Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Gene-set enrichment analysis to identify genes and biological pathways associated with egg weight in the whole laying period

Ali Reza Jafarymanesh

MSc Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran. Email: alirezajafarymanesh1371@gmail.com

Amir Hossein Khaltabadi Farahani

*Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran. Email: amfarahanikh@gmail.com

Mohammad Hossein Moradi

Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran. Email: moradi.hosein@gmail.com

Hossein Mohammadi

Ph.D Graduated, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email: mohammadi13371364@gmail.com

Abstract

Objective

Identifying genes with large effects on economically important traits, has been one of the important goals in chicken breeding. The present study aimed to conduct a genome wide association studies (GWAS) based on Gene-set enrichment analysis for identifying the loci associated with egg weight in Rhode Island Red chicken using the high-density SNPs.

Materials and methods

Phenotypes records and genotypic data were obtained from the Figshare online public repository. The gene set analysis consists basically in three different steps: the assignment of SNPs to genes, the assignment of genes to functional categories, and finally the association analysis between each functional category and the phenotype of interest. Genome wide

association study for 1,078 hens was performed with egg weight including first egg weight, eggs weight at 28, 36, 56, 66, 72, and 80 weeks of age using GenABEL software. Using the biomaRt2 R package the SNP were assigned to genes if they were within the genomic sequence of the gene or within a flanking region of 20 kb up- and downstream of the gene. Subsequently, gene enrichment analysis was performed with the goseq R package and bioinformatics analysis was implemented to identify the biological pathways performed in GO, KEEG, DAVID and PANTHER databases.

Results

In this research, 9 SNP markers on chromosomes 3, 4, 6, 7, 8, 9, 19, 20 and 22 located in MC3R, LEPR, ECT2, SH3GL2, KCNMA1, SPP1, PCK1, MMP9, PPP1CB, ACOX1, and IGFBP2 genes were identified. Some of the genes that were found are consistent with some previous studies related to egg weights. According to pathway analysis, 28 pathways from gene ontology and biological pathways were associated with the egg weight ($P<0.01$). Among these pathways, the regulation of feeding behavior, positive regulation of the apoptotic process, positive regulation of protein phosphorylation, osteoblast differentiation, positive regulation of gluconeogenesis, cell-cell junction, and focal adhesion have important functions in creating the egg weight and process production through the development and ovulation of the oocytes, the formation of albumen, and the formation of eggshell.

Conclusions

In total, this study supported previous results from GWAS of egg weights, also revealed additional regions in the chicken genome associated with these economically important traits, using these findings could potentially be useful for genetic selection in the breeding programs.

Keywords: Egg weight, Genome scan, Gene ontology, Pathway-based analysis.

Citation: Jafarymanesh AR, Khaltabadi Farahani AH, Moradi MH, Mohammadi M (2020) Gene-set enrichment analysis to identify genes and biological pathways associated with egg weight in the whole laying period. Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 91-116.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 91-116.

DOI: 10.22103/jab.2020.15255.1197

Received: July 18, 2020; Accepted: August 27, 2020

© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

ژنی جهت شناسایی ژن‌ها و مسیرهای زیستی مرتبط با صفات تجزیه و تحلیل مجموعه‌های وزن تخم‌مرغ در کل دوره تولید

علیرضا جعفری‌منش

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

alirezajafarymanesh1371@gmail.com

امیر حسین خلت آبادی فراهانی

*نویسنده مسئول. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

amfarahanikh@gmail.com

محمد حسین مرادی

استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران. moradi.hosein@gmail.com

حسین محمّدی

دانش آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز. تبریز، ایران.

mohammadi13371364@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰٤/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰٦/۰٦

چکیده

هدف: شناسایی ژن‌های بزرگ اثر مؤثر بر صفات مهم اقتصادی یکی از مهم‌ترین اهداف اصلاح نژادی در پرورش مرغ است. پژوهش حاضر به منظور مطالعه پویش ژنومی بر اساس آنالیز مجموعه‌های ژنی برای شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر صفات مرتبط با وزن تخم‌مرغ نژاد رُد آیلند رِد با استفاده از آرایه‌های ژنومی با تراکم بالا بوده است.

مواد و روش‌ها: اطلاعات رکوردهای فنوتیپی و ژنوتیپی مرتبط با وزن تخم‌مرغ نمونه‌ها از پایگاه ذخیره ژنومی برخط Figshare استفاده شد. آنالیز پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر در سه مرحله تعیین مکان SNPهای معنی‌دار با ژن، ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی و پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر انجام می‌شود. بر این اساس، مطالعه پویش ژنومی برای

صفات وزن تخم‌مرغ در اولین تخم‌گذاری و ۲۸، ۳۶، ۵۶، ۶۶، ۷۲ و ۸۰ هفتگی در ۱۰۷۸ قطعه مرغ در برنامه GenABEL انجام شد. سپس با استفاده از بسته نرم افزاری biomaRt2 ژن‌های معنی‌داری که در داخل و یا ۲۰ کیلوباز بالادست یا پایین دست نشانگرهای SNP معنی‌دار قرار داشتند، شناسایی گردید. در نهایت تفسیر مجموعه ژنی با بسته نرم افزاری goseq برنامه R با هدف شناسایی عملکرد بیولوژیکی ژن‌های نزدیک به مناطق انتخابی و ژن‌های کاندیدا از طریق پایگاه‌های GO، KEGG، DAVID و PANTHER انجام شد.

نتایج: در این پژوهش تعداد ۹ نشانگر تک نوکلئوتیدی واقع روی کروموزوم‌های ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۹، ۲۰ و ۲۲ شناسایی شدند که با ژن‌های MC3R، LEPR، ECT2، SH3GL2، KCNMA1، SPP1، PCK1، MMP9، PPP1CB، ACOX1 و IGFBP2 مرتبط بودند. تعدادی از این نشانگرهای شناسایی شده در مناطق ژنومی معنی‌دار با مطالعه پیشین مرتبط با وزن تخم-مرغ هم‌خوانی داشتند. در تفسیر مجموعه ژنی تعداد ۲۸ مسیر هستی شناسی ژنی و بیوشیمیایی با صفات وزن تخم‌مرغ شناسایی شد ($P<0.01$). از این بین، مسیرهای Regulation of feeding behavior، Positive Regulation of apoptotic process، Positive regulation of protein phosphorylation osteoblast differentiation، Positive regulation of gluconeogenesis، Cell-cell junction و Focal adhesion عملکردهای مهمی را در ارتباط با وزن تخم‌مرغ و فرآیند تولید تخم مرغ از طریق رشد اووسیت و تخمک‌اندازی، تشکیل پروتئین آلبومین و تشکیل پوسته تخم مرغ بر عهده داشتند.

نتیجه گیری: با توجه به تأیید نتایج حاصل از مطالعه قبلی در زمینه پویش ژنومی صفات وزن تخم‌مرغ و شناسایی مناطق ژنومی جدید استفاده از یافته‌های این تحقیق می‌تواند در انتخاب ژنتیکی برنامه‌های اصلاح نژادی مرغ مفید باشد.

کلمات کلیدی: آنالیز مسیر، پویش ژنومی، هستی شناسی، وزن تخم‌مرغ

مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن ۵ قبل از میلاد تا تقریبا قرن ۷ میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود (Mohammadifar and Mohammadabadi 2017). در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد (Shahdadnejad et al. 2016). حفاری‌های باستان شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (Zandi et al., 2014). بر

اساس تحقیقات West and Zhou استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی (Tepe Yahya) (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ قبل از میلاد و ۱۰۰۰ قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ قبل از میلاد (Mohammadifar and Mohammadabadi 2018). از طرفی، اصلاح کنندگان مرغ از طریق انتخاب پرندگان برتر سعی در افزایش تولید و کاهش هزینه‌های اقتصادی دارند (Yousefi et al. 2013 Zonuz). هدف از مطالعات پویش ژنومی که به منظور شناسایی ارتباط بین یک نشانگر SNP و یک صفت با استفاده از نشانگرهای با تراکم بالا در سطح ژنوم می‌باشد، یافتن ژن‌های حامل جهش‌هایی با اثر مستقیم بر فنوتیپ یک صفت تولیدی، تولیدمثلی و یا بیماری می‌باشد. این اطلاعات می‌تواند برای انتخاب به کمک نشانگر مفید بوده و به درک مکانیسم مولکولی صفات مورد مطالعه کمک نماید. داده‌های مورد استفاده در این تحقیق اولین بار توسط Liu et al. (2018) برای صفات مرتبط با وزن تخم‌مرغ از سن ۲۸ تا ۸۰ هفتگی و وزن تخم‌مرغ در اولین روز تولید، مورد آنالیز قرار گرفته‌اند که در آن تحقیق از مدل‌های خطی مختلط تک نشانگری و از تصحیح بنفرونی برای تعیین آستانه معنی‌داری و جلوگیری از خطای نوع اول استفاده شده است. در مجموع ۱۵ نشانگر تک نوکلئوتیدی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم‌مرغ در سنین ۳۶ و ۵۶ هفتگی و وزن تخم‌مرغ در اولین روز تخم‌گذاری شناسایی شده است. در یافته‌های مطالعه موردنظر و مطالعات مشابه (Pértille et al., 2017; Huang et al., 2018) مشکل بالا بودن نرخ خطای نوع اول و بیش برآورد اثر نشانگرهای SNP مشاهده می‌گردد. یکی از ایرادات تحقیقات مطالعات پویش ژنومی در نظر گرفتن آستانه معنی‌داری برای جلوگیری از بروز خطای نوع اول است. در حالی‌که پرهیز از خطای نوع اول سبب افزایش خطای نوع دوم و در نظر نگرفتن SNPهای دارای اثر معنی‌دار پایین‌تر از آستانه می‌شود (Peng et al. 2010).

یک جایگزین مناسب برای حل این مشکل، انجام مطالعات پویش کل ژنومی بر مبنای مسیر[1] با استفاده از تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی است. در واقع در این روش به جای انجام تجزیه برای یک SNP یا یک ژن، ارتباط بین صفت مورد مطالعه و واریانت‌های ژنتیکی در یک دسته یا گروه ژنی که به طور عملکردی با هم مرتبط هستند بررسی می‌شود. به عبارت دیگر پیوستگی بین یک مجموعه ژنی معنی‌دار با فنوتیپ، مورد آزمون قرار می‌گیرد (Wang et al. 2011). در حقیقت در این روش به دنبال ژن‌هایی هستیم که به تنهایی اثر آنها بر صفت مورد نظر معنی‌دار نشده و دارای اثرات متوسطی می‌باشند، ولی اثر تجمعی آنها روی صفت دارای اثر معنی‌دار است. برای اینکه بتوان تفسیر درستی از کنار هم قرار دادن این ژن‌ها حاصل شود، از مسیرهای زیستی به عنوان بستری معنی‌دار که عملکرد مجموع ژن‌ها در آنها یک یا چند هدف واحد را پیگیری می‌کند استفاده می‌شود (Mooney & Wilmot 2015).

[1] pathway-based analysis

اخیراً مطالعه پویش ژنومی بر مبنای مسیر با استفاده از تفسیر مجموعه‌های ژنی روی صفات مرتبط با تولید شیر گاوهای هلشتاین انجام شد، که منجر به شناسایی ۴ مجموعه ژنی و ۱ مسیر بیوشیمیایی KEGG معنی‌دار و ۵ ژن کاندیدای مکانی جدید مرتبط با صفت تولید شیر شد (Clancey et al. 2019). در پژوهشی دیگر که با استفاده از داده‌های کیفیت گوشت (تردی) از یک جمعیت گاو گوشتی نژاد نلور انجام شده است که نتایج نشان داد روش پویش ژنومی بر مبنای مسیر کارآیی بالاتری برای یافتن مناطق ژنومی و درک بهتری از معماری ژنتیکی صفات مرتبط با کیفیت گوشت نسبت به آنالیز پویش ژنومی بر پایه تک نشانگری داشت (Braz et al. 2019). هدف از انجام پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی و مسیرهای زیستی مرتبط با صفات وزن تخم‌مرغ در سنین مختلف مرغ نژاد رُد آیلند رِد با استفاده از تراشه‌های 600K و براساس پویش کل ژنوم بر مبنای مسیر می‌باشد. شناسایی این جایگاه‌ها از دیدگاه علمی و اقتصادی می‌تواند دارای اهمیت زیادی باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ابتدا فایل‌های تعیین ژنوتیپ با استفاده از تراشه‌های ژنومی همراه با رکوردهای فنوتیپی مرتبط با صفات وزن تخم‌مرغ که مربوط به گونه مرغ بود و در پایگاه‌های ذخیره‌ای عمومی داده‌های ژنومی (Dryad، NABIC، Zenodo، Animal Genome، Figshare) ذخیره شده بودند، استخراج و بر حسب اطلاعات مفید گروه‌بندی انجام شد. در نهایت از اطلاعات نسل یازدهم لاین خالص مرغ نژاد رُد آیلند رِد مرتبط با وزن تخم‌مرغ در هفته‌های ۲۸، ۳۶، ۵۶، ۶۶، ۷۲، ۸۰ و وزن تخم مرغ در اولین تخم‌گذاری استفاده گردید (Liu et al. 2018). برای دستیابی به اطلاعات رکوردهای فنوتیپی نیز از سایت برخط (https://figshare.com/articles/Genome-wide_Association_Analysis_of_Age-Dependent_Egg_Weights_in_Chickens/5844420) استفاده گردید. اطلاعات فنوتیپی شامل تعداد ۱۰۷۸ نمونه پرنده حاصل از ۹۲ خروس و ۸۰۱ مرغ بود که در طول سالیان متوالی برای تولید تخم‌مرغ انتخاب شده است. DNA نمونه‌ها با استفاده از تراشه‌های 600K براساس پروتکل استاندارد Affymetrix تعیین ژنوتیپ شده بودند. آرایه‌های طراحی شده امکان تعیین ژنوتیپ ۵۸۰۹۶۱ جایگاه نشانگری SNP در مرغ را فراهم می‌آورد. بعد از کنترل کیفیت و ایمپیوتیشن تعداد ۱۰۶۳ نمونه مرغ و تعداد ۲۹۴۷۰۵ SNP برای آنالیزهای مطالعه پویش کل ژنومی بر پایه روش غنی‌سازی مجموعه ژنی باقی ماندند. جهت ارتباط فنوتیپ‌ها با ژنوتیپ‌ها از نرم افزار GenABEL (Aulchenko et al. 2007) از بسته‌های نرم افزاری برنامه R و هفت مدل تک صفته برای آنالیز پویش ژنومی استفاده گردید.

آنالیز پویش کل ژنومی براساس مجموعه‌های ژنی (GSEA-SNP): اساساً آنالیز پویش ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی در سه مرحله انجام می‌گردد: ۱) تعیین مکان SNPهای معنی‌دار با ژن ۲) ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی ۳) پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر

تعیین مکان SNPها با ژن‌ها: SNPهایی که مقدار P-value آنها کمتر از ۰/۰۵ بود با استفاده از بسته نرم افزاری biomaRt2 (Durinck et al. 2009) در محیط R و با استفاده از ژنوم مرجع مرغ (نسخه GRCg6a) به ژن‌هایی که نشانگر SNP مورد نظر در داخل آن ژن و یا ۲۰kb بالادست یا پایین دست آن ژن قرار داشت، ارتباط داده شدند (تمامی ژن‌ها شامل کد-کننده، غیرکدکننده و کاذب). در این مرحله ژنی که حداقل حاوی یک SNP معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ باشد، ژن معنی‌دار به شمار می‌آید.

ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی: جهت تعیین طبقات عملکردی ژنی و مسیرهای متابولیکی و تنظیمی ژن‌های معنی‌دار از نرم افزار GO2MSIG (Powell 2014) استفاده شد. برنامه GO2MSIG از ۵ پایگاه‌های اطلاعاتی شامل GO (http://www.geneontology.org/)، KEGG (http://www.genome.jp/kegg/)، Panther (http://www.pantherdb.org)، Metacyc (http://www.metacyc.org) و Reactome (http://www.reactome.org) جهت تعیین طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی استفاده می‌نمائید. علاوه براین از پایگاه برخط DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov) برای تعیین بهتر دسته‌های ژنی استفاده گردید. در این مرحله فرض بر این است که ژن‌هایی که در یک طبقه عملکردی قرار می‌گیرند می‌توانند به عنوان یک گروه از ژن‌هایی که برخی از ویژگی‌های خاص و مشترک دارند مانند شرکت در ۳ فرایند هستی شناسی شامل فرایندهای زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی در نظر گرفته شوند.

پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر: ارتباط‌های معنی‌دار مسیرهای عملکردی مرتبط با صفات وزن تخم‌مرغ با استفاده از توزیع فوق هندسی[۲] و آماره Fisher's exact test مورد آزمون قرار گرفت. P-value مسیرهای عملکردی که تعداد k ژن معنی‌دار در آن قرار دارد براساس رابطه ۱ محاسبه شد:

(رابطه ۱)

$$\mathrm{P-value} = 1 - \sum_{i=1}^{k-1} \frac{\binom{S}{i}\binom{N-S}{m-i}}{\binom{N}{m}}$$

[۲] Hypergeometric

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

در این رابطه، k برابر است با تعداد ژن‌های معنی‌دار در طبقه عملکردی، S برابر با تعداد کل ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفات مورد بررسی، N برابر با کل تعداد ژن‌هایی که در این مطالعه آنالیز شدند و m برابر با تعداد کل ژن‌های موجود در مسیر عملکردی. تجزیه غنی‌سازی مجموعه ژنی با استفاده از بسته نرم افزاری goseq (Young et al. 2010) در محیط نرم افزار R انجام گردید. بسته goseq از آزمون فوق هندسی استفاده می‌کند. برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به دست آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی آنلاین GeneCards (http://www.genecards.org) و UniProtKB (http://www.uniprot.org) استفاده شد.

نتایج و بحث

آماره‌های توصیفی رکوردهای فنوتیپی مربوط به صفات وزن تخم مرغ در سنین مختلف در مرغ نژاد رُد آیلند رِد در جدول ۱ ارائه شده است. در این پژوهش مطالعه پویش کل ژنومی با تجزیه و تحلیل غنی سازی و مجموعه ژنی جهت شناسایی طبقات عملکردی و ساز و کارهای مولکولی مرتبط با وزن تخم‌مرغ در سنین مختلف مرغ نژاد رُد آیلند رِد انجام گردید. پلات‌های منهتن مرتبط با وزن تخم‌مرغ در سنین مختلف در شکل ۱ ارائه شده است.

شناسایی ژن‌های کاندیدا با استفاده از تجزیه GSEA-SNP[3]: تعداد ۱۵۰۱۲ ژن از ۱۶۸۷۸ ژن حاشیه نویسی شده در مرغ به وسیله نشانگرهای SNP پوشش داده شد که در این میان تعداد ۱۱۸۶ ژن دارای اثر معنی‌داری بودند، یعنی حداقل یک نشانگر با P-value کمتر از ۰/۰۵ در داخل و یا در بالا یا پایین دست این ژن تا فاصله kb ۲۰ قرار گرفت. این ژن‌ها به عنوان ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفات وزن تخم‌مرغ در سنین مختلف برای تجزیه GSEA-SNP انتخاب شدند و باقیمانده ژن-ها به عنوان ژن‌های پس زمینه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.

تعداد مجموعه‌های ژنی حاصل از پایگاه‌های داده‌ای مختلف شامل ۹۷۵ طبقات هستی شناسی (فرایند زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی) و ۸۴ مسیر بیوشیمیایی PANTHER بود. همانطور که در جداول ۲ تا ۸ مشاهده می‌شود، طبقات عملکردی در هستی شناسی فرایندهای زیستی، عملکرد مولکولی، اجزای سلولی و مسیرهای PANTHER با صفات مرتبط با وزن تخم‌مرغ دارای ارتباط هستند ($P<0.01$). مسیرهای بیوشیمیایی که شامل بیش از ۳ ژن و کمتر از ۵۰۰ ژن داشتند گزارش شده‌اند. همچنین در جدول ۲ ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات وزن تخم‌مرغ در سنین مختلف ارائه شده است.

[3] **Gene Set Enrichment Analysis- SNP**

جدول ۱. آماره‌های توصیفی صفات وزن تخم مرغ در سنین مختلف

Table 1. Descriptive statistics of egg weight traits at different ages

صفت (گرم) Trait (gr)	تعداد Number	میانگین Mean	انحراف معیار SD	ضریب تنوع CV	حداقل Min	حداکثر Max
وزن تخم‌مرغ در اولین روز First egg weight (FEW)	1052	42.44	5.06	11.92	17.00	75.00
وزن تخم‌مرغ در ۲۸ هفتگی Egg weight at 28 (EW28)	1063	57.19	3.47	6.07	46.80	68.80
وزن تخم‌مرغ در ۳٦ هفتگی Egg weight at 36 (EW36)	1063	59.35	3.28	5.53	54.00	69.70
وزن تخم‌مرغ در ٥٦ هفتگی Egg weight at 56 (EW56)	1027	60.98	4.54	7.44	35.50	77.00
وزن تخم‌مرغ در ٦٦ هفتگی Egg weight at 66 (EW66)	960	60.83	4.50	7.39	42.00	78.00
وزن تخم‌مرغ در ۷۲ هفتگی Egg weight at 72 (EW72)	847	60.97	4.50	7.39	42.00	86.00
وزن تخم‌مرغ در ۸۰ هفتگی Egg weight at 80 (EW80)	852	62.33	5.07	8.13	39.00	84.00

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

وزن تخم مرغ در اولین تخم‌گذاری و ۲۸ هفتگی: طبقات عملکردی مختلف هستی شناسی و مسیرهای PANTHER مرتبط با وزن تخم‌مرغ در اولین روز تولید و سن ۲۸ هفتگی در جداول ۳ و ۴ ارائه شده است. از مسیرهای هستی-شناسی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم‌مرغ، مسیر positive regulation of apoptotic process بدست آمد که جزء فرآیندهای زیستی می‌باشد. از میان ژن‌های کاندیدای موجود در این مسیر، ژن‌های ECT2 و KCNMA1 بیشترین ارتباط را با وزن تخم-مرغ نشان دادند. در مطالعه‌ای که با هدف آنالیز ترانسکریپتوم در تخمدان و بخش‌هایی از اویدوکت (مگنوم، ایستموس و رحم) در طول زمان تشکیل تخم مرغ انجام گرفته شده است، ژن ECT2 جزء ژن‌های کاندیدا معنی‌دار مرتبط با تشکیل آلبومین دارای fold change ۳/۲ بود (Sah & Mishra 2018). همچنین ژن کاندیدای KCNMA1 در بین ژن‌های این مجموعه ژنی قرار داشت و محصول این ژن، پروتئینی به همین نام است که یک کانال پتاسیمی است. این کانال با تغییر پتانسیل الکتریکی غشاء و یا با افزایش غلظت درون سلولی کلسیم باز شده و پتاسیم به درون سلول وارد می‌شود و سبب برقراری تعادل الکتریکی در دو طرف غشاء می‌شود (UniProtKB). در مطالعه دیگری با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با تشکیل پوسته تخم‌مرغ در مرغان تخم‌گذار ارتباط معنی‌داری بین ژن KCNMA1 با پوسته تخم‌مرغ گزارش نمودند (Duan at al. 2015). همچنین در مطالعه Boschiero et al. (2018) با مطالعه پویش کل ژنومی جهت شناسایی نشانه‌های انتخاب در لاین‌های مرغ تخم‌گذار، ژن کاندیدایKCNMA1 جزء ژن‌های مرتبط با رشد عضله گزارش کردند.

از مسیرهای دیگر فرآیندهای زیستی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم‌مرغ می‌توان به مسیر bicellular tight junction assembly اشاره کرد. از بین ژن‌های معنی‌دار در این مسیر ژن‌های کاندیدای MPP5 و CLDN3 در مطالعات قبلی در ارتباط با وزن تخم‌مرغ گزارش شده‌اند. ژن‌های خانواده MPP از جمله MPP5 در هموستازی فیبرهای ماهیچه‌ای و ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی ایفاء می‌نمایند. همچنین گزارش شده است ژن‌های خانواده MPP می‌توانند با تخریب بافت‌های همبند و کلاژنی اطراف فیبرهای ماهیچه‌ای موجب بازسازی ماتریکس خارج سلولی فیبرهای ماهیچه‌ای شوند (Gencards). جایگاه ژنی MPP5 جزء مکان‌های تحت انتخاب نژادهای مرغ مصری گزارش شده است (Walugembe 2019). همچنین ژن کاندیدای CLDN3 در ارتباط با صفت بازدهی خوراک مصرفی (باقیمانده خوراک مصرفی) در مرغ گزارش شده است (Sell-Kubiak et al. 2017).

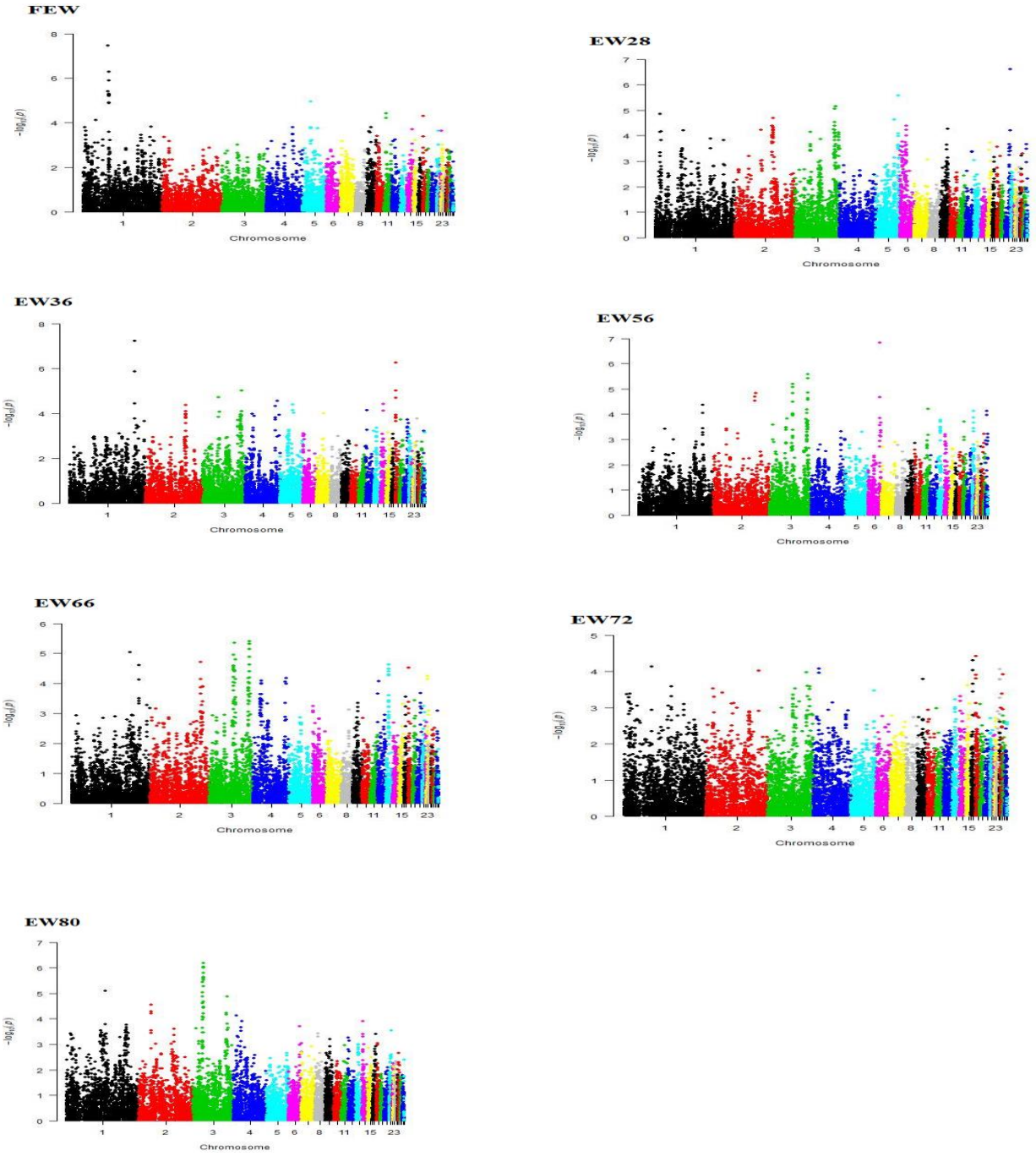
Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول۲. ارتباط نشانگرهای SNP معنی‌دار با صفات وزن تخم‌مرغ

Table 2. Association significant SNPs with egg weight traits

موقعیت ژنی Position gene	صفت مرتبط Related-trait	ژن کاندیدا Candidate gene	انتهای ژن Gene end (bp)	شروع ژن Gene start (bp)	کروموزوم Chromosome
Promoter	EW56, EW66	PPP1CB	27359503	27329699	3
Promoter	FEW	SPP1	45669023	45655850	4
Intron	FEW, EW28, EW56	KCNMA1	14648816	14211114	6
Promoter	EW66	IGFB2	23328028	23252168	7
Intron	EW72, EW80	LEPR	28717255	28687054	8
Promoter	FEW, EW28	ECT2	19406302	19381072	9
Intron	FEW, EW36	CLDN3	857198	855484	19
Promoter	EW28	PCK1	11562277	11554555	20
Promoter	EW72, EW80	MC3R	12062990	12062013	20
Exon	EW36	MMP9	10576665	10572557	20
Intron	EW66	SFRP1	2888842	2877954	22

مسیر معنی‌دار دیگر مرتبط با وزن تخم‌مرغ مسیر osteoblast differentiation و شامل ژن کاندیدای SPP1 بود. ژن SPP1 که نام دیگر آن استئوپتین (OPN) می‌باشد و در فسفریله کردن گلیکوپروتئین‌ها و تشکیل استخوان در انسان و موش از طریق تفرق سلولهای استئوبلاست نقش کلیدی دارد (Gencards). در مطالعه Dunn et al. (2009) ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی در ژن SPP1 با صفت تشکیل ماتریکس پوسته تخم‌مرغ در نژاد تخم‌گذار رُد آیلند رِد را گزارش کردند. ارتباط معنی-داری بین چند شکلی موجود در ژن SPP1 با صفت وزن بدن در لاین‌های مرغ گوشتی کاپ و مرغ تخم‌گذار لگهورن گزارش شده است (Bennett et al. 2006). با توجه به همبستگی ژنتیکی متوسط (۰/۴۰ ±۰/۰۷) بین وزن بدن در اولین تخم‌گذاری با صفات مرتبط با وزن تخم‌مرغ در مرغان نژاد رُد آیلند رِد (Tongsiri et al. 2015)، می‌توان نتیجه گرفت که ژن SPP1 می-تواند بر وزن تخم‌مرغ تولیدی تأثیرگذار باشد.



شکل ۱. پلات منهتن برای صفات مرتبط با وزن تخم مرغ در سنین مختلف مرغ رد ایلند رد. محور X مکان نشانگرهای روی کروموزوم‌ها و محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ ارزش P-value

Figure 1. Manhattan plot for related to egg weight in different age in Rhode Island Red chicken. X axis, SNPs positions on chromosomes, Y axis, -Log10 P-value

از مسیرهای مهم مرتبط با وزن تخم‌مرغ در سنین اولیه تخم‌گذاری می‌توان به positive regulation of gluconeogenesis، Protein dephosphorylation و Cell junction اشاره کرد که حاوی ژن‌های کاندیدای PCK1، CTDSPL وXIRP1 بودند. در مطالعه‌ای با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب در مرغان تخم‌گذار، ناحیه ژنومی مرتبط با وزن تخم‌مرغ شامل ژن PCK1 شناسایی شده است (Dong et al. 2019).

در مطالعه‌ی قبلی پویش ژنومی مرتبط با تعداد تخم‌مرغ تولیدی در کل دوره مرغ نژاد رُد آیلند رِد که براساس مدل خطی مختلط تک متغیره انجام شده بود، در ناحیه Mb ۴/۶۱ روی کروموزوم ۱(GGA1) در ارتباط با تعداد تخم‌مرغ تولیدی منطقه معنی‌دار گزارش شده بود (Liu et al. 2019) که با منطقه شناسایی شده (۴۱ کیلو باز بالادست ناحیه قبلی) در پژوهش حاضر همخوانی داشت. در مطالعه پویش کل ژنومی با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با خوراک مصرفی روزانه و بازدهی خوراک شامل باقیمانده خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک در طول دوره تخم‌گذاری در مرغان تخم‌گذار ارتباط معنی‌داری بین ژن CTDSPL با باقیمانده خوراک مصرفی گزارش نمودند (Wolc et al. 2013). همچنین در آنالیز ترانسکریپتومی با استفاده از تکنیک RNA-Seq، ژن کاندیدای XIRP1 با رشد و صفات لاشه مرتبط با تفرق و تکثیر سلولی در جوجه‌های گوشتی گزارش شده است (Chen et al. 2015).

وزن تخم‌مرغ در ۳٦ هفتگی: طبقات عملکردی مختلف هستی شناسی و مسیرهای PANTHER مرتبط با وزن تخم‌مرغ در سن ۳۶ هفتگی در جدول ۵ ارائه شده است. شاید بتوان مسیر positive regulation of protein phosphorylation را یکی از مهمترین مسیرهای مؤثر بر فرآیند تولید تخم‌مرغ دانست. در این مسیر پروتئین‌های هدف فسفریله می‌شوند. فسفریلاسیون پروتئین نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای سلولی دارد. از بین ژن‌های معنی‌دار در این مسیر مرتبط با وزن تخم‌مرغ می‌توان ژن MMP9 را نام برد. ژن کاندیدای MMP9 از جمله ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات تولید تخم‌مرغ است (Zhu & Jiang 2014). بطوریکه افزایش بیان ژن کلیدی MMP9 در توسعه فولیکول تخمدانی و تخمک-اندازی گزارش شده است

جدول ۳. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم مرغ در اولین تخم گذاری

Table 3. Gene set enrichment analysis significantly associated with first egg weight

کد هستی شناسی GO ID	نام مسیر (براساس سلسله مراتبی) GO Term	کل ژن‌های موجود در Term No. genes in the GO term	ژن‌های کاندیدای در هر Term Candidate genes in each of the Term	ارزش-p تصحیح شده Adjusted p-value
Biological process فرایند زیستی				
GO: 070830	Bicellular tight junction assembly	4	CLDN1, ***CLDN3***, ECT2, ***MPP5***	1.21E-05
GO: 0030036	Actin cytoskeleton organization	8	BCL6, DNAJB6, WASF2, CORO1C, DOCK2, FLNB, PALLD, ***XIRP1***	2.45E-03
GO: 0001649	Osteoblast differentiation	8	IBSP, IFT80, NOG, PSMC2, RRAS2, ***SPP1***, SEMA7A, TMEM119	1.96E-03
GO: 0043065	Positive regulation of apoptotic process	11	BCL6, BID, BARD1, RNPS1, CSRNP3, CTLA4, ***ECT2***, FRZB, ***KCNMA1***, RHOB, ERBB4	4.29E-06
GO: 0010762	Regulation of fibroblast migration	3	WDPCP, CORO1C, RAC1	4.18E-03
Molecular Function عملکرد مولکولی				
GO: 0008565	Protein transporter activity	8	USO1, VPS29, AP1S3, COG2, IPO13, IPO7, KPNA4, KPNA5	4.08E-03
Cellular component اجزای سلولی				
GO: 0005911	Cell-cell junction	9	WASF2, WTIP, CLIC4, LCP2, MAGI3, NRCAM, PKD2, ***SLC2A2***, TENM2	2.05E-03

ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفت وزن تخم‌مرغ به شکل ایتالیک و هایلایت مشخص شده‌اند.

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ٤. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم مرغ در سنین ۲۸ هفتگی

Table 4. Gene set enrichment analysis significantly associated with egg weight at 28 week of age

کد هستی شناسی GO ID	نام مسیر (براساس سلسله مراتبی) GO Term	کل ژن‌های موجود در Term No. genes in the GO term	ژن‌های کاندیدای در هر Term Candidate genes in each of the Term	ارزش-p تصحیح شده Adjusted p-value
Biological process فرایند زیستی				
GO: 045722	Positive regulation of gluconeogenesis	3	ARPP19, ***PCK1***, PTPN2	3.41E-02
GO: 0071333	Cellular response to glucose stimulus	4	NOX4, SIN3A, PIK3CA, PCK1	8.84E-04
GO: 0006470	Protein dephosphorylation	4	***CTDSPL***, FBXW11, BTRC, UBLCP1	9.76E-04
GO: 0043065	Positive regulation of apoptotic process	11	BCL6, BID, BARD1, RNPS1, CSRNP3, CTLA4, ***ECT2***, FRZB, ***KCNMA1***, RHOB, ERBB4	6.58E-03
Molecular Function عملکرد مولکولی				
GO: 0004712	Protein serine/threonine/tyrosine kinase activity	4	AURKA, PRKAA2, RELN, ***TNK2***	3.16E-04
Cellular component اجزای سلولی				
GO:0030054	Cell junction	11	EPB41, GABRE, GABRD, GTF2A2, GPHN, GRIN2B, GLRA3, NFIA, SDK1, TENM2, ***XIRP1***	7.43E-04
GO: 0005911	Cell-cell junction	9	WASF2, WTIP, CLIC4, LCP2, MAGI3, NRCAM, PKD2, ***SLC2A2***, TENM2	2.93E-03
PANTHER Pathways مسیرهای PANTHER				
P00021	FGF signaling pathway	7	FGF12, MAP2K2, PLCG2, FGF13, MAP2K4, PIK3C2G, PRKCZ	1.22E-02

ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفت وزن تخم‌مرغ به شکل ایتالیک و هایلایت مشخص شده‌اند.

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۵. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم مرغ در سنین ۳۶ هفتگی

Table 5. Gene set enrichment analysis significantly associated with egg weight at 36 week of age

کد هستی شناسی GO ID	نام مسیر (براساس سلسله مراتبی) GO Term	کل ژن‌های موجود در Term No. genes in the GO term	ژن‌های کاندیدای در هر Term Candidate genes in each of the Term	ارزش-p تصحیح شده Adjusted p-value
Biological process فرایند زیستی				
GO: 0006886	Intracellular protein transport	8	GRIK2, MYO6, PDCD6, RPH3A, RHOB, STX16, STX18, ***SNX6***	2.48E-03
GO: 0035994	Response to muscle stretch	4	RAF1, JUN, PXN, SLC8A1	7.93E-04
GO: 0006915	Apoptotic process	10	BID, TRAF7, WWOX, BIRC6, EGLN3, ***FGFR3***, MAP3K8, PDCD6, ***TGFBR2***, TP63	4.59E-04
GO: 0001934	Positive regulation of protein phosphorylation	6	ROCK2, WDFY2, DVL1, FLCN, ***MMP9***, PRR5	1.61E-001
Molecular Function عملکرد مولکولی				
GO: 0005515	Protein binding	9	CDH2, CNTN1, ITGB1, LEPRE1, MYO6, KCNMA1, TENM1, ***TGFBR2***, ETS1	3.12E-04
GO:0044877	Protein complex binding	4	FLCN, LEPRE1, KCTD5, KCTD2	4.41E-03
Cellular component اجزای سلولی				
GO: 005923	Bicellular tight junction	9	CLMP, BVES, CLDN1, CLDN16, CLDN19, **CLDN3**, ECT2, ***MPP7***, PARD3	9.83E-07
GO: 0005911	Cell-cell junction	9	WASF2, WTIP, CLIC4, LCP2, MAGI3, NRCAM, PKD2, ***SLC2A2***, ***SLC2A6***	4.45E-06
PANTHER Pathways مسیرهای PANTHER				
P00021	FGF signaling pathway	7	FGF12, MAP2K2, PLCG2, FGF13, MAP2K4, PIK3C2G, PRKCZ	3.80E-02

ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفت وزن تخم‌مرغ به شکل ایتالیک و هایلایت مشخص شده‌اند.

از دیگر مسیرهای اصلی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم‌مرغ در سن ۳۶ هفتگی می‌توان به مسیر apoptotic process و intracellular protein transport اشاره کرد. از میان ژن‌های کاندیدای موجود، ژن‌های کاندیدای FGFR3، TGFBR2 و SNX6 دارای بیشترین ارتباط معنی‌دار با وزن تخم‌مرغ بودند. ارتباط معنی‌داری بین ژن کاندیدای FGFR3 با رشد و توسعه عضلات اسکلتی در مرغ گزارش شده است، که این ژن نقش کلیدی در تکثیر و توسعه سلولی در بدن دارد (Jebessa et al. 2018). همچنین ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی موجود در ژن کاندیدای TGFBR2 با صفت ضریب تبدیل خوراک مصرفی در مرغ گزارش شده است (Rasal et al. 2015). ژن کاندیدای TGFBR2 در توسعه و عملکرد سیستم اندوکرینی در بدن نقش دارد (GeneCards). با توجه به همبستگی ژنتیکی متوسط بین وزن بدن با صفات مرتبط با وزن تخم‌مرغ در مرغان نژاد رُد آیلند رِد (Tongsiri et al. 2015)، می‌توان نتیجه گرفت که ژن TGFBR2 می‌تواند بر وزن تخم‌مرغ تولیدی تأثیرگذار باشد.

از مسیرهای مهم در بخش اجزای سلولی هستی شناسی، شاید بتوان مسیر Cell-cell junction را نام برد که حاوی ژن‌های کاندیدای SLC2A6 و SLC2A2 است و جزئی از خانواده ژنی SLC با ۲۳ عضو می‌باشد که دارای نقش انتقالی هستند. این خانواده ژنی نقش‌های بیولوژیکی بسیار گسترده‌ای از قبیل سیگنال‌دهی پرولاکتین، ترشح انسولین، جذب طیف وسیع از مواد مغذی، سنتز هورمون تیروئید و مسیرهای متابولیکی مختلف دیگر دارند (UniProtKB). با توجه به طیف فعالیتی وسیعی ژن‌های انتخابی این خانواده ژنی، اختصاص دقیق ژن‌های انتخابی این خانواده ژنی به مسیر بیولوژیکی خاصی امکان پذیر نیست. در مطالعه‌ی قبلی پویش ژنومی صفات مرتبط با وزن تخم مرغ روی مرغ نژاد رُد آیلند رِد که براساس مدل خطی مختلط تک متغیره بوسیله نرم افزار GEMMA انجام شده است در ارتباط با وزن تخم مرغ در سن ۳۶ هفتگی روی کروموزوم ۱ (GGA1) یک ناحیه kb ۹۰ در ناحیه ۱۶۲/۴۲ تا ۱۶۹/۵۱ گزارش شده است (Liu et al. 2018) که با منطقه شناسایی شده در پژوهش حاضر همخوانی داشت.

وزن تخم‌مرغ در سن ٥٦ و ٦٦ هفتگی: طبقات عملکردی مختلف هستی شناسی و مسیرهای PANTHER مرتبط با وزن تخم‌مرغ در سن ۵۶ و ۶۶ هفتگی در جداول ۶ و ۷ ارائه شده است. مسیر focal adhesion که جزء مسیرهای معنی‌دار مرتبط با وزن تخم‌مرغ در سنین ۵۶ و ۶۶ هفتگی بدست آمد حاوی ۱۰ ژن در این مجموعه ژنی بود که از این بین ژن کاندیدای PPP1CB را می‌توان مرتبط با وزن تخم‌مرغ در نظر گرفت. ژن PPP1CB جزو خانواده ژنی پروتئین فسفاتاز است که نقش کلیدی در تقسیم سلولی، متابولیسم گلیکوژن، سنتز پروتئین و در فرآیندهای متابولیکی گلوکز نقش دارد (UniProtKB). ژن کاندیدای PPP1CB مرتبط با صفات عملکردی گزارش شده است (Zappaterra 2017).

جدول ٦. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم مرغ در سنین ٥٦ هفتگی

Table 6. Gene set enrichment analysis significantly associated with egg weight at 56 week of age

کد هستی شناسی GO ID	نام مسیر (براساس سلسله مراتبی) GO Term	کل ژن‌های موجود در Term No. genes in the GO term	ژن‌های کاندیدای در هر Term Candidate genes in each of the Term	ارزش-p تصحیح شده Adjusted p-value
Biological process فرایند زیستی				
GO: 0006486	Protein glycosylation	7	NPC1, ST3GAL3, B3GNT4, GALNT16, WBSCR17, FUT11, TRIP11	3.02E-04
GO: 0018108	Peptidyl-tyrosine phosphorylation	6	EPHA3, EPHB6, ROS1, ***FGFR2***, MAP2K2, PTPN6	1.03E-03
GO: 0048146	Positive regulation of fibroblast proliferation	5	PDGFC, PDGFA, RNASEH2B, SIRT6, ZMIZ1	1.03E-03
Molecular Function عملکرد مولکولی				
GO: 0005515	Protein binding	9	CDH2, CNTN1, ITGB1, LEPRE1, MYO6, ***KCNMA1***, TENM1, ***IGFBR2***, ETS1	6.28E-06
Cellular component اجزای سلولی				
GO:0005925	Focal adhesion	10	ARF1, LIMS2, LPP, LIMK1, RAB21, SLC9A3R2, DOCK7, ***PPP1CB***, PPP1CC, RHOB	1.98E-03
PANTHER Pathways مسیرهای PANTHER				
P00021	FGF signaling pathway	7	FGF12, MAP2K2, PLCG2, FGF13, MAP2K4, PIK3C2G, PRKCZ	1.65E-04

ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفت وزن تخم‌مرغ به شکل ایتالیک و هایلایت مشخص شده‌اند.

مسیر cellular response to estrogen stimulus از مسیرهای فرایندهای زیستی با تعداد سه ژن معنی‌دار از دیگر مسیرهایی بود که در ارتباط با وزن تخم‌مرغ شناسایی شد. در مطالعه پویش کل ژنومی در مرغان نژاد لگهورن با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدا مرتبط با صفات تولیدی، ژن کاندیدای SFRP1 مرتبط با تولید تخم‌مرغ گزارش شده است (Li et al. 2012).

همچنین ارتباط معنی‌داری بین ژن SFRP1 با وزن عضله بدن در مرغ گزارش شده است (Lu et al. 2012). در مطالعه‌ی قبلی پویش ژنومی صفات مرتبط با وزن تخم‌مرغ ناحیه‌ی ۶۰ مگابازی در ارتباط با وزن تخم‌مرغ در سن ۵۶ هفتگی گزارش شده است(Liu et al. 2018) که با منطقه شناسایی شده در پژوهش حاضر همخوانی دارد.

جدول ۷. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم مرغ در سنین ٦٦ هفتگی

Table 7. Gene set enrichment analysis significantly associated with egg weight at 66 week of age

کد هستی شناسی GO ID	نام مسیر (براساس سلسله مراتبی) GO Term	کل ژن‌های موجود در Term No. genes in the GO term	ژن‌های کاندیدای در هر Term Candidate genes in each of the Term	ارزش-p تصحیح شده Adjusted p-value
Biological process فرایند زیستی				
GO: 0071391	Cellular response to estrogen stimulus	3	WBP2, BCAS3, ***SFRP1***	7.03E-03
GO: 0035372	Protein localization to microtubule	3	CHAMP1, DVL1, MAPRE1	1.87E-03
GO: 0007519	Skeletal muscle tissue development	5	FLNB, FOXP1, KLHL31, SVIL, ***IGFB2***	1.50E-05
Molecular Function عملکرد مولکولی				
GO: 0004672	Protein kinase activity	7	FASTKD2, JAK1, TBCK, MYLK, TRIB2, ERBB4, VRK1	1.76E-03
Cellular component اجزای سلولی				
GO:0005925	Focal adhesion	10	ARF1, LIMS2, LPP, LIMK1, RAB21, SLC9A3R2, DOCK7, ***PPP1CB***, PPP1CC, RHOB	3.75E-02
PANTHER Pathways PANTHER مسیرهای				
P00018	EGF receptor signaling pathway	8	PEBP1, MAP2K2, RASA2, ERBB4, MAP2K4, GAB1, PIK3CG, MRPL38	4.57E-02

ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفت وزن تخم‌مرغ به شکل ایتالیک و هایلایت مشخص شده‌اند.

مسیر skeletal muscle tissue development از دیگر مسیرهای معنی‌دار در این پژوهش است. از میان پنج ژن کاندیدا معنی‌دار، ژن IGFB2 با وزن تخم‌مرغ مرتبط است. عمده عملکرد هورمون رشد بواسطه هورمون‌های فاکتور رشد شبه

انسولین در طیور انجام می‌گیرد. هورمون‌های IGF تنظیم کننده‌های مهمی در تحریک رشد، سنتز پروتئین، تکثیر و تمایز سلول‌ها در بدن می‌باشند. همچنین ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی موجود در ژن IGBP2 با وزن بدن در جوجه‌های گوشتی گزارش شده است (Darzi Niarami et al. 2014).

وزن تخم‌مرغ در سن ۷۲ و ۸۰ هفتگی: طبقات عملکردی مختلف هستی شناسی و مسیرهای PANTHER مرتبط با وزن تخم‌مرغ در سن ۷۲ و ۸۰ هفتگی در جداول ۸ و ۹ ارائه شده است. از مسیرهای مهم و معنی‌دار مرتبط با وزن تخم-مرغ در سنین ۷۲ و۸۰ هفتگی می‌توان به مسیر regulation of feeding behavior اشاره کرد که از بین ژن‌های معنی‌دار در این مسیر، ارتباط معنی‌داری بین ژن‌های کاندیدای MC3R و LEPR در مطالعات قبلی با وزن تخم‌مرغ گزارش شده است. ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی موجود در ژن کاندیدای MC3R با صفات میانگین وزن تخم‌مرغ در سنین ۲۸، ۳۰ و ۳۲ هفتگی مرغان بومی فارس و مازندران گزارش شده است (Mohammadifar & Mohammadabadi 2018; Moazeni et al. 2016). ژن MC3R در تنظیم هموستازی انرژی، هورمون‌های نوروآندوکرین مؤثر بر فعالیت متابولیکی، مصرف خوراک، مصرف انرژی و متابولیسم محیطی نقش دارد. هورمون لپتین در تنظیم خوراک مصرفی، توازن انرژی، رشد و تولیدمثل بدن نقش کلیدی دارند (Moazeni et al. 2016). همچنین ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی در ژن کاندیدای LEPR با وزن بدن در مرغ گزارش شده است (Nie et al. 2005).

از مسیرهای اصلی و مهم معنی‌دار مرتبط با وزن تخم مرغ می‌توان به مسیر cell-cell junction از مسیر اجزای سلولی اشاره کرد. ژن SH3GL2 بر رشد و توسعه اووسیت تأثیرگذار است و ارتباط معنی‌داری بین ژن کاندیدای SH3GL2 با سن در اولین تخم‌گذاری گزارش شده است (Xu et al. 2011). از مسیرهای معنی‌دار مرتبط با وزن تخم‌مرغ می‌توان به positive regulation of proteolysis و lipid catabolic process اشاره نمود که از بین ژن‌های موجود در مسیرهای نامبرده می‌توان به ژن‌های کاندیدای PLCB4 و FGFR4 اشاره نمود. ارتباط معنی‌داری بین ژن‌های کاندیدای PLCB4 و FGFR4 و کارایی خوراک مصرفی (باقیمانده خوراک مصرفی) گزارش شده است (Liu et al. 2018). همچنین ارتباط معنی‌داری بین ژن کاندیدای BTRC با صفات رشد در مرغ گزارش شده است (Zhang et al. 2015).

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۸. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم مرغ در سنین ۷۲ هفتگی

Table 8. Gene set enrichment analysis significantly associated with egg weight at 72 week of age

کد هستی شناسی GO ID	نام مسیر (براساس سلسله مراتبی) GO Term	کل ژن‌های موجود در Term No. genes in the GO term	ژن‌های کاندیدای در هر Term Candidate genes in each of the Term	ارزش-p تصحیح شده Adjusted p-value
Biological process فرایند زیستی				
GO: 0031647	Regulation of protein stability	8	FBXO7, SUGT1, VPS35, AURKA, CDC42, DACT1, QRSL1, TADA2A	2.51E-03
GO: 0060259	Regulation of feeding behavior	3	***LEPR***, ***MC3R***, PCK1	3.73E-02
GO: 1903076	Regulation of protein localization to plasma membrane	3	KALRN, STX8, VTI1B	1.25E-002
GO: 0045862	Positive regulation of proteolysis	4	***FGFR4***, FBXW11, AURKAIP1, ***BTRC***	2.03E-002
Molecular Function عملکرد مولکولی				
GO: 0003707	Steroid hormone receptor activity	8	ABHD2, NR2E1, NR2E3, NR5A2, PPARD, PPARG, PAQR7, PAQR8	2.52E-002
Cellular component اجزای سلولی				
GO:0005925	focal adhesion	10	ARF1, LIMS2, LPP, LIMK1, RAB21, SLC9A3R2, DOCK7, PPP1CB, PPP1CC, RHOB	4.68E-02
GO: 0005911	Cell-cell junction	6	ADAM17, FGFR4, FLRT2, SH3GL2, PIKFYVE, PRKCD	2.01E-03
PANTHER Pathways مسیرهای PANTHER				
P00021	FGF signaling pathway	7	FGF12, MAP2K2, PLCG2, FGF13, MAP2K4, PIK3C2G, PRKCZ	4.95E-05

ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفت وزن تخم‌مرغ به شکل ایتالیک و هایلایت مشخص شده‌اند.

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۹. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار مرتبط با وزن تخم مرغ در سنین ۸۰ هفتگی

Table 9. Gene set enrichment analysis significantly associated with egg weight at 80 week of age

کد هستی شناسی GO ID	نام مسیر (براساس سلسله مراتبی) GO Term	ژن‌های موجود در Term No. genes in the GO term	ژن‌های کاندیدای در هر Term Candidate genes in each of the Term	ارزش-p تصحیح شده Adjusted p-value
Biological process فرایند زیستی				
GO: 0043406	Positive regulation of MAP kinase activity	4	FGF18, MIF, PIK3R5, PDGFB	8.26E-03
GO: 0060259	Regulation of feeding behavior	3	***LEPR***, ***MC3R***, PCK1	9.60E-03
GO: 0016042	Lipid catabolic process	7	LIPI, PNPLA2, PCK1, PLA2G1B, PLA2G1BL, ***PLCB4***, PLCL2	1.82E-03
Molecular Function عملکرد مولکولی				
GO: 0004364	Glutathione transferase activity	4	GDAP1L1, GSTA, GSTK1, HPGDS	3.35E-03
Cellular component اجزای سلولی				
GO: 0015629	Actin cytoskeleton	7	RAB22A, ARHGAP6, ABL1, KLHL17, NPFFR2, SLC16A3, SNCA	2.99E-02
GO: 0005911	Cell-cell junction	6	ADAM17, FGFR4, FLRT2, ***SH3GL2***, PIKFYVE, PRKCD	1.95E-02
PANTHER Pathways مسیرهای PANTHER				
P00018	EGF receptor signaling pathway	7	FGF12, MAP2K2, PLCG2, FGF13, MAP2K4, PIK3C2G, PRKCZ	4.13E-05

ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفت وزن تخم‌مرغ به شکل ایتالیک و هایلایت مشخص شده‌اند.

نتیجه‌گیری: بررسی این مناطق ژنومی با استفاده از پایگاه داده BioMart، GeneCards و UniProtKB نشان داد که این مناطق به طور مستقیم و غیر مستقیم با وزن تخم‌مرغ مرتبط می‌باشند. به طور کلی مسیرهای شناسایی شده در این تحقیق

می‌تواند ما را به سمت ژن‌های مؤثر بر صفات هدایت کند و بررسی بیشتر نواحی مهم ژنومی شناسایی شده با استفاده از آزمون‌های آزمایشگاهی مختلف می‌تواند در تأیید نتایج بدست آمده در این پژوهش مؤثر باشند. از طرفی در این تحقیق به دلیل عدم دسترسی به رکوردهای فنوتیپی و اطلاعات ژنوتیپی مرتبط با صفات وزن تخم‌مرغ در مرغان بومی کشور، از اطلاعات فنوتیپی و ژنوتیپی نژاد خالص رُد آیلند رِد استفاده شد. لذا استفاده از نتایج این تحقیق در مرغان بومی کشور نیاز به مطالعات بیشتر دارد تا در این جمعیت‌ها نیز تأیید شوند. استفاده از ژن‌های عمده اثر شناسایی شده در پژوهش حاضر و سایر پژوهش‌های مرتبط در نژادهای مختلف مرغ می‌تواند در این زمینه کاربردی باشد.

References

Aulchenko YS, Ripke S, Isaacs A, van Duijn CM (2007) GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. J Bioinform 23, 1294–1296.

Bennett AK, Hester PY, Spurlock DE (2006) Polymorphisms in vitamin D receptor, osteopontin, insulin-like growth factor 1 and insulin, and their associations with bone, egg and growth traits in a layer-broiler cross in chickens. Anim Genet 37, 283-286.

Boschiero C, Moreira GCM, Gheyas AA et al. (2018) Genome-wide characterization of genetic variants and putative regions under selection in meat and egg-type chicken lines. BMC Genomics 19, 83.

Braz CU, Taylor JF, Bresolin T et al. (2019) Sliding window haplotype approaches overcome single SNP analysis limitations in identifying genes for meat tenderness in Nelore cattle. BMC Genet 20, 8.

Chen B, Xu J, He X et al. (2015) A Genome-Wide mRNA Screen and Functional Analysis Reveal FOXO3 as a Candidate Gene for Chicken Growth. PLoS One 10, e0137087.

Clancey E, Kiser JN, Moraes JGN et al. (2019) Genome-wide association analysis and gene set enrichment analysis with SNP data identify genes associated with 305-day milk yield in Holstein dairy cows. Anim Genet 50, 254-258.

Darzi Niarami M, Masoudi AA, Vaez Torshizi R (2014) Association of single nucleotide polymorphism of GHSR and TGFB2 genes with growth and body composition traits in sire and dam lines of a broiler chicken. Anim Biotechnol 25, 13-22.

Dong X, Li J, Zhang Y et al. (2019) Genomic Analysis Reveals Pleiotropic Alleles at EDN3 and BMP7 Involved in Chicken Comb Color and Egg Production. Front Genet 10, 612.

Duan Z, Chen S, Sun C et al. (2015) Polymorphisms in Ion Transport Genes Are Associated with Eggshell Mechanical Property. PLoS One 10, e0130160.

Dunn IC, Joseph NT, Bain M et al. (2009) Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hens. Anim Genet 40, 110-114.

Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W (2009) Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/bioconductor package biomaRt. Nat Protoc 4, 1184–1191.

Huang S, He Y, Ye S et al. (2018) Genome-wide association study on chicken carcass traits using sequence data imputed from SNP array. J Appl Genet 59, 335-344.

Jebessa E, Ouyang H, Abdalla BA et al. (2017) Characterization of miRNA and their target gene during chicken embryo skeletal muscle development. Oncotarget 9, 17309-17324.

Li DF, Liu WB, Liu JF et al. (2012) Whole-genome scan for signatures of recent selection reveals loci associated with important traits in White Leghorn chickens. Poult Sci 91, 1804-1812.

Liu J, Liu R, Wang J et al. (2018) Exploring Genomic Variants Related to Residual Feed Intake in Local and Commercial Chickens by Whole Genomic Resequencing. Genes 9, 57-67.

Liu Z, Sun C, Yan Y, et al. (2018) Genome-wide association analysis of age-dependent egg weights in chickens. Front Genet 9, 128.

Liu Z, Yang N, Yan Y et al. (2019) Genome-wide association analysis of egg production performance in chickens across the whole laying period. BMC Genet 20, 67.

Lu Y, Chen SR, Liu WB et al. (2012) Polymorphisms in Wnt signaling pathway genes are significantly associated with chicken carcass traits. Poult Sci 91, 1299-307.

Moazeni SM, Mohammadabadi MR, Sadeghi M et al. (2016) Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. J Livest Sci Tech 4, 51-56.

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2018) Melanocortin-3 receptor (mc3r) gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. Malays Appl Biol 47, 85–90.

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2017) The Effect of Uncoupling Protein Polymorphisms on Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in the Fars Indigenous Chicken. Iran J Appl Anim Sci 7, 679-685.

Mooney MA, Wilmot B (2015) Gene Set Analysis: A Step-By-Step Guide. AM J MED GENET B 168, 517-527.

Nie Q, Lei M, Ouyang J et al. (2005) Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. Genet Sel Evol 37, 339-60.

Peng G, Luo L, Siu H et al. (2010) Gene and pathway-based second wave analysis of genome-wide association studies. Eur J Hum Genet 18, 111–117.

Pértille F, Moreira GC, Zanella R et al. (2017) Genome-wide association study for performance traits in chickens using genotype by sequencing approach. Sci Rep 7, 41748.

Powell JA (2014) GO2MSIG, an automated GO based multi-species gene set generator for gene set enrichment analysis. BMC Bioinform 17, 146.

Rasal KD, Shah TM, Vaidya M et al. (2015) Analysis of consequences of non-synonymous SNP in feed conversion ratio associated TGF-β receptor type 3 gene in chicken. Meta Gene 4, 107-117.

Sah N, Mishra B (2018) Regulation of egg formation in the oviduct of laying hen. Poult Sci J 74, 1–13.

Sell-Kubiak E, Wimmers K, Reyer H, Szwaczkowski T (2017) Genetic aspects of feed efficiency and reduction of environmental footprint in broilers: a review. J Appl Genet 58, 487-498.

Shahdadnejad N, Mohammadabadi MR, Shamsadini M. 2016. Typing of Clostridium Perfringens Isolated from Broiler Chickens Using Multiplex PCR. Genet 3rd millennium 14, 4368-4374.

Tongsiri S, Jeyaruban MG, Van Der Werf JH (2015) Genetic Parameters for Egg Production Traits in Purebred and Hybrid Chicken in a Tropical Environment. Br Poult Sci 6, 613-20.

Walugembe M, Bertolini F, Dematawewa CMB et al. (2019) Detection of Selection Signatures among Brazilian, Sri Lankan, and Egyptian Chicken Populations under Different Environmental Conditions. Front Genet 9, 737.

Wang L, Jia P, Wolfinger RD et al. (2011) Gene set analysis of genome-wide association studies: Methodological issues and perspectives. Genomics 98, 1–8.

Wolc A, Arango J, Jankowski T et al. (2013) Pedigree and genomic analyses of feed consumption and residual feed intake in laying hens. Poult Sci 92, 2270-2275.

Xu H, Zeng H, Luo C et al. (2011) Genetic effects of polymorphisms in candidate genes and the QTL region on chicken age at first egg. BMC Genet 15, 33.

Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A (2010) Method gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. Genome Biol 11, 14-23.

Yousefi Zonuz A, Alijani A, Mohammadi H et al. (2013) Estimation of genetic parameters for productive and reproductive traits in Esfahan native chickens. J Livest Sci Tech 1, 36-40.

Zandi E, Mohammadabadi MR, Ezzatkhah M, Esmailizadeh AK (2014) Typing of Toxigenic Isolates of Clostridium Perfringens by Multiplex PCR in Ostrich. Iran J Appl Anim Sci 4, 509-514.

Zappaterra M (2017) Genomics and New Approaches to Study Complex Traits in Pigs and Other Livestock Species. A Focus on the Investigation of Gene Networks Related to Fat Quality and Deposition in Pigs and Preliminary Research to Study Factors Related to Performances in Piglets and Poultry, PhD thesis, Alma Mater Studiorum Università di Bologna.

Zhang GX, Fan QC, Zhang T et al. (2015) Genome-wide association study of growth traits in the Jinghai Yellow chicken. Genet Mol Res 14, 15331-15338.

Zhu G, Jiang Y (2014) Polymorphism, genetic effect and association with egg production traits of chicken matrix metalloproteinases 9 promoter. Asian-Australas J Anim Sci 27, 1526-1531.