Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

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

Identification of genes related to the trait of litter size in prolificacy breeds using Genome-wide Association Studies (GWAS)

Abdulaziz Hamadalahmad[1,2], Mohammad Mahdi Shariati[3] , Sadegh Taheri[1], Ali Javadmanesh[4*]

[1] Ph.D, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[2] Instructor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Aleppo, Aleppo, Syria.
[3] AssistantProfessor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[4] Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, Email: javadmanesh@um.ac.ir

Article Info

Article type:

Article history:

Keywords: GWAS
Litter size
Sheep breeds Gene ontology

ABSTRACT

Introduction: Sheep reproductive traits are among the most important economic traits that directly determine production costs and economic benefits of sheep production. Ewes that produce more lambs per birth can increase the number of lambs and thus enhance economic efficiency. Therefore, identifying molecular markers that affect the birth rate in sheep is crucial. Reproductive function is one of the significant economic features in the sheep breeding industry. Litter size is the most important production trait among economic traits, accounting for 70-90% of the industry's economic value. Due to the high economic importance of fertility and reproduction traits in sheep, genome-wide association studies (GWAS) have been frequently performed as a standard method for mapping QTL, discovering new single nucleotide polymorphisms (SNPs), and identifying candidate genes for economically important traits in animals. In this study, a GWAS analysis was performed to identify biological pathways and genes associated with the litter size trait in 12 sheep breeds.

Materials and Methods: In this study, the litter size information of 12 sheep breeds was collected from various sources and articles. Based on the average litter size, these breeds were categorized into three groups: breeds with high litter size (2.52) (Finnsheep, Santa Ines, and Black Headed Mountain), five breeds with medium litter size (1.96) (Barbados Black Belly, Chinese Merino, Sakiz, Scottish Blackface, and Valais Blacknose Sheep), and four breeds with low litter size (1.17) (Cyprus Fat Tail, Karakas, Moghani, and Red Maasai). The data used in this research was genotypes from the 50K SNPChip belonging to the HapMap project were obtained from the study by Kijas et al. (Kijas et al., 2012). Genotype quality control (QC) was performed using PLINK v1.9 software (Purcell et al., 2007). SNPs with a missing genotype rate of more than 10%, MAF (minor allele frequency) less than 0.02, markers with a genotype loss rate of more than 2%, individuals with more than 1% missing genotypes, and SNPs that failed the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) test at a significance level of 0.005 were excluded from the analysis. We ranked the genome-wide association studies (GWAS) for all breeds using Plink software based on their litter size percentage from highest to lowest. In the

PROOF

next step, to identify significant genes and biological pathways, the DAVID server version 6.8 was used.

Results and Discussion: Based on the findings of the present study, pathways associated with the litter size trait were identified through candidate genes in the studied breeds. Further studies are necessary to validate these findings. The results highlight that a genome-wide association study conducted in these breeds revealed a panel of genes potentially linked to reproductive traits and litter size of interest. Specifically, GTF2A1, PHACTR1, KHDRBS3, SCMH1, FOXP1, ELMO1, KCNN3, BEST3, METTL14, PRDM2 and EFNA5 were identified as significant candidate genes. These genes may play roles in regulating the genetic architecture of twinning and litter size. This study underscores the genes associated with litter size traits and their involvement in pathways crucial for litter size and ovulation rate. The findings suggest that these candidate genes could influence the genetic basis of litter size and fertility. Despite limitations in data volume in the current study, it provides insights into the genetic mechanisms underlying birth rate and reproductive traits, potentially informing future sheep breeding programs.

Conclusion: The current study revealed genes associated with litter size in sheep and pathways that play an important role in litter size and ovulation rates. Among these, the genes ATG5, NCKAP1L, CERK, AGPS, DCK, EPHA7, DOCK5, FOXN2, SOX6, PIGN, and ONECUT2 were introduced for the first time as effective genes in litter size in sheep. The results of this research can be used as a guide for sheep breeding programs and might lead to improvements in reproductive traits.

Cite this article: Hamadalahmad, A.A., Shariati, M.M., Taheri, S., Javadmanesh, A. (2025). Identification of genes related to the trait of litter size in prolificacy breeds using Genome-wide Association Studies (GWAS). *Journal of Ruminant Research*, 13(2),

© The Author(s)
DOI:
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

PROOF

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

شناسایی ژن‌های مرتبط با صفت نرخ زایش در نژادهای چندقلوزا با استفاده از مطالعات ارتباطی کل ژنوم GWAS

عبدالعزیز حمد الاحمد[۱،۲]، محمد مهدی شریعتی[۳]، صادق طاهری[۱]، علی جوادمنش[۴*]

[۱] دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.
[۲] مربی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه حلب، سوریه.
[۳] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.
[۴] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران، رایانامه: javadmanesh@um.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: هدف این تحقیق بررسی ژنتیکی و شناسایی ژن‌های مرتبط با صفت نرخ زایش در گوسفندان به منظور استفاده در برنامه‌های به نژادی است. صفت نرخ زایش یکی از صفات اقتصادی مهم در صنعت پرورش گوسفند محسوب می‌شود که در سال‌های اخیر توجه متخصصین اصلاح نژاد را به خود جلب کرده است. شناسایی ژن‌ها، چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) و مسیرهای مرتبط با صفت نرخ زایش می‌تواند به برنامه‌ریزی بلندمدت برای انتخاب در گوسفند کمک کند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۱۲ نژاد گوسفند که به ۳ گروه براساس نرخ زایش شامل نژادهای با نرخ زایش بالا (۲/۵۲) Finnsheep، SantaInes و Black Headed Mountain و ۵ نژاد با نرخ زایش متوسط (۱/۹۶) BarbadosBlackBelly، ChineseMerino، Sakiz، Scottish Blackface، ScottishBlackface و Valais Blacknose Sheep و ٤ نژاد با نرخ زایش پایین (۱/۱۷) Cyprus Fat Tail، Karakas، Moghani و Red Maasai) تقسیم شدند، مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های مورد استفاده در این پژوهش ژنوتیپ‌های حاصل از SNPChip50K متعلق به پروژه HapMap بودند. در این تحقیق از تحلیل ارتباط ژنومی گسترده (GWAS) و مدل‌های آماری مختلط برای شناسایی ارتباطات بین SNPها و صفت نرخ زایش استفاده شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از برنامه PLINK 1.9 و بسته‌های نرم افزاری در محیط R انجام شد. برای شناسایی ژن‌های معنی‌دار و مسیرهای زیستی ژن‌های شناسایی شده، از سرور DAVID نسخه 6.8 استفاده شد.

یافته‌ها: با مطالعه ارتباط گسترده ژنوم در نژادهای مورد نظر، مجموعه‌ای از ژن‌ها شناسایی شدند که با صفات تولید مثلی و نرخ زایش مرتبط بودند. از جمله این ژن‌ها می‌توان به GTF2A1، PHACTR1، KHDRBS3، SCMH1، FOXP1، ELMO1، KCNN3، BEST3، METTL14، PRDM2، EFNA5 اشاره کرد. این ژن‌ها به عنوان کاندیداهای مهمی شناسایی شدند که ممکن است ساختار ژنتیکی نرخ زایش را تنظیم کنند.

نوع مقاله:

تاریخ دریافت:
تاریخ ویرایش:
تاریخ پذیرش:

واژه‌های کلیدی:
مطالعات ارتباطی
کل ژنوم
نرخ زایش
نژادهای گوسفند
هستی‌شناسی ژن

PROOF

نتیجه‌گیری: مطالعه کنونی ژن‌هایی که با صفت نرخ زایش در گوسفند مرتبط بودند و مسیرهایی که نقش مهمی در چندقلوزایی و تخمک‌گذاری داشتند را آشکار کرد. از این بین ژن‌های ATG5، NCKAP1L، CERK، AGPS، DCK، EPHA7، DOCK5، FOXN2 ، CERK، SOX6، PIGN و ONECUT2 برای اولین بار به عنوان ژن‌های موثر در نرخ زایش گوسفند معرفی شدند. نتایج این تحقیق می‌تواند به عنوان راهنمایی برای برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند مورد استفاده قرار گیرد و بهبود در صفات تولیدمثلی و نرخ زایش ایجاد کند.

استناد: حمد الاحمد، عبدالعزیز؛ شریعتی، محمد مهدی؛ طاهری، صادق؛ جوادمنش، علی. (۱٤۰٤). شناسایی ژن‌های مرتبط با صفت نرخ زایش در نژادهای چندقلوزا با استفاده از مطالعات ارتباطی کل ژنوم GWAS. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۳(۲)،

DOI:

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

PROOF

مقدمه

گوسفند یکی از پر استفاده‌ترین حیوانات از زمان اهلی شدن است. ماهیت سخت و سازگار گوسفند به گونه‌ای است که امکان توزیع گسترده در محیط‌های مختلف و زمین‌های متنوع، از جمله مناطق خشک را فراهم کرده و تنوع نژادها را امکان‌پذیر کرده است. علاوه بر این، تنوع منابع ارائه شده توسط گوسفند، این گونه را به عنوان یکی از اجزای اساسی اقتصاد کشاورزی جهانی معرفی کرده است (Hamadalahmad و همکاران، ۲۰۲۰). صفات باروری مانند میزان تخمک‌گذاری و تعداد نتاج در هر زایش را می‌توان از نظر ژنتیکی توسط بسیاری از ژن‌ها با اثرات کوچک و همچنین توسط ژن‌های منفرد با اثرات عمده، به نام ژن‌های باروری (Fec) تنظیم کرد (Tohidi و همکاران،۲۰۲٤؛ Jansson و همکاران، ۲۰۱٤). تولیدمثل فرآیند پیچیده‌ای است و جنبه‌های باروری مانند میزان تخمک‌گذاری و نرخ زایش را می‌توان از نظر ژنتیکی تحت تأثیر ژن‌های متعدد با تأثیر اندک و همچنین چند ژن اصلی قرار داد (Drouilhet و همکاران، ۲۰۰۹). تنوع زیاد در نرخ تخمک‌گذاری و نرخ زایش همراه با تکرارپذیری بالا، شاخص‌های وجود یک ژن اصلی تنظیم‌کننده باروری در یک جمعیت است. میش‌ها و قوچ‌های با باروری بالا غربالگری می‌شوند و ژنوم آن‌ها برای شناسایی ژن‌های یا واریانت‌های متفاوت نقشه‌برداری می‌شود (Jansson، ۲۰۰۹). صفات تولیدمثلی معمولاً دارای وراثت کم تا متوسط هستند و پاسخ قابل توجهی به انتخاب فنوتیپی از خود نشان نمی‌دهند؛ بنابراین، گنجاندن اطلاعات ژنتیکی بر روی ژن‌های مرتبط با توانایی تولیدمثلی می‌تواند به طور موثر پاسخ انتخاب را افزایش دهد (Abdoli و همکاران، ۲۰۱٦). مطالعات روی گوسفند نشان داده است که سه ژن اصلی باروری به نام گیرنده پروتئین مورفوژنتیک استخوان نوع B1 (BMPR1B) که به نام FecB نیز شناخته می‌شود، در کروموزوم ٦ وجود دارد (Souza و همکاران، ۲۰۰۱). پروتئین مورفوژنتیک استخوان ۱۵(BMP15) معروف به FecX بر روی کروموزوم X و فاکتور تمایز رشد ۹ (GDF9) معروف به FecG بر روی کروموزوم ۵ می‌باشد (Hanrahan و همکاران، ۲۰۰٤). GWAS روشی بدون فرضیه برای شناسایی ارتباط بین مناطق ژنتیکی و صفات فنوتیپی است. این رویکرد بر اساس جهش تک‌نوکلئوتیدی در حیوانات اهلی مختلف کار می‌کنند (Xu و Li، ۲۰۱۷) و به دلیل قدرتی که در تشخیص انواع جهش‌ها و توانایی در تعریف مناطق ژنومی دارد، ترجیح داده می‌شود (Hirschhorn و همکاران، ۲۰۱۲).

در گوسفند، GWAS برای اولین بار به منظور درک زمینه مولکولی انواع شاخ انجام شد (Johnston و همکاران، ۲۰۱۱). Hernández و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه ارتباطی کل ژنوم ژن‌های کاندیدا را برای صفات نرخ زایش در گوسفندان بلیبوی[1] انجام دادند. محققین نتیجه گرفتند که چندین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) و ژن کاندید که به طور بالقوه با صفت نرخ زایش در ارتباط هستند در گروه میش های چندقلوزا یافت شد. در این مطالعه ۵۷ SNP مرتبط با نرخ زایش در نژادهای بلیبوی گزارش شد و ژن‌های کاندید مرتبط با نرخ زایش در بلیبوی که ممکن است در فرآیند تولیدمثل دخیل باشند عبارت بودند از CLSTN2، MTMR2، CCDC174، NOM1، ANKRD11، DLG1، ALPK3، ROBO2، CGA و KDM4A (Hernández و همکاران، ۲۰۲۰). در پژوهشی که به منظور شناسایی ژن‌های مرتبط با چندقلوزایی در نژاد گوسفند چندقلوزای دنبه‌دار SSA[2] انجام شد، چندین ژن کاندید جدید و

1. Pelibuey
2. Sub-Saharan African

PROOF

شناخته‌شده، شناسایی شد که در باروری و تولیدمثل نر و ماده در سایر گونه‌ها نقش دارند. ژن‌های دخیل در تولیدمثل در جنس نر شامل FOXJ1 (عملکرد اسپرم و لقاح موفق) و NME5 (اسپرم‌زایی) می‌باشد. همچنین ژن‌هایی مانند PKD2L2، MAGED1 وKDM3B مشاهده شدند که با صفات باروری متنوع در هر دو جنس از گونه‌های مختلف مرتبط هستند (Dolebo و همکاران، ۲۰۱۹).

علاوه بر این، تجزیه و تحلیل ارتباط در گوسفند هان دم کوچک نشان داد که جایگاه rs399534524 در CLSTN2 به شدت با نرخ زایش اول مرتبط بود و نرخ زایش در میش‌های با ژنوتیپ CT بیشتر از میش‌های با ژنوتیپ CC یا TT بود. علاوه بر این، جایگاه rs407142552 در CTH با نرخ زایش دوم در گوسفند دم کوچک همراه بود و نرخ زایش ر در میش‌های با ژنوتیپ CT بیشتر از میش‌های با ژنوتیپ TT بود. درنهایت، شبکه‌ای از برهمکنش‌های پروتئینی برای CTH و CLSTN2 پیش‌بینی شد که نشان داد ژن‌های HTR1E، NOM1، CCDC174 و ALPK3 با CLSTN2 تعامل دارند و به‌عنوان ژن‌های کاندید مرتبط با نرخ زایش در گوسفند شناسایی شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که این ژن‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی مفیدی برای بهبود نرخ زایش در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند مورد استفاده قرار گیرند (Liu و همکاران، ۲۰۲٤).

در یک مطالعه GWAS، یک SNP (snp54094- scaffold824 899720) را در کروموزوم ۱۱ برای نرخ زایش، دو SNP نیز در کروموزوم ۲٦ (snp11508- scaffold142-1990450، SORCS450-1990450، SORCS45-8) شناسایی شدند. برخی از ژن های کاندید شناخته شده برای صفات اقتصادی مانند تولید مثل (TSHR، ANGPT4، CENPF، PIBF1، DACH1، DIS3، CHST1، COL4A1، PRKD1 و DNMT3B) و توسعه و رشد (TNPO2، IFT80، UCP2، UCP3، GHRCCM21، CTNNA3 و CTNNA1) آشکار شدند (Sun و همکاران، ۲۰۲۳). هدف از تحقیق حاضر شناسایی موقعیت جایگاه‌های صفت کمی و ژن‌های مرتبط با صفت نرخ زایش و چندقلوزایی در ۱۲ نژاد گوسفند با استفاده از روش GWAS می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نژادهای مورد مطالعه: در این مطالعه، اطلاعات نرخ زایش ۱۲ نژاد گوسفند از منابع و مقالات مختلف جمع‌آوری شد. این نژادها براساس میانگین نرخ زایش به سه گروه با نرخ زایش بالا، متوسط و پایین تقسیم شدند که در جدول ۱ مشخص شده‌اند.

جدول ۱- سه دسته گوسفندان مورد مطالعه بر اساس میانگین نرخ زایش

Table 1- Three categories of sheep based on the average litter size

گروه اول با نرخ زایش بالا (۲/۵۲) The first group with high litter size (2.52)	گروه دوم با نرخ زایش متوسط (۱/۹٦) The second group with medium litter size (1.96)	گروه سوم با نرخ زایش پایین (۱/۱۷) The third group with low litter size (1.17)
Finnsheep SantaInes BlackHeadedMountain	BarbadosBlackBelly ChineseMerino Sakiz ScottishBlackface ValaisBlacknoseSheep	CyprusFatTail Karakas Moghani RedMaasai

PROOF

داده‌های ژنوتیپی: داده‌های مورد استفاده در این پژوهش از مطالعه توسط کیجاس[3] و همکاران (۲۰۱۲) می‌باشد که این نژادها از آفریقا، آسیا، آمریکای جنوبی، اروپا، خاورمیانه، استرالیا، ایالات متحده آمریکا و کارائیب توسط محققین مختلف جمع آوری شدند و در ISGC[4] ثبت شده‌اند (Kijas و همکاران ۲۰۱۲).

کنترل کیفیت دادهای ژنوتیپی: با استفاده از نرم افزار PLINK V1.9 (Purcell و همکاران، ۲۰۰۷) در محیط R کنترل کیفیت برای هر نژاد انجام شد.SNP هایی که تولید شده است توسط موارد ذیل بررسی می‌شود: نرخ فراخواندن (خوانش) در هرSNP بیشتر ۹۰٪، فراوانی آللی جزئی (MAF) بیشتر ۲٪، ژنوتیپ‌های با نمره GC (Gencall Score) کمتر از ۰/٦ حذف شدند. تعداد افراد با ژنوتیپ حذف شده mind کمتر ۱٪، مارکرها از ژنوتیپ از دست رفته geno کمتر ۲٪، تعادل هاردی وینبرگ $^{-۵}$۱۰ در نظر گرفته شد که با استفاده از تصحیح بنفرونی به دست آمد. بعد از کنترل کیفیت SNPهایی برای تجزیه و تحلیل های بعدی نگهداری شدند (Roshandel و همکاران،۲۰۲۲؛ Taheri و همکاران، ۲۰۲۲).

آنالیز GWAS برای شناسایی مناطق ژنومی مرتبط یا صفت نرخ زایش: مطالعات ارتباط ژنومی را در سه گروه نژاد گوسفند با نرخ زایش بالا (Finnsheep، SantaInes و BlackHeadedMountain) و ۵ نژاد متوسط (ChineseMerino،BarbadosBlackBelly ، ScottishBlackface، ScottishBlackface، Sakiz و ValaisBlacknoseSheep) و ٤ نژاد کم نتاج (Cyprus FatTail، Karakas ،Moghani و Red Maasai) با استفاده از نرم افزار Plink (Purcell و همکاران، ۲۰۰۷) انجام شد. آنالیز ارتباطی بین ژن‌ها وصفت چندقلوزایی با استفاده از یک مدل خطی مختلط در نرم افزار Plink انجام شد. معادله مورد استفاده در GWAS بصورت زیر می باشد:

$$y = X\beta + Zu + e$$

در این مدل y بردار مشاهدات (صفت مورد مطالعه دوقلوزایی)، X ماتریس ضریب اثرات ثابت شامل میانگین و اثرات snp می‌باشد، β بردار اثرات ثابت، Z ماتریس ضرایب اثرات تصادفی ژنتیک افزایشی، U بردار ضرایب اثرات تصادفی ژنتیک افزایشی، e بردار اثرات باقیمانده می باشد (Purcell و همکاران، ۲۰۰۷). همه نژادها بر اساس در صد چندقلوزایی آنها از بالاترین تا کمترین رتبه بندی شدند. به منظور بررسی سطح معنی داری SNP با صفت مربوطه از نمودار منهتن استفاده شد. رنگ‌های مختلف در این نمودار نشان‌دهنده کروموزوم‌های مختلف ۱-۲۷ است، خط آبی نشان‌دهنده‌ی سطح معنی‌داری است ($\alpha=10^{-5}$) اما خط قرمز نشان‌دهنده‌ی سطح معنی‌داری اصلاح‌شده با روش Bonferroni است. نقاط بالای خط آبی SNPهایی که از سطح معنی‌داری معمولی عبور کرده‌اند و ممکن است با صفت مورد مطالعه مرتبط باشند اما نقاط بالای خط قرمز SNPهایی که ارتباط بسیار قوی با صفت مورد مطالعه را نشان می‌دهند. از نمودار QQ (Quantile-Quantile Plot) برای ارزیابی تفاوت بین توزیع آماری مورد مشاهده و توزیع آماری مورد انتظار استفاده شد.

تحلیل مسیرهای زیستی با سرور DAVID: برای تعیین طبقات عملکرد ژنی و مسیرهای مسیرهای زیستی و تنظیمی ژن‌های معنی‌دار، از سرور DAVID نسخه 6.8 استفاده شد. از پایگاه داده KEGG نیز مسیرهای مختلف مرتبط با ژن‌ها شناسایی شد. هر دو پایگاه داده DAVID و KEGG حاوی اطلاعات عملکردی در مورد هر ژن هستند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی با استفاده از ابزار پایگاه داده DAVID (https://davidbioinformatics.nih.gov/tools.jsp)

3. Kijas
4. International Sheep Genomics Consortium

PROOF

برای تعیین مسیرهای غنی‌شده انجام شد (Sherman و همکاران،۲۰۲۱؛ Mohammadi و همکاران، ۲۰۱۹).

نتایج و بحث

در این پژوهش، مطالعه پویش کل ژنومی با تجزیه و تحلیل غنی‌سازی و مجموعه ژنی جهت شناسایی طبقات عملکردی و ژن‌های مرتبط با نرخ زایش در گوسفند انجام گردید. با استفاده از نرم افزار PLINK V1.9کنترل کیفیت برای هر نژاد و با استفاده از کد دستوری با برازش یک مدل خطی با استفاده از بسته Rcmdr از نرم افزارR (ttp://socserv.socsci. mcmaster.ca /jfox/Misc/Rcmdr/ انجام شد (Fox و همکاران، ۲۰۲۰). گزارش نتایج کنترل کیفیت در فایل خروجی با پسوند log برای هر نژاد است که در جدول ۲ برای همه نژادها ارائه شد.

جدول ۲- نتایج بعد از انجام کنترل کیفیت با نرم افزار PLINK

Table 2- The results after quality control with software PLINK

گروه Group	نژاد Breed	تعداد حیوان Number	کلی تعداد اسنیپ SNP	فراوانی الل جزئی MAF	مارکرها از ژنوتیپ از دست رفته geno	تعداد افراد با ژنوتیپ حذف شده mind	تعادل هاردی واینبرگ HWE	تعداد اسنیپ‌های باقی مانده RSNP	نرخ ژنوتیپی Total genotyping rate
1	Finnsheep	99	49034	1950	3	0	668	46413	0.999913
	SantaInes	47	49034	2136	6	0	13	46879	0.999918
	BlackHeaded Mountain	24	49034	2360	8	0	1	46665	0.999948
2	BarbadosBlackBelly	24	49034	2839	19	0	3	46173	0.999842
	ChineseMerino	23	49034	1527	16	0	0	47491	0.999667
	Sakiz	22	49034	6326	23	0	0	42685	0.99976
	ScottishBlackface	56	49034	2112	5	0	1143	45774	0.999906
	ValaisBlackNoseSheep	24	49034	4865	5	0	0	44164	0.999907
3	CyprusFatTail	30	49034	6323	23	0	0	42688	0.999628
	Karakas	18	49034	3142	33	0	0	45859	0.999756
	Moghani	34	49034	1977	14	0	511	46532	0.999667
	RedMaasai	45	49034	3253	15	0	2	45764	0.999645

مطالعه ارتباطی کل ژنومی و نمودارهای منهتن و Q-Q عدم تعادل پیوندی برای تجزیه و تحلیل ارتباط به ترتیب در شکل‌های زیر ارائه شده است (شکل ۱). با توجه به نمودار منهتن و بر اساس مقادیرP (P-value) در سراسر ژنوم ، SNPهای معنی‌دار مشخص شدند. این پلات نشان می‌دهد کروموزوم‌های ۷، ۱۴، ۳ و ۱۸ دارای SNPهایی هستند که ارتباط قوی‌تری را نشان می‌دهند و باید به عنوان کاندیداهای اصلی برای تحقیقات بعدی در نظر گرفته شوند (شکل ۱).

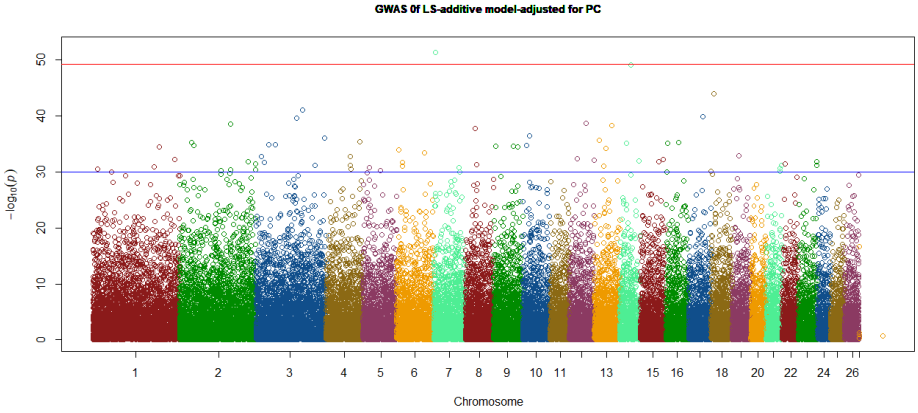
PROOF

در پلات‌های Q-Q مقادیر مورد مشاهده با مقادیر مورد انتظار همخوانی وجود دارند و این نشان می‌دهد ارتباط بسیار معناداری با صفت نرخ زایش دارند (Uffelmann و همکاران، ۲۰۲۱؛ Zeng و همکاران، ۲۰۲۱). این نشان‌دهنده وجود SNPهایی است که به احتمال زیاد به طور واقعی با صفت مورد مطالعه در ارتباط هستند و نیاز به بررسی بیشتر دارند (شکل ۲). این پلات‌ها نشان می‌دهند که SNPهای شناسایی شده می‌توانند به درک بهتر از ساختار ژنتیکی صفات مورد مطالعه کمک کنند و ممکن است به بهبود برنامه‌های اصلاح نژادی و تولیدی در گوسفندان کمک کنند. این نتایج نشان می‌دهد که برخی از SNPها ممکن است نقش مهمی در صفات تولیدمثلی و نرخ زایش در جمعیت‌های مختلف گوسفند داشته باشند. بررسی‌های بیشتر برای تأیید این نتایج و شناسایی عملکرد دقیق این ژن‌ها لازم است.

در این مطالعه، برای اولین بار چندین ژن با ارتباط معنی‌دار با صفت نرخ زایش شناسایی شدند که در جدول ۳ ارائه شده‌اند. این ژن‌ها پیش‌تر در هیچ مطالعه‌ای گزارش نشده بودند و نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که این ژن‌ها نقش بالقوه مهمی در فرآیندهای ژنتیکی مرتبط با صفت نرخ زایش دارند. کشف این ژن‌های جدید می‌تواند به درک عمیق‌تری از مکانیسم‌های ژنتیکی مربوط به این صفات منجر شود و مسیرهای جدیدی را برای تحقیقات آینده در این زمینه فراهم کند. اسماعیلی فرد و همکاران در سال ۲۰۲۱ از روش‌های جایگزین مطالعه ارتباط ژنومی گسترده (GWAS) و سپس تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی (GSEA) بر روی ژنوم میش‌ها برای شناسایی ژن‌های مؤثر بر نتایج بارداری در گوسفندان بلوچی ایرانی استفاده کردند. مسیرهای شناسایی شده دارای عملکردهای مرتبط با بارداری بودند، مانند خودخواری جفت، تولید پروژسترون توسط جفت، تشکیل جفت، انتقال یون کلسیم و پاسخ ایمنی مادری بود (Esmaeili-Fard و همکاران، ۲۰۲۱).

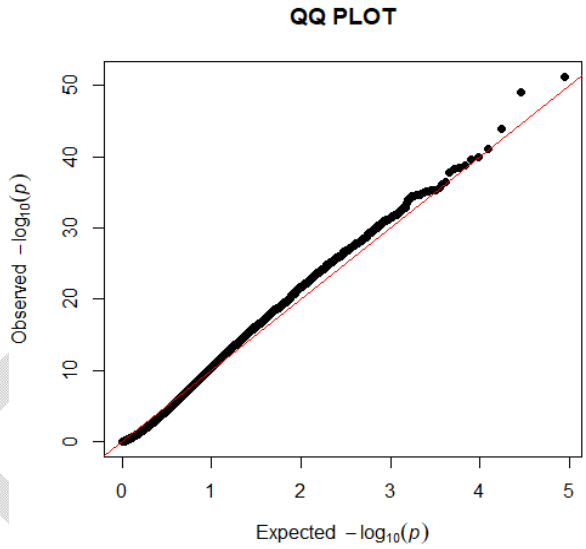
مطالعه‌ای که توسط عبدلی و همکاران در سال (۲۰۱۹) انجام شد، به بررسی ارتباط ژنومی گسترده (GWAS)برای ارزش‌های اصلاح نژادی تخمینی چهار صفت تولیدمثلی در گوسفند پرداخته است. در این مطالعه، ۱۲٤ میش لری-بختیاری با استفاده از آرایه SNP50k که دارای تراکم متوسطی است، تعیین ژنوتیپ شدند. در این تحقیق، دو چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) مرتبط با فاصله بین زایش‌ها بر روی کروموزوم‌های ۱ و ۲ شناسایی شدند که به‌عنوان ژن‌های کاندیدا (INHBE، TEX12، BCO2، INHBC، WDR70) برای صفات ترکیبی تولیدمثلی در گوسفندان لری-بختیاری پیشنهاد شدند. این ژن‌ها در مسیرهای بیولوژیکی قرار دارند که با ویژگی‌های باروری و رشد مرتبط هستند (Abdoli و همکاران، ۲۰۱۹). مطالعات ارتباط ژنومی گسترده (GWAS) در میش‌های لری-بختیاری انجام شد. دو چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) مرتبط با فاصله بین زایش‌ها بر روی کروموزوم‌های ۱ و ۲ شناسایی شدند. فرآیندهای زیستی و مسیرهای تولیدمثلی در گونه‌های پستانداران مرتبط است (Abdoli و همکاران، ۲۰۱۹).

PROOF



شکل ۱- پلات منهتن از مطالعه ارتباطی کل ژنوم مرتبط با صفت نرخ زایش در جمعیت‌های گوسفند مورد مطالعه.

Figure 1-Manhattan plots from the GWAS related to the litter size trait in the studied sheep populations.



شکل ۲- پلات‌های Q-Q از مطالعه ارتباطی کل ژنوم مرتبط با صفت نرخ زایش در جمعیت های گوسفند مورد مطالعه

Figure 2- Q-Q plots from the Gwas related to the litter size trait in the studied sheep populations.

جدول ۳- ژن‌های به دست آمده از آنالیز GWAS

Table 3- Genes obtained from GWAS analysis

Gene Symbol نام ژن	Position موقعیت
NEK11	Chr1:259291261-259572772
EPHA7	Chr1:259291261-259572772
TUT4	Chr1:26829499-26965945
RPAP2	Chr1:69551721-69666728
DCAF6	Chr1:120166600-120351438
SCMH1	Chr1:15545463-15761674
SLC9A9	Chr1:245697294-246350207
LOC101108019	Chr1:267501358-267514588
KCNN3	Chr1:104917025-105088052
AGPS	Chr2:132581636 -132715209
DOCK5	Chr2:40232384-40508680
CERK	Chr3:222805284-222845327
NCKAP1L	Chr3:132031554-132075582
FOXN2	Chr3:76086980-76145390
BEST3	Chr3:150056304-150114651
ARHGEF5	Chr4:108776036-108806041
ELMO1	Chr4:61461591-62043012
NRF1	Chr4:95140923-95268235
SLC26A4	Chr4:50189660-50253813
CHSY3	Chr5:21733552-22037277
EFNA5	Chr5:103981768-104274664
METTL14	Chr6:7020165-7059207
DCK	Chr6:87048501-87074607
GTF2A1	Chr7:90654782-90694827
ATG5	Chr8:30899311-31078799
KHDRBS3	Chr9:19450106-19611681
PRDM2	Chr12:53071256-53203167
NRP1	Chr13:18967330-19113664
SOX6	Chr15:35558602-36278876
GRIK4	Chr15:30930887-31332190
FOXP1	Chr19:30123283-30747304
USP4	Chr19:50810636-50850832
PHACTR1	Chr20:42474299-42996990
ONECUT2	Chr23:57026323-57084710
PIGN	Chr23:60814581-60917418

در مطالعه محمدی و همکاران ۲۰۲۲ با هدف انجام مطالعات ارتباط ژنومی گسترده مبتنی بر تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی برای شناسایی ناحیه ژنومی، ژن‌های کاندیدا و مسیرهای زیستی مرتبط با نرخ زایش در نژاد گوسفندان زندی انجام شد. تحلیل بیوانفورماتیک برای شناسایی مسیرهای زیستی در پایگاه‌های داده GO، KEEG و DAVID اجرا شد. مجموعه‌های مختلفی از ژن‌های کاندیدا مرتبط با نرخ زایش شناسایی شده ازجمله AFP، FOXO3، ESR2، ESR1، RBP4، AURKA، DLG1 و ZGLP1 با تعداد بره متولد و بر اساس تحلیل مسیرها، ۱۱ مسیر با صفت نرخ زایش مرتبط بودند. در میان مسیرهای زیستی، مسیرهای تمایز اووسیت، تخمک‌گذاری از فولیکول تخمدان، مسیر سیگنالینگ استروژن و مسیرهای تنظیم مثبت ترشح هورمون پپتیدی با نرخ تخمک‌گذاری و صفات استروئیدزایی تخمدان ارتباط معناداری داشتند که با مطالعه حاضر مطابقت ندارد (Mohammadi و همکاران، ۲۰۲۲).

PROOF

در مطالعه قلی‌زاده و همکاران (۲۰۲۲)، نخستین فراتحلیل ارتباط ژنومی گسترده (GWAS) برای نرخ‌زایش در شش نژاد گوسفند انجام شد. این پژوهش ۲۹ ارتباط معنی‌دار شناسایی کرد که بیشتر آنها در مطالعات فردی گزارش نشده بودند (Gholizadeh و همکاران، ۲۰۲۲).

در یک مطالعه ارتباط ژنومی گسترده روی دو گروه گوسفندان پل‌بیوئه، ژن‌های CLSTN2، MTMR2، DLG1، CGA، ABCG5، TRPM6 و HTR1E به‌عنوان ژن‌های کاندیدای مرتبط با نرخ زایش شناسایی شدند، اگرچه این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر تفاوت داشت. این ژن‌ها ممکن است در فرآیندهای تولیدمثلی و چندقلوزایی نقش داشته باشند و شناسایی این SNPها به درک بهتر مکانیسم‌های ژنتیکی مؤثر بر نرخ زایش کمک می‌کند (Hernández-Montiel و همکاران، ۲۰۲۰).

برای بررسی مکانیسم‌های ژنتیکی موثر بر تغییرات نرخ زایش، چندین مطالعه ارتباط ژنومی گسترده (GWAS) در پنج نژاد با نرخ زایش بالا (وادی، هو، ایسلندی، فین‌شپ، رومانوف) و یک نژاد با نرخ زایش کم (تکسل) انجام شد. ژن‌های کاندیدا شامل BMPR1B، FBN1 و MMP2 در وادی؛ GRIA2، SMAD1 و CTNNB1 در هو؛ NCOA1 در ایسلندی؛ NF1، FLT1، PTGS2 و PLCB3 در فین‌شپ؛ ESR2 در رومانوف؛ و ESR1، GHR، ETS1، MMP15، FLI1 و SPP1 در تکسل شناسایی شدند. تحلیل بیوانفورماتیک نشان داد مسیرهایی مانند ترشح هورمون‌ها، جفت‌زایی، فولیکولوژنز و تخمک‌گذاری در تنظیم نرخ زایش این نژادها نقش دارند (Xu و همکاران، ۲۰۱۸).

همانطور که در جدول ٤ قابل مشاهده است، نتایج پژوهش حاضر بر پایه غنی‌سازی مجموعه ژنی، نهایتاً منجر به شناسایی مسیرهایی شد که ارتباط معنی‌داری با صفات مرتبط با نرخ زایش داشتند. بررسی ژن‌های موجود در هر مسیر نشان داد که این ژن‌ها با صفات نرخ زایش و تولید مثل مرتبط هستند. برخی از این ژن‌ها در تحقیقات قبلی نیز به عنوان ژن کاندیدا برای صفات مختلف گزارش شده‌اند.

مسیر غشای پلاسمایی (GO:0005886~plasma membrane) با صفت نرخ زایش ارتباط دارد و ژن KCNN3 به عنوان یک ژن کاندیدای معنی‌دار در این مسیر وجود دارد. این ژن در عملکردهای مختلف تولید مثل، از جمله جنین‌زایی، بازسازی فولیکولی رحم و تخم‌گذاری نقش دارد که با مطالعه حاضر همپوشانی داشت (Onteru و همکاران، ۲۰۱۲؛Lai و همکاران، ۲۰۱٦). به عنوان مثال، بیان ژن KCNN3 در سلول‌های گرانولوزا[5] (GCها) در مراحل اولیه رشد کاهش یافته است، در حالی که بیان آن در تخمک‌ها افزایش یافته است (Bonnet و همکاران، ۲۰۱۳)؛ که با مطالعه حاضر مطابقت داشت.

نتایج مطالعه واحدی و همکاران با مطالعه حاضر همخوانی داشت که در مسیر (GO:0017124~SH3 domain binding) دو ژن شناسایی شد که مرتبط با صفت نرخ زایش بودند. از بین این ژن‌ها، ژن KHDRBS3 به عنوان ژن کاندیدا معرفی شد. این ژن در مطالعات قبلی با استفاده از WssGWAS و جستجوی ژن‌های شناسایی‌شده در پایگاه داده QTLdb خوک نشان داد که ژن‌های شناسایی شده در مناطقی که قبلاً با صفات رسوب چربی خوک مرتبط بوده‌اند و می‌توانند به عنوان ژن کاندید بالقوه برای BMI در خوک‌های یورکشایر در نظر گرفته شوند (Vahedi و همکاران، ۲۰۲۲). این نتایج می‌توانند به پژوهشگران کمک کنند تا مسیرهای ژنتیکی جدیدی برای بهبود صفات تولید مثل شناسایی کنند و کاربردهای عملی در دامپروری و بهبود نژاد ایجاد

5. Granulosa cells

PROOF

کنند. پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده، تمرکز بیشتری بر روی تحلیل عملکردی این ژن‌ها و بررسی تأثیرات محیطی و اپی‌ژنتیکی بر بیان آن‌ها داشته باشند.

مسیر زیستی GO:0005634~nucleus ارتباط معنی‌داری با صفت تولیدمثل دارد که با ژن SCMH1 در فرآیند تولید اسپرم[6] نقش دارد. در این مطالعه، نشان داده شده است که اکثریت ژن‌هایی که در دستگاه تولید مثل بوقلمون وجود دارند، SCMH1 اکثراً در بیضه‌ها بیان می‌شود که نقش بالقوه آن در اسپرم‌زایی را نشان می‌دهد که با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت دارد (Deng و همکاران، ۲۰۲۲). یک ژن معنی‌دار دیگر از این مسیر، ژن FOXP1 است که در طول فرآیند تمایز استخوانی، بیان آن تحت تنظیم circFOXP1 افزایش می‌یابد (Shen و همکاران، ۲۰۲۰). همچنین، یک مطالعه نشان داد که کاهش سطح FOXP1 با بیان افزایش یافته PPA همراه بود که به عنوان یک تنظیم‌کننده اصلی در تمایز سلول‌های چربی عمل می‌کند (Li و همکاران، ۲۰۱۷). بیان بیش از حد FOXP1 در سلول‌های چربی تأثیرات مخربی بر گرمازایی دارد و چاقی ناشی از رژیم غذایی را افزایش می‌دهد (Liu و همکاران، ۲۰۱۹).

در مطالعه‌ای که بر روی نژاد خوک شازیلینگ[7] انجام شد، در مجموع ۳۱ SNP شناسایی شد که احتمالاً با اندازه بدن و ویژگی‌های تولیدمثلی مرتبط بودند. از میان ژن‌های شناسایی‌شده، ژن FOXP1 و BMPR1B به عنوان ژن‌های کاندیدای مهمی شناسایی شدند که ممکن است در تنظیم ساختار ژنتیکی نقش داشته باشند؛ اما نتایج این مطالعه با یافته‌های حاضر مطابقت ندارد (Lan و همکاران، ۲۰۲۳).

در مسیر oas01100:Metabolic pathways که با صفات تولید مثلی مرتبط است، ژن PRDM2 به عنوان یک ژن کاندید شناخته می‌شود. این ژن در مطالعات قبلی با تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی اضافی، با اختلالات متعدد مرتبط با رحم مانند نارسایی دهانه رحم، افتادگی رحم و ناهنجاری‌های دهانه رحم مرتبط است. چندین ژن به عنوان مثال PRDM2 که نزدیک به نشانگر SNP در کروموزوم ۱۲ واقع شده‌اند، در خوشه‌های غنی‌سازی حاشیه‌نویسی دسته‌بندی شده‌اند که عمدتاً در مسیرهای تکاملی و بیوسنتزی، آپوپتوز و رونویسی با الگوی اسید نوکلئیک دخیل هستند. یافته‌های تحقیق حاضر ممکن است بیشتر به کشف مناطق ژنومی که برای تولید مثل در گوسفندان اهمیت دارند، کمک کند و می‌توانند در برنامه‌های اصلاح نژاد آینده به کار گرفته شوند.

در مطالعه تزارسیانیدو و همکاران در سال ۲۰۲۳ با استفاده از GWAS به این نتیجه رسیدند که چهار نشانگر SNP جدید (OAR2_127110460.1، OAR2_127469865.1، OAR2_12749743.1، OAR12_56902867.1) را بر روی کروموزوم‌های ۲ و ۱۲، PRDM2 به طور قابل توجهی با سن در اولین بره‌زایی مرتبط کرده‌اند که احتمالاً به افزایش نرخ زایش در گوسفندان اهمیت می‌دهند. این ژن‌ها در تشکیل استخوان و عضله و فرآیندهای رشد مرتبط با نرخ زایش بالای گوسفندان نقش دارند (Tsartsianidou و همکاران، ۲۰۲۳).

مسیر GO:0005654~nucleoplasm یکی از مسیرهای اساسی در مطالعه حاضر بود که با نتایج مطالعه Selionova در ارتباط با نرخ زایش همپوشانی داشت. در این مسیر، ژن کاندید METTL14 به عنوان یکی از ژن‌های مهم معرفی شد که اثر چند ژنی دارد. تحقیقات نشان داد که METTL14 به طور همزمان با محتوای ماده خشک و اسیدهای چرب مرتبط می‌باشد

6. Spermatogenesis
7. Shaziling

PROOF

(Selionova و همکاران، ۲۰۲٤). همچنین، این ژن توسط یانگ و همکاران به عنوان یک فعال‌کننده تکثیر میوبلاست و مهار کننده تمایز میوژنیک شناسایی شد (Yang و همکاران، ۲۰۲۲).

نتایج به‌دست‌آمده در مطالعات مختلف با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد. این همخوانی نشان می‌دهد که شواهد موجود بر اهمیت ژن‌های مرتبط با مسیرهای تولیدمثلی در گوسفندان تأکید دارند. همچنین، یافته‌های تحقیق حاضر تأیید می‌کنند که ژن‌های کاندید شناسایی‌شده در تحقیقات قبلی، در کنترل و تنظیم صفات مهم تولیدمثلی و متابولیکی نقش دارند. در مسیر GO:0005829~cytosol که به تولید مثل مربوط است، ژن GTF2A1 به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی شناخته شده است. تحقیقات نشان داده که GTF2A1 نقش مهمی در تولیدمثل برخی از ژن‌های جدید مانند FETUB، HNRNPA1 و HRG در گوسفندان دارد (Tao و همکاران، ۲۰۲۱). این ژن به عنوان یک زیر واحد از فاکتور رونویسی عمومی IIA شناخته شده است و در اسپرم زایی (Han و همکاران، ۲۰۰۱)، سرطان تخمدان (Huang و همکاران، ۲۰۰۹)؛ سرطان آندومتر (Bakkum-Gamez و همکاران، ۲۰۱۵) نقش دارد. همچنین، تحقیقات نشان داده‌اند که GTF2A1 با کنترل دوره نورانی تولیدمثل مرتبط است (Liu و همکاران، ۲۰۱٦). ژن GTF2A1 ظاهراً با عملکرد تخمدان و رحم مرتبط است و از این رو بر تولید تخمک تأثیر می‌گذارد، تجزیه و تحلیل GTF2A1 و CLSPN نشان داد که آنها بر عملکرد تخمدان و رحم تأثیر می گذارند و ممکن است به عنوان کاندیدای مرتبط در نظر گرفته شود (Yuan و همکاران، ۲۰۱۵).

در مطالعه توسط ژائو و همکاران که تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی مناطق ژنومی نشان داد که امضاهای انتخاب مربوط به ژن‌های کاندید متعدد نقشی در تنوع فنوتیپی داشتند. سپس اسکن ژنومیک برای امضای انتخاب با استفاده از hapFLK انجام شد. مشخص شد که ژن GTF2A1 با کنترل تولید مثل مرتبط است (Zhao و همکاران، ۲۰۲۰).

آنالیزهای ژنومی بر روی ۸۲۱ فرد با استفاده از سه رویکرد ژنومی (ارتباط ژنومی، XP-nSL و اجرای هموزیگوسیتی) انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که در میان ۳۵ ژن کاندید شناسایی شده، سه ژن اهلی‌سازی شامل TSHR، GTF2A1 و KITLG به عنوان مهم‌ترین ژن‌ها معرفی شدند. علاوه بر جهش FecB در BMPR1B، ارتباط معنی‌داری از یک جهش نادر rs406686139 در ژن TSHR با بره‌زایی فصلی و نرخ زایش گوسفندان مشاهده شد. همچنین، ارتباط ژن GTF2A1 با بره‌زایی در این مطالعه با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت (Tao و همکاران، ۲۰۲۱). برخی از مطالعات قبلی با نتایج ما تطابق ندارند، به ویژه در بررسی ژن‌های مرتبط با نرخ زایش. این تفاوت‌ها ممکن است ناشی از تفاوت‌های جمعیتی، شرایط محیطی و یا روش‌های آماری مختلف در آنالیزهای ژنومی باشد؛ بنابراین، برای تأیید نتایج و درک بهتر از نقش این ژن‌ها در نرخ زایش، نیاز به مطالعات بیشتر با تعداد نمونه بالاتر است که به صورت جامع‌تری به این مسائل بپردازند.

از دیگر مسیرهای زیستی معنی‌دار مرتبط با صفت نرخ زایش می‌توان به مسیر GO:0017124~SH3 domain binding اشاره نمود که به مسیرهای زیستی مرتبط با تولید مثل مرتبط است. این مسیر حاوی چند ژن معنی‌دار بود که می‌توان از بین آنها به ژن کاندیدای ELMO1 اشاره کرد. در مطالعه ژانگ، ژن ELMO1 به دلیل SNPهای قابل توجه مجاور و عملکرد آنها در ایمنی، لقاح، رشد جنینی و کیفیت اسپرم به عنوان ژن کاندیدا انتخاب شده است (Zhang و همکاران، ۲۰۲۳).

PROOF

ژن ELMO1 با صفت TNB[8] (تعداد کل متولدین) مرتبط است. نشان داده شده است که ژن ELMO1 نقش مهمی در پاکسازی سلول‌های زاینده آپوپتوز و اسپرم‌زایی در موش دارد (Elliott و همکاران، ۲۰۱۰)، و حذف سلول‌های زاینده آپوپتوز و اسپرم فرآیند مهمی برای حفظ سلامت باروری و تولید مثل است (Elliott و Ravichandran، ۲۰۱۰). بدیهی است که ELMO1 احتمالاً بر نرخ زایش در خوک‌ها تأثیر دارد (Zhang و همکاران، ۲۰۲۳). ژانگ و همکاران ژن های کاندید را شناسایی کردند، از جمله ELMO1 که به دلیل SNPهای قابل توجه مجاور و عملکرد آنها در ایمنی، لقاح، رشد جنینی و کیفیت اسپرم انتخاب شدند (Zhang و همکاران، ۲۰۲۳). در این مطالعه، یک تجزیه و تحلیل GWAS و ROH برای شناسایی ژن‌های مرتبط با تولید مثل با استفاده از K50 Bead Chip خوک‌های یورکشایر انجام شد. که در مجموع ۲۰ SNP کاندیدا را برای هفت صفت تولیدمثلی در خوک‌های یورکشایر با استفاده از GWAS شناسایی شد. بیشتر QTLهای شناسایی‌شده در ژن ELMO1 با یکدیگر همپوشانی داشتند.

ژن EFNA5، عضوی از خانواده گیرنده‌های تیروزین کیناز (RTKs)، در غشای سلولی واقع شده و در کروموزوم ۵ گوسفند (۱۰۳۹۸۱۷۶۸~۱۰۴۲۷۴۴۲۶ جفت باز) قرار دارد. تحقیقات بر روی ژن EFNA5 در حوزه‌های مختلف به طور مداوم گسترش یافته و عملکردهای فیزیولوژیکی متنوعی گزارش شده است. این ژن نقش مهمی در تنظیم تکثیر پستانداران دارد (Worku و همکاران، ۲۰۱۸). تجزیه و تحلیل گسترده ژنومی از شش صفت رشد، از جمله قد، طول بدن، ارتفاع باسن، اندازه قلب، اندازه شکم و اندازه استخوان لوله، در گاو سیمنتال در سه مرحله رشد (۶، ۱۲ و ۱۸ ماه پس از تولد) انجام شد. در این تحقیق، ژن EFNA5 به عنوان یکی از ژن‌های کاندید برای تأثیر بر این ویژگی‌ها شناسایی شد (Liu و همکاران، ۲۰۱۵).

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه اهمیت شناسایی ژن‌های مرتبط با صفت نرخ زایش را برای باروری و تولید مثل گوسفند برجسته می‌کند. همچنین، ژن‌های کاندید مرتبط با این صفت معرفی شده‌اند که باید در تعیین اثرات ژن بر چندقلوزایی و باروری بیشتر مورد بررسی قرار گیرند. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که مسیرها و ژن‌های کاندیدا با صفات نرخ زایش در نژادهای مورد مطالعه مرتبط هستند و برای تایید این نتایج نیاز به مطالعات بیشتر وجود دارد. در این تحقیق، با استفاده از ارتباط گسترده ژنوم در نژادهای مورد مطالعه، مجموعه‌ای از ژن‌ها شناسایی شد که به طور بالقوه با صفات تولید مثلی و نرخ زایش مرتبط هستند. این ژن‌ها شامل GTF2A1، PHACTR1، KHDRBS3، SCMH1، FOXP1، ELMO1، KCNN3، BEST3، METTL14، PRDM2 و EFNA5 می‌باشند که به عنوان ژن‌های کاندیدای مهمی شناسایی شدند و احتمالاً ساختار ژنتیکی چندقلوزایی و نرخ زایش را تنظیم می‌کنند. نتایج این تحقیق نشان داد که این ژن‌ها با صفات چندقلوزایی مرتبط هستند و مسیرهای مهمی روی چندقلوزایی و تخمگذاری دارند. با وجود حجم داده‌های محدود در مطالعه کنونی، این نتایج به ما کمک می‌کند تا اساس ژنتیکی صفات نرخ زایش و صفات تولید مثل را درک کنیم و می‌توانند در برنامه‌های بهبود پرورش گوسفندان مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد و گرنت شماره ۳/۵۵۱۸۷ انجام شد و از گروه علوم

8. Total number born

PROOF

دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد برای اختیار گذاشتن سخت افـزار بـرای آنـالیز داده‌هـا و از دکتر جیمز کیجاس برای اختیـار گذاشـتن داده‌هـا در اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

جدول ٤- مسیرهای KEGG غنی شده توسط ژن‌های کاندید SNPهای مهم ژنوم مرتبط با صفات چندقلوزایی

Table 4- KEGG pathways enriched by the candidate genes of important SNPs of the genome related to Litter size trait.

ژن‌ها Genes	سطح معنی داری مقادیر P- value	عبارات هستی شناسی ژن GO terms	Category
CERK, AGPS, CHSY3, PRDM2, DCK	0,039	oas01100:Metabolic pathways	KEGG_PATHWAY
NCKAP1L, ATG5	0,045	GO:0009410~response to xenobiotic stimulus	GOTERM_BP_DIRECT
METTL14, ONECUT2, PRDM2, DCK, ARHGEF5, NEK11	0,015	GO:0005654~nucleoplasm	GOTERM_CC_DIRECT
EPHA7, EFNA5	0,004	GO:0022407~regulation of cell-cell adhesion	GOTERM_BP_DIRECT
EPHA7, EFNA5	0,006	GO:0031290~retinal ganglion cell axon guidance	GOTERM_BP_DIRECT
EPHA7, EFNA5	0,004	GO:0045499~chemorepellent activity	GOTERM_MF_DIRECT
EPHA7, EFNA5	0,057	oas04360:Axon guidance	KEGG_PATHWAY
DOCK5, GTF2A1, PIGN, TUT4, PHACTR1, RPAP2, DCAF6	0,022	GO:0005829~cytosol	GOTERM_CC_DIRECT
KHDRBS3, SCMH1, PHACTR1, NRF1, FOXN2, FOXP1	0,064	GO:0005634~nucleus	GOTERM_CC_DIRECT
NRF1, SOX6, FOXN2, FOXP1	0,003	GO:0003700~transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	GOTERM_MF_DIRECT
KHDRBS3, ELMO1	0,066	GO:0017124~SH3 domain binding	GOTERM_MF_DIRECT
NRP1, GRIK4	0,020	GO:0099055~integral component of postsynaptic membrane	GOTERM_CC_DIRECT
SLC9A9, SLC26A4	0,026	GO:0006885~regulation of pH	GOTERM_BP_DIRECT
ATG5, LOC101112639	0,019	GO:0045060~negative thymic T cell selection	GOTERM_BP_DIRECT
SMOC2, NID1	0,045	GO:0010811~positive regulation of cell-substrate adhesion	GOTERM_BP_DIRECT
GRK5, NCKAP1L, ATG5	0,063	GO:0043066~negative regulation of apoptotic process	GOTERM_BP_DIRECT
ADAMTS12, NID1	0,094	GO:0007160~cell-matrix adhesion	GOTERM_BP_DIRECT
LOC101108019, BEST3	0,073	GO:0034707~chloride channel complex	GOTERM_CC_DIRECT
LOC101108019, BEST3	0,064	GO:0005254~chloride channel activity	GOTERM_MF_DIRECT
PIGN, USP4, KCNN3, BEST3	0,079	GO:0005886~plasma membrane	GOTERM_CC_DIRECT

PROOF

References

Abdoli, R., Zamani, P., Mirhoseini, S. Z., Ghavi Hossein-Zadeh, N., & Nadri, S. (2016). A review on prolificacy genes in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5), 631-637.

Abdoli, R., Mirhoseini, S. Z., Hossein-Zadeh, N. G., Zamani, P., Ferdosi, M. H., & Gondro, C. (2019). Genome-wide association study of four composite reproductive traits in Iranian fat-tailed sheep. Reproduction, Fertility and Development, 31(6), 1127-1133.

Abdoli, R., Mirhoseini, S. Z., Hossein-Zadeh, N. G., Zamani, P., Moradi, M. H., Ferdosi, M. H., & Gondro, C. (2019). Genome-wide association study of first lambing age and lambing interval in sheep. Small Ruminant Research, 178, 43-45.

Bakkum-Gamez, J. N., Wentzensen, N., Maurer, M. J., Hawthorne, K. M., Voss, J. S., Kroneman, T. N.,& Sherman, M. E. (2015). Detection of endometrial cancer via molecular analysis of DNA collected with vaginal tampons. Gynecologic Oncology, 137(1), 14-22.

Bonnet, A., Cabau, C., Bouchez, O., Sarry, J., Marsaud, N., Foissac, S., Woloszyn, F., Mulsant, Ph & Mandon-Pepin, B. (2013). An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. BMC Genomics, 14, 1-19.

Deng, T. X., Ma, X. Y., Lu, X. R., Duan, A. Q., Shokrollahi, B., & Shang, J. H. (2022). Signatures of selection reveal candidate genes involved in production traits in Chinese crossbred buffaloes. Journal of Dairy Science, 105(2), 1327-1337.

Dolebo, A. T., Khayatzadeh, N., Melesse, A., Wragg, D., Rekik, M., Haile, A., Rischkowsky, B., Rothschild, M. F., & Mwacharo, J. M. (2019). Genome-wide scans identify known and novel regions associated with prolificacy and reproduction traits in a sub-Saharan African indigenous sheep (*Ovis aries*). Mammalian Genome, 30(11), 339-352.

Drouilhet, L., Lecerf, F., Bodin, L., Fabre, S., & Mulsant, P. (2009). Fine mapping of the FecL locus influencing prolificacy in Lacaune sheep. Animal Genetics, 40(6), 804-812.

Elliott, M. R., & Ravichandran, K. S. (2010). ELMO1 signaling in apoptotic germ cell clearance and spermatogenesis. Annals of the New York Academy of Sciences, 1209(1), 30-36.

Elliott, M. R., Zheng, S., Park, D., Woodson, R. I., Reardon, M. A., Juncadella, I. J., Kinchen, J. M., Zhang, J., Lysiak, J. J., & Ravichandran, K. S. (2010). Unexpected requirement for ELMO1 in clearance of apoptotic germ cells in vivo. Nature, 467(7313), 333-337.

Esmaeili-Fard, S. M., Gholizadeh, M., Hafezian, S. H., & Abdollahi-Arpanahi, R. (2021). Genes and pathways affecting sheep productivity traits: genetic parameters, genome-wide association mapping, and pathway enrichment analysis. Frontiers in Genetics, 12, 710613.

Fox, J., Bouchet-Valat, M., Andronic, L., Ash, M., Boye, T., Calza, S., Chang, A.; Grosjean, P.; Heiberger, R.; & Pour, K. K. Package "Rcmdr". 2020. Available online: cran. ma. imperial. ac. uk/web/packages/Rcmdr/Rcmdr. pdf (accessed on 19 April 2020).

Roshandel Ghalezoo, M. R., 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), 47-72.

Gholizadeh, M., & Esmaeili-Fard, S. M. (2022). Meta-analysis of genome-wide association studies for litter size in sheep. Theriogenology, 180, 103-112.

Hamadalahmad, A., Almeziad, M., & Javadmanesh, A. (2020). Genetic similarity comparison between some Iranian and Middle Eastern sheep breeds using mitochondrial control region sequencing. DYSONA-Life Science, 1(1), 20-24.

Han, S., Zhou, L., Upadhyaya, A., Hyun Lee, S., Parker, K. L., & DeJong, J. (2001). TFIIAα/β-like factor is encoded by a germ cell-specific gene whose expression is up-regulated with other general transcription factors during spermatogenesis in the mouse. Biology of Reproduction, 64(2), 507-517.

Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., & Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). Biology of Reproduction, 70(4), 900-909.

Hernández-Montiel, W., Martínez-Núñez, M. A., Ramón-Ugalde, J. P., Román-Ponce, S. I., Calderón-Chagoya, R., & Zamora-Bustillos, R. (2020). Genome-wide association study reveals candidate genes for litter size traits in pelibuey sheep. Animals, 10(3), 434.

Hirschhorn, J. N., & Daly, M. J. (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. Nature Reviews Genetics, 6(2), 95-108.

Huang, Y. W., Jansen, R. A., Fabbri, E., Potter, D., Liyanarachchi, S., Chan, M. W., Liu, J. C., Crijns, A. P. G., Brown, R., Nephew, K . P ., van der Zee, A. G. J ., Cohn , D. E ., Yan , P. S ., Huang, T. H. M ., & Lin, H. J. L. (2009). Identification of candidate epigenetic biomarkers for ovarian cancer detection. Oncology Reports, 22(4), 853-861.

Jansson, T. (2014). Genes involved in ovulation rate and litter size in sheep. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences.

Johnston, S. E., McEwan, J. C., Pickering, N. K., Kijas, J. W., Beraldi, D., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., & Slate, J. O. N. (2011). Genome-wide association mapping identifies the genetic basis of discrete and quantitative variation in sexual weaponry in a wild sheep population. Molecular Ecology, 20(12), 2555-2566.

Kijas, J. W., Lenstra, J. A., Hayes, B., Boitard, S., Porto Neto, L. R., San Cristobal, M., Servin, B., McCulloch, R., Whan, V., Gietzen, K., Paiva, S., Barendse, W., Ciani, E., Raadsma, H., McEwan, J., Dalrymple, B., & International Sheep Genomics Consortium Members (2012). Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. PLoS biology, 10(2), e1001258. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001258

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). Scientific Reports, 6(1), 38096.

Lan, Q., Deng, Q., Qi, S., Zhang, Y., Li, Z., Yin, S., Yin, Sh., Li, Y., Tan, H., Wu, M., Yin, Y., He, J & Liu, M. (2023). Genome-wide association analysis identified variants associated with body measurement and reproduction traits in shaziling pigs. Genes, 14(2), 522.

Lawal, R. A., Al-Atiyat, R. M., Aljumaah, R. S., Silva, P., Mwacharo, J. M., & Hanotte, O. (2018). Whole-genome resequencing of red junglefowl and indigenous village chicken reveal new insights on the genome dynamics of the species. Frontiers in Genetics, 9, 370979.

Li, H., Liu, P., Xu, S., Li, Y., Dekker, J. D., Li, B., Fan, Y., Zhang , Z., Hong , Y., Yang , G., Tang , T., Ren, Y., Tucker, H. O., Yao, Z & Guo, X. (2017). FOXP1 controls mesenchymal stem cell commitment and senescence during skeletal aging. The Journal of clinical investigation, 127(4), 1241-1253.

Liu, P., Huang, S., Ling, S., Xu, S., Wang, F., Zhang, W., Zhou , R ., He , L ., Xia , X ., Yao , Z., Fan , Y ., Wang , N., Hu , C., Zhao , X., Tucker, H. O., Wang,J & Guo, X. (2019). Foxp1 controls brown/beige adipocyte differentiation and thermogenesis through regulating β3-AR desensitization. Nature Communications, 10(1), 5070.

Liu, K., Liu, Y., & Chu, M. (2024). Detection of polymorphisms in six genes and their association analysis with litter size in sheep. Animal Biotechnology, 35(1), 2309954.

Liu, Z., Ji, Z., Wang, G., Chao, T., Hou, L., & Wang, J. (2016). Genome-wide analysis reveals signatures of selection for important traits in domestic sheep from different ecoregions. BMC Genomics, 17, 1-14.

Liu, R., Sun, Y., Zhao, G., Wang, H., Zheng, M., Li, P., Liu, Li., & Wen, J. (2015). Identification of loci and genes for growth related traits from a genome-wide association study in a slow-× fast-growing broiler chicken cross. Genes & Genomics, 37, 829-836.

Mohammadi, H., Shahrebabak, H. M., & Taheri-Yeganeh, A. (2022). Genome-wide association study based on gene set enrichment method (pathway analysis) associated with litter size at birth in Zandi sheep. Agricultural Biotechnology Journal .

Mohammadi, F., Tahmoorespur, M., & Javadmanesh, A. (2019). Study of differentially expressed genes, related pathways and gene networks in sheep fetal muscle tissue in thin- and fat-tailed breeds. Animal Sciences Journal, 32(123), 301-312.

Onteru, S. K., Fan, B., Du, Z. Q., Garrick, D. J., Stalder, K. J., & Rothschild, M. F. (2012). A whole-genome association study for pig reproductive traits. Animal Genetics, 43(1), 18-26.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., Bakker, P.I. W., Daly, M. J., & 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.

Selionova, M., Trukhachev, V., Aibazov, M., Sermyagin, A., Belous, A., Gladkikh, M., & Zinovieva, N. (2024). Genome-Wide Association Study of Milk Composition in Karachai Goats. Animals, 14(2), 327.

Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., T. Imamichi & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). Nucleic acids research, 50(W1), W216-W221.

Shen, W., Sun, B., Zhou, C., Ming, W., Zhang, S., & Wu, X. (2020). CircFOXP1/FOXP1 promotes osteogenic differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells and bone regeneration in osteoporosis via miR-33a-5p. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 24(21), 12513-12524.

Souza, C. J. H., MacDougall, C., Campbell, B. K., McNeilly, A. S., & Baird, D. T. (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. Journal of Endocrinology, 169(2), R1.

Sun, X., Niu, Q., Jiang, J., Wang, G., Zhou, P., Li, J., & Ren, H. (2023). Identifying candidate genes for litter size and three morphological traits in Youzhou dark goats based on genome-wide Snp markers. Genes, 14(6), 1183.

Taheri, S., Zerehdaran, S., & Javadmanesh, A. (2022). Genetic diversity in some domestic and wild sheep and goats in Iran. Small Ruminant Research, 209, 106641.

Taheri, S., Saedi, N., Zerehdaran, S., & Javadmanesh, A. (2023). Identification of selection signatures in Capra hircus and Capra aegagrus in Iran. Animal Science Journal, 94(1), e13864.

Tao, L., Wang, X., Zhong, Y., Liu, Q., Xia, Q., Chen, S., He, X., Di, R & Chu, M. (2021). Combined approaches identify known and novel genes associated with sheep litter size and non-seasonal breeding. Animal Genetics, 52(6), 857-867.

Tao, L., Wang, X., Zhong, Y., Liu, Q., Xia, Q., Chen, S., He, X., Di, R., & Chu, M. (2021). Combined approaches identify known and novel genes associated with sheep litter size and non-seasonal breeding. Animal Genetics, 52(6), 857-867.

Tohidi, R., Javadmanesh, A., Ebrahimi Khoramabadi, E., & Ghasemi Bezdi, K. (2024). Investigation on single nucleotide polymorphism of BMPR1B and GDF9 genes in Mughani, Afshari and Baluchi ewes. Journal of Ruminant Research, 12(1), 69-84.

Tsartsianidou, V., Pavlidis, A., Tosiou, E., Arsenos, G., Banos, G., & Triantafyllidis, A. (2023). Novel genomic markers and genes related to reproduction in prolific Chios dairy sheep: a genome-wide association study. Animal, 17(3), 100723.

Uffelmann, E., Huang, Q. Q., Munung, N. S., De Vries, J., Okada, Y., Martin, A. R., Martin, H . C., Lappalainen, T, & Posthuma, D. (2021). Genome-wide association studies. Nature Reviews Methods Primers, 1(1), 59.

Vahedi, S. M., Salek Ardestani, S., Karimi, K., & Banabazi, M. H. (2022). Weighted single-step GWAS for body mass index and scans for recent signatures of selection in Yorkshire pigs. Journal of Heredity, 113(3), 325-335.

Worku, T., Wang, K., Ayers, D., Wu, D., Ur Rehman, Z., Zhou, H., & Yang, L. (2018). Regulatory roles of ephrinA5 and its novel signaling pathway in mouse primary granulosa cell apoptosis and proliferation. Cell Cycle, 17(7), 892-902.

Xu, S. S., Gao, L., Xie, X. L., Ren, Y. L., Shen, Z. Q., Wang, F., Shen, M., Eyþórsdóttir, E., Hallsson, JH., Kiseleva, T., Kantanen, J ., & Li, M. H. (2018). Genome-wide association analyses highlight the potential for different genetic mechanisms for litter size among sheep breeds. Frontiers in Genetics, 9, 118.

Yang, X., Mei, C., Ma, X., Du, J., Wang, J., & Zan, L. (2022). m6A methylases regulate myoblast proliferation, apoptosis and differentiation. Animals, 12(6), 773.

Xu, S. S., & Li, M. H. (2017). Recent advances in understanding genetic variants associated with economically important traits in sheep (*Ovis aries*) revealed by high-throughput screening technologies. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 4(3), 279-288.

Yuan, J., Sun, C., Dou, T., Yi, G., Qu, L., Qu, L., Wang, K., & Yang, N. (2015). Identification of promising mutants associated with egg production traits revealed by genome-wide association study. PLoS One, 10(10), e0140615.

Yi, W., Hu, M., Shi, L., Li, T., Bai, C., Sun, F., Ma, H., Zhao, Z ... & Yan, S. (2024). Whole genome sequencing identified genomic diversity and candidated genes associated with economic traits in Northeasern Merino in China. Frontiers in Genetics, 15, 1302222.

Zeng, P., Zhao, Y., Qian, C., Zhang, L., Zhang, R., Gou, J., Liu, J., Liu, L & Chen, F. (2014). Statistical analysis for genome-wide association study. Journal of biomedical research, 29(4), 285.

Zhao, F., Deng, T., Shi, L., Wang, W., Zhang, Q., Du, L., & Wang, L. (2020). Genomic scan for selection signature reveals fat deposition in Chinese indigenous sheep with extreme tail types. Animals, 10(5), 773.

PROOF