

## مطالعه پویش کل ژنومی برای شناسایی ژن‌های کاندیدا و مسیرهای زیستی مرتبط با تولید و ترکیبات شیر گوسفند وال دل بلیک بر پایه آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی

زینب علی پور<sup>۱</sup>، امیرحسین خلت آبادی فراهانی<sup>۲\*</sup>، محمدحسین مرادی<sup>۳</sup> و حسین محمدی<sup>۴</sup>

شماره صفحات  
۷۳-۸۴

(۱) کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، ایران.  
(۲ و ۳) دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، ایران.  
(۴) استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، ایران.

ایمیل نویسنده مسئول: amfarahanikh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۳۰

### چکیده

هدف پژوهش حاضر، مطالعه پویش کل ژنوم بر مبنای تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی جهت شناسایی جایگاه‌های ژنی و مسیرهای بیوشیمیایی مؤثر بر صفات مرتبط با تولید شیر و امتیاز سلول‌های بدنی در گوسفند نژاد وال دل بلیک بود. به این منظور اطلاعات ژنوتیپی ۴۷۶ رأس گوسفند این نژاد به همراه رکوردهای فنوتیپی مرتبط با صفات تولیدی شامل تولید شیر و ترکیبات شیر در برنامه PLINK نسخه (۱/۹۰) ارزیابی شد. پس از انجام مراحل مختلف کنترل کیفیت، نهایتاً ۴۲۲۸۵ نشانگر SNP در ۴۲۶ حیوان برای آنالیزهای نهایی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج آنالیز پویش ژنومی نشان داد که به ترتیب ۱۸۳۰، ۱۵۷۷، ۲۱۸۶، ۷۹۳، ۷۱۰ و ۱۰۶۳ نشانگر SNP با صفات تولید شیر، مقدار و درصد چربی، مقدار و درصد پروتئین شیر و نهایتاً امتیاز سلولهای بدنی در گوسفند وال دل بلیک در ارتباط می‌باشد ( $P\text{-value} \leq 0.05$ ). نتایج آنالیز بر پایه غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی منجر به شناسایی مسیرهای (ژن کاندیدای) فسفوریلاسیون چربی (ژن کاندیدای *TTC7B*)، جابجایی لیپوپروتئین (ژن *ZDHHC17*)، تنظیم انتقال یون کلسیم (ژن *ATP2B2*) و مسیر فرآوری هورمون پپتید (ژن *PCSK6*) در ارتباط با تولید شیر، مسیر تنظیم طبقات عملکردی اسید چرب (ژن *IRS1* و *SLC45A3*) مرتبط با چربی شیر، مسیر انتقال سیگنال توسط فسفوریلاسیون پروتئین (ژن *ERCC6*) و طبقه عملکردی اسید آمینه‌های گوگرددار (ژن *NOX4*) در ارتباط با پروتئین شیر و نهایتاً مسیرهای تنظیم مثبت پاسخ به محرک‌های بیوتیک (ژن *PRKCA*)، مسیر پاسخ به محرک‌های خارجی (ژن *CACNA2D1*)، تنظیم پاسخ به استرس (ژن‌های *EGFR* و *HSP90B1*) و مسیر پاسخ به عفونت‌های باکتریایی (ژن کاندید *ANXA3*) در ارتباط با امتیاز سلولهای بدنی شیر شد. در مجموع با توجه به اینکه تحقیقات انجام شده در زمینه شناسایی ژن‌های مرتبط با تولید شیر در گوسفند محدود می‌باشد، نتایج تحقیق حاضر می‌تواند نقش مهمی در شناسایی ژن‌های کاندید و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با تولید شیر در این گونه داشته باشد.

**کلید واژه‌ها:** پویش ژنومی، تولید شیر، امتیاز سلول‌های بدنی، آنالیز غنی‌سازی و گوسفند.

## مقدمه

انتظار می‌رود جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ به بیش از نه میلیارد نفر برسد. تغییر جمعیت جهان، همراه با افزایش شهرنشینی و نگرانی‌های فزاینده در مورد تأثیرات زیست محیطی دامپروری، نیازمند طراحی یک استراتژی جهانی بلند مدت برای تولید پایدارتر و بیشتر محصولات لبنی و پروتئینی حاصل از گونه‌های دامی مختلف می‌باشد (Ohashi *et al.*, 2022). در این میان گوسفند با بیش از ۱۳۰۰ نژاد و اکوتیپ در سراسر دنیا (Livestock systems, <http://www.fao.org>) می‌تواند نقشی استراتژیک در تأمین امنیت غذایی در جهان ایفا کند. با توجه به اینکه هدف اصلی پرورش گوسفند تولید گوشت می‌باشد و به علت رونق صنعت گاو شیری توجه کمتری به صنعت تولید شیر گوسفند شده است، این در حالی است که طبق آمار فائو، کشور ایران حدود ۵ درصد کل گوسفندان و حدود ۶/۲ درصد کل تولید شیر جهان را به خود اختصاص داده است (Hajihossinlo *et al.*, 2012). نداشتن رکوردهای فنوتیپی دقیق برای سایر صفات به خصوص صفات مرتبط با تولید شیر از جمله مشکلاتی است که اجرای برنامه‌های تحقیقاتی و کاربردی در این زمینه را در گوسفندان بومی محدود می‌کند (Moradi *et al.*, 2017). نژاد وال دل بلیک (Valle del Belice) یکی از مهمترین گوسفندان شیری در کشور ایتالیا است که در منطقه کوهستانی سیسیل پرورش می‌یابد و برای تولید سایر محصولات لبنی در این کشور به خصوص تولید پنیرهای سنتی حائز اهمیت بوده، لذا صفات تولید شیر و بهبود ژنتیکی آن‌ها در این نژاد در طی سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Sutera *et al.*, 2021). تولید شیر در نژادهای ایرانی نسبت به نژادهای خارجی کمتر است. بر اساس بررسی‌های انجام شده در نژادهای همچون قزل، ماکوئی، شال، زندی و ترکی قشقایی میزان تولید شیر روزانه از ۱۲۰ گرم (ترکی قشقایی) (Eilami, 2008). تا ۶۰۰ گرم (قزل) متغیر می‌باشد (Hajihossinlo, 2012). در حالی که این میزان در نژادهای خارجی همچون وال دل بلیک بیشتر بنظر می‌رسد (Todaro *et al.*, 2015).

با توجه به عدم وجود رکوردهای فنوتیپی صفات تولید شیر در گوسفندان بومی ایران، بر اساس بررسی منابع انجام شده تحقیقات کمی جهت پویش پیوستگی ژنومی<sup>۱</sup> (GWAS) در گوسفندان بومی انجام شده است و نتایج گزارش شده عمدتاً بر پایه شناسایی پارامترهای ژنتیکی (Kazemi *et al.*, 2017)، تنوع ژنتیکی (Nabiloo *et al.*, 2018) و شناسایی نشانه‌های انتخاب (Yousefi, 2019) استوار بوده‌اند. با این وجود تحقیقاتی در جهت پویش پیوستگی ژنومی برای شناسایی ژن‌ها و مناطق ژنومی مرتبط با تولید شیر در نژادهای مختلف گوسفند در دنیا انجام شده است (Johnston *et al.*, 2011). در این راستا به منظور برطرف نمودن چالش فوق و درک بهتر مبنا و اساس ژنتیکی و بیولوژیکی صفات پیچیده، از آنالیزهای غنی‌سازی مجموعه ژنی (GSEA<sup>۲</sup>) برای تعیین مجموعه‌ای از ژن‌های دارای عملکرد مشابه بیولوژیکی یا ساختاری مرتبط با صفت مورد

<sup>۱</sup>- Genome Wide Association Study

<sup>۲</sup>- Gene Set Enrichment Analysis

نظر و مستندسازی آنها در قالب گروه‌های عملکردی<sup>۱</sup> و مسیرهای بیولوژیکی<sup>۲</sup> استفاده می‌شود (Abdalla *et al.*, 2016) که یک روش منحصر به فرد برای تشخیص مسیرها و مکانیسم‌های ژنتیکی مرتبط با صفات است (Han and Penagaricano, 2016). در این نوع مطالعات به جای جستجوی معنی‌دارترین SNPها، بر روی گروهی از SNPها تمرکز می‌شود که می‌توانند باهم یک مجموعه‌ی ژنی را حاصل نمایند که با گروه‌های عملکردی و مسیرهای بیولوژیکی در ارتباط هستند. در نتیجه انتظار می‌رود با استفاده از GSEA بتوان SNPها، ژن‌های موثر، و مسیرهای بیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با هر یک از صفات تولید شیر و امتیاز سلول‌های بدنی در گوسفند را به طور صحیح‌تر مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار داد. بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر مطالعه پویای کل ژنوم بر مبنای تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی جهت شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر صفات مرتبط با تولید شیر و امتیاز سلول‌های بدنی در گوسفند نژاد وال دل بلیک بود که دارای اطلاعات فنوتیپی و ژنومی برای این صفات می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### اطلاعات فنوتیپی و ژنوتیپی مورد استفاده و مراحل اجرای کنترل کیفیت

داده‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر شامل اطلاعات خام حاصل از تعیین ژنوتیپ ۴۷۶ میش نژاد وال دل بلیک بود که پس از انجام مکاتبات با کشور ایتالیا (Sutera *et al.*, 2021) تهیه شدند. رکوردهای فنوتیپی ارسال شده برای اجرای تحقیق حاضر شامل صفات مقدار تولید شیر، درصد پروتئین، درصد چربی و امتیاز سلول‌های بدنی بود و جهت تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها از تراشه OvineSNP50K Bead Chip، استفاده شده بود. پس از تهیه اطلاعات ژنوتیپی و فنوتیپی این حیوانات برای ۴۶۸۲۷ جایگاه نشانگری SNP، ابتدا داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها جهت بررسی کیفی مورد داده‌کاوی و ویرایش قرار گرفتند. به این منظور ابتدا حیواناتی که دارای نرخ تعیین ژنوتیپ کمتر از ۹۵٪ بودند از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شدند. سپس نشانگرهای SNP که در تمام نمونه‌ها مونومورف بودند و فراوانی آلی نادر<sup>۳</sup> (MAF) آنها کمتر از ۰/۰۲ بود و همچنین نشانگرهایی که نرخ فراخوانی ژنوتیپی (Call Rate) آنها کمتر از ۹۵٪ بوده و یا با احتمال  $10^{-3}$  از تعادل هاردی وینبرگ خارج شده بودند (Moradi *et al.*, 2012)، از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شدند. برای این منظور از نرم‌افزار PLINK نسخه ۱/۹ استفاده شد (Purcell *et al.*, 2007).

### آنالیزهای آماری پویای پیوستگی در سطح ژنوم و ترسیم گراف‌های منهتن

آنالیز پویای پیوستگی در سطح ژنوم به منظور شناسایی تمام نشانگرهای SNP تاثیر گذار بر صفات مختلف با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد. به این منظور از نرم‌افزار PLINK نسخه ۱/۹ استفاده شد. برای مشاهده توزیع معنی‌داری نشانگرها

<sup>۱</sup> - Gene Ontology (GO) terms

<sup>۲</sup> - Biological pathways

<sup>۳</sup> - Minor Allele Frequency

در سطح ژنوم، گراف‌های منتهن برای صفات مختلف با استفاده از برنامه SNPEVG نسخه ۳/۲ ترسیم گردید (Wang *et al.*, 2012). در این گراف‌ها موقعیت ژنومی نشانگرها در مقابل مقدار p-value در نظر گرفته شد و برای تعیین موقعیت ژنومی نشانگرها در سطح ژنوم گوسفند از آخرین نسخه ژنومی در دسترس گوسفند استفاده شد.

### آنالیز پویش کل ژنوم بر اساس آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی (GSEA)

اساساً آنالیز پویش ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی در سه مرحله شناسایی ژن‌های گزارش شده در مناطق ژنومی کاندیدا، ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی و نهایتاً پویش کل ژنوم بر پایه آنالیز مسیر انجام می‌شود. به این منظور ابتدا نشانگرهای که مقدار p-value آنها کمتر یا مساوی ۰/۰۵ بود با استفاده برنامه Biomart با استفاده از ژنوم مرجع گوسفند (Oar\_v3.1) به ژنهایی که نشانگر SNP مورد نظر در داخل آن ژن و یا ۱۰۰ kb بالادست یا پایین دست آن ژن قرار داشت، ارتباط داده شدند. سپس پایگاههای اطلاعاتی شامل GO (Ashburner *et al.*, 2000) جهت تعیین طبقات عملکردی و شناسایی ژن‌های تنظیمی مورد استفاده قرار گرفتند. 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 سه فرآیند هستی‌شناسی شامل فرآیندهای زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی در نظر گرفته شوند. ارتباط‌های معنی‌دار مسیرهای عملکردی با صفات مرتبط با تولید شیر، درصد چربی شیر و امتیاز سلول‌های بدنی با استفاده از توزیع فوق هندسی و آزمون Fisher's exact test مورد آزمون قرار گرفت. P-value مسیرهای عملکردی که تعداد k ژن معنی‌دار در آن قرار دارد با فرمول زیر محاسبه می‌شود.

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

در این فرمول، 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 است

### نتایج و بحث

پس از اجرای مراحل مختلف بررسی کنترل کیفیت داده‌های اولیه، در نهایت ۴۲۶ راس گوسفند و تعداد ۴۲۲۸۵ SNP برای آنالیزهای مطالعه پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز غنی‌سازی مجموعه ژنی باقی ماندند (جدول ۱). تعداد حیوانات و نشانگرهای باقیمانده در این تحقیق با تعداد گزارش شده در مقاله Sutera و همکاران (۲۰۲۱) کمی متفاوت است که این به دلیل استفاده از داده‌های خام ژنوتیپی و فنوتیپی ارسال شده مربوط به نژاد وال دل بلیک از ایتالیا مورد استفاده در تحقیق حاضر می‌باشد. (Sutera *et al.*, 2021) (۲۷).

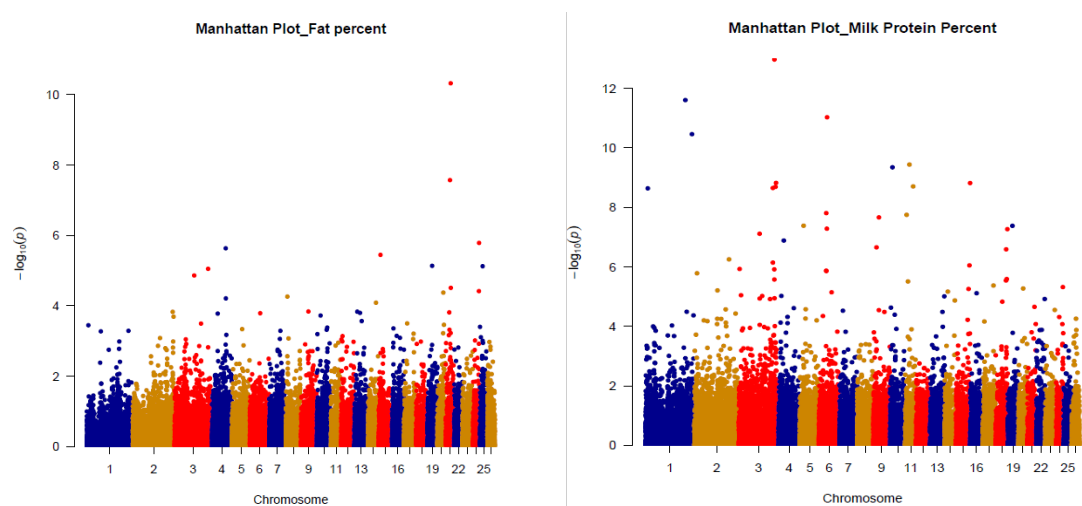
جدول ۱. توصیف مراحل مختلف بررسی کنترل کیفیت داده‌های اولیه مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 1. Description of the different stages of the quality control review of the primary data used in this research

۴۷۶	تعداد حیوانات
۵۰	حذف نمونه‌هایی با بیش از ۰/۰۵ ژنوتیپ از دست رفته
۴۲۶	تعداد کل نمونه‌های باقی‌مانده
۴۶۸۲۷	تعداد کل نشانگرهای مورد بررسی
۱۷۱۹	حذف نشانگرهایی با بیش از ۰/۰۵ ژنوتیپ از دست رفته
۲۰۶۶	حذف نشانگرها با $MAF < 0.02$
۹۹۹	حذف نشانگرها با انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ (۰,۰۰۱)
۴۲۲۸۵	تعداد نشانگرهای باقی‌مانده

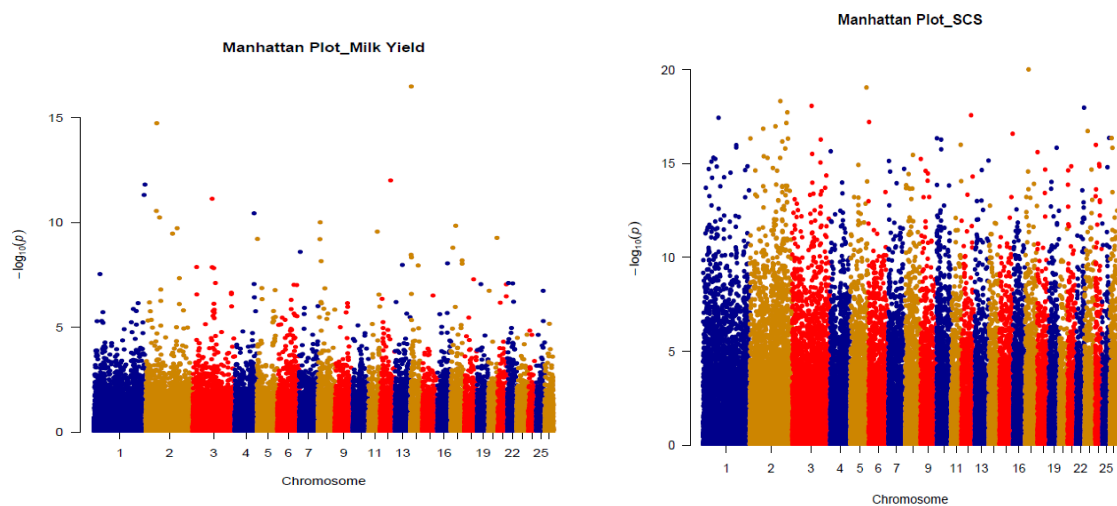
### آنالیزهای آماری پویش پیوستگی در سطح ژنوم و ترسیم گراف‌های منهتن

در این پژوهش مطالعه پویش کل ژنومی جهت شناسایی نشانگرهای SNP مرتبط با صفات تولید شیر، مقدار و درصد چربی و پروتئین شیر و امتیاز سلول‌های بدنی در گوسفند انجام گردید. پلات‌های منهتن مرتبط با تولید و ترکیبات شیر و امتیاز سلول‌های بدنی به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. نتایج این بخش نشان داد که به ترتیب ۱۵۷۷، ۱۸۳۰، ۷۹۳، ۷۱۰ و ۱۰۶۳ نشانگر SNP به ترتیب با صفات تولید شیر، مقدار و درصد چربی، مقدار و درصد پروتئین شیر و نهایتاً امتیاز سلول‌های بدنی در گوسفند وال دل بلیک در سطح ۰/۰۵ در ارتباط می‌باشد.



شکل ۱. پلات منهتن از مطالعه پیوستگی ژنومی برای درصد پروتئین شیر (شکل راست) و درصد چربی شیر (شکل چپ): در این گراف بر روی محور X موقعیت SNPها در کروموزوم‌های مختلف و روی محور Y ارزش‌های منفی لگاریتم P-Value نمایش داده شده است.

Figure 1. Manhattan plot from the study of genomic continuity for milk protein percentage (right figure) and milk fat percentage (left figure): in this graph, the position of SNPs in different chromosomes and the negative values of the logarithm P are on the Y axis. -Value is displayed. is on the X axis,



شکل ۲. پلات منهن از مطالعه پیوستگی ژنومی برای صفت امتیاز سلول‌های سوماتیک (سمت راست) و تولید شیر (سمت چپ). این گراف بر روی محور X موقعیت SNPها در کروموزوم‌های مختلف و روی محور Y ارزش‌های منفی لگاریتم P-Value نمایش داده شده است.

**Figure 2. Manhattan plot from a genome-wide association study for somatic cell score (right) and milk production (left) traits. This graph shows the position of SNPs in different chromosomes on the X-axis and the negative values of the logarithm of P-Value on the Y-axis.**

Esmaeili-Fard و همکاران (۲۰۲۱) نیز با استفاده از روش پویش پیوستگی ژنومی بر پایه غنی‌سازی مجموعه ژنی به بررسی ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با باروری و رشد در گوسفند بلوچی پرداختند. در این تحقیق ابتدا ژن‌های گزارش شده در داخل یا مجاورت (ژن ۱۳۱۰) نشانگرهای SNP معنی‌دار ( $P\text{-value} \leq 0.05$ ) حاصل از GWAS شناسایی شدند و سپس جهت آنالیزهای بعدی بر پایه غنی‌سازی مجموعه ژنی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج حاصل منجر به یافتن ژن‌ها و مسیرهای شناسایی شده دارای عملکردهای مرتبط با باروری مانند اتوفاژی در جفت، تولید پروژسترون توسط جفت، تشکیل جفت، انتقال یون کلسیم و پاسخ ایمنی مادر و همچنین مسیرهای مرتبط با وزن همانند مصرف خوراک، توسعه ساختار اسکلت سلولی غدد پستانی و تولید اجزای شیر مانند اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و ویتامین B-12 شد (Esmaeili *et al.*, 2021).

#### شناسایی ژن‌های کاندیدا در مناطق ژنومی با استفاده از تجزیه GSEA-SNP

پس از بررسی ژن‌های گزارش شده در داخل یا مجاورت نشانگرهای SNP معنی‌دار مرتبط با صفات مختلف، مجموع ۱۹۸۶ ژن به ترتیب شامل ۵۱۷، ۳۸۳، ۵۸۴، ۹۱، ۱۱۲ و ۲۹۹ برای نشانگرهای معنی‌دار مرتبط با صفات تولید شیر، مقدار و درصد چربی، مقدار و درصد پروتئین شیر و نهایتاً امتیاز سلول‌های بدنی در گوسفند وال دل بلیک شناسایی شد. تجزیه و تحلیل این مجموعه ژنی بر پایه آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی منجر به شناسایی ۱۱ طبقه عملکردی هستی‌شناسی ژن شد که به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) با صفات تولید و ترکیبات شیر و امتیاز سلول‌های بدنی دارای ارتباط هستند. مسیری که بیش از پنج ژن و کمتر از ۱۰۰۰ ژن داشتند در جدول (۲) گزارش شده‌اند (لازم به ذکر است چربی و پروتئین در جدول مربوط به مقدار و درصد آن‌هاست).

## جدول ۲. شناسایی مسیرهای معنی‌دار صفات تولید شیر و امتیاز سلول‌های بدنی

Table 2. Identification of significant paths of milk production traits and body cell count

Trait Category	Term	No. of gene	Gene	P value
MY	GO:0046834: Lipid phosphorylation	۹	BPNT1, SMG1, INPP1, PI4KB, PIK3CG, PIK3C2A, PIK3C2B, PIK3C2G, <b>TTC7B</b>	۸/۸E-۳
	GO:0042953: Lipoprotein transport	۵	CUBN, MSR1, UNC119B, UNC119, <b>ZDHC17</b>	۵/۱E-۳
	GO:0048369: Regulation of calcium ion transport	۲۸	ATP1B1, <b>ATP2B2</b> , ATP2C2, CXCL9, F2RL3, ANK2, ATG5, BEST1, CAMK2A, CASQ1, CTNNB1, F2, HOMER1, JPH3, PIK3CG, PLN, PLCG2, PML, PRKCE, PRKD1, P2RX7, SLC9A1, STIM1, TRPC1, TRPC3, UBQLN1, UBASH3B, WFS1	۶/E-۳
	GO:0016486: Peptide hormone processing	۷	CPE, CORIN, CEPEP, PCSK2, PCSK5, <b>PCSK6, REN</b>	۳/۰E-۲
% FAT	GO:0019217: Regulation of fatty acid metabolic process	۱۰	ABCD2, ERLIN1, WDTC1, ACACB, ACADVL, APOC3, <b>IRS1</b> , PIBF1, PDK2, <b>SLC45A3</b>	۶/۸E-۲
SCS	GO:0002833: Positive regulation of response to biotic stimulus	۲۹	CD180, CD226, CD24, DHX58, F2RL1, SASH1, TBK1, TRAF6, ACOD1, ANKRD17, LOC101106452, CRTAM, HSPD1, HRG, IL12A, IL12B, KLK5, KLK7, LRSAM1, LY86, LY96, MAPK3, NOD1, PGC, <b>PRKCA</b> , PUM1, PUM2, RIPK2, TRIM15	۳/۱E-۲
	GO:0009605: Response to external stimulus	۹۲۴	<b>CACNA2D1</b>	۲/۶E-۲
	GO: Regulation of response to stress	۵۹۹	<b>EGFR, HSP90B1</b>	۲/۶E-۲
	GO:0009617: Response to bacterium	۱۹۹	<b>ANXA3</b>	۳/۳E-۲
% PRO	GO:0000096: sulfur amino acid metabolic process	۶	MTRR, <b>NOX4</b> , CTH, CBS, MTHFD1, MUT	۷/۲E-۳
	GO: signal transduction by protein phosphorylation	۶۰	BANK, BARP, CCR5, EPHA7, EPHB1, <b>ERCC6</b>	۳/۴E-۲

همانطور که در جدول ۲ قابل مشاهده است نتایج تحقیق حاضر بر پایه غنی‌سازی مجموعه ژنی نهایتاً منجر به شناسایی مسیرهایی شد که ارتباط معنی‌داری با صفات مختلف مرتبط با تولید و ترکیبات شیر داشتند. بررسی ژن‌های موجود در هر مسیر نشان داد که برخی از آنها در تحقیقات قبلی نیز به عنوان ژن کاندیدا برای صفات مختلف گزارش شده‌اند که به طور

مستقیم یا غیر مستقیم می‌تواند با تولید و ترکیبات شیر در ارتباط باشند. در زیر با جزئیات بیشتر به برخی از این مسیرها و ژن‌های کاندید در هر مسیر اشاره می‌شود.

مسیر فسفوریلاسیون چربی از مسیرهای مرتبط با تولید شیر است، از بین ژن‌های موجود در این مسیر می‌توان ژن کاندیدای TTC7B را نام برد. این ژن نقش مهمی در متابولیسم چربی گاو دارد (MacLeod *et al.*, 2016). همچنین به عنوان یک ژن کاندید برای چاقی در موش گزارش شده است (Morton *et al.*, 2011). از دیگر مسیرهای مهم و معنی‌دار مرتبط با تولید شیر می‌توان به مسیر بیولوژیکی جابجایی لیپوپروتئین<sup>۱</sup> اشاره کرد که ژن کاندیدا ZDHHC17 در این مسیر قرار داشت. ZDHHC17 یک ژن کاندیدا با امتیاز بالا در حال تعامل با پروتئین HIP14<sup>۲</sup> است. تجزیه و تحلیل ایمونو هیستوشیمی مقاطع پانکراس نشان می‌دهد که HIP14 تقریباً به طور انحصاری در سلول‌های حساس به انسولین در جزایر لانگرهانس بیان می‌شود. HIP14 یک پروتئین ضد آپوپتوز است که برای بقای سلول‌های  $\beta$  و ترشح انسولین تحریک شده با گلوکز مورد نیاز است (Berchtold *et al.*, 2011).

مسیر تنظیم انتقال یون کلسیم<sup>۳</sup> با تعداد ۲۸ ژن معنی‌دار از دیگر مسیرهایی بود که در ارتباط با تولید شیر شناسایی شد از بین ژن‌های معنی‌دار در این مسیر، می‌توان به ژن کاندیدا ATP2B2 اشاره نمود. ATP2B2، PMCA2<sup>۴</sup> را رمزگذاری می‌کند و برای تعادل و عملکرد پستان (ویژگی‌های شیر و ورم پستان) حیاتی است. همچنین جهش ATP2B2 منجر به کاهش سطح کلسیم در شیر می‌شود (Reinhardt *et al.*, 2004). از مسیرهای دیگر مرتبط با تولید شیر می‌توان مسیر فرآوری هورمون پپتید<sup>۵</sup> را نام برد. این مجموعه ژنی دارای ۷ ژن می‌باشد از بین این ژن‌ها ژن PCSK6 کاندید این مسیر است. PCSK6 در هموستازی آهن دخیل است (Guillemot *et al.*, 2015). مسیر تنظیم طبقات عملکردی اسید چرب<sup>۶</sup> مسیر مرتبط با درصد چربی شیر است. از بین ۱۰ ژن معنی‌دار این مسیر دو ژن IRS1 و SLC45A3 کاندیدای این مسیر هستند. IRS1 ژن کاندید حساسیت به انسولین به طور مستقیم یا غیر مستقیم پروتئین‌هایی که در متابولیسم گلوکز نقش دارند را رمزگذاری می‌کند. بستر گیرنده انسولین (IRS) نوع ۱ که یک بستر اصلی برای گیرنده انسولین است، سیگنال‌های انسولین را در ماهیچه‌های اسکلتی، بافت چربی و عروق کنترل می‌کند (Wang *et al.*, 2012). کاهش فسفوریلاسیون تیروزین پروتئین‌های IRS1 باعث اختلال در تنظیم گیرنده‌های انسولین و اختلال در عملکرد سلول‌های B می‌شود (Copps and White, 2012). SLC45A3 متعلق به خانواده SLC45 است که نقش مهمی در نگهداری ملین با تعدیل گلوکز و همچنین کنترل متابولیسم چربی دارد (Shin *et al.*, 2012).

<sup>1</sup> Lipoprotein transport

<sup>2</sup> huntingtin-interacting protein

<sup>3</sup> Regulation of calcium ion transport

<sup>4</sup> plasma membrane calcium ATPase

<sup>5</sup> Peptide hormone processing

<sup>6</sup> Regulation of fatty acid metabolic process



از مسیرهای اصلی مرتبط با امتیاز سلول‌های بدنی تنظیم مثبت پاسخ به محرک‌های بیوتیک<sup>۱</sup> است. PRKCA ژن کاندیدا این مسیر است. که در مسیر سلول‌های سرطانی و در تنظیم هورمون شیردهی دخالت دارد. این ژن از نظر عملکردی مورد توجه قرار گرفته است، همچنین طیف گسترده‌ای از مسیرهای سیگنالینگ (تکثیر سلولی، آپوپتوز، تمایز، مهاجرت، چسبندگی و تومورزایی) را تنظیم می‌کند. مسیر پاسخ به محرک‌های خارجی<sup>۲</sup> یکی دیگر از مسیرهای مرتبط با امتیاز سلول‌های بدنی می‌باشد. CACNA2D1 به عنوان یکی از ژن‌های کاندید بالقوه موثر بر نمره سلول‌های بدنی و ورم پستان در این مسیر است که نقش مهمی در انقباض ماهیچه‌ها و باز و بسته شدن کانال پستان در هنگام خروج شیر دارد (Gabashvili *et al.*, 2007). همچنین در مسیر ترشح رنین دخیل بوده و ممکن است نقش مهمی در ایپوکسی ایفا کند (Wan *et al.*, 2017).

از مسیرهای مهم و معنی‌دار دیگر مرتبط با امتیاز سلول‌های بدنی می‌توان به مسیر بیولوژیکی تنظیم پاسخ به استرس<sup>۳</sup> اشاره نمود که از بین ژن‌های معنی‌دار EGFR و HSP90B1 ژن‌های کاندیدای این مسیر هستند. EGFR مربوط به گروهی از گیرنده‌های داخل سلول به نام گیرنده‌های فعال‌کننده پراکسیزومی هستند که در تنظیم سوخت‌وساز چربی، گلوکز و همچنین در تمایز سلولی نقش اساسی دارند. ارتباط معنی‌داری بین ژن کاندیدای EGFR در رابطه با مقاومت در برابر انگل‌های داخلی به وسیله ایمنی اکتسابی و ذاتی در گاوهای نژاد سیاه آلمانی گزارش شده است (May *et al.*, 2019). EGFR مستقیماً از آپوپتوسیز (مرگ و میر سلولی) پیشگیری می‌کند و زمانی که جاندار با تنش گرمایی روبرو می‌شود، سلول‌های آسیب دیده پروتئین‌هایی ایجاد خواهند کرد که از آن‌ها در برابر صدمه محافظت می‌کند. یکی از پاسخ‌های حفاظتی تولید پروتئین شوک حرارتی (HSP) است. مسیر پاسخ به عفونت‌های باکتریایی<sup>۴</sup> یکی دیگر از مسیرهای شناسایی شده در تحقیق حاضر در ارتباط با امتیاز سلول‌های بدنی است. ژن کاندید این مسیر ANXA3 می‌باشد که نقش مهمی در سرطان آندومتر دارد و در سلول‌های اپیتلیال، کبد، رحم، دندریتها و لنف بیان بالایی دارد (Andorfer *et al.*, 2011).

از مسیرهای بیولوژیکی معنی‌دار مرتبط با درصد پروتئین شیر می‌توان مسیر انتقال سیگنال توسط فسفوریلاسیون پروتئین<sup>۵</sup> را نام برد. ERCC6 ژن کاندید این مسیر است که به طور قابل توجهی با EPA<sup>۶</sup> مرتبط است (Chamberlain, 2012). طبقات عملکردی اسید آمینه‌های گوگرددار<sup>۷</sup> نیز مرتبط با پروتئین شیر در تحقیق حاضر شناسایی شد که دارای ۶ ژن معنی‌دار است. NOX4 ژن کاندیدای این مسیر است که در غلظت‌های طبیعی اکسیژن، سیگنالی برای تخریب فاکتورهای رونویسی HIF<sup>۸</sup>

<sup>1</sup> Positive regulation of response to biotic stimulus

<sup>2</sup> Response to external stimulus

<sup>3</sup> Regulation of response to stress

<sup>4</sup> Response to bacterium

<sup>5</sup> Signal transduction by protein phosphorylation

<sup>6</sup> Eicosa Pentaenoic Acid

<sup>7</sup> Sulfur amino acid metabolic process

<sup>8</sup> hypoxia-induced factors

می‌دهد. هنگامی که سطح اکسیژن کاهش می‌یابد و HIF دست نخورده در سلول باقی می‌ماند به سلول کمک می‌کند تا با شرایط کم اکسیژن مقابله کند (Flashman, 2016).

### نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر با هدف پویش کل ژنوم بر مبنای تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی جهت شناسایی ژن‌های کاندیدا و مسیرهای بیوشیمیایی مؤثر بر صفات مرتبط با تولید شیر و امتیاز سلول‌های بدنی در گوسفند نژاد وال دل بلیک انجام شد. نتایج حاصل از مطالعه پویش ژنومی (GWAS) منجر به شناسایی مجموع ۸۱۵۹ نشانگرهای SNP معنی‌دار ( $P\text{-value} \leq 0.05$ ) مرتبط با صفات مختلف شد. بررسی ژن‌های گزارش شده در این مناطق نشان داد که این نشانگرها در داخل یا مجاورت مجموع ۱۹۸۶ برای صفات مختلف قرار گرفته‌اند. مطالعات هستی‌شناسی و بررسی مسیرهای بیوشیمیایی درگیر توسط این ژن‌ها نیز نشان داد که مسیرهای شناسایی شده مربوط به تولید شیر حاوی ژن‌های (TTC7B, ZDHHC17, ATP2B2, PCSK6)، درصد چربی شیر (IRS1, SLC45A3)، درصد پروتئین شیر (NOX4, ERCC) و امتیاز سلول‌های بدنی (PRKCA, CACNA2D1, EGFR, HSP90B1, ANXA3) می‌باشد.

### منابع

**Abdalla, E., Peñagaricano, F., Byrem, T., Weigel, K., & Rosa, G. (2016).** Genome-wide association mapping and pathway analysis of leukosis incidence in a US Holstein cattle population. *Animal Genetics*, 47(4), 395-407.

**Andorfer, CA., Necela, B M., Thompson, EA., & Perez, EA. (2011).** MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends Mol Med* 17(6): 313-319.

**Ashburner, M., Ball, CA., Blake, JA., Botstein, D., Butler, H., Cherry, JM., Davis, AP., Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin, GM, & Sherlock, G. (2000).** Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25: 25–29

**Chamberlain, A. J. (2012),** Validation of single nucleotide polymorphisms associated with milk production traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 95, 864–875, doi: 10.3168/jds.2010-3786.

**Copps, KD. & White, MF. (2012).** Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 255:2565–82.

**Eilami, B. (2008).** Lactation performance and lamb growth of Torky Ghashghai sheep. *Journal of Pajohesh and Sazandegi*, 76: 80–89. (In Persian)

**Esmaili-Fard, SM., Gholizadeh, M., Hafezian, SH. & Abdollahi-Arpanahi, R. (2021)** Genes and Pathways Affecting Sheep Productivity Traits: Genetic Parameters, Genome-Wide Association Mapping, and Pathway Enrichment Analysis. *Front. Genet.* 12:710613.

**Flashman, E. (2016).** “How decreasing oxygen activity helps cells cope with hypoxia,” *The Biochemist*, vol. 38, no.5, pp. 26\_29

**Gabashvili, IS., Sokolowski, BH., Morton, CC. & Giersch, AB. (2007).** Ion Channel Gene Expression in the Inner Ea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, 8: 305–28

**Guillemot, J. & Seidah, NG. (2015).** PACE4 (PCSK6): another proprotein convertase link to iron homeostasis? *Haematologica*. 100, e377.

**Hajihossainlo, A., Sadeghi, S., Rafat, S. A. Bohluli, M. & Bahrani Behzadi, M. R. (2012).** Estimated of milking characteristic, milk composition and their determinants effects in Ghezel pure breed ewes and Ghezel×Arkhamerino, Moghani×Arkhamerino crossbreds. *Proceedings of the 5th Congress on Animal Science*, pp. 543-548., Iran, Esfahan. (In Persian).

**Han, Y., & Peñagaricano, F. (2016).** Unravelling the genomic architecture of bull fertility in Holstein cattle. *BMC Genetics*, 17(1), 143.

**Johnston, SE., McEwan, JC., Pickering, NK., Kijas, JW., Beraldi, D., Pilkington, JG., Pemberton, JM. & Slate, J. (2011).** Genome-wide association mapping identifies the genetic basis of discrete and quantitative variation in sexual weaponry in a wild sheep population. *Mol Ecol*. 20(12):2555–2566

**Kazemi Borzel Abad, F., Hassani, S., Samadi, F., Ahani Azari, M., Saghi., DA. (2017).** Genetic analysis of milk yield by fixed and random regression models in Shirvan Kurdi sheep. *Animal Science Researches*. 28: 127-141. (In Persian).

**Berchtold, LA., Storling, ZM., Ortis, F., Lage, K, Bang-Berthelsen, C., Bergholdt, R., Hald, J., Brorsson, CA., Eizirik, DL., Pociot, F., Brunak, S. & Storling J (2011).** 13;108(37): E681-8. doi: 10.1073/pnas.1104384108. Epub 2011 Jun 24. PMID: 21705657

**MacLeod, IM., Bowman, PJ., Vander Jagt, CJ., Haile-Mariam, M., Kemper, KE., Chamberlain, AJ., Schrooten, C., Hayes, BJ., & Goddard, ME. (2016).** Exploiting biological priors and sequence variants enhances QTL discovery and genomic prediction of complex traits. *BMC Genomics* 17, 144.

**May, K., Scheper, C., Brügemann, K., Yin, T., Strube, C., Korcuć, P. & König, S. (2019).** Genome-wide associations and functional gene analyses for endoparasite resistance in an endangered population of native German Black Pied cattle. *BMC genomics*, 20(1), 1-15.

**Moradi, M.H., Farahani, A.H. & Nejati-Javaremi, A. (2017).** Genome-wide evaluation of effective population size in some Iranian sheep breeds using linkage disequilibrium information, *Iranian Journal of animal Science*, 48, 39–49.

**Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds, K. G. & McEwan, J. C. (2012).** Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. *BMC Genetics*, 13:10.

**Morton, N.M., Nelson, Y.B., Michailidou, Z. (2011).** A stratified transcriptomics analysis of polygenic fat and lean mouse adipose tissues identifies novel candidate obesity genes. *PLoS ONE* 6, e23944.

**Nabiloo, R., Zandi Baghcheh-Maryam, M.B., Harakinezhad, M.T. (2018).** Study of Genetic diversity of indigenous (Afshari, Moghani and Ghezel) and exotic (Romney, Merinos and Dorper) sheep breeds using high-density SNP markers. *Iranian Journal of Animal Science*. 49(3): 437-451.

**Ohashi, O.M., Kumar, S., Rolim Filho, S.T., Ribeiro, H.F.L., Freitas, V.J.d.F., Vale, W.G. (2022).** Advances in Embryo Production in Buffaloes: In Vivo Versus In Vitro Procedures. In: Chauhan, M.S., Selokar, N. (eds) *Biotechnological Applications in Buffalo Research*. Springer, Singapore.

**Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A. & Bender, D. (2007).** PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *The American Journal of Human Genetics* 81: 559-575.

**Reinhardt, T.A., Horst, A.G., Waters, W.R. & Physiol, A.M. (2004).** Regulation of the *atp2b2* gene, 286: C164-C169.

**Shin, D.S., Howng, Y.B., Ptáček, L.J. & Fu, Y.H. (2012).** MiR-32 and its target SLC45A3 regulate the lipid metabolism of oligodendrocytes and myelin. *Neuroscience* 213:29–37.

**Sutera, A.M., Di Gerlando, R., Mastrangelo, S., Sardina, M.T., D'Alessandro, E., Portolano B., Tolone, M. (2021).** Genome-wide association study for milk production traits in an economically important local dairy sheep breed, *Italian Journal of Animal Science*. 20:1, 1500-1505.

– **Sutera, A.M., Tolone, M., Mastrangelo, S., Di Gerlando, R., Sardina, M.T., Portolano, B., Pong-Wong R & Riggio, V. (2021).** Detection of genomic regions underlying milk production traits in Valle del Belice dairy sheep using regional heritability mapping. *J Anim Breed Genet*.00:1–10.

**Todaroa, M., Puleio, R., Sabelli, C., Scatassa, M.L., Console, A. & Loria, G.R. (2017).** Determination of milk production losses in Valle del Belice sheep following experimental infection of *Mycoplasma agalactiae*. *Small Ruminant Research*. 123(1): 167-172.

**Wang, S., D. Dvorkin, & Y. Da. (2012).** SNPEVG: a graphical tool for GWAS graphing with mouse clicks. *BMC Bioinformatics*.2012, 13:319.

**Wan, W., Su, R. & Li, X. (2017).** Identification of selection signal by large-scale whole genome resequencing of cashmere goats,” *Scientific Report*. Vol, no. 1, p.15142.

**Wang, Z., Shah, O.J. & Hunter T. (2012).** The transcriptional coactivators p/CIP and SRC-1 control insulin resistance through IRS1 in obesity models. *PLoS One*. e36961.

**Yousefi, Z. (2019).** Genomic scan for selective sweeps and assessment of population genetic structure in some Iranian sheep breeds. *Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan*, PhD Thesis, 154 pages.