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

Genome-wide association study based on gene set enrichment method (pathway analysis) associated with litter size at birth in Zandi sheep

Hossein Mohammadi

Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Environmental Sciences, Arak University, Arak, Iran. Email: H-mohammadi64@araku.ac.ir

Hossein Moradi Shahrebabak

*Assistant Professor, Department of Animal Sciences, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: hmoradis@ut.ac.ir

Amir Taheri-Yeganeh

Deputy of General Director of Animal Breeding Center and Production Improvement. Ministry of Agriculture of IRAN, Karaj, Iran. Email: ammm1349@yahoo.com

---

Abstract

Objective

Reproductive traits (especially litter size at birth) is one of the most important economic traits in sheep breeding systems. The present study aimed to conduct a genome wide association studies based on Gene-set enrichment analysis for identifying the genomic region, candidate genes and biological pathways associated with Litter size in Zandi sheep breed.

Materials and Methods

Prolific ewes with at least one twining record and others with only singleton records were genotyped using the medium-density Illumina Ovine SNP50 array. 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 litter size evaluated using Plink software method case-control. Using the biomaRt2 R package the SNP were assigned to genes. 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

We identified different sets of candidate genes related to litter size: AFP, FOXO3, ESR1, ESR2, RBP4, AURKA, DLG1 and ZGLP1 in Zandi sheep. According to pathway analysis, 11 pathways were associated with the litter size trait. Among biological pathways, the Oocyte differentiation, Ovulation from ovarian follicle, Estrogen signaling pathway and Positive regulation of peptide hormone secretion pathways have significant association with ovulation rate and ovarian steroidogenesis traits.

Conclusions

Considering, this study supported previous results from GWAS of litter size, also revealed additional regions in the sheep genome associated with these economically important traits, presented here should be contribute to a better understanding of the genetic control of litter size in sheep and using these findings can accelerate the genetic progress in sheep breeding programs.

Keywords: Biological pathways, Genome scan, Litter size, Sheep.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mohammadi H. Moradi Shahrebabak H. Taheri-Yeganeh A (2022) Genome-wide association study based on gene set enrichment method (pathway analysis) associated with litter size at birth in Zandi sheep. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 101-116.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (1), 101-116. DOI: 10.22103/jab.2022.18185.1342
Received: December 20, 2021. Accepted: January 17, 2022.
Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.
© the authors

دانشگاه شهید باهنر کرمان
مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
انجمن بیوتکنولوژی ایران
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

پویش کل ژنوم بر پایه روش آماری غنی‌سازی شبکه ژنی(آنالیز مسیر) مرتبط با تعداد بره متولد شده در هر زایش متعلق به گوسفند زندی

حسین محمّدی

استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران. رایانامه: H-mohammadi64@araku.ac.ir

حسین مرادی شهربابک

*نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: hmoradis@ut.ac.ir

امیر طاهری یگانه

استادیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: amm.1349@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۷

چکیده

هدف: صفات تولیدمثل (مخصوصاً تعداد بره متولد شده در هر زایش) یکی از مهم‌ترین صفات مهم اقتصادی در سیستم‌های پرورش گوسفند می‌باشد. پژوهش حاضر با هدف شناسایی مناطق ژنی، ژن‌های کاندیدا و مسیرهای زیستی مؤثر بر تعداد بره متولد شده میش نژاد زندی بر اساس آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی بوده است.

مواد و روش‌ها: بدین منظور، میش‌های با باروری بالا با حداقل یک رکورد دوقلوزایی و میش‌های دیگر با تنها رکوردهای تک قلوزا با استفاده از آرایه‌های 50K گوسفندی تعیین ژنوتیپ شدند. 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، ارزیابی پویش ژنومی با استفاده از روش مورد-شاهدی در برنامه PLINK انجام شد. سپس با استفاده از بسته نرم افزاری *biomaRt2* ژن‌های معنی‌داری 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، ژن‌های *AFP*، *FOXO3*، *ESR1*، *ESR2*، *RBP4*، *AURKA*، *DLG1* و *ZGLP1* با تعداد بره متولد شده در هر زایش مرتبط بودند ($P < ۰/۰۵$). در تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی، تعداد ۱۱ مسیر با صفت تعداد نتاج در هر زایش مرتبط بودند. از بین مسیرهای زیستی شناسایی شده، مسیرهای Oocyte differentiation، Ovulation from ovarian follicle، Estrogen signaling pathway و Positive regulation of peptide hormone secretion نقش مهمی در نرخ تخمک‌ریزی و استروئیدوژنز تخمدانی داشتند.

نتیجه‌گیری: با توجه به تأیید مناطق قبلی پویش ژنومی صفت تعداد نتاج متولد شده در هر زایش، همچنین شناسایی مناطق ژنومی جدید، آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌ی ژنی درک بهتری از کنترل ژنتیکی صفت تعداد نتاج متولد شده را نشان می‌دهد. استفاده از نتایج این تحقیق می‌تواند سبب تسریع در پیشرفت ژنتیکی برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند شود.

کلیدواژه‌ها: پویش ژنومی، تعداد بره در هر زایش، گوسفند، مسیرهای زیستی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: محمّدی حسین، مرادی شهربابک حسین، طاهری یگانه امیر (۱۴۰۱) پویش کل ژنوم بر پایه روش آماری غنی‌سازی شبکه ژنی(آنالیز مسیر) مرتبط با تعداد بره متولد شده در هر زایش متعلق به گوسفند زندی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۴(۱)، ۱۱۶–۱۰۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

نژادهای بومی هر کشوری به عنوان یک سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد و رونق آن کشور محسوب می‌شوند که حفظ و نگهداری از این نژادها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است (Mohammadi and Sadeghi 2010). نشخوارکنندگان کوچک، به ویژه انواع نژادهای بومی، از جنبه های اقتصادی–اجتماعی در معیشت قسمت قابل توجهی از جمعیت انسانی در مناطق گرم نقش بسزایی دارند (Mohammadifar and Mohammadabadi 2011; Jafari Darehdor et al. 2016). بنابراین، آزمایشات ترکیبی با تأکید بر مدیریت و پیشرفت ژنتیکی برای بهبود تولیدات حیوانی از اهمیت تعیین کننده‌ای برخوردار هستند (Ahsani et al. 2011; Mohammadabadi 2016). کارآیی اقتصادی و بیولوژیکی صنایع پرورش گوسفند به طور کلی با افزایش بهره‌وری و عملکرد تولیدمثلی میش‌ها بهبود می‌یابد (Vajed Ebrahimi et al. 2016; Mohammadabadi et al. 2017). بیست و شش نژاد گوسفند در ایران پرورش داده می‌شوند (Mohammadabadi et al. 2018; Ghotbaldini et al. 2019) که شامل بیش از ۵۰ میلیون رأس هستند (Amiri Roudbar et al. 2018; Masoudzadeh et al. 2020a) که هر کدام از آنها با بخش خاصی از کشور سازگار شده‌اند (Amiri Roudbar et al. 2017; Masoudzadeh et al. 2020b).

صفات تولیدمثلی، مهم‌ترین صفات مؤثر بر سودآوری اقتصادی سیستم‌های پرورش گوسفند هستند و سالانه به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر توانایی میش در تولید بره‌های بیشتر قرار می‌گیرند (Mohammadi and Sadeghi 2010). از سوی دیگر، تولیدمثل یک فرآیند پیچیده زیست شناختی بوده که علاوه بر شرایط محیطی تحت تأثیر فاکتورهای ژنتیکی نیز قرار دارد. صفت باروری یک صفت کمی است که توسط ژن‌های گوناگون کنترل می‌شود و در انتخاب به کمک نشانگرهای ژنتیکی دارای پیوستگی با جایگاه‌های صفات کمی، ژنوتیپ می‌تواند به طور مستقیم انتخاب شده و توسعه‌ی اصلاح نژادی با سرعت بالا مد نظر قرار گیرد. در طی سال‌های اخیر، تکنیک‌های بیولوژی مولکولی با سرعت شگرفی توسعه پیدا کرده و موجب گردیده است تا پروژه‌های مختلف توالی‌یابی کل ژنوم، از جمله گوسفند تکمیل شود و متعاقب آن پانل‌های مختلفی از آرایه‌های نانویی با تراکم متفاوت طراحی شده و انجام مطالعات پویش کل ژنومی را امکان پذیر نماید. مطالعه پویش ژنومی می‌تواند به شناسایی دقیق ژن‌های مرتبط با صفات اقتصادی کمک کرده و یافته‌های آن برای انتخاب به کمک نشانگر مفید باشد (Johnston et al. 2011).

در مطالعات پویش کل ژنومی به طور معمول از تصحیح بنفرونی برای تعیین آستانه معنی‌داری و جلوگیری از خطای نوع اول استفاده 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 ارتباط آماری 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. از مسیرهای زیستی به عنوان بستری معنی‌دار که عملکرد مجموع ژن‌ها در آنها یک یا چند هدف واحد را پیگیری می‌کند استفاده می‌شود (Mooney and Wilmot 2015).

اخیراً، مطالعات پویش ژنومی بر مبنای مسیر با استفاده از تفسیر مجموعه‌های ژنی روی صفات مرتبط با تعداد بره متولد شده در هر زایش متعلق به نژادهای مختلف گوسفندان جهان انجام شده است. نتایج به دست آمده از آنالیز مسیر، منجر به شناسایی ۳۰ طبقه مختلف عملکردی هستی‌شناسی ژن و مسیرهای زیستی KEGG معنی‌دار مرتبط شامل TGF-β signaling pathway، Oxytocin signaling pathway، Estrogen signaling pathway، Prolactin signaling pathway و Insulin signaling pathway و ژن‌های کاندیدای *BMP5*، *DHCR24*، *BMPR1B*، *ESR1*، *ESR2* و *SMAD1*، *PLCB1*، *SMAD2*، *INSR*، *PTGS2*، *BMP7*، *EGFR* و *KCNMA1* شده بود (Khaltabadi Farahani et al. 2020). در

---

[1] Pathway-based analysis

پژوهشی دیگر با عنوان مطالعه ارتباط سنجی در سطح ژنوم برپایه تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی برای شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر نرخ دو قلوزایی در ۹۶ گوسفند بلوچی که براساس نرخ دوقلوزایی بالا و پایین انتخاب شده بودند، موفق به شناسایی ژن‌های کاندیدا شامل CTH، *ANKRD13C*، *SRSF11*، *PTGER3*، *LDHB*، *LRRC40* و *NTRK2* روی کروموزوم‌های شماره ۱، ۳، ۱۰، ۱۵ و ۲۵ شدند. همچنین مسیرهای زیستی defense response، cell adhesion و cell junction گزارش شده بودند، نتایج نشان داد روش پویش ژنومی بر مبنای مسیر کارآیی بالاتری برای یافتن مناطق ژنومی و درک بهتری از معماری ژنتیکی صفت تعداد نتاج متولد شده نسبت به آنالیز پویش ژنومی بر پایه تک نشانگری داشت (Esmaeili-Fard et al. 2021). مطالعه‌ی مروری با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای و مسیرهای زیستی مرتبط با تعداد بره متولد شده در گوسفند براساس آنالیز مسیر انجام شده است، از میان ۲۱ ژن کاندیدای شناسایی شده ژن‌های *FLT1* و *CCL2* و از میان ۲۰ مسیر زیستی مرتبط با تعداد نتاج، مسیر زیستی negative regulation of vascular endothelial cell proliferation بیشترین ارتباط را با تعداد نتاج متولد شده در هر زایش را داشتند (Ghiasi and Abdollahi-Arpanahi 2021). هدف از انجام پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی و مسیرهای زیستی مرتبط با صفت تعداد نتاج متولد شده در هر زایش گوسفند زندی 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 تحقیق حاضر، از ۲۰۰ گوسفند نژاد زندی حاضر در دو گله مرکز اصلاح نژاد خجیر واقع در تهران وابسته به سازمان جهاد کشاورزی استان تهران، مقدار ۷-۵ سی سی خون استحصال و همراه با ۰/۵ میلی لیتر EDTA در لوله‌های خلاء با pH ۵-۷/۸ نگهداری شد. از میان نمونه‌های اخذ شده پس از آنالیز شجره، حیواناتی که کمترین رابطه خویشاوندی را با هم داشته باشند به تعداد ۹۶ رأس انتخاب شدند. تعدادی از میش‌ها (۴۴ رأس) براساس صفت تعداد بره متولد شده به ازای هر زایش بیشتر از یک (دارای حداقل یک رکورد دوقلوزایی) و تعدادی میش (۵۲ رأس) براساس صفت تعداد بره متولد شده در هر زایش برابر با یک (دارای رکورد تک قلوزایی) انتخاب شدند. استخراج DNA با استفاده از روش بهینه یافته استخراج بافر نمکی از خون کامل انجام شد. ژنوتیپ نمونه‌ها در کمپانی Neogen (http://genomics.neogen.com) در کشور آمریکا با استفاده از آرایه‌های Illumina OvineSNP50K BeadChipتعیین ژنوتیپ شدند. برای فیلتراسیون داده‌های ژنومی در ابتدا نمونه‌هایی که فراوانی تعیین ژنوتیپ در آنها کمتر از ۹۵ درصد بود، شناسایی و حذف شدند. در مرحله بعد نشانگرهایی که فراوانی آلل نادر در آنها کمتر از ۱ درصد بود حذف شدند. سپس، نشانگرهایی که نرخ تعیین ژنوتیپ آنها در نمونه‌ها کمتر از ۹۵ درصد بود شناسایی و حذف شدند. در نهایت، برای SNPهای باقیمانده آنهایی که در تعادل هاردی-واینبرگ قرار نداشتند، کنار گذاشته شدند و در نهایت، نشانگرهایی که موقعیت ژنتیکی آنها نامعلوم بود از آنالیز پویش کل ژنومی کنار گذاشته شدند. مراحل مختلف فیلتراسیون با استفاده از نرم افزار PLINK (v1.90; http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink) انجام شد (Chang et al. 2015). بعد از کنترل کیفیت تعداد ۹۲ رأس

دام و تعداد ۴۶۰۷۰ SNP برای آنالیزهای مطالعه پویش کل ژنومی بر پایه روش غنی‌سازی مجموعه ژنی باقی ماندند. جهت ارتباط فنوتیپ با ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش مورد–شاهدی نرم افزار PLINK 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

۱-**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 گوسفند (*Oar_v3.1*) به ژن‌هایی که نشانگر SNP مورد نظر در داخل آن ژن و یا ۳۰۰kb بالادست یا پایین دست آن ژن قرار داشت، ارتباط داده شدند.

۲- **ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی:** جهت تعیین طبقات عملکردی ژنی و مسیرهای متابولیکی و تنظیمی ژن‌های معنی‌دار از پایگاه‌های اطلاعاتی شامل GO (http://www.geneontology.org/)، KEGG (http://www.genome.jp/kegg/)، Panther (http://www.pantherdb.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 دست‌های ژنی استفاده گردید. در این مرحله فرض بر این است که ژن‌هایی که در یک طبقه عملکردی خاص از سه مجموعه ژنی هستی شناسی قرار می‌گیرند می‌توانند به عنوان یک گروه از ژن‌هایی که برخی از ویژگی‌های خاص و مشترک دارند.

۳- **پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر:** ارتباطهای معنی‌دار مسیرهای عملکردی مرتبط با صفات تولیدمثلی 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:

$$\mathrm{P-value} = 1 - \sum_{i=1}^{k-1} \frac{\binom{S}{i}\binom{N-S}{m-i}}{\binom{N}{m}} \qquad \text{(رابطه ۱)}$$

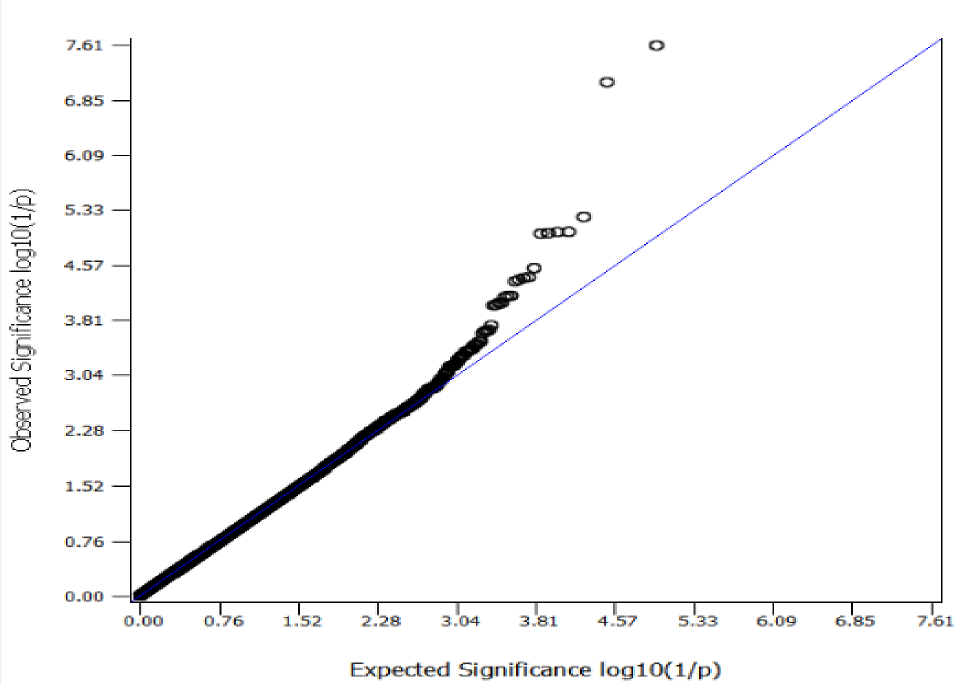
در این رابطه، k برابر است با تعداد ژن‌های معنی‌دار در طبقه عملکردی، S برابر با تعداد کل ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفت مورد بررسی، N برابر با کل تعداد ژن‌هایی که در این مطالعه آنالیز شدند و m برابر با تعداد کل ژن‌های موجود در مسیر عملکردی. تجزیه غنی‌سازی مجموعه ژنی با استفاده از بسته نرم افزاری goseq (Young 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.

---

[۲] Hypergeometric

نتایج و بحث

در این پژوهش، مطالعه پویش کل ژنومی با تجزیه و تحلیل غنی‌سازی و مجموعه ژنی جهت شناسایی طبقات عملکردی و ساز و کارهای مولکولی مرتبط با تعداد بره متولد شده به ازای هر زایش در گوسفند نژاد زندی انجام گردید. پلات‌های Q-Q و منهتن مرتبط با صفت تعداد بره متولد شده به ازای هر زایش در شکل ۱ و ۲ ارائه شده است. چندین روش برای تخمین کنترل تورم ژنومیکی (λ) وجود دارد که در این تحقیق روش تخمین گر میانه اجرا شد. فاکتور تورم کنترل جمعیتی بزرگتر از ۱ ($\lambda>1$) وجود لایه‌بندی جمعیتی و یا خطای تعیین ژنوتیپ را نشان می‌دهد. فاکتور لامبدا از طریق آنالیز پیوستگی در PLINK برای صفت مورد مطالعه محاسبه شد که برای صفت تعداد بره متولد شده به ازای هر زایش ۱/۰۵۸، بود که همان طور که مشاهده می‌شود تقریباً برابر با ۱ بودند و نشان دهنده عدم وجود لایه بندی جمعیتی برای اجرای آنالیزهای پویش کل ژنومی بود. در مطالعاتی که لامبدا کوچکتر از ۱/۱ یا مساوی ۱ است نیازی به تصحیح اثرات ساختار جمعیتی نیست (Hinrichs et al. 2009).

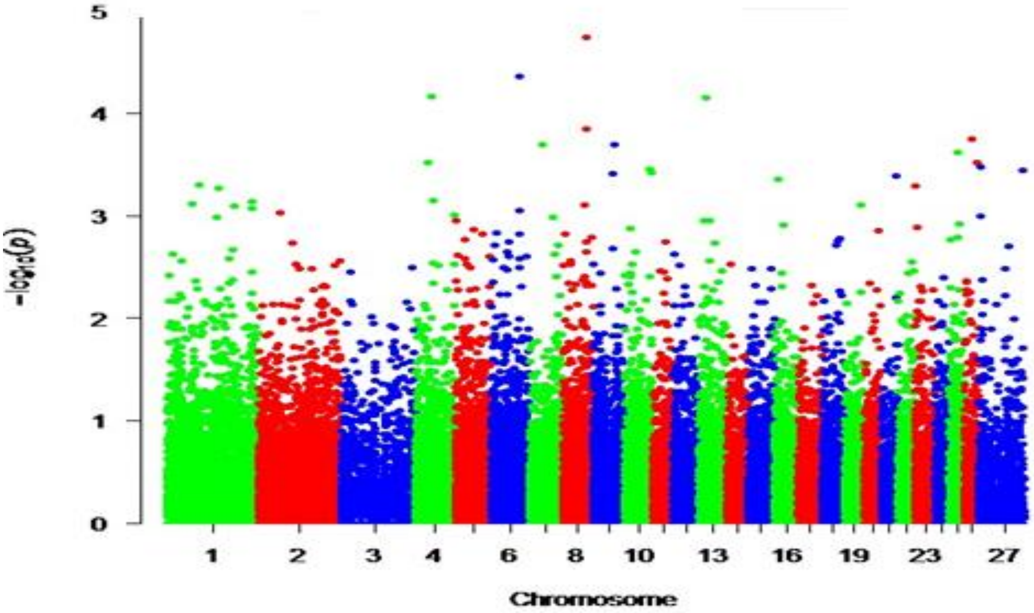


شکل ۱. پلات Q-Q برای صفت تعداد بره متولد شده در هر زایش در گوسفند زندی

Figure 1. Plots Q-Q for litter size at birth trait in zandi sheep

تعداد ۲۵۷۰۰ عدد ژن از ۲۷۰۵۴ ژن حاشیه‌نویسی شده در گوسفند به وسیله نشانگرهای SNP پوشش داده شد که در این میان تعداد ژن‌های معنی‌دار در گوسفندان زندی ۴۷۲۸ ژن 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 ۳۰۰ kb قرار گرفت. این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفت تعداد بره متولد شده به ازای هر زایش برای تجزیه GSEA-SNP انتخاب شدند. تعداد مجموعه‌های ژنی حاصل از پایگاه‌های داده‌ای مختلف شامل

۱۴۳ طبقات هستی شناسی به دست آمد و ۱۱ مسیر زیستی KEGG مشاهده شد. مسیرهای که بیشتر از سه ژن و کمتر از ۳۰۰ ژن داشتند گزارش شده‌اند.



شکل ۲. پلات منهتن برای صفت تعداد بره متولد شده در هر زایش در گوسفند زندی. محور X مکان نشانگرها روی کروموزوم‌ها و محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ ارزش P-value

Figure 2. Manhattan plot for litter size at birth trait in zandi sheep. X axis, SNP positions on chromosomes, Y axis, -Log10 P-value

براساس تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO)، فرآیندهای زیستی مختلفی برای ژن‌های مؤثر بر تعداد بره متولد شده به ازای هر زایش مشاهده شد که مطابق با نتایج به دست آمده از تحقیقات پیشین بود (Esmaeili-Fard et al. 2021; Khaltabadi Farahani et al. 2020). جزئیات کامل ترم‌های هستی شناسی به همراه اسامی ژن‌های کاندیدا در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج حاصل از این تحلیل نشان دهنده این است که ژن‌های *AFP* و *FOXO3* با فرآیند Ovulation from ovarian follicle، ژن‌های *BMP4*، *ESR1* و *ESR2* با فرآیند Steroid hormone mediated signaling pathway، ژن‌های *AURKA*، *DLG1* و *ZGLP1* با فرآیند Oocyte differentiation و ژن *RBP4* در فرآیند زیستی Positive regulation of peptide hormone secretion مرتبط با تعداد بره متولد شده به ازای هر زایش با بیشترین مقدار ضریب غنی‌سازی هستند، در گوسفندان نژاد زندی مشاهده شد. برخی از ژن‌های این فرآیند زیستی در مطالعات مختلف بررسی ژن‌های کاندیدای مرتبط با تولیدمثل به خصوص چند قلوزایی در ارتباط می‌باشند. ژن کاندیدای *AFP* از خانواده ژنی آلبومین می‌باشد که نقش اساسی در انتقال اسیدهای چرب و کلسترول دارد. مطالعه‌ی پویش ژنومی در سطح mRNA با استفاده از تکنیک RNA-Seq گوسفندان آمیخته رامنی و تکسل، ژن کاندیدای *AFP* به عنوان ژن کاندیدا مرتبط با توسعه و رشد تخمدان در دوره جنینی گزارش شده است (Smith et al. 2019). همچنین، در مطالعه‌ای با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب در گوسفندان نژاد Djallonké، ژن کاندیدای *AFP* مرتبط

با سازگاری با شرایط سخت محیطی گزارش شده است (Álvarez et al. 2020). ژن کاندیدای *FOXO3* از خانواده ژنی *FOXO* بوده و در کنترل فولیکوژنوسیز نقش دارد. فعالیت رونویسی ژن کاندیدای *FOXO3* در پاسخ به عوامل انسولین، آپوپتوز، پاسخ به استرس اکسیداتیو و متابولیسم انرژی انجام می‌شود (Genecards). مطالعه پویش کل ژنومی برای شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با تعداد توله زنده متولد شده در هر زایش خوک انجام شده بود، ژن کاندیدای *FOXO3* به عنوان ژن کاندیدا گزارش شده است (Wu et al. 2018). دو ایزوفرم برای گیرنده استروژن شناسایی شده است: گیرنده استروژن آلفا (*ESRα*) و گیرنده استروژن بتا (*ESRβ*) که هر کدام توسط ژن‌های جداگانه‌ای *ESR1* و *ESR2* واقع در کروموزوم‌های ۸ و ۷ به ترتیب کد می‌شوند. مطالعات اخیر، نشان دهنده این است که ژن‌های *ESR1* و *ESR2* ژن‌های بسیار مهمی هستند که در مکانیسم چند قلوزایی نقش دارند (Mencik et al. 2019).

جدول ۱. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی داری (P<0.05) مرتبط با تعداد بره متولد شده

Table 2. Gene set enrichment analysis significantly (P < 0.05) associated with litter size at birth

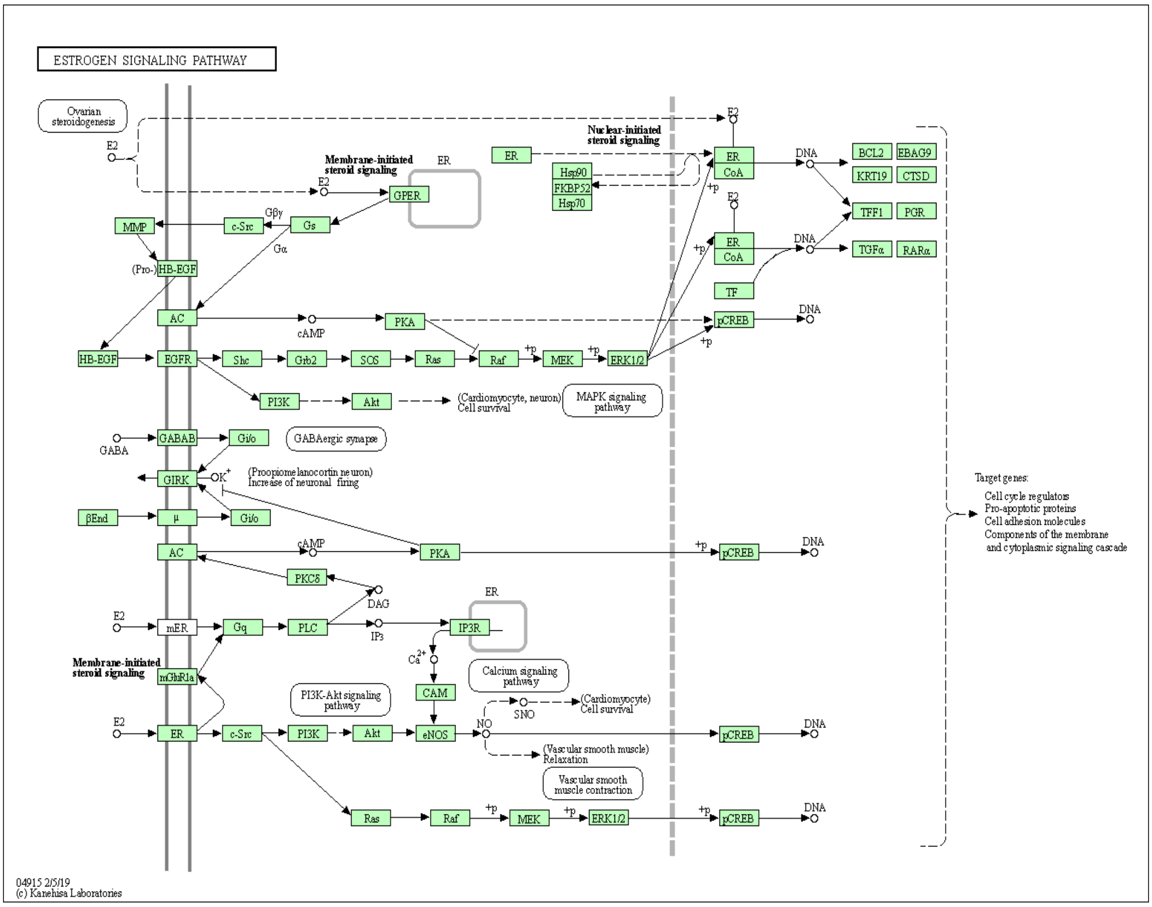
GO ID	Term (GO hierarchy level)	Enrichment score	No. genes in the GO term	No. significant genes	FDR
Biological process					
GO:0001542	Ovulation from ovarian follicle	1.31	27	4	2.71E-02
GO:0043401	Steroid hormone mediated signaling pathway	2.50	26	6	2.54E-02
GO:0009994	Oocyte differentiation	1.65	12	4	3.29E-02
GO:0090277	Positive regulation of peptide hormone secretion	1.40	20	3	2.42E-02
GO:0046425	Regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT	1.23	32	21	2.43E-02
Molecular Function					
GO:0034056	Estrogen response element binding	1.78	27	4	2.16E-02
GO:0004984	Olfactory receptor activity	1.45	45	12	4.00E-02
Cellular component					
GO:0030054	Cell junction	1.23	130	65	1.30E-02
PANTHER Pathways					
P04915	Estrogen signaling pathway	2.1	133	18	2.26E-02
P04512	ECM-receptor interaction	2.35	36	9	2.04E-03
Reactome pathways					
R-HAS1170546.1	Prolactin receptor signaling	1.10	14	8	3.10E-03

این ژن‌ها در دو مسیر مختلف فرآیند زیستی شامل Steroid hormone mediated signaling pathway وEstrogen response element binding مشاهده شد. استروژن یکی از دو هورمون جنسی استروئیدی است که به‌وسیله

تخمدان ترشح می‌شود و در رشد جنینی، بروز صفات ثانویه جنسی، سیکل باروری شامل شکل‌گیری فولیکول‌ها و بلوغ تخمک‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند. برای تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی هورمون‌های استروئیدی وجود گیرنده‌ها در سلول‌های هدف ضروری می‌باشد. گیرنده‌های استروژن در سلول‌های رحم و واژن و به طور اختصاصی در تخمک، سلول‌های گرانولوزا و سلوهای اپیتلیال تخمدان وجود دارند (Mohammadabadi, 2020a).

با مطالعه پویش کل ژنومی برپایه تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی مرتبط با چندقلوزایی در گوسفندان جهان، ژن‌های *ESR1* و *ESR2* در فرآیند زیستی Cellular response to estrogen stimulus به عنوان ژن‌های کاندیدای در نژاد وادی و رومانوف با باروری بالا گزارش شده‌اند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (Khaltabadi Farahani et al. 2020). همچنین در مطالعه‌ای با بررسی بیان ژن گیرنده‌های استروژن در بافت‌های تخمدان، رحم، بیضه، قلب، کلیه و مغز بزهای کرکی رائینی مشخص گردید که بیان ژن‌های *ESR1* و *ESR2* در بافت‌های تولیدمثلی (تخمدان و رحم) بسیار بیشتر از بافت‌های غیر تولیدمثلی بیان شده‌اند که نشان دهنده نقش استروژن در رشد، تمایز و بلوغ سلول‌های گرانولوزا می‌باشد (Mohammadabadi, 2020a,b). با توجه به نتایج پژوهش حاضر و نتایج سایر محققین می‌توان نتیجه گرفت که گیرنده‌های استروژن نقش مهمی در اسپرماتوژنز و باروری دارند و نتایج این پژوهش اساسی را برای پژوهش‌های آینده جهت توصیف نقش ژن‌های *ESR1* و *ESR2* به عنوان ژن‌های کاندیدا برای باروری ماده‌ها فراهم کرده است. *AURKA* و *DLG1* دو ژن مهم دیگری مرتبط با تولیدمثل می‌باشند که تأثیر این دو ژن در چند قلوزایی در مطالعات اخیر مشاهده است. محصول ژن *AURKA* یک پروتئین است که از ۳۰۴ اسید آمینه تشکیل شده است. این پروتئین دو بخش تنظیمی و کاتالیتیک دارد که بخش کاتالیتیک آن فعالیت آنزیم‌های داخل سلولی را افزایش می‌دهد (Genecards). ژن کاندیدای *AURKA* در مطالعه پویش کل ژنومی برپایه آنالیز غنی سازی مجموعه‌های ژنی در گوسفندان نژاد بلوچی مرتبط با دوقلوزایی در مسیر زیستی Phosphotransferase activity و Transferase activity گزارش شده است (Esmaeili-Fard et al. 2021). همچنین در مطالعه‌ی پویش کل ژنومی مرتبط با تعداد بزغاله‌های متولد شده در هر زایش نیز ژن کاندیدای *AURKA* گزارش شده است (Wang et al. 2021). ژن کاندیدای *DLG1* مرتبط با محرک تقسیم میتوز سلول‌های گرانولوزا بوده و تولید پروژسترون تخمدانی می‌شود و یک ژن درگیر در لانه‌گزینی بوده و در اپیتلیوم رحم چسبندگی آغازین را بر عهده دارد. در مطالعه پویش کل ژنومی جهت شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با تعداد نتاج متولد شده در هر زایش در گوسفندان نژاد Pelibuey، ژن کاندیدای *DLG1* گزارش شده است که با نتایج حاضر همخوانی دارد (Hernández-Montiel et al. 2020). تحلیل مسیرهای زیستی KEGG نشان‌دهنده این است که ژن‌های *ESR1*، *ESR2* و *DLG1* به طور معنی‌داری با مسیر زیستی سیگنال‌دهی استروژن در ارتباط می‌باشند. این مسیر زیستی نقش مهمی در مکانیسم تولیدمثلی به خصوص تعداد نتاج در هر زایش دارد. در شکل ۳ مسیر سیگنالی استروژن و ژن‌های مربوطه شناسایی شده از پایگاه برخط KEGG ارائه شده است. در بعضی از مطالعات ژنتیکی نشان داده شده که میزان تخمک‌اندازی و تعداد نتاج در هر زایش می‌تواند تحت تأثیر چند ژن بزرگ اثر باشند.

مسیر معنی‌دار دیگر مرتبط با چندقلوزایی مسیر Positive regulation of peptide hormone secretion و شامل ژن کاندیدای *RBP4* بود. ژن *RBP4* پروتئینی از خانواده لیپوکالین‌ها می‌باشد و وظیفه انتقال رتینول را در گردش خون از کبد به بافت‌های محیطی برعهده دارد اما اخیراً نقش آن به عنوان ادیپوکاین نیز مورد توجه قرار گرفته است که حساسیت به انسولین را کاهش داده و گلوکونئوژنز کبدی را افزایش می‌دهد، بنابراین *RBP4* به عنوان یک فاکتور التهابی، نقش واسطه‌ای بین بافت چربی و بافت هدف دارد. از اینرو می‌تواند موجب افزایش رهاسازی تخمک در اویداکت گردد. ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی در ژن کاندیدای *RBP4* با تعداد توله متولد شده در هر زایش در نژادهای آمیخته با باروری بالا در خوک گزارش شده است (Mencik et al. 2019).


ESTROGEN SIGNALING PATHWAY
Ovarian steroidogenesis
E2
Membrane-initiated steroid signaling
ER
GPER
Gs
Gβγ
Gα
c-Src
MMP
(Pro-)HB-EGF
HB-EGF
AC
cAMP
PKA
EGFR
Shc
Grb2
SOS
Ras
Raf
MEK
ERK1/2
+p
PI3K
Akt
(Cardiomyocyte, neuron) Cell survival
MAPK signaling pathway
Nuclear-initiated steroid signaling
Hsp90
FKBP52
Hsp70
CoA
DNA
BCL2
EBAG9
KRT19
CTSD
TFF1
PGR
TGFα
RARα
TF
pCREB
GABA
GABAB
Gi/o
GABAergic synapse
GIRK
K+
(Proopiomelanocortin neuron) Increase of neuronal firing
βEnd
μ
PKCδ
DAG
mER
Gq
PLC
IP3
IP3R
Ca2+
CAM
Calcium signaling pathway
mGluR1a
PI3K-Akt signaling pathway
eNOS
NO
SNO
(Cardiomyocyte) Cell survival
(Vascular smooth muscle) Relaxation
Vascular smooth muscle contraction
Target genes:
Cell cycle regulators
Pro-apoptotic proteins
Cell adhesion molecules
Components of the membrane and cytoplasmic signaling cascade
04915 2/5/19
(c) Kanehisa Laboratories

شکل ۳. مسیر سیگنالی استروژن و ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفت تعداد بره متولد شده که به صورت هایلایت مشخص شده‌اند (پایگاه داده KEGG)

Figure 3. Estrogen signaling pathway and candidate genes related to litter size trait highlighted (KEGG database)

با توجه به تعداد کم نمونه مورد استفاده در پژوهش حاضر (۹۶ رأس) نیز باید در استفاده از ژن‌های کاندیدای شناسایی شده مرتبط با تعداد نتاج متولد شده در هر زایش در برنامه‌های اصلاحی با احتیاط عمل کرد. البته می‌توان با ادغام داده‌های تحقیقات

مشابه جدید و استفاده از آنالیزهای آماری جامع‌تر برای تأیید نتایج پژوهش حاضر استفاده کرد. همچنین با استفاده از آزمون‌های آزمایشگاهی مختلف می‌تواند در تأیید نتایج بدست آمده در این پژوهش مؤثر باشند. علاوه بر این، با توجه به توسعه و تجاری شدن آرایه‌های گوسفندی با تراکم بالا (600k) با بکارگیری این نوع تراشه‌ها، امکان شناسایی دقیق‌تر جایگاه‌های مسبب صفت مورد بررسی دو از انتظار نخواهد بود.

نتیجه‌گیری: بررسی مناطق ژنومی به دست آمده با استفاده از پایگاه داده BioMart، GeneCards و UniProtKB نشان داد که بیشتر این مناطق شناسایی شده روی کروموزوم‌های مختلف با صفات تولیدمثلی در نژادهای مختلف گوسفند مرتبط می‌باشند. با توجه به عملکرد بیولوژیکی مسیرهای شناسایی شده در این پژوهش، به نظر می‌رسد این ژن‌ها در بروز فنوتیپی صفت تعداد بره متولد شده به ازای هر زایش نقش ایفا می‌کنند، در نتیجه می‌توان کارآیی روش تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی برای پویش ژنومی صفات تولیدی اقتصادی به خصوص صفت تعداد بره متولد شده به ازای هر زایش را نیز مورد تأیید قرار داد.

سپا سگزاری: از شرکت دانش بنیان ساینا گستر البرز به خاطر حمایت مالی تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها و ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند زندی استان تهران (ایستگاه خجیر) برای در اختیار گذاشتن حیوانات در اجرای این پروژه کمال تشکر را داریم.

منابع

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

خلت آبادی فراهانی امیرحسین، محمدی حسین، مرادی محمد حسین (۱۳۹۹) تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی با استفاده از مطالعات پویش کل ژنومی جهت شناسایی ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با تعداد نتاج در نژادهای مختلف گوسفند. مجله تولیدات دامی ۲۲(۳)، ۳۳۵-۳۲۵.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR . مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۳-۱۱۱.

محمدی حسین، صادقی مصطفی (۱۳۸۹) برآورد پارامترهای ژنتیکی صفات رشد و تولیدمثل و روند ژنتیکی صفات رشد در گوسفند نژاد زل تحت سیستم روستائی. علوم دامی ایران ۴۱(۳)، ۲۴۱-۲۳۱.

محمدی‌فر آمنه، محمدآبادی محمد رضا (۱۳۹۰) کاربرد نشانگرهای ریزماهواره برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی. علوم دامی ایران ۴۲(۴)، ۳۳۷-۳۴۴.

واجدابراهیمی محمدتقی، محمدآبادی محمدرضا، اسماعیلی زاده علی (۱۳۹۴) بررسی تنوع ژنتیکی پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۷(۴)، ۱۵۸-۱۴۳.

References

Ahsani MR, Bafti MS, Esmailizadeh AK, Mohammadabadi MR (2011) Genotyping of isolates of Clostridium perfringens from vaccinated and unvaccinated sheep. Small Rumin Res 95, 65-69.

Álvarez I, Fernández I, Traoré A, et al. (2020) Genomic scan of selective sweeps in Djallonké (West African Dwarf) sheep shed light on adaptation to harsh environments. Sci Rep 10(1), 2824.

Amiri Roudbar M, Mohammadabadi MR, Mehrgardi AA, Abdollahi-Arpanahi A (2017) Estimates of variance components due to parent-of-origin effects for body weight in Iran-Black sheep. Small Rum Res 149, 1-5

Amiri Roudbar M, Abdollahi-Arpanahi R, Ayatollahi Mehrgardi A, et al. (2018) Estimation of the variance due to parent-of-origin effects for productive and reproductive traits in Lori-Bakhtiari sheep. Small Rumin Res 160, 95-102.

Chang CC, Chow CC, Tellier LCAM, et al. (2015) Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. Giga Sci 4(7), 1–16.

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

Esmaeili-Fard SM, Gholizadeh M, Hafezian SH, Abdollahi-Arpanahi R (2021) Genome-wide association study and pathway analysis identify NTRK2 as a novel candidate gene for litter size in sheep. PLoS One 16(1), e0244408.

Ghiasi H, Abdollahi-Arpanahi R (2021) The candidate genes and pathways affecting litter size in sheep. Small Rumin Res 205, 106546.

Ghotbaldini H, Mohammadabadi MR, Nezamabadi-pour H, et al. (2019). Predicting breeding value of body weight at 6-month age using Artificial Neural Networks in Kermani sheep breed. Acta Scientiarum. Anim Sci 41, e45282.

Hernández-Montiel W, Martínez-Núñez MA, Ramón-Ugalde JP, et al. (2020) Genome-Wide Association Study Reveals Candidate Genes for Litter Size Traits in Pelibuey Sheep. Animals (Basel) 10(3), 434.

Hinrichs AL, Larkin EK, Suarez BK (2009) Population Stratification and Patterns of Linkage Disequilibrium. Genet Epidemiol 33, 88-92.

Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh A, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. J Rumin Res 4 (4), 119-132 (In Persian).

Johnston SE, McEwan JC, Pickering NK, et al. (2011) Genome-wide association mapping identifies the genetic basis of discrete and quantitative variation in sexual weaponry in a wild sheep population. Mol Ecology 20, 2555–2566.

Khaltabadi Farahani AH, Mohammadi H, Moradi MH (2020) Gene set enrichment analysis using genome-wide association study to identify genes and pathways associated with litter size in various sheep breeds. Anim prod 22 (3), 325-335 (In Persian)

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020a) Effects of diets with different levels of fennel (Foeniculum vulgare) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. Small Rumin Res 193, e106276.

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020b) Dlk1 Gene Expression in Different Tissues of Lamb. Iran J Appl Anim Sci 10 (4), 669-677.

Mencik S, Vukovic V, Spehar M, et al. (2019) Association between ESR1 and RBP4 genes and litter size traits in a hyperprolific line of Landrace × Large White cross sows. Veterinarni Medicina 64(03), 109–117.

Mohammadabadi M.R. (2016). Inter-Simple Sequence Repeat Loci associations with predicted breeding values of body weight in Kermani sheep. Genet 3rd Millennium 14, 4383-4390.

Mohammadabadi MR (2020a) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 12(1), 177-192. (In Persian)

Mohammadabadi MR (2020b) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 12 (4), 169-184. (In Persian)

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. J Res Develop 5 (2), e154.

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10 (3), 111-122 (In Persian).

Mohammadi H, Sadeghi, M (2010) Estimation of Genetic Parameters for Growth and Reproduction Traits and Genetic Trends of Growth Traits in Zel Sheep Breed under Rural Production System. Iran J Anim Sci 41(3), 231-241. (In Persian)

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. Iran J Anim Sci 42 (4), 337-344. (In Persian)

Mooney MA Wilmot B (2015) Gene Set Analysis: A Step-By-Step Guide. American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics 168, 517-527.

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

Smith P, Juengel J, Maclean P, et al. (2019) Gestational nutrition 2: gene expression in sheep fetal ovaries exposed to gestational under nutrition. Reproduction 157(1), 13-25.

Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2016) Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers. Agric Biotechnol J 7 (4), 143-158 (In Persian).

Wang K, Liu X, Qi T, et al. (2021) Whole-genome sequencing to identify candidate genes for litter size and to uncover the variant function in goats (Capra hircus). Genomics 13(1), 142-150.

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

Wu P, Yang Q, Wang K, et al. (2018) Single step genome-wide association studies based on genotyping by sequence data reveals novel loci for the litter traits of domestic pigs. Genomics 10(3), 171-179.

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