

Selection signature and gene ontology for traits related to fat deposition in Afshari and Sunite fat-tailed sheep breeds

Maryam Roshandel Ghalezoo¹, Saeed Zerehdaran^{2*}, Ali Javadmanesh³

¹MS.c. Graduated, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

²Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, Email: zerehdaran@um.ac.ir

³Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 01/04/2022
Revised: 05/06/2022
Accepted: 05/07/2022

Keywords:
fat-tailed sheep
gene ontology
selection signature
XP-EHH

ABSTRACT

Background and objectives: Tail in sheep is a valuable source of energy. However, in the modern intensive and semi-intensive sheep industry, lean-tailed sheep breeds are more desirable and marketable. Therefore, due to the negative effect of tail size on production efficiency, researchers are looking for methods to eliminate this trait. Identification of genes involved in the process of fat deposition in the tail is necessary for reducing tail size in sheep. Several genomic methods such as genome-wide association and selection signature studies or gene expression analysis for describing a possible genetic background for deposition of fat in various fat-tail breeds have been used. The aim of this study was to identify effective genes in fat-tailed sheep breeds (Afshari and Sunite) compared to breeds without tail (Dorper and German Mutton) using selection signature and gene ontology methods.

Materials and methods: In this study, genotype information of 366 sheep (37 Afshari, 69 Sunite, 99 Dorper, and 161 German Mutton) genotyped with Illumina Ovine SNP50K BeadChip genome arrays, were used. The XP-EHH method using R software package version 1.9 was used to identify the selection signature. Genomic version Oar_v4.0 database NCBI was used for detecting the genomic position of SNPs in the sheep genome. Candidate genes were identified by SNPs located at 1% upper range of XP-EHH using Plink v1.9 software and the gene list of Illumina in R. Additionally, the latest published version of Animal genome database was used for defining QTLs associated with fat deposition traits in identified locations.

Results: Based on the results of XP-EHH, 18 common genes were identified by comparing the Afshari population with German Mutton and Dorper breeds, in which five genes (*LOC114116389*, *LOC114118754*, *KCMF1*, *TCF7L1*, and *RASSF2*) were associated with QTLs related to fat deposition including carcass fat percentage, internal fat amount and fat tail deposition. 15 common genes were also identified by comparing Sunite population with German Mutton and Dorper populations, in which two genes (*SEMA5B* and *CDH9*) were associated with QTLs related to fat deposition. The results of gene ontology showed that some of these genes play effective roles in signaling Wnt, growth, development, and morphology of cells.

Conclusion: based on the results of the selection signature using the XP-EHH method in Afshari and Sunite breeds, the *RASSF2* gene was identified

as a selection signature in Afshari breeds. This gene was also related to tail fat storage QTL, which was identified for the first time in this study. *LOC11411689* and *LOC114118754* genes related to carcass fat percentage QTL, *KCMF1*, and *TCF7L1* genes related to the QTL of the internal fat amount in the Afshari breed were also identified. In addition, the *SEMA5B* gene associated with the QTL of carcass fat percentage and the *CDH9* gene associated with subcutaneous fat weight were identified in the Sunite breed. The results of this study could be used in sheep breeding programs to reduce fat deposition in the tail, especially in the Afshari breed.

Cite this article: Roshandel Ghalezoo, M., Zerehdaran, S., Javadmanesh, A. (2022). Selection signature and gene ontology for traits related to fat deposition in Afshari and Sunite fat-tailed sheep breeds. *Journal of Ruminant Research*, 10 (2), 47-62.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejrr.2022.19815.1829

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشانه‌های انتخاب و هستی‌شناسی ژن برای صفات مرتبط با ذخیره چربی در گوسفندان دنبه‌دار افشاری و سونیت

مریم روشندل قلعه‌زو^۱، سعید زره‌داران^{۲*}، علی جوادمش^۳

۱. فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، رایانامه: zerehdaran@um.ac.ir

۳. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی - پژوهشی	سابقه و هدف: با توجه به تمایل به کوچک کردن اندازه‌ی دنبه در نژادهای دنبه‌دار به دلیل کاهش بازدهی تولید، محققین به دنبال یافتن راه‌کارهایی برای کوچک شدن دنبه در این حیوانات هستند. شناسایی ساختار ژنتیکی و ژن‌های درگیر در فرآیند تشکیل دنبه، برای طراحی برنامه‌های اصلاح نژادی در جهت کاهش اندازه‌ی آن بسیار ضروری است. از روش‌های مختلف ژنومی مانند مطالعات گسترده ژنومی، مطالعه ردپای انتخاب یا تجزیه و تحلیل بیان ژن برای توصیف زمینه‌ی ژنتیکی احتمالی برای رسوب چربی در انواع نژادهای مختلف دنبه‌دار استفاده شده است. هدف از این مطالعه، شناسایی ژن‌های مؤثر در چربی دنبه در گوسفندان دنبه‌دار افشاری و سونیت در مقایسه با دو نژاد بدون دنبه دورپر و موتن آلمانی از طریق روش‌های شناسایی ردپای انتخاب و هستی‌شناسی ژن می‌باشد.
واژه‌های کلیدی: دنبه ردپای انتخاب گوسفند هستی‌شناسی ژن XP-EHH	مواد و روش‌ها: در این پژوهش از اطلاعات ژنوتیپ ۳۶۶ رأس گوسفند (۳۷ رأس نژاد افشاری، ۶۹ رأس نژاد سونیت، ۹۹ رأس نژاد دورپر و ۱۶۱ رأس نژاد موتن آلمانی) که با استفاده از آرایه‌های ژنگانی ایلومینا Ovine SNP50K BeadChip تعیین ژنوتیپ شده بودند، استفاده شد. برای جستجوی نشانه‌های انتخاب از آزمون XP-EHH در بسته نرم‌افزاری R نسخه ۱/۹ استفاده شد. برای تعیین موقعیت ژنومی SNP ها در سطح ژنوم گوسفند نیز از نسخه ژنومی Oar_v4.0 پایگاه اطلاعاتی NCBI استفاده شد. ژن-های کاندید با استفاده از SNP هایی که در بازه‌ی ۱٪ بالای XP-EHH واقع شده بودند، با استفاده از نرم‌افزار Plink v1.9 و توسط لیست ژنی شرکت ایلومینا در محیط R شناسایی شدند. همچنین، برای بررسی وجود QTL های مرتبط با صفات مربوط به چربی در مناطق شناسایی شده معنی‌دار، از آخرین نسخه منتشر شده پایگاه Animal genome استفاده شد.
	یافته‌ها: نتایج حاصل از XP-EHH نشان داد که در مقایسه‌ی جمعیت افشاری با دورپر و موتن آلمانی ۱۸ ژن مشترک شناسایی گردید که پنج ژن (<i>KCMF1</i> ، <i>LOC114118754</i> ، <i>LOC114116389</i>) و <i>RASSF2</i> و <i>TCF7L1</i> مرتبط با QTL های چربی شامل درصد چربی لاشه، مقدار چربی احشائی و ذخیره‌ی چربی در دنبه بودند. همچنین، در مقایسه‌ی جمعیت سونیت با دو جمعیت دورپر و موتن آلمانی، ۱۵ ژن مشترک شناسایی گردید که دو ژن <i>SEMA5B</i> و <i>CDH9</i> در ارتباط با QTL های چربی بودند. نتایج هستی‌شناسی ژن نیز نشان داد که برخی از این ژن‌ها نقش مؤثری در مسیرهای سیگنال دهی Wnt تنظیم‌کننده رشد و توسعه‌ی سلول‌ها و مورفولوژی سلولی دارند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصل از نشانه‌های انتخاب در نژادهای دنبه‌دار افشاری و سونیت، ژن *RASSF2* با استفاده از روش XP-EHH به‌عنوان نشانه انتخاب در نژاد دنبه‌دار افشاری شناسایی شد. ژن مذکور با QTL ذخیره‌ی چربی دنبه نیز در ارتباط است که برای اولین بار در این تحقیق شناسایی شد. همچنین، ژن‌های *LOC11411689* و *LOC114118754* مرتبط با QTL درصد چربی در لاشه و ژن‌های *KCMF1* و *TCF7L1* مرتبط با QTL مقدار چربی احشائی در نژاد افشاری شناسایی شد. علاوه بر این، در نژاد سونیت ژن *SEMA5B* مرتبط با QTL درصد چربی در لاشه و ژن *CDH9* مرتبط با QTL وزن چربی زیر جلدی شناسایی شدند. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند به‌منظور حذف دنبه به خصوص در نژاد افشاری مورد استفاده قرار گیرد.

استناد: روشندل قلعه زو، م، زره داران، س،، جوادمنش، ع. (۱۴۰۱). نشانه‌های انتخاب و هستی‌شناسی ژن برای صفات مرتبط با ذخیره چربی در گوسفندان دنبه‌دار افشاری و سونیت. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱۰ (۲)، ۶۲-۴۷.

DOI: 10.22069/ejrr.2022.19815.1829

© نویسنده‌گان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان



مقدمه

در بین گوسفندان جهان، حدود ۲۶٪ دنبه‌دار و مابقی بدون دنبه‌اند. این در حالی است که حدود ۹۶٪ از گوسفندان ایرانی دنبه‌دار و تنها ۴٪ دیگر بی دنبه‌اند (۱). اعتقاد بر این است که اجداد وحشی گوسفند، بدون دنبه بوده‌اند و در حقیقت نژادهای گوسفند دنبه‌دار به‌منظور سازگاری در شرایط سخت و چالش‌برانگیز محیطی مانند تغییرات آب‌وهوا، خشک‌سالی و کاهش منابع خوراکی ظاهر شدند (۱۴). علی‌رغم کارایی مناسب در گذشته، امروزه دنبه یک عامل نگرانی برای پرورش‌دهندگان محسوب شده و سبب کاهش راندمان استفاده از خوراک و در نتیجه کاهش کارایی اقتصادی پرورش گوسفند شده است. علاوه بر این، با توجه به مشکلات سلامتی انسان در ارتباط با سوخت‌وساز چربی و چاقی، نژادهای گوسفند دنبه‌دار یک مدل حیوانی مطلوب برای صنعت پرورش گوسفند نیستند و این نکته مطالعه فرآیند ژنتیکی کنترل رسوب چربی و ذخیره انرژی به شکل دنبه را اجتناب‌ناپذیر می‌کند (۱۱، ۲۳).

کیفیت و ترکیب لاشه از مهم‌ترین صفات اقتصادی گوسفند و گاو بوده و میزان چربی احشائی و دنبه از جمله عوامل اثرگذار بر کیفیت گوشت هر نژاد می‌باشد (۷). خالدار و همکاران (۲۰۰۹) طی بررسی نتایج حاصل از تحقیقات مختلف مربوط به کیفیت لاشه گوسفند در ایران گزارش کردند، تلاش برای حذف دنبه در نژادهای بومی با استفاده از روش‌های فیزیکی و یا آمیزش با نژادهای بدون دنبه، روش مناسبی به نظر نمی‌رسد و تلاقی‌های غیراصولی آسیب جبران‌ناپذیری به ذخایر ژنتیکی گوسفندان بومی وارد می‌کند (۹). در طی سال‌های گذشته تحقیقات گوناگونی برای شناسایی جایگاه‌های مرتبط با صفات مهم اقتصادی در گوسفند انجام شده است. شناسایی چندشکلی DNA و همچنین ژن‌های مرتبط

با صفات وزن بدن، اطلاعات لازم برای انتخاب به کمک نشانگر و بر اساس ژن را به وجود می‌آورد (۵، ۸). با کمک پویش ژنومی و نقشه یابی ژنتیکی حیوانات، ژن‌های اصلی مؤثر بر صفات اقتصادی در حیوانات مزرعه‌ای شناسایی شده‌اند (۶، ۹).

یکی از اهداف بزرگ در ژنتیک جمعیت، شناسایی نشانه‌های انتخاب است. شناسایی مکان‌های ژنی دارای عملکرد و آشکار نمودن تنوع ژنتیکی صفات کمی دارای اهمیت بالایی است. همچنین با شناسایی این نواحی، اطلاعات مفیدی در ارتباط با تکامل و سازوکارهای پایه که روی تکامل اثرگذار هستند، فراهم می‌شود (۱۶، ۳). از گذشته تا به امروز روش‌های آماری مختلفی برای شناسایی نواحی تحت انتخاب به کار گرفته شده است که هر یک معایب و مزایایی نسبت به یکدیگر دارند. توانایی آزمون‌های مختلف در شناسایی این سیگنال‌های تحت انتخاب، به اهداف، فراوانی و سن گونه موردنظر بستگی دارد (۱۹). در این تحقیق برای شناسایی نواحی ژنومی تحت انتخاب مثبت برای چربی دنبه از آزمون آماری هموزیگوسیتی هاپلوتیپ‌های بسط یافته جمعیت تلاقی (XP-EHH) بر پایه عدم تعادل لینکاژی و طول هاپلوتیپی استفاده می‌شود. بنابراین، هدف این پژوهش، شناسایی ژن‌های مؤثر بر ایجاد دنبه از طریق ردپای انتخاب در گوسفندان دنبه‌دار (افشاری و سونیت) در مقایسه با گوسفندان بدون دنبه (موتن آلمانی و دورپر) و همچنین شناخت ساختار ژنتیکی و عملکرد ژن‌های درگیر در فرآیند تولید دنبه است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، داده‌های OvineSNP50K مربوط به سه نژاد گوسفند سونیت (۶۹ عدد شامل ۵۷ نر و ۱۲ ماده)، موتن آلمانی (۱۶۱ عدد شامل ۷۱ نر و ۹۰ ماده) و دورپر (۹۹ عدد شامل ۴۹ نر و ۵۰ ماده) از

مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی و طول هاپلوتیپی است. آماره XP-EHH دارای توان بالایی برای شناسایی مناطق تثبیت شده دارد. در روش مذکور، مناطق ژنومی متأثر از انتخاب مثبت به وسیله آللهایی با EHH و فراوانی بالا قابل شناسایی هستند. در آزمون XP-EHH به منظور در نظرگیری تنوع در میزان نوترکیبی مناطق مختلف ژنوم، هاپلوتایپها در دو جمعیت با یکدیگر مقایسه می شوند. برای شناسایی نشانه‌های انتخاب در چهار مقایسه از پکیج rehh نرم افزار R x64 4.0.4 استفاده شد. برای شناسایی سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم از ارزش‌های عددی هر SNP استفاده شد و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرها دارای ارزش بالایی بودند، به عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند. برای محاسبه این آماره از برنامه‌های مشابه، شامل فایل هاپلوتیپی و فایل نقشه‌های SNPها استفاده شد. فایل نقشه ورودی، شامل ۵ ستون بود که در آن نام SNP، موقعیت فیزیکی، ژنتیکی و آللهایی که بیانگر عدد ۰ و ۱ در فایل هاپلوتیپ مشخص شده بود. موقعیت فیزیکی هر SNP به نسخه ژنومی گوسفند Oar_v4.0 به هنگام آوری شد.

$$EHH = \frac{\sum_{i=1}^{h_x} \binom{ni}{2}}{\binom{na}{2} \binom{nA}{2}}$$

در این معادله na و nA نشان‌دهنده تعداد هاپلوتیپهایی که در آنها a و A به ترتیب وجود دارند، هستند و hx گویای تعداد هاپلوتیپهای مجزا در یک منطقه ژنومی تا فاصله x است. بعد از برآورد EHH آماره xp-ehh از معادله زیر قابل محاسبه است.

$$XP EHH_{scores} = \ln\left(\frac{I_A}{I_B}\right)$$

در معادله فوق، IA و IB به ترتیب نشان‌دهنده میزان انتگرال EHH با توجه به فاصله ژنتیکی در دو جمعیت A و B هستند (۲۱). برای شناسایی نشانه‌های

مطالعه ژانگ و همکاران (۲۰۱۳) جمع آوری شدند (۲۵). همچنین، اطلاعات ژنوتیپی مربوط به نژاد دنبه‌دار افشاری (۳۷ نمونه) نیز از پروژه HapMap و از پایگاه _____ داده‌ای استفاده (<http://widde.toulouse.inra.fr/widde/>) استفاده گردید.

کنترل کیفیت داده‌ها: ابتدا موقعیت ژنومی SNP ها بر روی کروموزومها در گوسفندان مورد مطالعه به نسخه ژنومی Oar_v4.0 گوسفندی آپدیت شد. سپس برای اطمینان از کیفیت داده‌های ناشی از تعیین ژنوتیپ در تجزیه و تحلیل‌های پایانی، مراحل مختلف کنترل کیفیت روی داده‌ها انجام شد. در آغاز حیوانات با بیش از ۱۰ درصد ژنوتیپ از دست رفته از تجزیه‌های بعدی کنار گذاشته شدند. سپس SNP هایی که در مجموع حیوانات دارای کمترین فراوانی هم‌ردیفی ژنی (MAF) کمتر از ۱ درصد و درصدی از نمونه‌ها که برای آن نشانگر تعیین ژنوتیپ شده‌اند کمتر از ۹۹/۹ درصد داشتند، حذف شدند. در نهایت برای SNP های باقی مانده، تعادل هاردی-واینبرگ بررسی و SNP هایی که در تعادل نبودند به عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ کنار گذاشته شدند (۲۱). بدین جهت سطح احتمال 10^{-6} در نظر گرفته شد که با استفاده از تصحیح بنفرونی به دست آمد. تجزیه و تحلیل این بخش با نرم افزار PLINK v1.9 در محیط R انجام شد (۱۷). علاوه بر این، به منظور ایجاد یک دیدگاه کلی در مورد ساختار جمعیتی نمونه‌های بکار رفته در پژوهش، آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر پایه ماتریس خویشاوندی ژنگانی، باهدف شناسایی دام‌هایی که خارج از گروه نژادی خود قرار گرفته‌اند، در محیط نرم افزار R i386 3.6.2 (۱۵) انجام شد.

روش آماری برای شناسایی نشانه‌های انتخاب: برای شناسایی نشانه‌های انتخاب از آزمون XP-EHH استفاده شد. این آماره یکی از مهم‌ترین آزمون‌های

ژن‌ها، هستی‌شناسی ژن‌ها و آنالیز مسیر KEGG از برنامه CluoGo v2.5.6 که یک افزونه در نرم‌افزار Cytoscape v3.8.2 است، استفاده شد.

نتایج و بحث

کنترل کیفیت داده: از سه نژاد دورپر با ۹۹ نمونه، موتن آلمانی با ۱۶۱ نمونه و سونیت با ۶۹ نمونه بعد از مرحله کنترل کیفیت، ۹۸ نمونه نژاد دورپر با ۴۲۷۹۲ SNP، ۱۶۰ نمونه نژاد موتن آلمانی با ۴۲۷۹۲ SNP و ۶۹ نمونه نژاد سونیت با ۴۴۲۳۴ SNP باقی ماندند. در نژاد افشاری نیز از مجموع ۴۶۸۱۹ SNP از ۳۷ نمونه بعد از کنترل کیفیت تعداد ۴۴۸۲۶ SNP و ۳۷ نمونه برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. به دلیل بررسی نشانه‌های انتخاب و شناسایی مناطق تحت انتخاب مثبت مربوط به چربی دنبه، نژادهای دنبه‌دار با نژادهای بدون دنبه ادغام شد. پس از ادغام نژادهای افشاری و دورپر ۳۵۹۵۴ SNP با ۱۳۵ نمونه، نژادهای افشاری با موتن آلمانی ۳۶۳۵۱ SNP با ۱۹۷ نمونه، نژادهای سونیت با دورپر ۴۰۱۵۱ SNP با ۱۶۷ نمونه و در نژادهای سونیت با موتن آلمانی ۴۰۷۵۷ SNP با ۲۲۹ نمونه برای تجزیه و تحلیل مراحل بعدی باقی ماندند.

آنالیز PCA: به منظور بررسی نحوه قرار گرفتن حیوانات در گروه‌های نژادی، تجزیه و تحلیل PCA با به‌کارگیری اطلاعات تعیین نژادگان بین نژادهای دنبه‌دار افشاری و سونیت و بدون دنبه دورپر و موتن آلمانی به‌عنوان راهی متمایز به منظور توصیف واگرایی، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که با استفاده از دو مؤلفه PC1 و PC2 این چهار نژاد در گروه‌های جداگانه قرار گرفته‌اند و در هیچ نقطه‌ای با هم همپوشانی ندارند. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، حیوانات به چهار دسته دورپر، موتن آلمانی، سونیت و افشاری تفکیک شدند

انتخاب در چهار مقایسه که هر یک از دو جمعیت تشکیل شده است، از پکیج rehh نرم‌افزار R i386 3.6.2 استفاده شد.

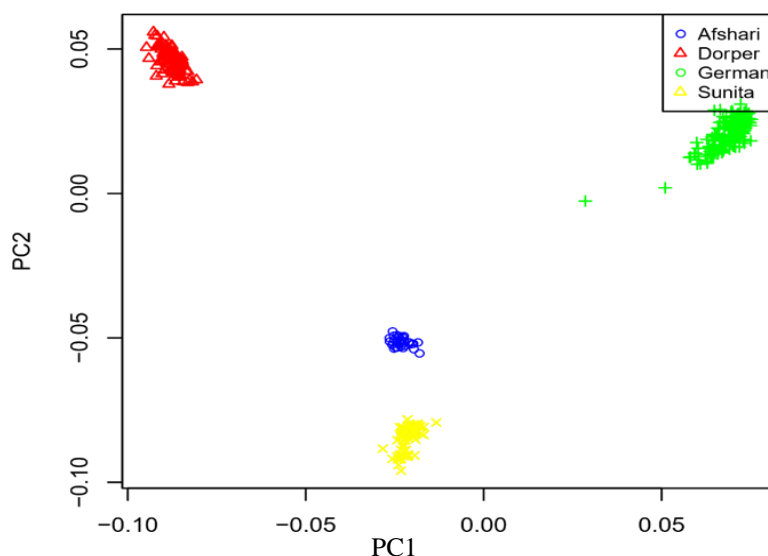
شناسایی ژن‌ها و QTL های گزارش شده در مناطق ژنومی شناسایی شده در روش (XP-EHH): برای تعیین موقعیت ژنومی SNP ها در سطح ژنوم گوسفند از نسخه ژنومی Oar_v4.0 پایگاه اطلاعاتی NCBI استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار Plink v1.9 و توسط لیست ژنی شرکت ایلومینا در محیط R، ژن‌های کاندید با استفاده از SNP هایی که در بازه ۱٪ بالای XP-EHH واقع شده بودند، شناسایی شدند. همچنین، در این مطالعه برای بررسی وجود QTL های مرتبط با صفات مربوط به چربی در مناطق شناسایی شده معنی‌دار، از آخرین نسخه منتشر شده پایگاه Animal QTLdb (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>) استفاده شد. از جمله QTL های مورد بررسی در این تحقیق تراکم چربی در لاشه و گوشت (Fat Density)، درصد چربی لاشه (Carcass Fat Percentage)، وزن چربی در لاشه (Fat Weight (In Carcass Total Fat)، ذخیره چربی دنبه (Fat Tail deposition)، کل سطح چربی^۱ (Area Subcutaneous Fat)، مقدار چربی احشائی (Internal Fat Amount) و وزن چربی زیر جلدی (Subcutaneous Fat Weight) بود. گزارش QTL مربوط به هر سه روش و همچنین ژن‌های مرتبط با این QTL ها با استفاده از نرم‌افزار Plink v1.9 در محیط R انجام شد.

شناسایی مسیر بیوشیمیایی و عملکردی ژن‌های کاندید: برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به‌دست‌آمده در این روش، از پایگاه‌های اطلاعاتی آنالین GeneCards و UniProtKB و KEGG استفاده شد. برای شناسایی فرآیندهای بیولوژیکی و عملکردی

۱. مقدار کل مساحت اشغال شده توسط بافت چربی در اسکن مقطعی

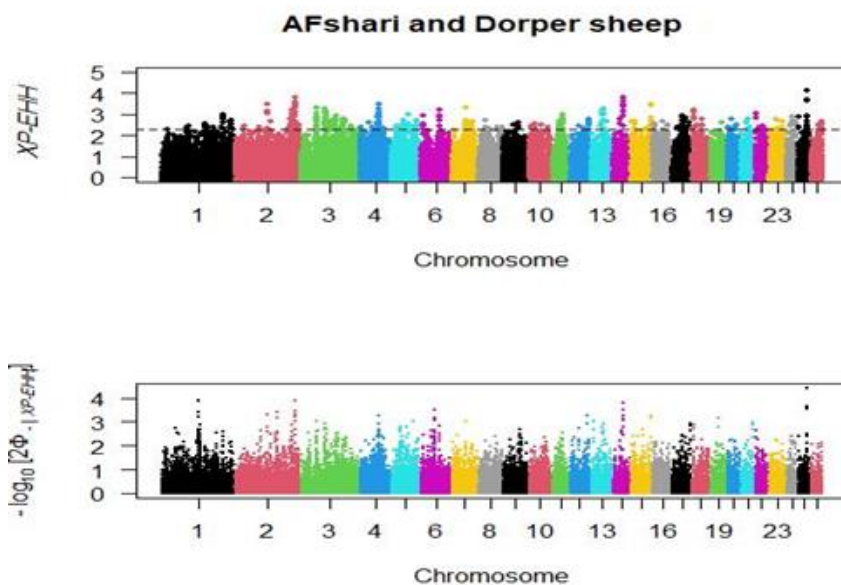
انتخاب برای چهار دسته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

که ۹۹ رأس دورپر، ۱۶۱ رأس موتن آلمانی، ۶۹ رأس سونیت و ۳۷ رأس افشاری مشخص شد و نشانه‌های



شکل ۱- تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) بین نژادهای افشاری، سونیت، دورپر و موتن آلمانی

Figure 1- PCA among Dorper, German Mutton, Sunite and Afshari sheep breeds

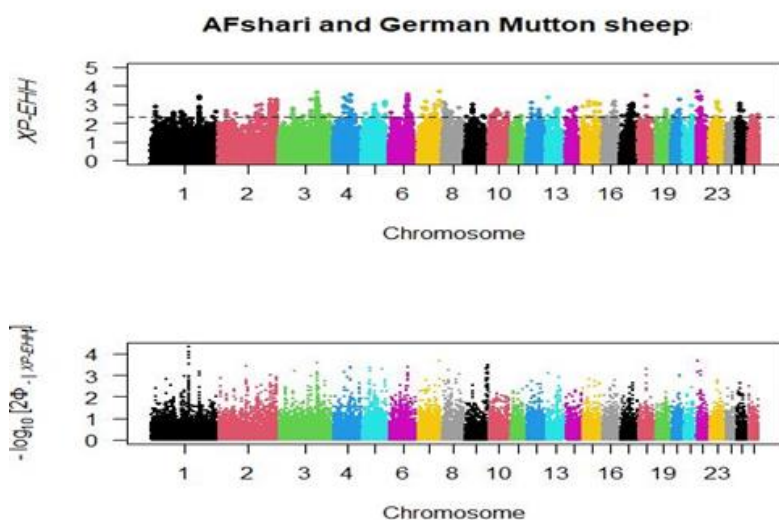


شکل ۲- منهن پلات برای شناسایی نشانه‌های انتخاب در جمعیت نژاد افشاری در مقایسه گوسفند افشاری با دورپر: پلات اول مقدار XP-EHH را در کروموزوم‌های مختلف نشان می‌دهد و پلات دوم $-\log$ معنی‌داری XP-EHH را نشان می‌دهد. محور X موقعیت SNP ها روی کروموزوم‌های مختلف و محور Y ارزش‌های XP-EHH را نشان می‌دهد.

Figure 2- Manhattan plot to identify selection cues in Afshari population by comparing Afshari sheep and Dorper: The first plot shows the amount of XP-EHH on different chromosomes and the second plot shows the $-\log$ significance of XP-EHH. The X-axis shows the position of SNPs on different chromosomes and the Y-axis shows the XP-EHH values.

بررسی نشانه‌های انتخاب: محاسبه ارزش XP-EHH برای گوسفندان نژاد افشاری و دورپر: برای شناسایی سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم از ارزش عددی هر SNP استفاده شد و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرها دارای ارزش بالایی بودند (شکل ۲). به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی شدند (شکل ۲). پلات اول نشان‌دهنده اسکور XP-EHH است که بر اساس EHH نواحی تحت انتخاب را نسبت به یک جمعیت بررسی می‌کند. پلات دوم $-\log$ است که نشان‌دهنده معنی‌داری اختلاف EHH ها است. درواقع این پلات بیانگر معنی‌داری نقاط تحت انتخاب، با این اسکور XP-EHH می‌باشد. بر اساس نتایج این آماره، از مجموع ۳۵۹۵۴ SNP در دو جمعیت افشاری و دورپر ۳۶۰ SNP انتخاب شدند که با ۷۷ ژن در ارتباط بودند، همچنین، بیشترین ارزش محاسبه‌شده XP-EHH برای نژاد افشاری بر روی کروموزوم ۲۲ ($XP-EHH=۳/۷۲$) و کم‌ترین ارزش محاسبه‌شده بر روی کروموزوم ۲ ($XP-EHH=۲/۳۰$) بودند.

بررسی نشانه‌های انتخاب: محاسبه ارزش XP-EHH برای گوسفندان نژاد افشاری و دورپر: برای شناسایی سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم از ارزش عددی هر SNP استفاده شد و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرها دارای ارزش بالایی بودند (۲۳) و ارزش $XP-EHH > ۲/۲۸$ داشتند، به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی شدند (شکل ۲). پلات اول نشان‌دهنده اسکور XP-EHH است که بر اساس EHH نواحی تحت انتخاب را نسبت به یک جمعیت بررسی می‌کند. پلات دوم $-\log$ است که نشان‌دهنده معنی‌داری اختلاف EHH ها است. درواقع این پلات بیانگر معنی‌داری نقاط تحت انتخاب، با این اسکور XP-EHH می‌باشد. بر اساس نتایج این آماره، از مجموع ۳۵۹۵۴ SNP در دو جمعیت افشاری و دورپر ۳۶۰ SNP انتخاب شدند که با ۷۷ ژن در ارتباط بودند، همچنین، بیشترین ارزش محاسبه‌شده XP-EHH برای نژاد افشاری بر روی کروموزوم ۲۵

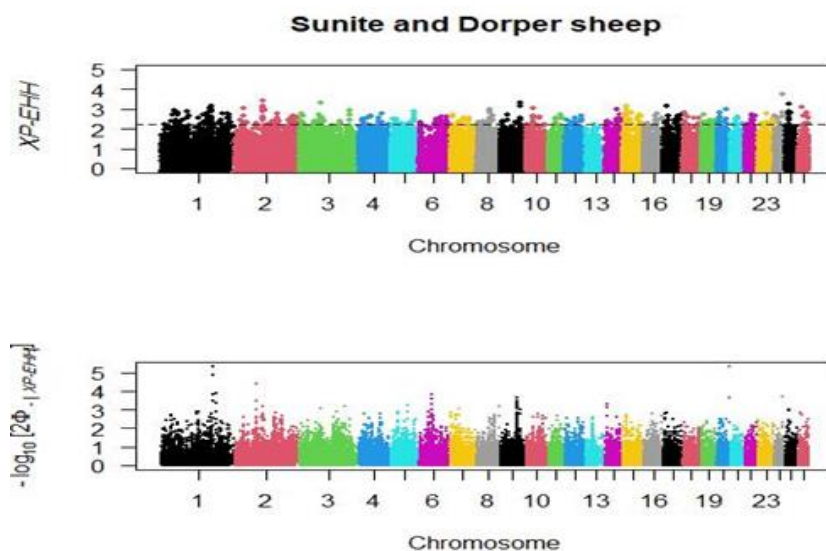


شکل ۳- منتهن پلات برای شناسایی نشانه‌های انتخاب در جمعیت گوسفند افشاری در مقایسه افشاری و موتن آلمانی: پلات اول مقدار XP-EHH را در کروموزوم‌های مختلف نشان می‌دهد و پلات دوم $-\log$ معنی‌داری XP-EHH را نشان می‌دهد: محور X موقعیت SNP ها روی کروموزوم‌های مختلف و محور Y ارزش‌های XP-EHH را نشان می‌دهد.

Figure 2- Manhattan plot to identify selection cues in Afshari population by comparing Afshari sheep and German Mutton: The first plot shows the amount of XP-EHH on different chromosomes and the second plot shows the $-\log$ significance of XP-EHH. The X-axis shows the position of SNPs on different chromosomes and the Y-axis shows the XP-EHH values.

۵ ژن با QTL های چربی مانند درصد چربی لاشه (FATP)، مقدار چربی احشائی (INTFAT) و ذخیره چربی دنبه (TAILFD) مرتبط بودند (جدول ۱). ژن‌های LOC114116389 و LOC114118754 بر روی کروموزوم ۱ و به ترتیب در منطقه ژنومی ۹۴/۶۳ تا ۹۴/۶۷ کیلو جفت باز و ۱۹۹/۰۹۲۱ تا ۱۹۹/۰۹۳۵ کیلو جفت باز قرار دارند و مرتبط با درصد چربی لاشه شناسایی شدند. ژن‌های (Potassium Channel Modulatory Factor 1) KCMF1 و TCF7L1 (Transcription Factor 7 Like 1) بر روی کروموزوم ۳ و به ترتیب در منطقه ژنومی ۶۰/۸۶ تا ۶۰/۹۴ و ۶۱/۰۰ تا ۶۱/۱۹ کیلو جفت باز قرار دارند و با QTL مقدار چربی احشائی در ارتباط بودند. ژن RASSF2 (Ras Association Domain Family Member 2) بر روی کروموزوم ۱۳ و در منطقه ژنومی ۴۸/۷۴ تا ۴۸/۷۶ کیلو جفت باز قرار دارد و در این مطالعه با QTL ذخیره چربی دنبه مرتبط بود.

شناسایی ژن‌ها و QTL های گزارش شده در مناطق ژنومی تحت انتخاب با استفاده از آماره XP-EHH : برای شناسایی ژن‌های مرتبط با بخش‌های انتخابی ژنوم، از نسخه OAR V4.0 گوسفندی استفاده شد. در این مطالعه QTL هایی که مرتبط با چربی بودند، انتخاب شدند. این QTL ها شامل سطح کل چربی (TFAREA) و تراکم چربی (FATDENS) در مطالعه ماتیکا و همکاران (۲۰۱۶)، درصد چربی لاشه (FATP)، مقدار چربی احشائی (INTFAT)، وزن چربی در لاشه (FATWT) و وزن چربی زیر جلدی (SCFWT) در مطالعه کاوانا و همکاران (۲۰۱۰) و ذخیره چربی دنبه (TAILFD) در مطالعه یوان و همکاران (۲۰۱۷) شناسایی شده بودند (۲۳، ۳، ۱۳). در مقایسه XP-EHH برای افشاری- دورپر و افشاری- موتن آلمانی تنها پلات‌های گوسفندان افشاری و ژن‌های مرتبط با این نژاد مدنظر قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۱۸ ژن مشترک بین دو مقایسه بودند که



شکل ۴- گراف منهنن برای شناسایی نشانه‌های انتخاب در جمعیت گوسفند سونیت در مقایسه گوسفند سونیت و دورپر: پلات اول مقدار XP-EHH را در کروموزوم‌های مختلف نشان می‌دهد و پلات دوم $-\log$ معنی‌داری XP-EHH را نشان می‌دهد محور X موقعیت SNP ها روی کروموزوم‌های مختلف و محور Y ارزش‌های XP-EHH را نشان می‌دهد.

Figure 2- Manhattan plot to identify selection cues in Sunite population by comparing Sunite sheep and Dorper: The first plot shows the amount of XP-EHH on different chromosomes and the second plot shows the $-\log$ significance of XP-EHH. The X-axis shows the position of SNPs on different chromosomes and the Y-axis shows the XP-EHH values.

جدول ۱- ژن‌های مشترک و QTL های شناسایی شده مربوط به نواحی تحت انتخاب بر اساس آماره XP-EHH بین دو مقایسه گوسفندان افشاری - دورپر و گوسفندان افشاری - موتن آلمانی

Table 1- Common genes and identified QTLs related to selected areas based on XP-EHH statistics between two comparisons of Afshari-Dorper sheep and Afshari-German Mutton sheep

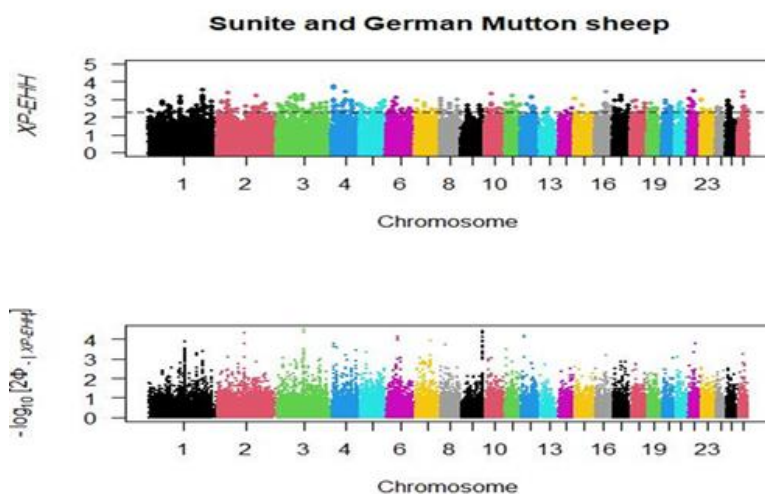
QTL(Trait /QTL ID)	Mean XP-EHH (AD ¹ /AMG ²)	Gene names	Position	CHR
(FATP ³ / 14277)	2.2872 / 2.4567	<i>LOC114116389</i>	94,633,303-94,675,016	1
(FATP /14277)	2.3624 / 2.4855	<i>LOC114118754</i>	199,092,103-199,093,544	1
	2.7659 / 2.6736	<i>CARF</i>	219,148,328-219,224,898	2
	2.9027 / 2.8124	<i>NBEAL1</i>	219,227,369-219,386,024	2
(INTFAT ⁴ / 14281)	2.4092 / 2.5462	<i>KCMF1</i>	60,868,432-60,946,368	3
(TNTFAT / 14281)	2.8455 / 2.6437	<i>TCF7L1</i>	61,007,289-61,199,015	3
	2.5733 / 2.4446	<i>ITPRID1</i>	71,593,820-71,724,293	4
	2.3575 / 2.4306	<i>LOC101104231</i>	94,821,736-95,396,545	4
	2.8833 / 1.9100	<i>PDE1C</i>	70,965,558-71,497,667	4
	2.3920 / 2.9628	<i>LOC114114910</i>	92,751,392-92,791,326	5
	2.4701 / 2.4422	<i>PPP2R2B</i>	60,228,930-60,774,162	5
	1.8140 / 1.8197	<i>FUT8</i>	80,928,743-81,244,180	7
(TAILFD ⁵ / 127011)	2.7196 / 2.3616	<i>RASSF2</i>	48,742,453-48,769,371	13
	2.3335 / 2.6204	<i>LOC101114644</i>	52,215,633-52,221,585	17
	2.8064 / 2.9321	<i>ZNF10</i>	52,042,590-52,106,764	17
	2.5972 / 2.5552	<i>PTPRG</i>	40,852,269-41,626,842	19
	2.4250 / 3.3123	<i>TNKS2</i>	15,305,067-15,368,561	22
	2.3898 / 2.4500	<i>ANK1</i>	39,936,028-40,174,230	26

۱-افشاری-دورپر، ۲-افشاری-موتن آلمانی، ۳-درصد چربی در لاشه، ۴-مقدار چربی احشائی و ۵-ذخیره چربی دنبه

محاسبه ارزش XP-EHH برای گوسفندان نژاد سونیت و دورپر: برای شناسایی سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم از ارزش عددی هر SNP استفاده شد و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرها دارای ارزش بالایی بودند و ارزش XP-EHH > ۲/۲۶ داشتند، به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی شدند (شکل ۴). نتایج نشان داد که از مجموع ۴۰۱۵۱ SNP در دو جمعیت سونیت و دورپر ۴۰۲ SNP انتخاب شدند که با ۱۲۱ ژن در ارتباط بودند، همچنین برای نژاد سونیت، بالاترین ارزش محاسبه‌شده XP-EHH بر روی کروموزوم ۲۴

کم‌ترین ارزش محاسبه‌شده بر روی کروموزوم ۴ (XP-EHH=۲/۲۰) بودند. محاسبه ارزش XP-EHH برای گوسفندان نژاد سونیت و موتن آلمانی: برای شناسایی سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم از ارزش عددی هر SNP استفاده شد و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرها دارای ارزش بالایی بودند و ارزش XP-EHH > ۲/۲۶ داشتند، به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی شدند (شکل ۵). نتایج نشان داد که از مجموع ۴۰۷۵۷ SNP در دو جمعیت سونیت و موتن آلمانی ۴۰۸ SNP انتخاب شدند که با ۱۲۳ ژن در

ارتباط بودند، همچنین بیشترین ارزش محاسبه شده برای XP-EHH در کروموزوم ۴ بود. کمترین ارزش محاسبه شده بر روی کروموزوم ۱ (XP-EHH=۲/۲۶) بود.



شکل ۵-منهتن پلات برای شناسایی نشانه‌های انتخاب در جمعیت سونیت در مقایسه سونیت و موتن آلمانی: پلات اول مقدار XP-EHH را در کروموزوم‌های مختلف نشان می‌دهد و پلات دوم $-\log$ معنی داری XP-EHH را نشان می‌دهد. محور X موقعیت SNP ها روی کروموزوم‌های مختلف و محور Y ارزش‌های XP-EHH را نشان می‌دهد.

Figure 2- Manhattan plot to identify selection cues in Sunite population compared to Sunite sheep and German Mutton: The first plot shows the amount of XP-EHH on different chromosomes and the second plot shows the $-\log$ significance of XP-EHH. The X-axis shows the position of SNPs on different chromosomes and the Y-axis shows the XP-EHH values.

نشانه‌های انتخاب در جمعیت بزهای فرانسوی انجام شده بود، بر روی کروموزوم ۲۰ و در ناحیه ۴۶/۵ تا ۵۰/۱ جفت باز شناسایی شده است (۱۶).

شناسایی مسیر بیوشیمیایی و عملکردی ژن‌های کاندید: برای شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی از برنامه ClueGo v2.5.8 که یک افزونه نرم‌افزار Cytoscape است، استفاده شد. مسیرهایی که مقدار آن‌ها کاملاً معنی دار بود (P-Value کمتر از ۰/۰۱) به عنوان مسیرهای تحت انتخاب مثبت معرفی شدند. از جمله مسیرهای شناسایی شده در این مطالعه، می‌توان به مسیر سیگنال دهی Wnt، مورفولوژی سلولی، رشد و توسعه سلول و سیستم‌های عصبی اشاره کرد. ژن TCF7L1 در مسیر سیگنال دهی Wnt نقش دارد. پروتئین‌های Wnt، مورفوژن‌های ترشح شده‌ای هستند که برای فرآیندهای اولیه رشد

شناسایی ژن‌ها و QTL های گزارش شده در مناطق ژنومی تحت انتخاب با استفاده از آماره XP-EHH: نتایج آماره XP-EHH نشان داد که ۱۵ ژن در بین مقایسات سونیت-دورپر با سونیت-موتن آلمانی مشابه بود که تنها ۲ مورد مرتبط با QTL های چربی شامل درصد چربی در لاشه و وزن چربی زیر جلدی مشاهده شد (جدول ۲). ژن SEMA5B (Semaphorin 5B) بر روی کروموزوم ۱ و در منطقه ژنومی ۲۰/۵۳ تا ۲۰/۵۴ شناسایی شد که مرتبط با QTL درصد چربی در لاشه بود. این ژن نقش مهمی در سیستم عصبی مرکزی ایفا می‌کند. ژن CDH9 (Cadherin 9) بر روی کروموزوم ۱۶ و در ناحیه ژنومی ۵۰/۰۲ تا ۵۰/۱۶ کیلو جفت باز و مرتبط با QTL وزن چربی زیر جلدی شناسایی شد. این ژن در مطالعه اوگت و همکاران (۲۰۱۹) که با هدف آنالیز تنوع ژنتیکی و

اطلاعات ناقص در مورد اطلاعات هستی‌شناسی ژن‌ها در گوسفند، نتایج کاربردی نیازمند کامل‌تر شدن این اطلاعات در پایگاه‌های اطلاعاتی مربوطه است. بنابراین، پس از کامل شدن حاشیه‌نویسی عملکردی ژن‌ها در گوسفند، نتایج باقابلیت اطمینان بیشتر حاصل خواهد شد.

مانند تعیین سرنوشت سلول، تکثیر سلول‌های پیش ساز و کنترل تقسیم نامتقارن سلولی در گونه‌ها و اندام‌های مختلف موردنیاز هستند (KEGG) همچنین این مسیر نقش مهمی در رشد جنین، بازسازی بافت و حساسیت به بیماری‌ها به‌ویژه سرطان دارد (۱۸). ژن SEMA5B نیز در مورفولوژی سلولی و همچنین در رشد و توسعه سلول نقش دارد. با توجه به

جدول ۲- ژن‌های مشترک و QTL های شناسایی شده مربوط به نواحی تحت انتخاب بر اساس آماره XP-EHH بین دو مقایسه گوسفندان سونیت - دورپر و گوسفندان سونیت- موتن آلمانی

Table 2- Common genes and identified QTLs related to selected areas based on XP-EHH statistics between two comparisons of Sunite-Dorper sheep and Sunite-German mutton sheep

QTL(Trait / QTL ID)	Mean	Gene names	Position	CHR
	XP-EHH(SD ¹ /SMG ²)			
(FATP ³ / 14277)	2.5427 / 2.5208	<i>PIK3CB</i>	272,987,282-273,171,44	1
	3.1379 / 2.5524	<i>SEMA5B</i>	205,324,708-205,457,86	1
	2.6534 / 2.5206	<i>ACVR2A</i>	173,020,628-173,111,29	2
	2.5186 / 2.4730	<i>KCND2</i>	92,712,656-93,269,396	4
	2.2123 / 2.4204	<i>AP3B1</i>	9,924,370-10,163,664	7
	2.6095 / 2.9275	<i>LHFPL2</i>	10,464,569- 10,634,363	7
	2.3586 / 2.4873	<i>CAMSAP2</i>	82,961,782-83,058,150	12
(SCFWT ⁴ / 14309)	2.4741 / 2.6252	<i>NECTIN1</i>	33,008,560-33,080,960	15
	2.4588 / 2.5537	<i>CDH9</i>	50,026,218-50,164,105	16
	2.5592 / 2.5524	<i>SEMA5A</i>	69,618,287-70,174,939	16
	2.6630 / 2.6920	<i>PTPN11</i>	70,956,372-71,024,245	17
	2.7056 / 2.4688	<i>TRIM71</i>	7,801,209-7,861,864	19
	2.5352 / 2.5352	<i>LOC105603828</i>	39,270,021-39,672,011	20
	2.3662 / 2.4347	<i>OTOA</i>	20,857,367-20,929,749	24
	2.7534 / 2.3398	<i>RET</i>	13,227,048-13,282,709	25

۱-سونیت-دورپر، ۲-سونیت-موتن آلمانی، ۳-درصد چربی در لاشه و ۴-وزن چربی زیرجلدی

افشاری شناسایی شد. ژن مذکور با QTL ذخیره چربی دنبه نیز در ارتباط است که برای اولین بار در این تحقیق شناسایی شد. همچنین، ژن‌های LOC11411689 و LOC114118754 مرتبط با QTL درصد چربی در لاشه، ژن‌های *KCMF1* و *TCF7L1* مرتبط با QTL مقدار چربی احشائی در نژاد افشاری نیز شناسایی شد. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی پژوهش حاضر نشان داد که بر اساس نتایج حاصل از نشانه‌های انتخاب در نژادهای دنبه‌دار سونیت و افشاری، ژن SEMA5B مرتبط با QTL درصد چربی در لاشه و ژن CDH9 مرتبط با QTL وزن چربی زیر جلدی در نژاد سونیت شناسایی شدند. علاوه بر این، ژن RASSF2 با استفاده از روش XP-EHH به‌عنوان نشانه انتخاب در نژاد دنبه‌دار

در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند به‌منظور حذف
دنبه به‌خصوص در نژاد افشاری مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Bakhtiarizadeh, M.R., Moradi-Shahrbabak, M. and Ebrahimie, E. 2013. Underlying functional genomics of fat deposition in adipose tissue. *Gene*, 521(1): 122-128.
2. Biswas, S. and Akey, J.M. 2006. Genomic insights into positive selection. *Trends in Genetics*, 22(8): 437-446.
3. Cavanagh, C.R., Jonas, E., Hobbs, M., Thomson, P.C., Tammen, I. and Raadsma, H.W. 2010. Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) in sheep. III. QTL for carcass composition traits derived from CT scans and aligned with a meta-assembly for sheep and cattle carcass QTL. *Genetics Selection Evolution*, 42(1): 1-14.
4. Georges, M. 2007. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 8: 131-162.
5. Goddard, M. 1996. The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genetics Selection Evolution*, 28(2): 161-176.
6. Hayes, B.J., Chamberlain, A.J., Maceachern, S., Savin, K., Mcpartlan, H., Macleod, I., Sethuraman, L. and Goddard, M.E. 2009. A genome map of divergent artificial selection between *Bos taurus* dairy cattle and *Bos taurus* beef cattle. *Animal Genetics*, 40(2): 176-184.
7. Javadmanesh, A., Näsiri, M.R. and Azghandi, M. 2017. Study of HVR-III region of mitochondrial genome of Iranian sheep by sequencing method. *Animal Science Research (Agricultural Science)*, 27 (2): 133-141.
8. Kashan, N., Azar, G.M., Afzalzadeh, A. and Salehi, A. 2005. Growth performance and carcass quality of fattening lambs from fat-tailed and tailed sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 60(3): 267-271.
9. Khaldari, M. 2009. Challenges and strategies of sheep carcass quality in Iran. The first seminar on sheep carcass quality in Iran, Karaj Agricultural and Natural Resources Campus - University of Tehran 25 June. Pages 79-68.
10. Lv, F.-H., Agha, S., Kantanen, J., Colli, L., Stucki, S., Kijas, J.W., Joost, S., Li, M.-H. and Ajmone Marsan, P. 2014. Adaptations to climate-mediated selective pressures in sheep. *Molecular Biology and Evolution*, 31(12): 3324-3343.
11. Mastrangelo, S., Bahbahani, H., Moioli, B., Ahbara, A., Al Abri, M., Almathen ,F., Da Silva, A., Belabdi, I., Portolano, B. and Mwacharo, J.M. 2019. Novel and known signals of selection for fat deposition in domestic sheep breeds from Africa and Eurasia. *Plos One*, 14(6): e0209632.
12. Matika, O., Riggio, V., Anselme-Moizan, M., Law, A.S., Pong-Wong, R., Archibald, A.L., and Bishop, S.C. 2016. Genome-wide association reveals QTL for growth, bone and *in vivo* carcass traits as assessed by computed tomography in Scottish Blackface lambs. *Genetics Selection Evolution*, 48(1): 1-15.
13. Moradi, M.H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds, K.G., and 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(1): 1-15.
14. Morandat, F., Hill, B., Osvald, L. and Vitek, J. 2012. Evaluating the design of the R language. In *European Conference on Object-Oriented Programming* (pp. 104-131). Springer, Berlin, Heidelberg.
15. Nielsen, R. 2005. Molecular signatures of natural selection. *Annual Review of Genetics*, 39: 197-218.
16. Oget, C., Servin, B. and Palhiere, I. 2019. Genetic diversity analysis of French goat populations reveals selective sweeps involved in their differentiation. *Animal genetics*, 50(1): 54-63.

17. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D. and Sham, P.C. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3): 559-575.
18. Reya, T. and Clevers, H. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843-850.
19. Sabeti, P.C., Schaffner, S.F., Fry, B., Lohmueller, J., Varilly, P., Shamovsky, O., Palma, A., Mikkelsen, T., Altshuler, D. and Lander, E. 2006. Positive natural selection in the human lineage. *Science*, 312: 1614-1620.
20. Sabeti, P. C., Varilly, P., Fry, B., Lohmueller, J., Hostetter, E., Cotsapas, C. and Lander, E. S. 2007. Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature*, 449(7164): 913-918.
21. Teo, Y.Y., Fry, A.E., Clark, T G., Tai, E.S. and Seielstad, M. 2007. On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Human Genetics*, 71(5): 701-703.
22. Xu, S.S., Ren, X., Yang, G.L., Xie, X.L., Zhao, Y.X., Zhang, M., Shen, Z.Q., Ren, Y.L., Gao, L. and Shen, M. 2017. "Genome-wide association analysis identifies the genetic basis of fat deposition in the tails of sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics*, 48(5): 560-569.
23. Yang, J., Li, W.-R., Lv, F.-H., He, S. G., Tian, S. L., Peng, W. F., Sun, Y. W., Zhao, Y. X., Tu, X. L. and Zhang, M. 2016. Whole-genome sequencing of native sheep provides insights into rapid adaptations to extreme environments. *Molecular Biology and Evolution*, 33(10): 2576-2592.
24. Yuan, Z., Liu, E., Liu, Z., Kijas, J., Zhu, C., Hu, S., Ma, X., Zhang, L., Du, L. and Wang, H. 2017. Selection signature analysis reveals genes associated with tail type in Chinese indigenous sheep. *Animal Genetics*, 48(1): 55-66.
25. Zhang, L., Liu, J., Zhao, F., Ren, H., Xu, L., Lu, J. and Du, L. 2013. Genome-wide association studies for growth and meat production traits in sheep. *Plos One*, 8(6): e66569.