم مثبت فعال سازی سلولی	<i>HES1, p21, BOLA-DQB, BOLA-DQA5</i>	0.011
Intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage (GO:0008630) مسیر سیگنال دهی آپوپتوز درونی در پاسخ به آسیب DNA	<i>DDIT4, p21, SNAI1</i>	0.013
Response to stimulus (GO:0050896) پاسخ به محرک	<i>HBA, HBB, CXCR4, ALAS2, HES1, DDIT4, p21, SNAI1, NR4A1, RGS1, BOLA-DQB, PPP1R1B, BOLA-DQA5</i>	0.014
Positive regulation of multicellular organismal process (GO:0051240)	<i>CXCR4, HES1, p21, SNAI1, BOLA-DQB, BOLA-DQA5</i>	0.024

0.027	<i>CXCR4, ALAS2, DDIT4, p21, PPP1R1B</i>	تنظیم مثبت فرآیندهای موجودات چندسلولی Response to abiotic stimulus (GO:0009628) پاسخ به محرک‌های غیرزیستی
0.029	<i>DDIT4, p21, SNAI1</i>	Signal transduction by p53 class mediator (GO:0072331) انتقال سیگنال به واسطه میانجی‌های کلاس p53
0.031	<i>HBA, HBB</i>	Oxygen transport (GO:0015671) انتقال اکسیژن
0.040	<i>HES1, p21, BOLA-DQB, BOLA-DQA5</i>	Regulation of lymphocyte activation (GO:0051249) تنظیم فعال‌سازی لنفوسیت‌ها

در این مطالعه نتایج تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها نشان داد که تعدادی از ژن‌ها تغییر معنی‌داری در سطح بیان نشان می‌دهند که هر یک در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف نقش دارند. در تحلیل مسیرهای زیستی، ژن‌های با بیان افتراقی در ۱۱ مسیر بیولوژیکی به‌طور معنی‌دار درگیر بودند. در میان این ژن‌ها، چهار ژن *HBA*، *BOLA-DQB*، *HBB* و *PPP1R1B* بیشترین تفاوت بیان را بین دو گروه نشان دادند.

ژن *BOLA-DQB* پروتئینی را کد می‌کند که بخشی از مولکول MHC کلاس II است. این مولکول‌ها در ارائه پپتیدهای مشتق‌شده از پروتئین‌های پاتوژن‌ها به سلول‌های ایمنی $CD4^+$ T نقش دارند و از این طریق پاسخ ایمنی اکتسابی را فعال می‌سازند (Takeshima and Aida, 2006). افزایش بیان ژن‌های *BOLA-DQB* و *BOLA-DQA5* در آمیخته‌ها بیانگر تقویت مسیرهای ایمنی اکتسابی است، که می‌تواند نشانه‌ای از ظرفیت ایمنی بالاتر در این دام‌ها باشد. چنین تغییری ممکن است مزیتی برای زیست در محیط‌های با فشار عفونی بالا ایجاد کند و این ژن‌ها می‌توانند به عنوان نشانگرهای ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند.

در مقابل، کاهش بیان ژن‌های *HBA* و *HBB* مشاهده شد که به ترتیب زیرواحدهای آلفا و بتای هموگلوبین را رمزگذاری می‌کنند. این ژن‌ها نقش کلیدی در انتقال اکسیژن از ریه‌ها به بافت‌ها دارند (Aldakeel et al., 2020). کاهش بیان آن‌ها می‌تواند ظرفیت حمل اکسیژن را محدود کند و در نتیجه، کارایی فیزیولوژیکی حیوان را، به‌ویژه در شرایط تنش گرمایی یا کمبود اکسیژن، کاهش دهد (Taiwo et al., 2022). با توجه به اقلیم گرم و خشک منطقه سیستان، این موضوع می‌تواند بیانگر کاهش تطابق آمیخته‌ها با محیط بومی باشد. با این حال، باید توجه داشت که نتایج حاضر بر اساس سطح mRNA است و لزوماً با سطح پروتئین همبستگی کامل ندارد؛ لذا سنجش‌های پروتئینی تکمیلی ضروری است.

ژن *PPP1R1B* نیز در آمیخته‌ها افزایش بیان نشان داد. این ژن که با نام *DARPP-32* نیز شناخته می‌شود، در مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی از جمله مهار آنزیم پروتئین فسفاتاز ۱ (PP1) نقش دارد و از این طریق فرآیندهای تنظیمی متعددی مانند رشد سلولی، تمایز، متابولیسم و تنظیم انقباض عضلانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Casamayor and Arino, 2020). هرچند *PPP1R1B* عمدتاً در بافت‌های عصبی بیان می‌شود، مطالعات نشان داده‌اند که برخی ایزوفرم‌های آن در سلول‌های غیرنورونی از جمله سلول‌های ایمنی نیز بیان می‌شوند و ممکن است در تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی در سلول‌های خون نقش داشته باشند (Svenningsson et al., 2004). از این رو، افزایش بیان آن در خون ممکن است بازتابی از تنظیم متقاطع مسیرهای متابولیکی و فیزیولوژیکی مرتبط با رشد و عملکرد عضلانی باشد.

در تحلیل مسیرهای زیستی، مسیر فرآیند متابولیک گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر بیشترین معنی‌داری را نشان داد (جدول ۲). ROS مولکول‌هایی هستند که در متابولیسم طبیعی سلولی، به‌ویژه در میتوکندری، تولید می‌شوند و نقش مهمی در سیگنال‌دهی و دفاع سلولی دارند؛ اما افزایش بیش از حد آن‌ها موجب استرس اکسیداتیو و آسیب به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌شود (Forrester et al., 2018; Venditti et al., 2013).

در این مسیرها، علاوه بر ژن‌های *HBA* و *HBB*، دو ژن *DDIT4* و *p21* نیز درگیر بودند که در آمیخته‌ها کاهش بیان نشان دادند. ژن *DDIT4 (REDD1)* تنظیم‌کننده‌ی منفی مسیر *mTORC1* است و در پاسخ به استرس اکسیداتیو یا هیپوکسی فعال می‌شود تا رشد سلولی را مهار و اتوفاجی را تحریک کند (Gharibi et al., 2016). کاهش بیان آن در آمیخته‌ها می‌تواند نشانگر کاهش حساسیت سلول‌های خونی به استرس اکسیداتیو و در نتیجه کاهش سازگاری سلولی در برابر تنش باشد. ژن *p21* نیز تنظیم‌کننده‌ی کلیدی چرخه سلولی است که در پاسخ به آسیب DNA توسط *p53* فعال می‌شود (Dutto et al., 2015). کاهش بیان آن ممکن است با تضعیف مکانیسم‌های بازدارنده‌ی تقسیم سلولی در شرایط استرس اکسیداتیو همراه باشد.

علاوه بر این، کاهش بیان ژن‌هایی مانند *CXCR4*، *SNAIL1* و *HES1* که در مهاجرت سلولی، تمایز و تنظیم رشد بافتی نقش دارند، می‌تواند حاکی از تفاوت در فرآیندهای رشد و تکامل سلول‌های سیستم ایمنی باشد (Hemmatzadeh et al., 2018; Zhang et al., 2025). ژن *CXCR4* در هدایت سلول‌های ایمنی به محل التهاب نقش دارد و کاهش بیان آن می‌تواند به تضعیف پاسخ ایمنی منجر شود.

مطالعه‌ی Moridi et al. (2019) نیز با استفاده از RNA خون در جمعیت‌های آمیخته بین نژادهای هلشتاین و تالشی، نتایجی مشابه گزارش کرد. آن‌ها بیش از ۲۲۶۲ ژن با بیان افتراقی را شناسایی کردند که عمدتاً در مسیرهای ایمنی و التهابی درگیر بودند. تفاوت‌های مشاهده شده در پروفایل بیان ژنی میان گاوهای اصیل سیستانی و آمیخته‌های

سیستانی-هلشتاین، فراتر از تغییرات کمی، بازتاب‌دهنده یک مصالحه تکاملی میان سازگاری اقلیمی و پتانسیل ایمنی است. کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های زیرواحد هموگلوبین (*HBA* و *HBB*) در آمیخته‌ها نسبت به نژاد خالص سیستانی، احتمالاً ریشه در رقیق‌شدگی ژنتیکی صفات سازگاری دارد. نژاد سیستانی طی قرن‌ها انتخاب طبیعی در اقلیم گرم و خشک، مکانیسم‌های کارآمدی برای انتقال اکسیژن و مقابله با هیپوکسی ناشی از تنش گرمایی توسعه داده است، که بیان بالای این ژن‌ها در گروه خالص مؤید آن است. کاهش بیان این ژن‌ها در آمیخته‌ها می‌تواند توجه‌کننده حساسیت بیشتر آن‌ها به تنش‌های محیطی باشد. در مقابل، افزایش بیان ژن‌های کلاستر MHC کلاس II مانند *BOLA-DQB* و *BOLA-DQA5* در آمیخته‌ها، می‌تواند ناشی از پدیده هتروزیس باشد که منجر به تقویت سیستم نظارت ایمنی و ظرفیت بالاتر برای ارائه آنتی‌ژن شده است. این یافته با نتایج مطالعه Moridi et al. (2019) که تغییرات گسترده در مسیرهای ایمنی را در آمیخته‌های نژادهای بومی و خارجی گزارش کرده‌اند، هم‌خوانی دارد، با این تفاوت که در مطالعه حاضر، این تقویت ایمنی با هزینه کاهش بیان ژن‌های محافظتی سلولی نظیر *DDIT4* و *p21* همراه بوده است. کاهش بیان ژن *DDIT4* (تنظیم‌کننده منفی مسیر mTOR) در آمیخته‌ها پیشنهاد می‌کند که سلول‌های خونی در این دام‌ها اولویت متابولیسمی خود را از مکانیسم‌های بقا و پاسخ به استرس به سمت رشد و فعالیت ایمنی تغییر داده‌اند. بنابراین، الگوی ترانسکریپتومی مشاهده شده نشان می‌دهد که آمیخته‌گری اگرچه ظرفیت پاسخ ایمنی اکتسابی را بهبود بخشیده، اما احتمالاً مکانیسم‌های ذاتی تحمل تنش اکسیداتیو و گرمایی که ویژگی بارز نژاد بومی سیستانی است را تضعیف کرده است.

در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که در آمیخته‌ها مسیرهایی مرتبط با انتقال اکسیژن و فرآیند متابولیک ROS کاهش فعالیت داشته‌اند، در حالی که مسیرهای مرتبط با تنظیم فعالیت لنفوسیتی و ارائه آنتی‌ژن تقویت شده‌اند. این الگوها ممکن است بیانگر جابه‌جایی فیزیولوژیکی در آمیخته‌ها از جهت بهبود کارایی ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زا در ازای کاهش تحمل به استرس‌های محیطی باشد. چنین تفاوت‌هایی می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی آینده به منظور حفظ توازن بین مقاومت زیستی و کارایی تولید مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، تحلیل ترانسکریپتوم سلول‌های خونی نشان داد که ۱۹۴ ژن با بیان افتراقی معنی‌دار میان گاوهای اصیل سیستانی و آمیخته‌های سیستانی-هلشتاین وجود دارد. یافته‌ها نشان داد که تغییرات مولکولی عمدتاً در دو محور انتقال اکسیژن و پاسخ به استرس و ایمنی اکتسابی متمرکز بوده است. به‌طور مشخص، کاهش قابل توجه بیان ژن‌های گلوبینی مانند *HBA* و *HBB* و نیز ژن‌های محافظتی همچون *DDIT4* و *p21* در آمیخته‌ها، سبب تغییر

محسوس در مسیرهای فرآیند متابولیک گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و انتقال اکسیژن شد، امری که احتمال کاهش توان سازگاری با هیپوکسی و تنش گرمایی را در این جمعیت مطرح می‌کند. در سوی دیگر، افزایش بیان ژن‌های کمپلکس سازگاری بافتی اصلی (MHC) نظیر *BOLA-DQB* و *BOLA-DQA5* و همچنین ژن *PPP1R1B* در آمیخته‌ها، به غنی‌شدگی مسیر تنظیم مثبت فعال‌سازی لنفوسیت‌ها انجامیده است. در مجموع، نتایج نشان می‌دهد که هرچند آمیخته‌گری از طریق مسیرهای وابسته به MHC می‌تواند پتانسیل ایمنی و پاسخ به عوامل بیماری‌زا را تقویت کند، این مزیت با کاهش کارایی سازوکارهای بومی مقابله با استرس اکسیداتیو همراه بوده است. بر این اساس، ژن‌هایی مانند *HBA*، *BOLA-DQB* و *DDIT4* می‌توانند به‌عنوان شاخص‌های ژنتیکی مؤثر برای پایش توازن میان سازگاری و تولید در برنامه‌های اصلاح نژادی آینده مورد استفاده قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

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. 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 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.

منابع

بناءبازی، 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.، بناءبازی، م. ح. ۱۳۹۸. بیان افتراقی ژن گاوه‌های بوس تاروس (هلشتاین) و بوس ایندیکوس (کلیستانی) با استفاده از داده‌های RNA-Seq. مجله علوم دامی ایران، ۵۰ (۱): ۴۷-۵۵.

- Adelson, D.L., Raison, J.M., and Edgar, R.C. (2009). Characterization and distribution of retrotransposons and simple sequence repeats in the bovine genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(31): 12855–12860. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901282106>
- Aldakeel, S.A., Ghanem, N.Z., Al-Amodi, A.M., Osman, A. K., Al Asoom, L.I., Ahmed, N.R., Almandil, N.B., Akhtar, M.S., Azeez, S.A., and Borgio, J.F. (2019). Identification of seven novel variants in the β -globin gene in transfusion-dependent and normal patients. *Archives of Medical Science*. 16(2): 453–459. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.84063>
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data [Computer software]. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Astuti, P. K., Sarkany, P., Wanjala, G., Bagi, Z., & Kusza, S. (2025). A systematic review on the trend of transcriptomic study in livestock: An effort to unwind the complexity of adaptation in a climate change environment. *Heliyon*, 11, e41090. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e41090>
- Barahimipour, R., Strenkert, D., Neupert, J., Schroda, M., Merchant, S.S., and Bock, R. (2015). Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*. 84(4): 704–717. <https://doi.org/10.1111/tpj.13037>.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15):2114-2120.
- Casamayor, A., and Ariño, J. (2020). Controlling Ser/Thr protein phosphatase PP1 activity and function through interaction with regulatory subunits. In K. W. Hunter (Ed.). *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 122: 231–288.. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2020.01.004>
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., et al. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*. 17: 13. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>
- Dutto, I., Tillhon, M., Cazzalini, O., et al. (2015). Biology of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A: Molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Archives of Toxicology*. 89: 155–178. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1430-4>
- Elsik, C.G., Tellam, R.L., Worley, K.C., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., et al. (2009). The genome sequence of taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution. *Science*. 324(5926): 522–528. <https://doi.org/10.1126/science.1169588>
- Favero, R., Menezes, G.R.O., Torres, R.A.A., et al. (2019). Crossbreeding applied to systems of beef cattle production to improve performance traits and carcass quality. *Animal*. 13(11): 2679–2686. <https://doi.org/10.1017/S175173111900074X>
- Forrester, S.J., Kikuchi, D.S., Hernandez, M.S., Xu, Q., and Griendling, K.K. (2018). Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation Research*. 122(6): 877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>
- Gharibi, B., Ghuman, M., and Hughes, F. J. (2016). DDIT4 regulates mesenchymal stem cell fate by mediating between HIF1 α and mTOR signalling. *Scientific Reports*. 6: 36889. <https://doi.org/10.1038/srep36889>
- Goff, L., Trapnell, C., and Kelley, D. (2024). cummeRbund: Analysis, exploration, manipulation, and visualization of Cufflinks high-throughput sequencing data (R package version 2.48.0). <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/cummeRbund.html>
- Hemmatzadeh, M., Mohammadi, H., Babaie, F., et al. (2018). Snail-1 silencing by siRNA inhibits migration of TE-8 esophageal cancer cells through downregulation of metastasis-related genes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 8(3): 437–445. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.050>

- Kamalzadeh, A., Rajabbaigy, M., and Kiasat, A. (2008). Livestock production systems and trends in livestock industry in Iran. *Journal of Agriculture and Social Sciences*. 4: 183–188.
- Kebede, T., Kallu, S.A., and Bezabih, M.K. (2018). Review on the role of crossbreeding in improvement of dairy production in Ethiopia. *Global Veterinaria*. 20(2): 81–90.
- Langmead, B. and S. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9:357–359.
- Moridi, M., Hosseini Moghaddam, S.H., Mirhoseini, S.Z., and Bionaz, M. (2019). Transcriptome analysis showed differences of two purebred cattle and their crossbreds. *Italian Journal of Animal Science*. 18(1): 70–79. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1482800>
- Nayan, V., Singh, K., Iquebal, M.A., Jaiswal, S., Bhardwaj, A., Singh, C., Bhatia, T., Kumar, S., Singh, R., Swaroop, M.N. and Kumar, R. (2022). Genome-wide DNA methylation and its effect on gene expression during subclinical mastitis in water buffalo. *Frontiers in genetics*, 297.
- Petrov, P., Bonet, M.L., Reynés, B., Oliver, P., Palou, A., and Ribot, J. (2016). Whole blood RNA as a source of transcript-based nutrition- and metabolic health-related biomarkers. *PLoS ONE*, 11(3): e0151255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151255>
- Rao, Y.S., Chai, X.W., Wang, Z.F., Nie, Q.H., and Zhang, X.Q. (2013). Impact of GC content on gene expression pattern in chicken. *Genetics Selection Evolution*. 45(1): 9. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-45-9>
- Statello, L., Guo, C.J., Chen, L.L., and Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 22: 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Svenningsson, P., Nairn, A.C., and Greengard, P. (2005). DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. *AAPS Journal*. 7(2): E353–E360. <https://doi.org/10.1208/aapsj070235>
- Taiwo, G.A., Idowu, M., Denvir, J., Cervantes, A.P., and Ogunade, I.M. (2022). Identification of key pathways associated with residual feed intake of beef cattle based on whole blood transcriptome data analyzed using gene set enrichment analysis. *Frontiers in Veterinary Science*. 9: 848027. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.848027>
- Takeshima, S.N., and Aida, Y. (2006). Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal*. 77(2): 138–150. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00339.x>
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*. 28(5): 511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- Venditti, P., Di Stefano, L., and Di Meo, S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*. 13(2): 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.008>
- Zhang, B., Wen, J., Li, M., Wang, J., Ji, Z., Lv, X., Usman, M., Mauck, J., Loor, J.J., Yang, W., Wang, G., Ma, J., and Xu, C. (2025). Fatty acids promote migration of CD4+ T cells through calcium release-activated calcium modulator ORAI1 sensitive glycolysis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 108(1): 856–867. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-23987>
- Zimin, A.V., Delcher, A.L., Florea, L., et al. (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology*. 10, R42. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-4-r42>

Transcriptomic Analysis and Identification of Differentially Expressed Genes in Purebred Sistani Cattle and Sistani-Holstein Crosses Using RNA-Seq Data

Abstract

Transcriptomic studies are powerful tools for identifying biological pathways and genetic markers associated with economically important traits and disease resistance in livestock. In this study, gene expression patterns in pure Sistani cattle and their crossbreeds with Holstein were examined using RNA-Seq technology. Blood samples from two groups (pure Sistani cattle and Sistani-Holstein crossbreeds; each group with two biological replicates) were collected and analyzed. After quality control, the data were processed using Cuffdiff, and differentially expressed genes were identified based on the criterion $FDR < 0.05$. Differential expression analysis revealed that a total of 194 genes showed significant differences between the two groups. Functional analysis of these genes indicated their involvement in pathways related to immune response, metabolism of reactive oxygen species (ROS), and cellular signal transduction. The reduced expression of oxygen-transport-related genes (*HBA* and *HBB*) and the increased expression of MHC family genes (*BOLA-DQB*) in the crossbreeds may reflect physiological adaptations resulting from crossbreeding. Additionally, alterations in cell-cycle genes (*p21*) and stress-response genes (*DDIT4*) highlighted the impact of crossbreeding on cellular protective mechanisms. Overall, the findings suggest that crossing Sistani cattle with the Holstein breed can, while retaining part of the native breed's resistance advantages, lead to improvements in productive traits.

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