Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Bioinformatics analysis of candidate genes for milk production and litter size in goat

Bahram Afzali-talkhak[1], Mohsen Gholizadeh[2]*, Seyed Hasan Hafezian[3], Seyed Mehdi Esmaeili-fard[4]

[1]M.Sc. graduate, [2]Associate Professor and [3]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal and Aquatic Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, Email: m.gholizadeh@sanru.ac.ir
[4] Researcher, Center for immunity and immunotherapy, Seattle children's Research Institute, Seattle, USA.

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 08/03/2023
Revised: 10/20/2023
Accepted: 10/21/2023

Keywords:
Goat
litter size
Gene network analysis
Candidate gene

Abstract

Background and Objectives: Milk production and reproductive traits are important economic traits in goat. The different approaches including candidate gene mapping and genome-wide association studies (GWAS) are now implemented in goats in an attempt to identify the molecular mechanisms affecting these economically important traits. The gene ontology (GO) analysis gives a controlled vocabulary for describing attributes of genes and gene products. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) provides the mythology for the careful examination of gene functions in respect of networks of genes and molecules. Gene network analysis can also identify paths and processes shared by candidate genes. The purpose of the present study was to bioinformatics analysis (GO, path enrichment, and network analysis of the effects of protein-protein interaction) of genes effective in litter size and milk production in goat.

Materials and Methods: Candidate genes associated with studied traits were retrieved from literature review, review of candidate gene studies, GWAS and NCBI database. GO analysis and enrichment analysis of the signaling pathways of KEGG were performed using online database of G: Profiler. The String database was used to infer the network of protein-protein interactions (PPI) and the selection of performance module. Cytoscape software was used to draw the resultant networks of protein-protein interactions. Finally, cytoHubba was used to identify Hub genes.

Results: GO analysis for litter size showed that, for molecular function the candidates genes enriched in signaling receptor binding, signaling receptor active activity, hormone activity, protein binding and transforming growth factor beta receptor activity. The effect of the transforming growth factor β (TGF-β) family on fertility and reproduction, embryonic development, organogenesis, and uterine growth and function is remarkable in a wide range of organisms. In mammals, even early stages of reproductive development, including male and female germline specification, are controlled by TGF-β-related proteins. Hormone binding play an important role in fertility and reproduction. Sex hormone-binding globulin (SHBG),

specifically bound to the biologically active androgens and estrogens that are key regulators of the reproductive organs as well as other sex-differentiated tissues such as muscle, adipose tissue, and bone. KEGG analysis also identified some signaling pathways including ،PI3K-Akt signaling pathway, TGF-beta signaling pathway and ovarian steroidogenesis which are significantly associated with litter size. GO analysis for 33 candidate genes related to milk production traits identified only one GO category for biological process namely linoleic acid metabolic process.

Conclusion: In this study, we identified several significant biological and signaling pathways that can be used to better understand the biological processes associated with litter size and milk production in goats.

Cite this article: Afzali-talkhak, B., Gholizadeh, M., Seyed Hafezian, H., Esmaeili-fard, S.M. (2023). Bioinformatics analysis of candidate genes for milk production and litter size in goat. *Journal of Ruminant Research*, 12(1), 101-118.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/ejrr.2023.21636.1910
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

آنالیز بیوانفورماتیکی ژن‌های کاندید مؤثر بر چند قلوزایی و تولید شیر در بز

بهرام افضلی‌تلخک[۱]، محسن قلی‌زاده[۲*]، سیدحسن حافظیان[۳]، سیدمهدی اسماعیلی‌فرد[۴]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، [۲]دانشیار و [۳]استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
رایانامه: m.gholizadeh@sanru.ac.ir

[۴] پژوهشگر، مرکز ایمنی و ایمونوتراپی، موسسه تحقیقات کودکان سیاتل، سیاتل، ایالات متحده آمریکا

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۱۲
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۷/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۲۹

واژه‌های کلیدی:
آنالیز شبکه ژنی
بز
چندقلوزایی
ژن کاندید

چکیده

سابقه و هدف: تولید شیر و صفات تولیدمثلی از صفات اقتصادی مهم در بز می‌باشند. در حال حاضر رویکردهای مختلف ازجمله نقشه‌یابی ژن کاندید و مطالعات ژنومی برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مؤثر بر این صفات مهم اقتصادی در بز انجام می‌شود. تجزیه‌وتحلیل هستی‌شناسی ژن، امکان توصیف ویژگی‌های ژن‌ها و محصولات ژنی را به شکل طبقه‌بندی‌شده و قابل‌فهم‌تر ارائه می‌دهد. آنالیز KEGG، رویکردی را برای بررسی دقیق عملکردهای ژن در رابطه با شبکه‌های ژنی با استفاده از داده‌های مولکولی ارائه می‌دهد. تجزیه‌وتحلیل شبکه ژنی، هم‌چنین می‌تواند مسیرها و فرآیندهای مولکولی مشترک ژن‌های کاندید را شناسایی کند. هدف از پژوهش حاضر آنالیز بیوانفورماتیکی (هستی‌شناسی ژن، مسیرهای بیولوژیکی و تجزیه‌وتحلیل شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین) ژن‌های مؤثر بر چندقلوزایی و تولید شیر در بز بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا با بررسی منابع، شامل مطالعات انجام‌شده روی ژن‌های کاندیدا، مطالعات پویش کامل ژنومی و پایگاه داده NCBI، ژن‌های مؤثر بر چندقلوزایی و تولید شیر در بز جمع‌آوری شدند. آنالیز هستی‌شناسی ژن و آنالیز غنی‌سازی مسیر KEGG، ژن‌های کاندید با استفاده از پایگاه داده g: Profiler انجام شد. پایگاه داده STRING، برای تشکیل شبکه برهم-کنش پروتئین-پروتئین و انتخاب ماژول عملکرد مورداستفاده قرار گرفت. از نرم‌افزار Cytoscape، برای ترسیم شبکه اثرات متقابل پروتئین-پروتئین استفاده شد. درنهایت از افزونه cytoHubba جهت شناسایی ژن‌های کلیدی استفاده شد.

یافته‌ها: آنالیز هستی‌شناسی ژن نشان داد که برای صفت چندقلوزایی، ژن‌های کاندید موردمطالعه برای عملکردهای مولکولی در مسیرهای اتصال گیرنده سیگنالی، فعالیت گیرنده سیگنالی، فعالیت هورمونی، اتصال پروتئین و فعالیت گیرنده فاکتور رشد تغییردهنده بتا غنی شدند. همچنین آنالیز KEGG، مسیرهای سیگنالی متعددی ازجمله برهم‌کنش گیرنده سیتوکین-سیتوکین، PI3K-Akt، TGF-بتا و استروئیدوژنز تخمدان را شناسایی نمود که با چندقلوزایی در گونه‌های مختلف پستانداران در ارتباط هستند. تأثیر خانواده تبدیل‌کننده فاکتور رشدβ، بر باروری و تولیدمثل، رشد جنینی، اندام‌زایی و رشد و عملکرد رحم در طیف وسیعی از موجودات چشمگیر است. در پستانداران، حتی مراحل اولیه رشد تولیدمثلی، از جمله تمایز ژرم

لاین نر و ماده، توسط پروتئین‌های مربوط به TGF-β کنترل می‌شوند. باندشونده‌های هورمون نقش مهمی در بر باروری و تولیدمثل ایفا می‌کنند. گلوبولین باندشونده به هورمون جنسی، به‌طور خاص به آندروژن‌ها و استروژن‌های فعال بیولوژیکی متصل می‌شوند که تنظیم‌کننده‌های کلیدی اندام‌های تناسلی و سایر بافت‌های دارای تفاوت جنسی مانند ماهیچه، بافت چربی و استخوان هستند. آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی برای تعداد ۳۳ ژن کاندید مرتبط با صفت تولید شیر، تنها یک طبقه هستی‌شناسی ژن برای مسیر زیستیِ فرآیند متابولیک اسید لینولئیک را شناسایی نمود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، چندین مسیر زیستی معنی‌دار و مسیرهای سیگنالی را شناسایی شد که می‌توانند برای درک بهتر فرآیندهای زیستی مرتبط با صفات چندقلوزایی و تولید شیر در بز مورداستفاده قرار گیرند.

استناد: افضلی‌تلخک، ب.؛ قلی‌زاده، م.، حافظیان، س.ح.، اسماعیلی‌فرد، س.م. (۱۴۰۳). آنالیز بیوانفورماتیکی ژن‌های کاندید مؤثر بر چند قلوزایی و تولید شیر در بز. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۲(۱)، ۱۱۸-۱۰۱.

DOI: 10.22069/ejrr.2023.21636.1910

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

تولید شیر و راندمان تولیدمثل، از جمله صفات مهم اقتصادی و هدف برنامه‌های اصلاح‌نژادی در صنعت پرورش بز محسوب می‌شوند. تأکید بیش‌ازحد بر صفات تولیدی، در عین نادیده گرفتن سایر صفات، ممکن است منجر به پیامدهای نامطلوب برای باروری حیوانات شود که باعث کاهش طول عمر اقتصادی می‌شود (Oltenacu و Broom، ۲۰۱۰). رابطه منفی ژنتیکی بین صفات تولید شیر و باروری در گونه‌های مختلف بررسی‌شده است؛ بنابراین، اهمیت گنجاندن صفات تولیدمثلی در برنامه‌های اصلاح نژادی بزهای شیری به عنوان راهکاری برای اصلاح رابطه ژنتیکی منفی صفات تولیدی و تولیدمثلی، به دلیل انتخاب ماده‌های با تولید بالا افزایش‌یافته است (Ziadi و همکاران، ۲۰۲۱).

امروزه با توسعه نشانگرهای مولکولی تک نوکلئوتیدی، امکان انجام مطالعه ارتباط ژنومی برای شناسایی نواحی ژنی مرتبط با صفات اقتصادی مانند خصوصیات تولیدمثلی و تولید شیر در بز فراهم‌شده است. مطالعات مختلف ژنومی و مطالعات ارتباطی با ژن‌های کاندیدا منجر به معرفی ژن‌های متعددی شده است که عامل تنوع فنوتیپی در این صفات هستند. آنالیز هستی‌شناسی ژن می‌تواند شرح‌نویسی ژن‌ها را به عملکردهای مولکولی، اجزای سلولی و فرآیندهای زیستی مرتبط نماید و از این طریق با محاسبات آماری، ژن‌های معنی‌دار را در هریک از این طبقه‌بندی (ترم)های مؤثر شناسایی نماید. هدف از آنالیز شبکه ژنی، مطالعه مسیرها و فرآیندهای زیستی است که توسط این ژن‌ها به اشتراک گذاشته می‌شوند (Verardo و همکاران، ۲۰۱۵). علاوه بر این، اطلاعات زیستی که توسط این شبکه‌های ژنی معرفی می‌شوند برای فهم بهتر تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها برای صفات مشابه مفید است (Verardo و همکاران، ۲۰۱۶).

درحالی‌که پروژه‌های توالی یابی ژنوم به‌سرعت مشخصه‌های ژنی را برای تعداد فزاینده‌ای از ارگانیسم‌ها تعیین می‌کند، حاشیه‌نویسی عملکردی ژن‌ها هنوز تا حد زیادی ناقص است. KEGG (دائره‌المعارف ژن‌ها و ژنوم‌های کیوتو[1]) تلاشی برای پیوند دادن اطلاعات ژنومی با اطلاعات عملکردی دقیق‌تر، از طریق ثبت دانش فعلی در مورد فرآیندهای سلولی و با استانداردسازی حاشیه‌نویسی‌های ژنی است. به‌طورکلی، عملکرد زیستی سلول زنده نتیجه برهم‌کنش بسیاری از مولکول‌ها می‌باشد و نمی‌توان آن را فقط به یک ژن یا یک مولکول منفرد نسبت داد. آنالیز عملکردی در KEGG فرآیندی است که در آن، مجموعه‌ای از ژن‌ها در ژنوم با شبکه‌ای از مسیرهای سیگنالی مولکولی در سلول ارتباط می‌یابند (Kanehisa و Goto، ۲۰۰۰). برهم‌کنش‌های مولکولی برای هماهنگی مکانیسم‌های درون‌سلولی حیاتی هستند که سلول‌ها را قادر می‌سازد تا فرآیندهای پیچیده مانند به‌کارگیری مجموعه‌های مولکولی موردنیاز برای تکمیل عملکردهای سلولی و انتقال پیام‌های مولکولی بین قسمت‌های مختلف سلول، در حمایت از هموستازی را اجرا کنند. اختلال در مسیرهای مولکولی می‌تواند منجر به سیگنال دهی ناهنجار و در نهایت اختلال عملکرد سلولی شود. یکی از اجزای اصلی این ارتباط درون‌سلولی توسط برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین (PPIs) هدایت می‌شود و بنابراین، رویکردهای تحلیل شبکه PPI ابزار ارزشمندی برای دستیابی به دیدگاهی جامع از فرآیندهای بیولوژیکی در سطح مولکولی و سیستمی است (Tomkins و Manzoni، ۲۰۲۱). ابزارهای بیوانفورماتیکی و تجزیه‌وتحلیل عملکردی ژن‌های

1. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

کاندید با هدف بررسی مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی صفات اقتصادی، مورداستفاده قرار می‌گیرند. برای تولید شیر در بوفالو، تجزیه‌وتحلیل هستی‌شناسی ژن[1] (GO) نشان داده است که ژن‌های کاندید با فرآیندهای بیولوژیکی پیچیده، مانند تکثیر سلولی و تقسیم هسته‌ای میتوزی مرتبط هستند. تجزیه‌وتحلیل KEGG نشان داد که این ژن‌های کاندید در مسیرهای سیگنالی متعدد، مانند AMPK، ErbB، گیرنده Toll مانند و Jak-STAT غنی‌شده‌اند. علاوه بر این، یک ماژول عملکردی متشکل از ۵۷ گره و ۱۳۹ لبه از شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI) شناسایی شد. تجزیه‌وتحلیل GO نشان داد که ۵۷ ژن کاندید در این ماژول عملکردی در سه فرآیند اصلی بیولوژیکی، ازجمله هموستاز، متابولیس و پاسخ سلولی غنی شدند (Du و همکاران، ۲۰۲۰).

هدف از پژوهش حاضر مطالعه بیوانفورماتیکی (هستی‌شناسی ژن، غنی‌سازی مسیر و آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین) ژن‌های مؤثر در چندقلوزایی و تولید شیر در بز بود. سازوکارهای مولکولی شناسایی‌شده در این تحقیق در درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی و بهبود صفات مورداستفاده قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده و آنالیز عملکرد و غنی‌سازی مسیر: ابتدا با بررسی منابع، شامل مطالعات انجام‌شده روی ژن‌های کاندیدا، مطالعات پویش کامل ژنومی و پایگاه‌های داده NCBI، ژن‌های مؤثر بر چندقلوزایی (جدول ۱) و تولید شیر (جدول ۲) در بز جمع‌آوری شدند. معیار انتخاب ژن‌ها، بر اساس گزارش ارتباط معنی‌دار بین واریانت‌های ژن‌ها با صفات موردمطالعه بود.

آنالیز هستی‌شناسی: آنالیز هستی‌شناسی ژن (GO) و غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی برای ژن‌های کاندیدا در سه طبقه موردبررسی قرار گرفت. عملکرد مولکولی، فعالیت‌هایی که در سطح مولکولی به‌وسیله محصولات ژنی انجام می‌شود را توصیف می‌نماید. جزء سلولی: موقعیت‌های سلولی که محصولات ژنی در آن قسمت‌ها عمل می‌نمایند را توصیف می‌نماید. فرآیند زیستی: فرآیندهای زیستی را که از آن طریق عملکردهای مولکولی انجام می‌شود را معرفی می‌نماید. در این پژوهش، آنالیز GO و غنی‌سازی مسیر KEGG ژن‌های کاندید با استفاده از پایگاه داده g: Profiler(Raudvere و همکاران، ۲۰۱۹) انجام شد. روش پیش‌فرض با سطح معنی‌داری ۰/۰۵، جهت حل مشکل تست‌های چندگانه برای مقادیر P-value به‌دست‌آمده مورداستفاده قرار گرفت.

تشکیل شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین و انتخاب ماژول عملکرد: پایگاه داده STRING (string-db.org) برای تشکیل شبکه اثرات متقابل پروتئین-پروتئین و انتخاب ماژول عملکردی با نمره اطمینان بیشتر از ۰/۴ مورداستفاده قرار گرفت. از نرم‌افزار Cytoscape برای ترسیم شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI) استفاده شد. افزونه MCOD برای شناسایی معنی‌دارترین ماژول‌های عملکردی شبکه PPI با در نظر گرفتن تعداد گره مورداستفاده قرار گرفت. در شبکه PPI، گره‌ها نشان‌دهنده پروتئین‌ها و پیوندها که نشان‌دهنده برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین هستند به‌عنوان لبه (خط) نمایش داده می‌شوند. نمودار برهم‌کنش‌های پروتئین برای درک رفتار شبکه بسیار مهم است. درنهایت از افزونه cytoHubba جهت شناسایی هاب ژن‌ها (ژن‌های با ارتباط بالا) استفاده شد.

1. Gene ontology

جدول ۱- ژن‌های کاندید مؤثر بر چندقلوزایی در بز

Table 1. Significant candidate genes for litter size in goat

ژن	نویسنده(گان)	ژن	نویسنده(گان)	ژن	نویسنده(گان)
Gene	Author(s)	Gene	Author(s)	Gene	Author(s)
AA-NAT	Sharma et al. (2015a)	IGF1	Thomas et al. (2017)	THEM4	Lai et al., 2016
BMP15	Heikal and Naby (2017); Ahlawat et al. (2016); Song et al. (2023)	INHbb	Sharma et al. (2015b)	CDH26	Lai et al., 2016
BMPR1B	Ahlawat et al. (2015b; 2016); Song et al.,(2023)	KDM6A	Cui et al. (2018); Lai et al. (2016)	KHDRBS2	Zhang et al., 2018; Verardo et al., 2016
BMP4	Sharma et al. (2013)	SMAD2	Lai et al., 2016, Li et al., 2008	POUF1	Mishra et al., 2017
CART	Wang et al. (2011)	ADCY1	Lai et al., 2016	PRP 1	Mishra et al., 2017
CSNS1	Wang et al. (2018)	CCNB2	Lai et al., 2016,	PRP 6	Mishra et al., 2017
FSHβ	Zhang et al. (2011b)	AR	Zhao et al., 2019,	KITLG	An et al. 2012
FSHR	Guo et al. (2013)	DNMT3B	Lai et al., 2016	KiSS-1	Mekuriaw et al. 2017
GDF9	Feng et al. (2011); Ahlawat et al. (2012, 2016); Chu et al. (2011); Song et al., (2023)	AMHR2	Lai et al., 2016	LHβ	Li et al. (2011)
GH	Zhang et al. (2011a)	ERBB2	Lai et al., 2016	PRLR	Li et al. (2011)
GnRHR	Chu et al. (2009); Yang et al. (2011); Ariyarathne et al. (2017); Bemji et al. (2018)	FGFR1	Lai et al., 2016	SETDB2	Lai et al. (2016)
GPR54	Ahlawat et al. (2015a)	MAP3K12	Lai et al., 2016		

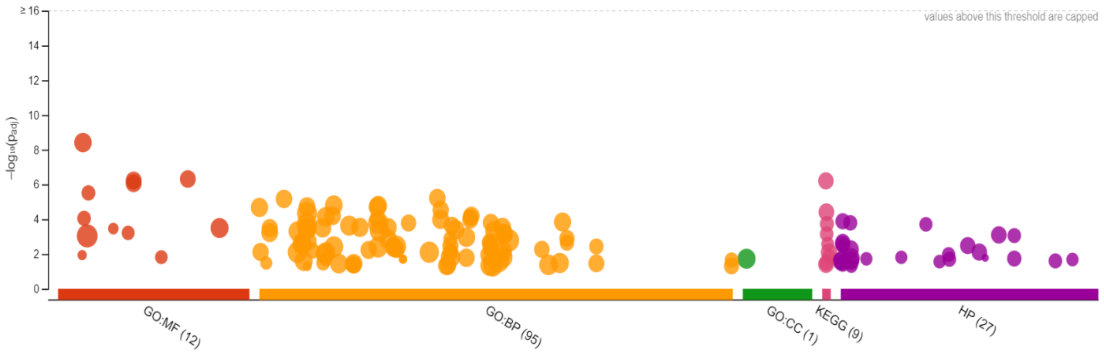
جدول ۲- ژن‌های کاندید موثر بر تولید شیر در بز

Table 1. Significant candidate genes for milk production in goat

ژن	نویسنده(گان)	ژن	نویسنده(گان)	ژن	نویسنده(گان)
Gene	Author(s)	Gene	Author(s)	Gene	Author(s)
SLC1A1	Sebastian Mucha et al., (2018)	ELP5	Scholtens et al. 2020	GH1	Mullen et al., 2011
ALOX12	Sebastian Mucha et al., (2018)	CNTROB	Scholtens et al. 2020	KIAA0753	Scholtens et al. 2020
POU1F1	Lan et al., 2007; Pardo et al.,(2022)	GUCY2D	Scholtens et al. 2020	WSCD1	Scholtens et al. 2020
LGB	Dettori et al., 2015; El Hanafy et al., 2015	ALOXE3	Scholtens et al. 2020	NLRP1	Scholtens et al. 2020
LALBA	Dettori et al., 2015	TMEM107	Scholtens et al. 2020	RABEP1	Scholtens et al. 2020
MTHFR	An et al., 2012	PIK3R6	Scholtens et al. 2020	ZNF232	Scholtens et al. 2020
PRLR	Hou et al., 2013	NTN1	Scholtens et al. 2020	ZFP3	Scholtens et al. 2020
GH	Malveiro et al., 2001; Marques et al., 2003; Dettori et al., 2013	STX8	Scholtens et al. 2020	KIF1C	Scholtens et al. 2020
DGAT1	Grisart et al., 2002; Winter et al., 2002	GLP2R	Scholtens et al. 2020	ZMYND15	Scholtens et al. 2020
ASGR2	Scholtens et al. 2020	VPS13	Zhang et al., 2018	RNASEK	Scholtens et al. 2020
DLG4	Scholtens et al. 2020	BTNA1	Dong et al., 2015	CTC1	Scholtens et al. 2020

نتایج و بحث

آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی: در این پژوهش، با استفاده از ژن‌های کاندید گزارش‌شده در مطالعات مختلف برای صفات چندقلوزایی و تولید شیر، آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی جهت شناسایی طبقات عملکردی و سازوکارهای مولکولی مرتبط با صفات موردمطالعه انجام شد. شکل ۱ مجموعه‌های ژنی شناسایی‌شده برای صفت چندقلوزایی را به تفکیک نوع هستی‌شناسی (Ontology) و پایگاه داده استفاده‌شده نشان می‌دهد.



شکل ۱- ترم‌ها و مسیرهای سیگنالی آنالیز GO، KEGG و HP مرتبط با چندقلوزایی در بز

Figure 1- Terms and signaling pathways of GO, KEGG and HP analysis related to litter size in goat

همچنین طبقات عملکردی و مسیرهای KEGG و HPO شناسایی‌شده شاخص برای صفت چندقلوزایی در جدول‌های ۳ و ۴ به تفکیک نشان داده‌شده‌اند.

جدول ۳- ترم‌های معنی‌دار شناسایی‌شده در آنالیز هستی‌شناسی ژن برای چندقلوزایی در بز

Table 1- Significant terms identified in gene ontology analysis for litter size in goat

منبع source	عنوان ترم term_id	نام ترم term_name	اندازه ترم term_size	اندازه‌بررسی query_size	اندازه اشتراک intersection_size	P_value(adj)
GO:MF	GO:0005102	Signaling receptor binding	974	27	14	8.15E-09
	GO:0030546	Signaling receptor activator activity	377	27	9	9.20E-07
	GO:0005179	Hormone activity	100	27	5	0.0001
	GO:0005515	Protein binding	6900	27	22	0.0033
	GO:0005024	Transforming growth factor beta receptor activity	7	27	2	0.0134
	GO:0042562	Hormone binding	51	27	3	0.0184
GO:BP	GO:0003006	Developmental process involved in reproduction	592	25	10	6.76E-06
	GO:0010647	Positive regulation of cell communication	1098	25	12	1.55E-05
	GO:0023056	Positive regulation of signaling	1105	25	12	1.66E-05
	GO:0022414	Reproductive process	876	25	11	1.96E-05
	GO:0000003	reproduction	881	25	11	2.08E-05
	GO:0022412	Cellular process involved in reproduction in multicellular organism	258	25	7	9.40E-05
	GO:0048589	Developmental growth	428	25	8	0.0001
	GO:0023052	Signaling	4859	25	20	0.0001
	GO:0007154	Cell communication	4912	25	20	0.0001
	GO:0007292	Female gamete generation	90	25	5	0.0002
	GO:0043405	Regulation of MAP kinase activity	124	25	5	0.0013

	GO:0007276	gamete generation	399	25	7	0.0017
	GO:0048477	Oogenesis	58	25	4	0.0022
	GO:0043408	Regulation of MAPK cascade	439	25	7	0.0034
	GO:0010646	Regulation of cell communication	2185	25	13	0.0038
	GO:0019953	Sexual reproduction	477	25	7	0.0058
	GO:0007548	Sex differentiation	170	25	5	0.0064
	GO:0048599	Oocyte development	30	25	3	0.0173
	GO:0009755	Hormone-mediated signaling pathway	113	25	4	0.0322
	GO:0001541	Ovarian follicle development	37	25	3	0.0330
	GO:0003006	Developmental process involved in Reproduction	592	25	10	6.76E-06
GO:CC	GO:0005576	extracellular region	1341	27	9	0.0187

GO: Geno Ontology; MM: Molecular Function; BP: Biological Process; Cellular Component

جدول ۴. مسیرهای بیولوژیکی معنی‌دار KEGG شناسایی‌شده برای چندقلوزایی در بز

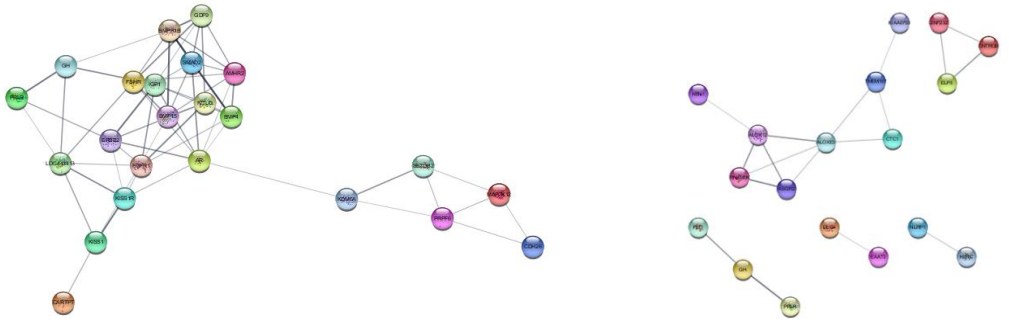
Table 2. Significant KEGG and HPO pathways identified for litter size in goat

منبع source	عنوان ترم term_id	نام ترم term_name	اندازه ترم term_size	اندازه‌بررسی query_size	اندازه اشتراک intersection_size	P_value(adj)
KEGG	KEGG:04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	290	26	10	9.62E-07
	KEGG:04151	PI3K-Akt signaling pathway	339	26	9	5.64E-05
	KEGG:04350	TGF-beta signaling pathway	95	26	5	0.0008
	KEGG:04913	Ovarian steroidogenesis	62	26	4	0.0031
	KEGG:04114	Oocyte meiosis	118	26	4	0.0378
	KEGG:04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	340	26	6	0.0483

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes;

آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی برای تعداد ۳۳ ژن کاندید مرتبط باصفت تولید شیر نیز صورت گرفت. طی این آنالیز تنها یک طبقه عملکردی GO در آنتالوژی مسیرهای زیستی (BP) شناسایی شد (P-value = 0.049). این طبقه فرآیند متابولیک اسید لینولئیک (GO:0043651) بود که تعداد ۲ ژن (ALOX12, ALOXE3) از ۳۳ ژن کاندید در آن موجود می‌باشد.

آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین: با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape و افزونه StringApp شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین به ترتیب برای ۳۵ و ۳۳ ژن کاندید برای صفات چندقلوزایی و تولید شیر رسم شد. برای صفت چندقلوزایی، در مجموع ۲۹ ژن در شبکه پیچیده PPI، شامل ۲۹ گره و ۶۰ لبه قرار گرفتند (شکل a۲). بر اساس نتایج، ۶ ژن از ۳۵ ژن کاندید در شبکه PPI قرار نگرفتند. برای صفت تولید شیر، درمجموع ۲۹ ژن در شبکه پیچیده PPI، شامل ۱۸ گره و ۱۸ لبه قرار گرفتند (شکل b۲). بر اساس نتایج حاصله، ۱۱ ژن از ۳۳ ژن کاندید در شبکه PPI قرار نگرفتند.

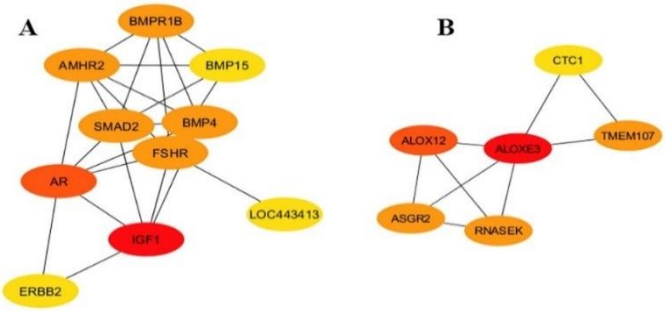


a b

شکل ۲- شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین ژن‌های کاندید مرتبط با چندقلوزایی (a) و تولید شیر (b) در بز

Figure 2- Protein-protein interaction network of genes related to littersize (a) and milk production (b) in goat.

بر اساس Cytoscape MCODE و تجزیه‌وتحلیل ماژول عملکردی، این ماژول‌ها داخل شبکه‌ی اصلی شناسایی شدند. شکل ۳ این ماژول‌های عملکردی را با تعداد ۱۰ و ۶ هاب ژن، به ترتیب برای صفات چندقلوزایی و تولید شیر نشان می‌دهد.



شکل ۳- ماژول‌های عملکردی استخراج‌شده برای تولید شیر (A) و چندقلوزایی (B) در بز

Figure 3- Extracted functional modules for milk production (A) and litter size (B) in goat

در مرحله بعد جهت شناسایی ژن‌های اصلی (hub genes) از افزونه cytoHubba و شاخص مرکزیت درجه استفاده شد. شاخص مرکزی درجه برای یک گره، درجه آن گره نامیده می‌شود که درواقع تعداد لبه (یال) یا ارتباطاتی است که آن گره دارد. هر چه درجه بالاتر باشد، گره، مرکزیت و اهمیت بیشتری دارد. جدول ۵، هاب ژن‌های شناسایی‌شده را برای هر دو صفت موردمطالعه نشان می‌دهد.

جدول ۵- هاب ژن‌های شناسایی‌شده برای صفات چندقلوزایی و تولید شیر در بز

Table 3- Hub genes identified for litter size and milk production in goat

رتبه Rank	چندقلوزایی Litter size		تولید شیر Milk production	
	نام ژن Gene Name	نمره Score	نام ژن Gene Name	نمره Score
1	IGF1	9	ALOXE3	8
2	AR	8	ALOX12	7
3	AMHR2	7	RNASEK	6
4	SMAD2	7	ASGR2	6
5	BMP4	7	TMEM107	3
6	FSHR	7	CTC1	2
7	BMPR1B			
8	BMP15			
9	ERBB2			

نقش ژن‌های هاب شناسایی‌شده، در مطالعات متعدد موردبحث قرارگرفته است. به‌طور مثال، IGF1 یک ژن کاندید قوی برای صفات تولیدمثلی در نظر گرفته می‌شود. با توجه به مطالعات چندشکلی، ناحیه 5′UTR، با تنظیم رونویسی ژن، به‌عنوان منطقه‌ای تأثیرگذار برای صفات تولیدمثلی گزارش‌شده است (Naicy و همکاران ۲۰۱۶). علاوه بر این، اثر معنی‌دار جهش در اگزون ۴ و اینترون ۳ و ۴ این ژن روی صفات تولیدی و تولیدمثلی در بز گزارش‌شده است (El-Shorbagy و همکاران، ۲۰۲۲). نشانه‌های انتخاب برای چندقلوزایی در بز، بر اساس توالی یابی کل ژنوم، ژن AR را به‌عنوان ژن کاندید شناسایی کرده است (Zhao و Huang، ۲۰۱۹). AR در سلول‌های گرانولوزا، سلول‌های مزانشیمی فولیکولی و تخمک‌ها در تخمدان بیان می‌شود. مشخص شد که موش‌های فاقد ژنAR، کاهش باروری، اختلال عملکرد تخمدان و کاهش سطح آندروژن داشتند (Wang و همکاران، ۲۰۱۵). ژن AMHR2، در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های پره آنترال و فولیکول‌های کوچک آنترال بیان می‌شود که نشان می‌دهد، بیان AMHR2 به مرحله خاصی از رشد غدد جنسی وابسته است (Wu و همکاران، ۲۰۱۰). ژن SMAD2 در هسته فولیکول‌های اولیه یافت می‌شوند و برای رشد جنینی موردنیاز هستند. علاوه بر این، تکثیر و تمایز سلول‌های تخمدان به پروتئین SMAD2 وابسته است. تجزیه‌وتحلیل ژنومی روی کروموزوم ۲۴ در بزهای بالغ نشان داد که SMAD2 ژن کاندید برای باروری بالا است (Xu و همکاران، ۲۰۲۰). نقش ژن ALOXE3 در تولید شیر در بزهای شیری آمیخته گزارش‌شده است. این ژن در فرآیندهای تمایز به سلول‌های چربی، متابولیسم اسفنگولیپید و بیوسنتز سرامید نقش دارد؛ بنابراین، نقش احتمالی آن در ترکیب پستان را می‌توان با فعالیت آن در متابولیسم چربی، تمایز سلولی و تکثیر درک نمود (Mucha و همکاران، ۲۰۱۸). ژن ALOX12، با چندین فرآیند بیولوژیکی مانند فرآیندهای متابولیکی و بیوسنتزی اسیدهای چرب غیراشباع مرتبط است و بیان متفاوت آن در گاوهای شیری با تولید شیر بسیار بالا و پایین گزارش است (Bai و همکاران، ۲۰۱۶؛ Yang و همکاران، ۲۰۱۶). RNASEK یک پروتئین بین غشایی و بسیار محافظت‌شده در بین پستانداران است. RNASEK در سطح سلول و مسیر آندوزوم قرار می‌گیرد و با پمپ پروتون ATPase ارتباط نزدیکی دارد (Perreira و همکاران، ۲۰۱۵). ارتباط معنی‌دار ژن RNASEK با صفات مختلف تولید شیر در بز گزارش‌شده است (Mucha و همکاران، ۲۰۱۸). ژن ASGR2 زیر واحد گیرنده آسیالوگلیکوپروتئین که درگیر با فرآیند متابولیک گلیکوپروتئین، هموستاز لیپیدها و تنظیم‌کننده ثبات پروتئین است را کد می‌کند؛ بنابراین، احتمال نقش ژن ASGR2 با صفات تولید شیر توسط فعالیت آن در هموستازی چربی و ثبات پروتئین پشتیبانی می‌شود (Scholtens و همکاران، ۲۰۲۰). نقش مؤثر و معنی‌دار ژن ASGR2 با صفات مختلف تولید شیر در بز گزارش‌شده است (Scholtens و همکاران، ۲۰۲۰)

آنالیز GO برای ژن‌های مرتبط باصفت چندقلوزایی در بز عبارات معنی‌دار درگیر در طبقه‌بندی‌های سلولی، عملکرد مولکولی و فرایند زیستی را شناسایی نمود. در این میان، فعالیت گیرنده فاکتور رشد تغییردهنده بتا از مسیرهای عملکرد مولکولی شناسایی‌شده است که ژن‌های موردمطالعه برای آن غنی شدند. خانواده TGF-β، ازجمله TGF-β، اکتیوین و پروتئین‌های ریخت‌زایی استخوان (BMPs) نقش حیاتی در رشد، هموستازی بافتی و ایجاد برخی بیماری‌ها دارند (Huang و Chen، ۲۰۱۲). تأثیر خانواده TGF-β بر باروری و تولیدمثل،

رشد جنینی، اندام‌زایی و رشد و عملکرد رحم در طیف وسیعی از موجودات چشمگیر است (David و Massagué، ۲۰۱۸). در پستانداران، پروتئین‌های مربوط به TGF-β، مراحل اولیه رشد تولیدمثلی، ازجمله تمایز ژرم لاین نر و ماده را نیز کنترل می‌نمایند (Donoughe و همکاران، ۲۰۱۴). در پستانداران بالغ، پروتئین‌های مرتبط با TGF-β بر رشد و تمایز سلول‌های سوماتیک و همچنین سلول‌های زاینده درون غدد جنسی نظارت می‌کنند. علاوه بر این، لیگاندهای خانواده TGF-β به‌طور پیچیده در کنترل تخمک‌گذاری و لقاح و ایجاد و حفظ بارداری نقش دارند. چندین فاکتور رشد مرتبط با TGF-β نیز به‌عنوان هورمون‌های غدد درون‌ریز برای ادغام وضعیت تولیدمثل غدد جنسی با شرایط فیزیولوژیکی ارگانیسم عمل می‌کنند (Monsivais و همکاران، ۲۰۱۷). اثرات TGF-βs بر عملکرد سلول‌های گرانولوزا نیز بین گونه‌ها متفاوت است. در جوندگان، TGF-βها محرک‌های قوی تکثیر سلولی گرانولوزا هستند در حالیکه در گونه‌های دیگر، مانند گاو و خوک، این فاکتورهای رشد فقط یک اثر تحریکی یا حتی بازدارنده خفیف دارند (Gilchrist و همکاران، ۲۰۰۰۳). به همین ترتیب، TGF-βها سنتز پروژسترون را از سلول‌های گرانولوزای جوندگان تحریک می‌کنند و اثرات مهاری در سلول‌های گرانولوزا جمع‌آوری‌شده از گوسفند، گاو و خوک مشاهده می‌شود (Gilchrist و همکاران، ۲۰۰۳).

دیگر مسیر عملکرد مولکولی شناسایی‌شده، اتصال هورمونی بود که نقش مهمی در باروری و تولیدمثل ایفا می‌کنند. گلوبولین باندشونده به هورمون جنسی (SHBG)، به‌طور خاص به آندروژن‌ها و استروژن‌های فعال بیولوژیکی متصل می‌شوند که تنظیم‌کننده‌های کلیدی اندام‌های تناسلی و همچنین سایر بافت‌های با تفاوت جنسی مانند ماهیچه، بافت چربی و استخوان هستند (Laurent و همکاران، ۲۰۱۶). SHBG پلاسما به دلیل میل بسیار بالای اتصال به لیگاند، پروتئین اصلی انتقال پلاسما برای آندروژن‌ها و استروژن‌های فعال بیولوژیکی است و تغییرات در سطوح خونی SHBG بر توزیع پلاسما و دسترسی آن‌ها به بافت‌ها و سلول‌های هدف تأثیر می‌گذارد (Hammond، ۲۰۱۱). SHBG به‌طور خاص به هورمون‌های جنسی برای تنظیم سطح هورمون جنسی بیواکتیوپلاسما متصل می‌شود. ازآنجایی‌که بیان هورمون جنسی در جنس نر تحت تأثیر تستوسترون است، اتصال گلوبولین متصل-شونده به هورمون جنسی به تستوسترون منجر به کاهش تستوسترون زیستی می‌شود که نمی‌تواند نقش فیزیولوژیکی خود را انجام دهد و در نتیجه منجر به ناباروری و اختلال غدد جنسی می‌شود (Wan و همکاران، ۲۰۲۱).

آنالیز KEGG مسیرهای سیگنالی متعددی را شناسایی نمود که به‌طور معنی‌داری قابلیت تولیدمثل را تحت تأثیر قرار می‌دهند. از مسیرهای شناسایی‌شده برهمکنش گیرنده سیتوکین-سیتوکین است که مطالعات نشان داده است ارتباط قابل‌توجهی با کیفیت اسپرم و تولیدمثل دارد (Zheng و همکاران، ۲۰۱۹). شواهد نشان می‌دهد که تعدادی از سیتوکین‌های ایمنی فعال، در رویدادهای اولیه تولیدمثل مانند لانه گزینی و رشد جفت شرکت می‌کنند. علاوه بر این، سیتوکین‌ها، ممکن است بر رشد و تمایز جنین تأثیر بگذارند (Austgulen و همکاران، ۱۹۹۵). همچنین، مطالعات اخیر نشان داده است که سیتوکین‌ها، عملکردهای تعدیل‌کننده مهمی در تنظیم عملکرد تخمدان توسط هورمون‌های هیپوفیز دارند (Kranc و همکاران، ۲۰۱۷؛ Richani و Gilchrist، ۲۰۱۸).

مسیر سیگنالی PI3K یک مسیر اساسی برای تنظیم تکثیر سلولی، بقا، مهاجرت و متابولیسم در انواع فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیک است. مطالعات

اخیر در انسان و موش تائید کرده است که سیگنال‌دهی PI3K/Akt نقش مهمی در تنظیم رشد GC و آپوپتوز در طول رشد فولیکولی ایفا می‌کند (John و همکاران، ۲۰۰۹). مسیر سیگنالی PI3K-Akt در بسیاری از مراحل تولیدمثل، از جمله تنظیم محور هیپوتالاموس-هیپوفیز (HPG) در طی اسپرماتوژنز، تکثیر و تمایز اسپرماتوگونی و سلول‌های سوماتیک و تنظیم اتوفاژی اسپرم و عملکرد غدد درون‌ریز بیضه در حضور آلاینده‌های محیطی، به‌ویژه مواد شیمیایی مختل‌کننده غدد درون ریز (EDCs) نقش دارد (Deng و همکاران، ۲۰۲۱). هورمون رشد که گیرنده‌های آن در GCها و تخمک بیان می‌شوند، می‌تواند آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو را در برخی از انواع سلول‌ها ازجمله اندوتلیوم عروقی، کاردیومیوسیت‌ها و سلول‌های عضلانی عصبی و اسکلتی با فعال کردن مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt کاهش دهد (Gong و همکاران، ۲۰۲۰).

استروئیدوژنز تخمدانی از مسیرهای معنی‌دار سیگنالی KEGG بود. در پستانداران، غدد جنسی و آدرنال اندام‌های اولیه‌ای هستند که هورمون‌های استروئیدی را از کلسترول تولید می‌کنند. هورمون‌های استروئیدی در پدیده‌های فیزیولوژیکی مختلف برای حفظ هموستاز نقش دارند. گلوکوکورتیکوئید و مینرالوکورتیکوئید آدرنال برای متابولیسم گلوکز، پاسخ استرس، ایمنی و تعادل مایع الکترولیت ضروری هستند. آندروژن و استروژن گنادی، برای تمایز جنسی و تولیدمثل مهم هستند. این هورمون‌های استروئیدی از کلسترول از طریق مجموعه‌ای از واکنش‌ها تولید می‌شوند که توسط سیتوکروم P450 (CYP) هیدروکسیلازها و هیدروکسی استروئید دهیدروژنازها کاتالیز می‌شوند (Miller و همکاران، ۱۹۹۸). منبع کلسترول برای استروئیدزایی در درجه اول به جذب استر کلسترول از پروتئین‌های پلاسما توسط گیرنده‌های لیپوپروتئینی، مانند گیرنده جابجایی کلاس B عضو (SR-BI) بستگی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که تخمدان‌ها هورمون‌های استروئیدی متعددی مانند پرگننولون، پروژسترون، α۱۷-پروژسترون، دهیدرواپی آندروسترون، آندروستندیون، تستوسترون، استرون و استرادیول ترشح می‌کنند که به چرخه فحلی بستگی دارد (Adashi و همکاران، ۱۹۹۴). دو نوع سلول سوماتیک، سلول‌های گرانولوزای فولیکولی و سلول‌های اطراف آن، Theca، مسئول استروئیدوژنز تخمدان هستند. سلول‌های Theca به‌طور مستقل پروژسترون و آندروژن را سنتز می‌کنند، در حالیکه سلول‌های گرانولوزای نابالغ تنها آندروژن‌های تولیدشده توسط سلول theca را به استروژن تبدیل می‌کنند. این فرآیندها به خوبی توسط دو گنادوتروپین، هورمون محرک فولیکول (FSH) و هورمون لوتئینه کننده (LH) تنظیم می‌شوند. در طول رشد فولیکول، LH تولید آندروژن‌ها را در سلول‌های theca تحریک می‌کند که توسط آروماتاز القایی با FSH (CYP19A1/Cyp19a1) در سلول‌های گرانولوزا به استروژن تبدیل می‌شوند. چنین مسیر مصنوعی استروژن تخمدانی نظریه دو سلولی-دو گنادوتروپین را نشان می‌دهد .بااین‌حال، LH باعث تمایز سلول‌های گرانولوزا به سلول‌های لوتئال تولیدکننده پروژسترون مستقل در طول مرحله تخمک‌گذاری می‌شود (Yazawa و همکاران، ۲۰۱۹).

میوز اووسیت از مسیرهای معنی‌دار سیگنالینگ KEGG بود. میوز یکی از رویدادهای تعیین‌کننده در گامتوژنز است. سلول‌های زایا نر و ماده هر دو در طول رشد خود تحت یک دور تقسیم سلولی میوز قرار می‌گیرند تا پلوئیدی گامت‌ها را کاهش دهند و درنتیجه پلوئیدی گونه را پس از لقاح حفظ کنند. برخی از جنبه‌های میوز در ژرم لاین مولد ماده وجود دارد، مانند توقف طولانی مدت در مرحله اووژنز که

به نظر می‌رسد تخمک‌ها را مستعد تجمع نادرست کروموزوم‌ها و انتقال آنیوپلوئیدی به نسل بعدی می‌کند (MacLennan و همکاران، ۲۰۱۵).

نتیجه‌گیری کلی

آنالیز بیوانفورماتیکی که روی ژن‌های کاندید مؤثر بر چندقلوزایی در بز انجام شد، ترم‌ها و مسیرهای سیگنالی متعدد معنی‌داری را شناسایی کرد که ژن‌ها برای آن‌ها غنی می‌شوند. مکانیسم‌های شناسایی‌شده از طریق درک بهتر روابط ژنی و شناسایی مبنای ژنتیکی صفات کمی می‌توانند در برنامه‌های بهبود صفات مورد مطالعه مورداستفاده قرار گیرند.

منابع

Adashi, E. Y. (1994). Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction*, 9(5), 815–827.

Ahlawat, S., Sharma, R. & Maitra, A. (2012). Analysis of coding DNA sequence of GDF9 gene in Indian goats for prolificacy associated markers. *Indian Journal of Animal Science*, 82, 721–725.

Ahlawat, S., Sharma, R., Maitra, A. & Tantia, M. S. (2015c). Current status of molecular genetics research of goat fecundity. *Small Ruminant Research*, 125, 34–42.

Ahlawat, S., Sharma, R., Maitra, A., Borana, K., Tantia, M.S. & Prakash, V. (2015a). Association analysis of a novel SNP in GPR54 gene with reproductive traits in Indian goats. *Indian Journal of Dairy Science*, 68(1), 39–44.

Ahlawat, S., Sharma, R., Maitra, A., Raja, K. N., Verma, N. K. & Tantia, M. S. (2015b). Prolificacy in Indian goat breeds is independent of FecB mutation. *Indian Journal of Dairy Science*, 85, 617–620.

Ahlawat, S., Sharma, R., Roy, M., Mandakmale, S., Prakash, V. & Tantia, M. S. (2016). Genotyping of novel SNP in BMPR1B, BMP15, and GDF9 genes for association with prolificacy in seven Indian goat breeds. *Animal Biotechnology*, 27, 199–207.

An, X. P., Hou, J. X., Li, G., Song, Y. X., Wang, J. G., Chen, Q. J. & Cao, B. Y. (2012). Polymorphism identification in the goat KITLG gene and association analysis with litter size. *Animal Genetics*, 43(1), 104-107.

Ariyarathne, H. B. P. C., Ariyaratne, H. B. S. and Lokugalappatti, L. G. S. (2017). Single nucleotide polymorphism of candidate genes in non-descript local goats of Sri Lanka. *Livestock Science*, 196, 49–54.

Austgulen, R., Arntzen, K. J., Vatten, L. J., Kahn, J. & Sunde, A. (1995). Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor-β) and soluble tumour necrosis factor receptors in embryo culture fluids during *in-vitro* fertilization. *Human Reproduction*, 10(1), 171–176.

Bai, X., Zheng, Z., Liu, B., Ji, X., Bai, Y. & Zhang, W. (2016). Whole blood transcriptional profiling comparison between different milk yield of Chinese Holstein cows using RNA-seq data. *BMC genomics*, 17(7), 173-182.

Bemji, M. N., Isa, A. M., Ibeagha-Awemu, E. M. & Wheto, M. (2018). Polymorphisms of caprine GnRHR gene and their association with litter size in West African Dwarf goats. *Molecular Biology Reports*, 45, 63–69.

Chu, M. X, Wen, X. J., Ran, D., Wei, L. X., Li, F., Hui, M. Y. & Kui, L. (2009). Polymorphism of gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) gene and its relationship with prolificacy of lining grey goat. *Journal of Agriculture and Biotechnology*, 17, 218–223.

Chu, M. X., Wu, Z. H., Feng, T., Cao, G. L., Fang, L., Di, R., Huang, D. W., Li, X. W. & Li, N. (2011). Polymorphism of GDF9 gene and its association with litter size in goats. *Veterinary Research Communications*, 35:329–336.

Cui, Y., Yan, H., Wang, K., Xu H., Zhang, X., Zhu, H., Liu, J., Qu, L., Lan, X. & Pan, C. (2018). Insertion/deletion within the KDM6A gene is significantly associated with litter size in goat. *Frontiers in Genetics*, 9, 1–11.

David, C. J. & Massagué, J. (2018). Contextual determinants of TGFβ action in development, immunity and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(7), 419–435.

Deng, C.-Y., Lv, M., Luo, B.-H., Zhao, S.-Z., Mo, Z.-C. & Xie, Y.-J. (2021). The role of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway in male reproduction. *Current Molecular Medicine*, 21(7), 539–548.

Dettori, M. L., Pazzola, M., Paschino, P., Pira, M. G. & Vacca, G. M. (2015). Variability of the caprine whey protein genes and their association with milk yield, composition and renneting properties in the Sarda breed. 1. The LALBA gene. *Journal of Dairy Research*, 82(4), 434-441.

Dettori, M. L., Rocchigiani, A. M., Luridiana, S., Mura, M. C., Carcangiu, V., Pazzola, M. & Vacca, G. M. (2013). Growth hormone gene variability and its effects on milk traits in primiparous Sarda goats. *Journal of Dairy Research*, 80(3), 255-262.

Donoughe, S., Nakamura, T., Ewen-Campen, B., Green, D. A., Henderson, L. & Extavour, C. G. (2014). BMP signaling is required for the generation of primordial germ cells in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4133–4138.

Du, C., Deng, T. X., Zhou, Y., Ghanem, N. & Hua, G. H. (2020). Bioinformatics analysis of candidate genes for milk production traits in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Tropical Animal Health and Production*, 52(1), 63–69.

El Hanafy, A. A. M., Qureshi, M. I., Sabir, J., Mutawakil, M., Ahmed, M. M. M., El Ashmaoui, H., Ramadan, H., Abou-Alsoud, M. & Sadek, M. A. (2015). Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies of beta-lactoglobulin gene in native Saudi goat breeds in relation to milk yield. *Czech Journal of Animal Science*, 60, 132–138.

El-Shorbagy, H. M., Abdel-Aal, E. S., Mohamed, S. A. & El-Ghor, A. A. (2022). Association of PRLR, IGF1, and LEP genes polymorphism with milk production and litter size in Egyptian Zaraibi goat. *Tropical Animal Health and Production*, 54(5), 321.

Feng, T., Geng, C. X., Lang, X. Z., Chu, M. X., Cao, G. L., Di, R., Fang, L., Chen, H. Q., Liu, X. L. & Li, N. (2011). Polymorphisms of caprine GDF9 gene and their association with litter size in Jining Grey goats. *Molecular Biology Reports*, 38, 5189–5197.

Gilchrist, R. B., Morrissey, M. P., Ritter, L. J. & Armstrong, D. T. (2003). Comparison of oocyte factors and transforming growth factor-β in the regulation of DNA synthesis in bovine granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 201(1–2), 87–95.

Gong, Y., Luo, S., Fan, P., Zhu, H., Li, Y. & Huang, W. (2020). Growth hormone activates PI3K/Akt signaling and inhibits ROS accumulation and apoptosis in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1), 1–12.

Guo, X., Li, Y., Chu, M. X., Feng, C., Di, R., Liu, Q., Feng, T., Cao, G., Huang, D. & Fang, L. (2013). Polymorphism of 5′ regulatory region of caprine FSHR gene and its association with litter size in Jining Grey goat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 37, 497–503.

Hammond, G. L. (2011). Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biology of Reproduction*, 85(3), 431–441.

Heikal, H. S. M. & Naby W.S.H.A.E. (2017). Genetic Improvement of litter size in four goat breeds in Egypt using polymorphism in bone morphogenetic protein 15 gene. *Advanced Animal and Veterinary Sciences*, 5, 410–415.

Hou, J. X., An, X. P., Song, Y. X., Wang, J. G., Ma, T., Han, P., Fang, F. & Cao, B. Y. (2013). Combined effects of four SNPs within goat PRLR gene on milk production traits. *Gene*, 529, 276–281.

Huang, F. & Chen, Y.-G. (2012). Regulation of TGF-β receptor activity. *Cell and Bioscience*, 2(1), 9.

Hui, Y., Zhang, Y., Wang, K., Pan, C., Chen, H., Qu, L. & Lan, X. (2020). Goat DNMT3B: An indel mutation detection, association analysis with litter size and mRNA expression in gonads. *Theriogenology*, 147, 108-115.

John, G. B., Shidler, M. J., Besmer, P. & Castrillon, D. H. (2009). Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. *Developmental Biology*, 331(2), 292–299.

Kanehisa, M. & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27

Kranc, W., Budna, J., Kahan, R., Chachuła, A., Bryja, A., Ciesiółka, S., Borys, S., Antosik, M. P., Bukowska, D., Brussow, K. P., Bruska, M., Nowicki, M., Zabel, M. & Kempisty, B. (2017). Molecular basis of growth, proliferation, and differentiation of mammalian follicular granulosa cells. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 31(1), 1–8.

Lai, F. N., Zhai, H. L., Cheng, M., Ma, J. Y., Cheng, S. F., Ge, W., Zhang, G. L., Wang, J. J., Zhang, R. Q. Wang, X., Min, L. J. Song, J. Z. & Shen, W. (2016). Whole-genome scanning for the litter size trait associated genes and SNPs under selection in dairy goat (*Capra hircus*). *Science Reproduction*, 6,1–12.

Lan, X. Y., Pan, C. Y., Chen, H., Lei, C. Z., Hua, L. S., Yang, X. B., Qiu, G. Y., Zhang, R. F. & Lun, Y. Z. (2007). DdeI polymorphism in coding region of goat POU1F1 gene and its association with production traits. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20, 1342–1348.

Laurent, M. R., Hammond, G. L., Blokland, M., Jardí, F., Antonio, L., Dubois, V., Khalil, R., Sterk, S. S., Gielen, E., Decallonne, B., Carmeliet, G., Kaufman, J.-M., Fiers, T., Huhtaniemi, I. T., Vanderschueren, D. & Claessens, F. (2016). Sex hormone-binding globulin regulation of androgen bioactivity *in vivo*: validation of the free hormone hypothesis. *Scientific Reports*, 6(1), 35539.

Li, G., An, X. P., Fu, M. Z., Hou, J. X., Sun, R. P., Zhu, G. Q., Wang, J. G. & Cao, B. Y. (2011). Polymorphism of PRLR and LHβ genes by SSCP marker and their association with litter size in Boer goats. *Livestock Science*, 136,281–286.

Li, Q., Pangas, S. A., Jorgez, C. J., Graff, J. M., Weinstein, M. & Matzuk, M. M. (2008). Redundant roles of SMAD2 and SMAD3 in ovarian granulosa cells *in vivo*. *Molecular and cellular biology*, 28, 7001–7011.

MacLennan, M., Crichton, J. H., Playfoot, C. J. & Adams, I. R. (2015). Oocyte development, meiosis and aneuploidy. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 45, 68–76.

Malveiro, E., Pereira, M., Marques, P. X., Santos, I. C., Belo, C., Renaville, R. & Cravador, A. (2001). Polymorphisms at the five exons of the growth hormone gene in the algarvia goat: possible association with milk traits. *Small Ruminant Research*, 41, 163–170.

Mekuriaw, G., Mwacharo, J. M., Dessie, T., Mwai, O., Djikeng, A., Osama, S., Gebreyesus, G., Kidane, A., Abegaz, S. & Tesfaye, K. (2017). Polymorphism analysis of kisspeptin (KISS1) gene and its association with litter size in Ethiopian indigenous goat populations. *African Journal of Biotechnology*, 16, 1254–1264.

Miller, W. L. (1998). Why Nobody Has P450scc (20, 22 Desmoslase) Deficiency g. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(4), 1399–1400.

Mishra, C., Rout, M., Mishra, S. P., Sahoo, S. S., Nayak, G. & Patra, R. C. (2017). Genetic polymorphism of prolific genes in goat-a brief review. *Exploratory Animal and Medical Research*, 7(2).

Monsivais, D., Matzuk, M. M. & Pangas, S. A. (2017). The TGF-β family in the reproductive tract. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(10), a022251.

Mucha, S., Mrode, R., Coffey, M., Kizilaslan, M., Desire, S. & Conington, J. (2018). Genome-wide association study of conformation and milk yield in mixed-breed dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 2213-2225.

Mullen, M. P., Lynch, C. O., Waters, S. M., Howard, D. J., O'boyle, P., Kenny, D. A., Buckley, F., Horan, B. & Diskin, M. G. (2011). Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and insulin-like growth factor-1 genes are associated with milk production, body condition score and fertility traits in dairy cows. *Genetics and Molecular Research*, 26, 1819-30.

Naicy T., Venkatachalapathy R.T., Aravindakshan T. V. & Raghavan K. C. (2016). Molecular cloning, SNP detection and association analysis of 5′ flanking region of the goat IGF1 gene with prolificacy. *Animal Reproduction Science*, 67, 5–18.

Oltenacu, P. A. & Broom, D. M. (2010). The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare*, 19(1), 39–49.

Perreira, J. M., Aker, A. M., Savidis, G., Chin, C. R., McDougall, W. M., Portmann, J. M. & Brass, A. L. (2015). RNASEK is a V-ATPase-associated factor required for endocytosis and the replication of rhinovirus, influenza A virus, and dengue virus. *Cell reports*, 12(5), 850-863.

Salgado Pardo, J.I., Delgado Bermejo, J.V., González Ariza, A. León Jurado, J.M., Marín Navas, C., Iglesias Pastrana, C., Martínez Martínez, M.D.A. & Navas González, F.J. (2022). Candidate genes and their expressions involved in the regulation of milk and meat production and quality in goats (*Capra hircus*). *Animals*, 12(8), 988.

Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H. & Vilo, J. (2019). g: Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W191–W198.

Richani, D. & Gilchrist, R. B. (2018). The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human Reproduction Update*, 24(1), 1–14.

Scholtens, M., Jiang, A., Smith, A., Littlejohn, M., Lehnert, K., Snell, R., Lopez-Villalobos, N., Garrick, D. & Blair, H. (2020). Genome-wide association studies of lactation yields of milk, fat, protein and somatic cell score in New Zealand dairy goats. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11, 1–14.

Sharma, R., Ahlawat, S. & Tantia, M. S. (2015a). Novel polymorphism of AA-NAT gene in Indian goat breeds differing in reproductive traits. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16:377–380.

Sharma, R., Ahlawat, S., Maitra, A., Roy, M., Mandakmale, S. & Tantia, M. S. (2013). Polymorphism of BMP4 gene in Indian goat breeds differing in prolificacy. *Gene*, 532,140–145.

Sharma, R., Maitra, A., Ahlawat, S., Roy, M., Mandakmale, S. & Tantia, M. S. (2015b). Identification of novel SNPs in INHBB gene of Indian goat. *Indian Journal of Animal Science*, 85, 55–59.

Song, T., Liu, Y., Cuomu, R., Tan, Y., A. Wang, C., De, J., Cao, X. & Zeng, X. (2023). Polymorphisms Analysis of BMP15, GDF9 and BMPR1B in Tibetan Cashmere Goat (*Capra hircus). Genes*, 14(5), 1102.

Thomas, N., Venkatachalapathy, R. T., Aravindakshan, T. V. & Kurian, E. (2017). Association of a Cac8I polymorphism in the IGF1 gene with growth traits in Indian goats. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15, 7–11.

Tomkins, J. E. & Manzoni, C. (2021). Advances in protein-protein interaction network analysis for Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 155, 105395.

Verardo, L. L, Silva, F. F., Varona, L, Resende, M. D. V, Bastiaansen, J. W. M., Lopes, P. S. & Guimarães, S. E. F. (2015). Bayesian GWAS and network analysis revealed new candidate genes for number of teats in pigs. *Journal of Applied Genetics*, 56, 123-132.

Verardo, L. L., Lopes, M. S., Wijga, S., Madsen, O., Silva, F. F., Groenen, M. A. M., Knol, E. F., Lopes, P. S. & Guimarães, S. E. F. (2016). After genome-wide association studies: Gene networks elucidating candidate genes divergences for number of teats across two pig populations. *Journal of Animal Science*, 94(4), 1446–1458.

Verardo, L. L., Silva, F. F., Varona, L., Resende, M. D. V., Bastiaansen, J. W. M., Lopes, P. S. & Guimarães, S. E. F. (2015). Bayesian GWAS and network analysis revealed new candidate genes for number of teats in pigs. *Journal of Applied Genetics*, 56(1), 123–132.

Wan, Q., Xie, Y., Zhou, Y. & Shen, X. (2021). Research progress on the relationship between sex hormone- binding globulin and male reproductive system diseases. *Andrologia*, 53(1), e13893.

Wang, K., Yan, H., Xu, H., Yang, Q., Zhang, S., Pan, C., Chen, H., Zhu, H., Liu, J., Qu, L. & Lan, X. (2018). A novel indel within goat casein alpha S1 gene is significantly associated with litter size. *Gene*, 671,161–169.

Wang, P. Q., Deng, L. M., Zhang, B. Y., Chu, M. X. & Hou, J. Z. (2011). Polymorphisms of the cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) gene and their association with reproductive traits in Chinese goats. *Genetic and Molecular Research*, 10, 731–738.

Wang, RS., Chang, HY., Kao, SH., Kao, CH., Wu, YC., & Yeh, S. (2015). Abnormal mitochondrial function and impaired granulosa cell differentiation in androgen receptor knockout mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 9831e49.

Wu, G. C., Chiu, P. C., Lyu, Y. S. & Chang, C. F. (2010). The expression of amh and amhr2 is associated with the development of gonadal tissue and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Biology of Reproduction*, 83, 443-453.

Xu, Z., Wang, X., Zhang, Z., An, Q., Wen, Y., Wang, D., Liu, X., Li, Z., Lyu, S., Li, L. & Wang, E. (2020). Copy number variation of CADM2 gene revealed its association with growth traits across Chinese *Capra hircus* (goat) populations. *Gene*, 741, 144519.

Yang, J., Jiang, J., Liu, X., Wang, H., Guo, G., Zhang, Q. & Jiang, L. (2016). Differential expression of genes in milk of dairy cattle during lactation. *Animal genetics*, 47(2), 174-180.

Yazawa, T., Imamichi, Y., Sekiguchi, T., Miyamoto, K., Uwada, J., Khan, M., Islam, R., Suzuki, N., Umezawa, A. & Taniguchi, T. (2019). Transcriptional regulation of ovarian steroidogenic genes: recent findings obtained from stem cell-derived steroidogenic cells. *BioMed Research International*.

Zhang, B., Chang, L., Lan, X., Asif, N., Guan, F., Fu, D., Li, B., Yan, C., Zhang, H. & Zhang, X. (2018). Genome-wide definition of selective sweeps reveals molecular evidence of trait-driven domestication among elite goat (*Capra species*) breeds for the production of dairy, cashmere, and meat. *GigaScience*, 7, giy105.

Zhang, C., Liu, Y., Huang, K., Zeng, W., Xu D., Wen, Q. & Yang, Z. (2011a). The association of two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in growth hormone (GH) gene with litter size and superovulation response in goat-breeds. *Genetic Molecular Biology*, 34, 49–55.

Zhang, C., Wu, C. J., Zeng, W., Huang, K., Li, X., Feng, J. H., Wang, D., Hua, G. H., Xu, D.Q., Wen, Q. Y. & Yang, L. G. (2011b). Polymorphism in exon 3 offollicle stimulating hormone beta (FSHB) subunit gene and its association with litter traits and superovulation in the goat. *Small Ruminant Research*, 96, 53–57.

Zhang, H., Liu, A., Li, X., Xu, W., Shi, R., Luo, H. & Wang, Y. (2019). Genetic analysis of skinfold thickness and its association with body condition score and milk production traits in Chinese Holstein population. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2347-2352.

Zhao, Y. J., Guang,-Xin, E. & Huang, Y. F. (2019). Selection signatures of litter size in Dazu black goats based on a whole genome sequencing mixed pools strategy. *Molecular Biology Reports, 46*(5), 5517-5523.

Zheng, Y.X., Zhang, X.X., Hernandez, J. A., Mahmmod, Y. S., Huang, W.Y., Li, G.F., Wang, Y.P., Zhou, X., Li, X.M. & Yuan, Z.-G. (2019). Transcriptomic analysis of reproductive damage in the epididymis of male Kunming mice induced by chronic infection of Toxoplasma gondii PRU strain. *Parasites and Vectors*, 12(1), 529.

Ziadi, C., Muñoz-Mejías, E., Sánchez, M., López, M. D., González-Casquet, O. & Molina, A. (2021). Genetic analysis of reproductive efficiency in Spanish goat breeds using a random regression model as a strategy for improving female fertility. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 1681–1688.

Zhao, Y. J. & Huang, Y. F. (2019). Selection signatures of litter size in Dazu black goats based on a whole genome sequencing mixed pools strategy. *Molecular Biology Reports*, 46(5), 5517-5523.