

پوش کل ژنومی و تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی مرتبط با صفات ساختاری بدن در نژادهای مختلف بز

مجید شکوهمند^۱، حسین محمدی^{۲*}، امیر حسین خلت آبادی فراهانی^۳، محمد حسین مرادی^۳
 ۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
 ۲. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
 ۳. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۲

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۷۵۸۴۵۷۲

Email: H-mohammadi64@araku.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ ASJ.2023.362337.2315

چکیده

هدف پژوهش حاضر، شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر صفات ساختاری بدن در برخی از نژادهای بز از طریق پوش ژنومی بر پایه آنالیز مسیر بود که با تراش‌های 50K گونه بز تعیین ژنوتیپ شده بودند. بدین منظور از ۸۷۹ رأس بز شامل نژادهای بینال (۶۳۱)، تدی (۱۱۴)، دیرا دین پناه (۲۱)، نجی (۳۳)، بربری (۲۳)، پهری (۴۱) و پوس‌وری (۱۶)، پنج صفت بیومتری ارتفاع قد از جدوگاه، دور سینه، طول بدن، عمق سینه و طول استخوان شرمگاهی رکورد جمع‌آوری شد. ارزیابی پوش ژنومی برای صفات مورد بررسی در نرم‌افزار GEMMA انجام شد، سپس با استفاده از بسته نرم افزاری *biomaRt2* برنامه R ژن‌های معنی‌داری که در داخل و یا ۱۵ کیلوباز بالا و پایین دست نشانگرهای معنی‌دار قرار داشتند، شناسایی گردید. در نهایت، آنالیز تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی با برنامه KOBAS با هدف شناسایی عملکرد بیولوژیکی ژن‌های نزدیک به مناطق انتخابی انجام شد. در این پژوهش مناطق ژنومی معنی‌دار مرتبط با صفات ساختاری بدن روی کروموزوم‌های ۱، ۴، ۵، ۶، ۱۰، ۱۱، ۱۶، ۱۷، ۲۲ و ۲۷ شناسایی شدند که شامل ژن‌های کاندیدای *PDE5A*، *WDR1*، *ATF3*، *SIPAIL1*، *TMT2*، *CHCHD3*، *SHROOM2*، *TBPL2*، *ASAHI*، *ADIPOQ* و *LRPPRC* بودند. بوسیله تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی، تعداد ۱۸ مسیر بیولوژیکی مرتبط شناسایی شد. از بین مسیرهای زیستی شناسایی شده نقش مهمی در ارتباط با سنتز کلاژن، فرآیند استخوان‌سازی، رشد عضلات اسکلتی و تنظیم یون کلسیم بر عهده داشتند. نتایج این تحقیق می‌تواند در درک ساز و کار ژنتیکی کنترل‌کننده صفات ساختاری بدن مورد استفاده قرار گیرد و با توجه به تأیید مناطق قبلی پوش ژنومی و شناسایی مناطق ژنومی جدید، استفاده از یافته‌های این پژوهش می‌تواند در انتخاب ژنتیکی بز مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: اندازه بدن، پوش ژنومی، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، ژن کاندیدا، صفات تیپ.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 142 pp: 59-72**Genomic wide association study (GWAS) (related to body conformation traits in different goat breeds**By: M. Shokohmand¹, H. Mohammadi^{*2}, A. H. Khaltabadi Farahani³, M. H. Moradi³

1. MSc student animal breeding and genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran.

3. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran.

Received: May 2023**Accepted: July 2023**

The present study aimed to conduct a genome wide association studies based on Gene-set enrichment analysis for identifying the loci associated with conformation traits in some goats genotyped with the Caprine 50K SNP chip. For this purpose, 879 samples including Beetal (631), Daira Din Pannah (21), Nachi (33), Barbari (23), Teddi (114), Pahari (41) and Pothwari (16) phenotype records related to body length, body height, pubic bone length, heart girth and chest length were obtained. Genome wide association study was performed with conformation traits using GEMMA software. Using the *biomaRt2* R package the SNP were assigned to genes if they were within the genomic sequence of the gene or within a flanking region of 15 kb up- and downstream of the gene. Finally, a gene enrichment analysis was performed with the KOBAS platform from online bioinformatics databases for the assignment of the genes to functional categories. In this research, genomic region related to conformation traits on chromosomes 1, 4, 5, 6, 10, 11, 16, 17, 22 and 27 were identified. Also, genes related to body conformations traits in our study included *PDE5A*, *WDR1*, *ATF3*, *SIPA1L1*, *TMTC2*, *CHCHD3*, *SHROOM2*, *TBPL2*, *ADIPOQ*, *ASAHI* and *LRPPRC*. According to pathway analysis, 18 pathways from gene ontology and biological pathways were associated with the conformation traits. The results of our research can be used to understand the genetic mechanism controlling conformation traits and considering, this study supported previous results from GWAS of conformation traits, also revealed additional regions, using these findings could potentially be useful for genetic selection in goat.

Key words: Body size, Candidate gene, Genome scan, SNP, Type traits.**مقدمه**

تیپ بدن به عنوان شاخص‌های مهم انتخاب در نظر گرفته می‌شوند (Moaeen ud Din و همکاران، ۲۰۲۲).

در طی سال‌های اخیر، تکنیک‌های بیولوژی مولکولی با سرعت شگرفی توسعه پیدا کرده و موجب گردیده است تا پروژه‌های مختلف توالی‌یابی کل ژنوم، از جمله بز در سال ۲۰۱۰ میلادی توسط کنسرسیوم بین‌المللی ژنوم بز (IGGC) تکمیل شود و متعاقب آن پانل‌های مختلفی از آرایه‌های نانویی با تراکم متفاوت طراحی شده و انجام مطالعات پویش کل ژنومی را امکان پذیر

صفات بیومتری یا اندازه‌گیری‌های بدنی برای تخمین میزان خوراک مصرفی، صفات تولیدمثلی و وزن لاشه در گونه‌های مختلف از جمله بز استفاده می‌شوند. این روش، به خصوص در مناطقی که شرایط محیطی و مدیریتی، اجازه اندازه‌گیری آسان وزن را در دام‌ها نمی‌دهد، می‌تواند مناسب باشد. وزن بدن صفت مهم اقتصادی در انتخاب حیوانات و از اهداف اصلی برنامه‌های اصلاح نژادی می‌باشد (Zhang و همکاران ۲۰۲۱). این امر بویژه در نژادهای گوشتی حائز اهمیت است که در آنها سرعت رشد و

¹ International Goat Genome Consortium (IGGC)

نسبت به آنالیز پویش ژنومی بر پایه تک نشانگری داشت (Esmaeili-Fard و همکاران، ۲۰۲۱). مطالعه‌ی مروری با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای و مسیرهای زیستی مرتبط با تعداد بره متولد شده در گوسفند براساس آنالیز مسیر انجام شده است، از میان ۲۱ ژن کاندیدای شناسایی شده ژن‌های *FLT1* و *CCL2* و از میان ۲۰ مسیر زیستی مرتبط با تعداد نتاج، مسیر زیستی *negative regulation of vascular endothelial cell proliferation* بیشترین ارتباط را با تعداد نتاج متولد شده در هر زایش را داشتند (قیاسی و عبداللهی آرپناهی، ۲۰۲۱).

داده‌های مورد استفاده در این پژوهش، قبلاً با هدف آنالیز پویش کل ژنومی براساس مدل‌های خطی کلاسیک با در نظر گرفتن تصحیح نرخ کشف کاذب-بنجامین هوشبرگ برای تعیین آستانه معنی‌داری و جلوگیری از خطای نوع اول مرتبط با صفات ساختاری بدن شامل وزن بدن، ارتفاع قد از جدوگاه، دور سینه، طول بدن، عمق سینه و طول استخوان شرمگاهی استفاده شده بود. نتایج این تحقیق نشان داد ژن‌های کاندیدای *ATP2B4*، *IF2*، *THEGL*، *EPHA5* و *THEGL* ارتباط معنی‌داری با صفات مورد بررسی دارند (Moaeen-ud-Din و همکاران، ۲۰۲۲).

تا به امروز اکثر مطالعات پویش کل ژنومی در نژادهای مختلف بز براساس آنالیز رگرسیونی تک نشانگری و مرتبط با صفات تعداد نتاج (Bai و همکاران، ۲۰۲۱)، رنگ بدن (Martin و همکاران، ۲۰۱۶)، وضعیت شاخ‌داری (Guo و همکاران، ۲۰۲۱) و تولید شیر (Tilahun و همکاران، ۲۰۲۰) بوده است و تحقیقات بسیار اندکی پویش ژنومی براساس آنالیزهای مسیر صورت گرفته است. بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر، آنالیز پویش کل ژنومی براساس تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی و مسیرهای زیستی مرتبط با برخی از صفات ساختاری در نژادهای مختلف بز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر از اطلاعات ژنوتیپی مجموع ۸۷۹ رأس بزهای غیر خویشاوند (۳۶۶ رأس دام نر و ۵۱۳ رأس دام ماده) مربوط به نژادهای بیتال^۳ (۶۳۱ رأس)، تدی^۴ (۱۱۴ رأس)، دیرا دین پناه^۵ (۲۱

نماید. مطالعه پویش کل ژنومی می‌تواند به شناسایی دقیق‌تر مناطق ژنومی و متعاقب آن ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات اقتصادی کمک کرده و یافته‌های آن برای انتخاب به کمک نشانگر مفید باشد (Johnston و همکاران، ۲۰۱۱).

در مطالعات پویش کل ژنومی به طور معمول از تصحیحات بنفرونی یا نرخ کشف کاذب برای تعیین آستانه معنی‌داری و جلوگیری از خطای نوع اول استفاده می‌گردد. یکی از ایرادات تحقیقات مطالعات پویش ژنومی در نظر گرفتن آستانه معنی‌داری برای جلوگیری از بروز خطای نوع اول است. در حالی که پرهیز از خطای نوع اول سبب افزایش خطای نوع دوم و در نظر نگرفتن SNP‌های دارای اثر معنی‌دار پایین‌تر از آستانه می‌شود (Marjanovic و همکاران، ۲۰۲۰؛ Taiwo و همکاران، ۲۰۲۲).

یک جایگزین مناسب برای حل این مشکل، انجام مطالعات پویش کل ژنومی بر مبنای مسیر^۲ با استفاده از تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی است. در واقع در این روش به جای انجام تجزیه برای یک SNP یا یک ژن، ارتباط بین صفت مورد مطالعه و واریانت‌های ژنتیکی در یک دسته یا گروه ژنی که به طور عملکردی با هم مرتبط هستند بررسی می‌شود. به عبارت دیگر ارتباط آماری بین یک مجموعه ژنی معنی‌دار با فنوتیپ، مورد آزمون قرار می‌گیرد (Abdalla و همکاران، ۲۰۲۳).

اخیراً، پژوهشی با عنوان مطالعه ارتباط سنجی در سطح ژنوم برپایه تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی برای شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر نرخ دو قلو زایی در ۹۶ گوسفند بلوچی که براساس نرخ دو قلو زایی بالا و پایین انتخاب شده بودند، موفق به شناسایی ژن‌های کاندیدا شامل *SRSF11*، *ANKRD13C*، *CTH*، *LDHB*، *PTGER3*، *LRRC40* و *NTRK2* روی کروموزوم‌های شماره ۱، ۳، ۱۰، ۱۵ و ۲۵ شدند. همچنین مسیرهای زیستی *cell adhesion*، *defense response* و *cell junction* گزارش شده بودند، نتایج نشان داد روش پویش ژنومی بر مبنای مسیر کارآیی بالاتری برای یافتن مناطق ژنومی و درک بهتری از معماری ژنتیکی صفت تعداد نتاج متولد شده

³ Beetal

⁴ Teddi

⁵ Daira Din Pannah

² Pathway-based analysis

رأس)، نجی^۶ (۳۳ رأس)، بربری^۷ (۲۳)، پهری^۸ (۴۱ رأس) و پوس-وری^۹ (۱۶ رأس) استفاده گردید. استخراج DNA توسط دانشگاه PMAS-Arid Agriculture پاکستان انجام شده بود. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت بالای DNA استخراج شده، نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های شرکت ایلومینا Caprine 50 K SNP Bead Chip برای ۵۳۳۴۷ جایگاه نشانگری تعیین ژنوتیپ شده بودند. داده‌های مورد استفاده این پژوهش در پایگاه برخط figshare

(<https://figshare.com/articles/dataset/19668633>)

در دسترس می‌باشد. در این پژوهش از اطلاعات فنوتیپی مرتبط با صفات ساختاری بدن شامل ارتفاع قد از جدوگاه، دور سینه، طول بدن، عمق سینه و طول استخوان شرمگاهی استفاده گردید. جدول ۱ آمار توصیفی صفات مورد بررسی مرتبط با صفات ساختاری بدن در این پژوهش را نشان می‌دهد.

برای فیلتراسیون داده‌های تعیین ژنوتیپ شده، ابتدا نمونه‌هایی که فراوانی نرخ تعیین ژنوتیپ آنها کمتر از ۹۵٪ بود، شناسایی و حذف شد. در مرحله بعد نشانگرهایی که حداقل فراوانی آلی در آنها کمتر از ۵٪ بود حذف شدند. همچنین نشانگرهایی که در تعادل هاردی-واینبرگ نبودند و یا موقعیت نامشخص روی کروموزوم داشتند، کنار گذاشته شدند. مراحل مختلف فیلتراسیون با استفاده از نرم افزار PLINK (نسخه ۱/۹) انجام شد (Purcell و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین در این تحقیق برای بررسی وجود یا عدم وجود لایه‌بندی جمعیتی با استفاده از روش کنترل ژنومیک از طریق فاکتور تورم کنترل جمعیتی (λ) در نرم افزار PLINK بررسی شد.

⁶ Nachi

⁷ Barbari

⁸ Pahari

⁹ Pothwari

جدول ۱- آمار توصیفی صفات ساختاری بدن مورد بررسی شده در نژادهای مختلف بز

صفات	تعداد رکورد	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
دور سینه (سانتی متر)	۸۲۷	۷۶/۳۳	۱۲/۱۲	۲۴/۰۰	۱۱۰/۰۰
ارتفاع قد از جدوگاه (سانتی متر)	۸۲۷	۷۶/۸۸	۱۱/۵۲	۱۲/۰۰	۱۱۱/۰۰
طول بدن (سانتی متر)	۸۲۷	۶۷/۷۳	۱۰/۵۱	۱۹/۰۰	۹۶/۰۰
طول استخوان شرمگاهی (سانتی متر)	۸۲۷	۱۱/۹۳	۲/۶۹	۳/۰۰	۲۱/۵۰
عمق سینه (سانتی متر)	۸۲۷	۲۰/۴۷	۴/۴۰	۶/۰۰	۳۹/۰۰

آنالیز پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر

جهت ارتباط فنوتیپ‌ها با ژنوتیپ‌ها از نرم افزار GEMMA (ژو و استیفن، ۲۰۱۲) نسخه ۰/۹۸ استفاده شد. مدل مورد استفاده بر پایه مدل خطی مختلط به شکل زیر بود:

$$y = Wa + x\beta + Zu + e$$

که y : بردار مشاهدات فنوتیپی، a بردار اثرات ثابت شامل نژاد و جنس، x : بردار ژنوتیپ‌های نشانگر تحت آزمون، u بردار اثرات پلی‌ژنیک، e بردار اثر باقی‌مانده‌های تصادفی و β ، Z و W ماتریس‌های طرح ارتباط دهنده.

آنالیز پویش ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی در سه مرحله انجام گردید: (۱) تعیین مکان SNP‌های معنی‌دار با ژن (۲) ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی (۳) پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر

۱- تعیین مکان SNP‌ها با ژن‌ها: SNP‌هایی که مقدار P -value آنها کمتر از ۰/۰۵ بود با استفاده از بسته نرم افزاری *biomaRt2* در محیط R و با استفاده از ژنوم مرجع بز (*ARSI*) به ژن‌هایی که نشانگر SNP مورد نظر در داخل آن ژن و یا ۱۵kb بالادست یا پایین دست آن ژن قرار داشت، ارتباط داده شدند (Clancey و همکاران، ۲۰۱۹). ۲- ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی: جهت تعیین طبقات عملکردی ژنی و مسیرهای متابولیکی و تنظیمی ژن‌های معنی‌دار از پایگاه‌های اطلاعاتی شامل GO (<http://www.geneontology.org>)، KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>)، Panther

BioCyc (<http://www.pantherdb.org>),

Reactome و (<http://www.BioCyc.org>)

(<http://www.reactome.org>) جهت تعیین طبقات

عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی استفاده می‌نماید. در این مرحله

فرض بر این است که ژن‌هایی که در یک طبقه عملکردی خاص

از سه مجموعه ژنی هستی شناسی قرار می‌گیرند می‌توانند به عنوان

یک گروه از ژن‌هایی که برخی از ویژگی‌های خاص و مشترک

دارند. ۳- پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر: ارتباط‌های معنی‌دار

مسیرهای عملکردی مرتبط با صفات تولیدمثلی با استفاده از توزیع

فوق هندسی^{۱۰} و آماره Fisher's exact test مورد آزمون قرار

گرفت. تجزیه غنی‌سازی مجموعه ژنی با استفاده از بسته نرم

افزاری *KOBAS* (Bu و همکاران، ۲۰۲۱) انجام گردید. در

نهایت برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به دست آمده از پایگاه-

های اطلاعاتی آنالیز GeneCards

UniProtKB و (<http://www.genecards.org>)

(<http://www.uniprot.org>) استفاده شد.

نتایج

مراحل مختلف کنترل کیفیت در جدول ۲ ارائه شده است. از

مجموع ۵۳۳۴۷ نشانگر SNP به کار رفته در این تحقیق، ۳۶۸۶۱

نشانگر توانستند مراحل مختلف کنترل کیفیت را بگذرانند. به طور

کلی ۳۹۶۳ نشانگر به دلیل حداقل فراوانی آلی کمتر از ۰/۰۵،

۱۳۴۲ نشانگر به دلیل نرخ تعیین ژنوتیپ کمتر از ۹۵٪ در هر نمونه،

۹۷۶۱ نشانگر به دلیل عدم تعادل هاردی واینبرگ و ۱۴۲۰ نشانگر

¹⁰ Hypergeometric

کیفیت و میانگین فاصله بین دو نشانگر SNP در جدول ۳ نشان داده شده است.

با موقعیت ناشناخته و همچنین ۵۲ نمونه به دلیل فراوانی تعیین ژنوتیپ کمتر از ۹۰٪ حذف شدند. تعداد نشانگرها به ترتیب کروموزوم، تعداد نشانگرها به ازای هر کروموزوم بعد کنترل

جدول ۱- مراحل مختلف فیلتراسیون داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ قبل از آنالیز پوش کل ژنومی

۸۷۹	تعداد حیوانات
۵۲	حذف نمونه‌هایی با بیش از ۱۰٪ ژنوتیپ از دست رفته
۸۲۷	تعداد کل نمونه‌های باقی‌مانده
۵۳۳۴۷	تعداد کل نشانگرهای مورد بررسی
۳۹۶۳	حذف نشانگرها با حداقل فراوانی آللی در آنها کمتر از ۵٪
۱۳۴۲	حذف نشانگرهای با نرخ فراخوانی کمتر از ۹۵٪ در هر نمونه
۹۷۶۱	حذف نشانگرها با انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ (10^{-6})
۱۴۲۰	حذف نشانگرها با موقعیت نامشخص
۳۶۸۶۱	تعداد نشانگرهای باقی‌مانده

ژن‌های معنی‌دار در نژاد مورد بررسی ۲۸۴۹ ژن بودند، یعنی حداقل یک نشانگر با P-value کمتر از ۰/۰۵ در داخل و یا در بالا یا پایین دست این ژن تا فاصله ۱۵ kb قرار گرفت. این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفات ساختاری بدن برای تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی انتخاب شدند. تعداد مجموعه‌های ژنی حاصل از پایگاه‌های داده‌ای مختلف شامل ۱۴۸ طبقات هستی‌شناسی به دست آمد و ۲۵ مسیر بیوشیمیایی مشاهده شد. مسیرهای که بیشتر از سه ژن و کمتر از ۳۰۰ ژن داشتند گزارش شده‌اند.

بحث

در شکل ۲-a و ۲-b نتایج ارتباط نشانگرهای SNP با صفات طول بدن و ارتفاع قد از جدوگاه مشاهده می‌شود. جزئیات کامل ترم‌های هستی‌شناسی و مسیرهای بیوشیمیایی، به همراه اسامی ژن‌های کاندیدا در جدول ۴ ارائه شده است. مهمترین مناطق ژنومی شناسایی شده مرتبط با صفت طول بدن به ترتیب روی کروموزوم شماره ۶ (دو منطقه) و کروموزوم شماره ۱۶ بودند. همچنین در ارتباط با صفت ارتفاع قد از جدوگاه مهمترین مناطق ژنومی به ترتیب روی کروموزوم‌های شماره ۵ و ۱۰ شناسایی شدند،

پلات‌های Q-Q و منتهن مرتبط با صفات ساختاری بدن در شکل-های ۱ و ۲ ارائه شده است. چندین روش برای تخمین کنترل تورم ژنومیکی (λ) وجود دارد که در این تحقیق روش تخمین گر میانه اجرا شد. فاکتور تورم کنترل جمعیتی بزرگتر از ۱ ($\lambda > 1$) وجود لایه‌بندی جمعیتی و یا خطای تعیین ژنوتیپ را نشان می‌دهد. فاکتور لامبدا از طریق تجزیه و تحلیل پیوستگی در PLINK برای صفات مورد مطالعه محاسبه شد که برای صفات ارتفاع قد از جدوگاه، دور سینه، طول بدن، عمق سینه و طول استخوان شرمگاهی به ترتیب ۱/۰۳۴، ۱/۰۰۹، ۱/۰۱۲، ۱/۰۰۶ و ۱/۰۲۱ بود که همان طور که مشاهده می‌شود تقریباً برابر با ۱ بودند و نشان دهنده عدم وجود لایه‌بندی جمعیتی برای اجرای تجزیه و تحلیل-های پوش کل ژنومی بود. در مطالعاتی که لامبدا کوچکتر از ۱/۱ یا مساوی ۱ است نیازی به تصحیح اثرات ساختار جمعیتی نیست (Hinrichs و همکاران، ۲۰۰۹).

شناسایی ژن‌های کاندیدا مرتبط با صفات در مناطق ژنومی شناسایی شده

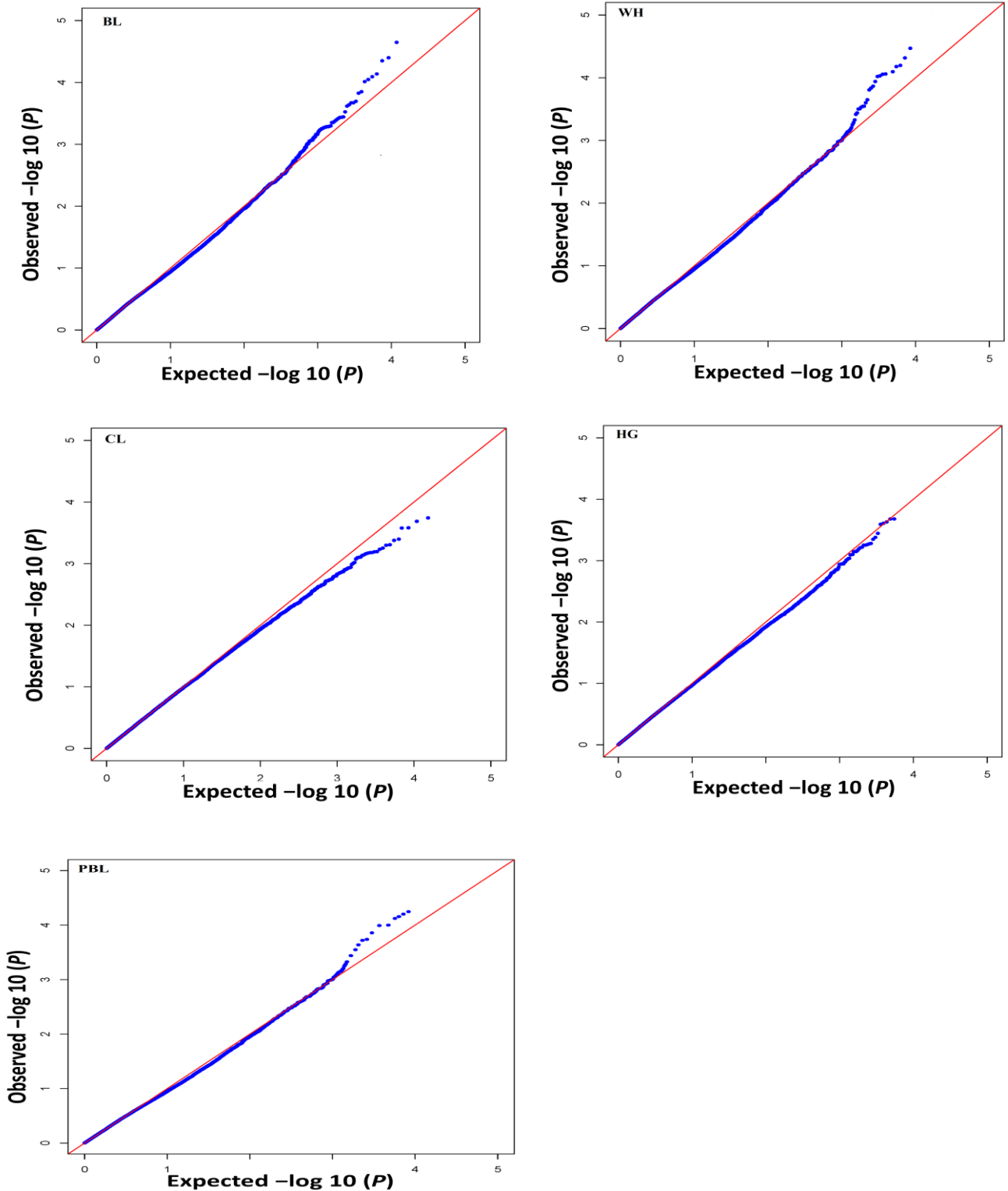
تعداد ۲۶۱۰۹ عدد ژن از ۲۷۰۵۴ ژن حاشیه‌نویسی شده در بز به وسیله نشانگرهای SNP پوشش داده شد که در این میان تعداد

regulation of MAP kinase morphogenesis
positive calcium ion homeostasis, activity
و regulation of muscle cell differentiation
Calcium ion transport اشاره کرد (جدول ۴).

همچنین ناحیه ژنومی مشترک با صفت طول بدن روی کروموزوم
شماره ۶ شناسایی شد. از مسیرهای مهم و معنی‌دار حاوی ژن‌های
کاندیدای مرتبط با طول بدن و ارتفاع قد از جدوگانه را می‌توان به
مسیرهای بیولوژیکی anatomical structure

جدول ۲- توزیع تعداد نشانگرهای SNP بعد از کنترل کیفی و میانگین فاصله آن‌ها به تفکیک کروموزوم‌های مختلف

شماره کروموزوم	طول کروموزوم (مگا جفت‌باز)	تعداد نشانگر بعد از کنترل کیفی	میانگین فاصله بین نشانگرهای SNP (کیلو جفت‌باز)
۱	۱۵۷/۴۰۳	۲۱۵۶	۷۳/۰۰
۲	۱۳۶/۵۱۰	۲۱۲۲	۶۴/۳۳
۳	۱۲۰/۰۳۸	۱۶۸۶	۷۱/۲۰
۴	۱۲۰/۷۳۴	۱۷۹۱	۶۷/۴۱
۵	۱۱۹/۰۲۰	۱۶۵۰	۷۲/۱۳
۶	۱۱۷/۶۴۲	۱۵۶۸	۷۵/۰۲
۷	۱۰۸/۴۳۳	۱۵۵۵	۶۹/۷۳
۸	۱۱۲/۶۷۲	۱۷۷۳	۶۳/۵۵
۹	۹۱/۵۶۸	۱۳۲۹	۶۸/۹۰
۱۰	۱۰۱/۰۸۷	۱۵۸۲	۶۳/۹۰
۱۱	۱۰۶/۲۲۵	۱۵۸۹	۶۶/۸۵
۱۲	۸۷/۲۷۷	۱۳۴۰	۶۵/۱۳
۱۳	۸۳/۰۳۴	۱۱۲۵	۷۳/۸۱
۱۴	۹۴/۶۷۲	۱۳۵۵	۶۹/۸۷
۱۵	۸۱/۹۰۴	۱۱۶۸	۷۰/۱۲
۱۶	۷۹/۳۷۰	۱۱۰۵	۷۱/۸۳
۱۷	۷۱/۱۳۷	۱۰۴۶	۶۸/۰۱
۱۸	۶۷/۲۷۵	۷۷۳	۸۷/۰۳
۱۹	۶۲/۵۱۶	۸۲۶	۷۵/۶۸
۲۰	۷۱/۷۸۴	۱۱۲۷	۶۳/۶۹
۲۱	۶۹/۴۲۵	۱۰۷۶	۶۴/۵۲
۲۲	۶۰/۲۸۳	۸۲۰	۷۳/۵۱
۲۳	۴۸/۸۶۶	۷۲۰	۶۷/۸۷
۲۴	۶۲/۳۱۰	۹۳۹	۶۶/۳۵
۲۵	۴۲/۸۵۸	۵۸۶	۷۳/۱۳
۲۶	۵۱/۴۲۱	۷۸۶	۶۵/۴۲
۲۷	۴۴/۷۰۹	۶۸۱	۶۵/۶۵
۲۸	۴۴/۶۷۲	۶۸۳	۶۵/۴۰
۲۹	۵۱/۳۳۲	۷۲۰	۷۱/۲۹
X	۱۱۵/۹۴۳	۵۵۹	۲۰۷/۴۱



شکل ۱. پلات‌های Q-Q برای صفات ساختاری بدن. طول بدن (BL) ارتفاع قد از جدوگاه (WH)، عمق سینه (CL)، دور سینه (HG) و طول استخوان شرمگاهی (PBL).

کاندیدای *CHCHD3*، *SHROOM2*، *TBPL2* و *ADIPOQ* بودند.

در مطالعه پویش کل ژنومی مرتبط با صفات ساختاری بدن در بزهای Karachai، ژن کاندیدای *ADIPOQ* مرتبط با صفت عمق سینه گزارش شده است (Easa و همکاران، ۲۰۲۲). ژن کاندیدای *ADIPOQ* نقش کلیدی در تفرق سلول‌های ماهواره-ای عضلات اسکلتی دارد (Chuluun-Erdene و همکاران، ۲۰۲۰). مطالعه‌ی پویش ژنومی در گاوهای گوشتی سمینتال با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با رشد عضله انجام شده بود، ژن *CHCHD3* را گزارش کردند (Bordbar و همکاران، ۲۰۱۹). همچنین ژن *CHCHD3* در احیای مولکول ATP، مصرف اکسیژن، تاخوردگی کمپلکس پروتئینی و اتصال آنزیم فسفاتاز نقش دارد و در عضلات اسکلتی بیان ژن بالایی دارد. ژن کاندیدای *SHROOM2* در انتقال یون سدیم در سطح غشای سلولی و فعال کردن مولکول میوزین نقش دارد (genecards). علاوه بر این ژن *TBPL2* به عنوان یک فاکتور رونویسی در تمایز سلول‌های عضلانی و رشد و نمو اندام‌های بدن مشارکت دارد (genecards).

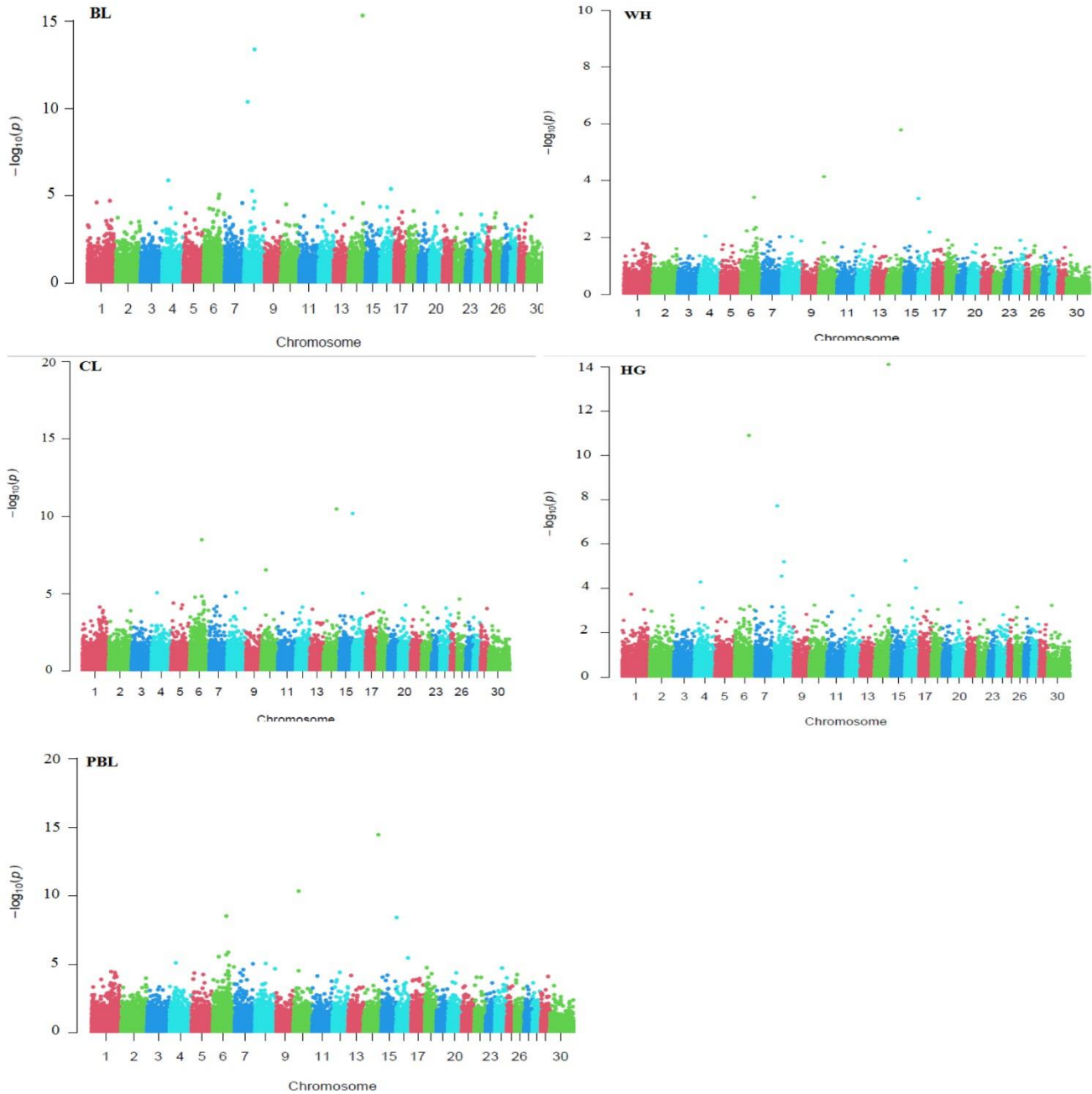
در شکل ۲-e، نتایج ارتباط نشانگرهای SNP با صفت طول استخوان شرمگاهی مشاهده می‌شود. مهمترین مناطق ژنومی حاوی ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفت (جدول ۲) به ترتیب روی دو ناحیه مختلف کروموزوم شماره ۲۷ و کروموزوم شماره ۱۱ بدست آمد. از مسیرهای اصلی معنی‌دار مرتبط با طول استاپل *hormone-mediated signaling pathway* و *Adipose tissue development* بدست آمد که جزء فرآیندهای زیستی می‌باشند. که بین ژن‌های کاندیدای موجود در این مسیرها، ژن‌های کاندیدای *ASAHI* و بیشترین ارتباط را داشتند. در مطالعه پویش کل ژنومی مرتبط با صفات ساختاری بدن در بزهای Karachai، ژن کاندیدای *ASAHI* مرتبط با صفت طول بدن گزارش شده است (Easa et al., 2022). ژن *ASAHI* نقش مهمی در فرآیند متابولیسم اسیدهای چرب دارد. همچنین مطالعه‌ی پویش کل ژنومی در خوک‌های نژاد دانمارکی،

از ژن‌های کاندیدای شناسایی شده مرتبط با طول بدن می‌توان به ژن‌های *ACTR3B*، *WDR1*، *PDE5A* و *ATF3* اشاره کرد. همچنین در ارتباط با صفت ارتفاع قد از جدوگاه می‌توان به ژن‌های کاندیدای *SIPA1L1* و *TMTC2* اشاره کرد. که از بین این ژن‌ها، ژن کاندیدای *ATF3* در مطالعات قبلی ارتباط معنی-داری با سنتز کلاژن در بزهای شیری نژاد مورسیا-گرانادا مرتبط با صفات ساختاری دست و پا گزارش شده است (Luigi-Sierra و همکاران، ۲۰۲۰). در مطالعه پویش ژنومی با هدف شناسایی جایگاه‌های ژنی تحت انتخاب مثبت در بزهای بوئر استرالیایی مرتبط رشد و توسعه عضلات بدن، ژن کاندیدای *PDE5A* گزارش شده است (Yang و همکاران، ۲۰۲۱). ژن کاندیدای *SIPA1L1* در مطالعه پویش کل ژنومی با هدف شناسایی ژن‌های مرتبط با صفات ساختاری بدن در بزهای نژاد Dazu Black گزارش شده است و نقش تنظیمی افزایشی روی رشد و توسعه سلول‌های استئوبلاستی دارد (Gu و همکاران، ۲۰۲۲). علاوه بر این ژن کاندیدای *TMTC2* در توازن یون کلسیم نقش کلیدی دارد (Jiang و همکاران، ۲۰۱۹). همچنین در مطالعه‌ای با هدف بررسی چندشکلی موجود در ژن کاندیدای *ACTR3B* با صفات تیپ در گاوهای نژاد گوشتی، ارتباط معنی‌داری بین ژن کاندیدای *ACTR3B* با عرض استخوان‌های هیپ در نژادهای سمینتال و آنگوس گزارش شده است (Edgar و همکاران، ۲۰۰۱).

در شکل ۲-c و ۲-d، نتایج ارتباط نشانگرهای SNP با صفات مرتبط با عمق سینه و دور سینه ارائه شده است. مهمترین مناطق ژنومی مرتبط با صفت عمق سینه روی کروموزوم شماره ۱ و پس از آن منطقه ژنومی روی کروموزوم شماره ۱ شناسایی گردید. همچنین در ارتباط با صفت دور سینه مناطق ژنومی روی کروموزوم شماره ۱ و پس از آن منطقه ژنومی روی کروموزوم شماره ۱۰ شناسایی شد. از مسیرهای هستی‌شناسی معنی‌دار مرتبط با صفات عمق و دور سینه می‌توان به مسیرهای *anatomical Positive regulation of structure homeostasis*، *Positive regulation of cytosolic ossification* و *calcium ion concentration* اشاره کرد که حاوی ژن‌های

LRPPRC نقش کلیدی در تنظیم فعالیت شبکه سایتواسکتون داشته و دارای نقش ضروری در فرآیند استخوان سازی دارد.

ژن کاندیدای *LRPPRC* مرتبط با صفات ساختاری دست و پا گزارش شده است (Le و همکاران، ۲۰۱۷). ژن کاندیدای



شکل ۲. پلات های منهن حاصل از مطالعات پویش کل ژنومی برای صفات ساختاری بدن. طول بدن (BL) ارتفاع قد از جدوگاه (WH)، عمق سینه (CL)، دور سینه (HG) و طول استخوان شرمگاهی (PBL).

جدول ۴- تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار ($P < 0.05$) مرتبط با ساختاری بدن و ژن‌های کاندیدای شناسایی شده

دسته هستی‌شناسی (صفت)	نام مسیر (GO)	ژن‌های معنی‌دار	ژن‌های کاندیدای مرتبط	P-adjust
فرآیند زیستی				
GO_BP (BL)	GO: 0006486:protein glycosylation	۹	<i>MDM4, PIK3C2B, PPP1R15B, KISS1, PLEKHA6, GOLT1A, ETNK2, SNRPE</i>	۰/۰۲۳
	GO: 0009653:Anatomical structure morphogenesis	۶	<i>CCDC146, FGL2, ARMC10, NAPEPLD, FAM185A, PDE5A STRAP, SMC5, TEP1, PRKCQ, MC4R, USH2A, NPHP4, RSBN1L, WDR1, FBXL13, GSAP</i>	۰/۰۴۱
	GO: 0043405:regulation of MAP kinase activity	۱۱	<i>THR3, NR1H3, RPL15, ATF3, FBN2, NLK, STRAP, TGFB3, TRIM33, ZFH3</i>	۰/۰۲۹
	GO: 0055074:calcium ion homeostasis	۱۰	<i>MFSD6, TENM3, SIPA1L1, DCTD, SMARCAD1, ATOH1, OGN, PLXNA1, PLXNA2, SMAD2 PIK3R3, SIRPB1, TGFB2, AKT3, FOSL2, SOX1, TUBGCP3, UBE2K, N4BP2, TMTC2, RHOH, CHRNA9</i>	۰/۰۴۵
GO_BP (WH)	GO: 0060538: skeletal muscle organ development	۱۰		۰/۰۰۷
	GO:0051149: positive regulation of muscle cell differentiation	۱۲		۰/۰۱۹
	GO:0006816: Calcium ion transport	۶	<i>CCDC146, FGL2, ARMC10, NAPEPLD, FAM185A, ACTR3B</i>	
GO_BP (CL)	GO:0007204: anatomical structure homeostasis	۸	<i>PTGFR, PTPN6, RPL36AL, MGAT2, ARF6, SOS2, LIG1, CHCHD3</i>	۰/۰۲۸
	GO:0055074: Calcium ion homeostasis	۱۱	<i>GLP1R, F2RL3, PTGER4, SPPPL3, SMDT1, GLP1R, CYTH2, RPL18, TTC21B, SHROOM2, GALNT3</i>	۰/۰۱۴
GO_BP (HG)	GO: 0045778: Positive regulation of ossification	۱۲	<i>GPCPD1, GDF3, MEGF10, CHL3A1, DLL4, EGLN1, MIC1, TCF19, CCHCR1, TBPL2, VARS2, PPP1R18</i>	۰/۰۲۶
	GO: 0007204: Positive regulation of cytosolic calcium ion concentration	۱۰	<i>CAPN3, FOXN2, VAX1, BTG2, KCNJ14, CSRN3, PQLC1, KCNG2, NFATC1, ADIPOQ</i>	۰/۰۳۲
GO_BP (PBL)	GO:0009755:hormone-mediated signaling pathway	۷	<i>ARFGEF1, CPA6, PREX2, ASAH1, STMN2, HEY1, MRPS28</i>	۰/۰۰۶
	Adipose tissue development GO:0060612	۹	<i>LRPPRC, DGKZ, ATG13, ARHGAP1, ZNF408, PLDB2, OAS2, OAS1Y, OAS1X</i>	۰/۰۲۵
اجزای سلولی				
GO_CC	GO:0034704: Calcium channel complex	۱۱	<i>AKAP6, SESTD1, ANXA2, ANXA5, CACNA1C, CACNA1B, CACNA1G, CACNA1H, CCDC109B, SMDT1, TRPC4</i>	۰/۰۰۱۷

GO:0034703:Cation channel complex	۴	<i>TACR2, PDGFRA, SLC25A4, EGLN1</i>	۰/۰۱۲
GO_MF			
GO:0015485:Cholesterol binding	۵	<i>TGFBR2, AKT3, FOSL2, FCGR2A, FCGR2B</i>	۰/۰۰۹
مسیرهای بیوشیمیایی			
Panther Pathway P04923:Regulation of lipolysis in adipocytes	۱۵	<i>FOS, NOX3, TAB1, TAB2, TRAF2, TGFBR3, TYROBP, CAMK4, CSF1R, GRB2, IL1R1, MAPK8, PIK3R1, PIK3R3, SIRPB1, ADCY2, PLCB4, CALM3, HR2H, ITPR3, LHCGR, MYLK, PHKB, PTK2B, PPP3CA, SHROOM2, P2RX4, P2RX7, SPHK1, SPHK2</i>	۰/۰۰۵۱
KEGG Pathway hsa04020: Calcium signaling pathway	۱۴		۰/۰۱۲

^۱ژن‌های کاندیدا مرتبط با صفت به صورت پر رنگ نشان داده شده‌اند.

نتیجه‌گیری

بررسی در این پژوهش، به نظر می‌رسد این ژن‌ها در بروز فنوتیپی صفات ساختاری بدن در سنین مختلف نقش ایفا می‌کنند، در نتیجه می‌توان کارآیی روش آنالیز مسیر برای پویش ژنومی صفات ساختاری بدن را نیز مورد تأیید قرار داد. همچنین با بررسی چند شکلی موجود در ژن‌های کاندیدای شناسایی شده مرتبط با صفات ساختاری بدن از طریق مطالعات آزمایشگاهی در نژادهای بز بومی و نتایج به‌دست آمده را برای مطالعات اصلاحی به کار برد.

در این پژوهش کارآیی پویش ژنومی برپایه آنالیز مسیر با هدف شناسایی مناطق ژنومی و ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات ساختاری بدن انجام شد. روش آنالیز مسیر در مقایسه با روش پویش ژنومی براساس مدل خطی کلاسیک، مناطق ژنومی مرتبط با صفات ساختاری بدن را بهتر شناسایی کرد، بطوریکه علاوه بر اینکه مناطق ژنومی شناسایی شده در مطالعه قبلی را تأیید نمود، مناطق ژنومی جدیدی را شناسایی کرد. با توجه به عملکرد بیولوژیکی ژن‌های کاندیدای شناسایی شده مرتبط با صفات مورد

منابع

Abdalla I.M., Hui J., Nazar M., Arbab A.A.I., Xu T., Abdu S.M.N., Mao Y., Yang Z. And Lu X. 2023. Identification of Candidate Genes and Functional Pathways Associated with Body Size Traits in Chinese Holstein Cattle Based on GWAS Analysis. *Animals (Basel)*, 13(6), 992.

Bai Y., Li J., Zhu H., Liu J., Dong S., Li L., Qu L., Chen H., Song X. and Lan X. 2021. Deletion mutation within the goat PPP3CA gene identified by GWAS significantly affects litter size. *Reproduction, Fertility and*

Development, 33, 476–483.

Bordbar F., Jensen J., Zhu B., Wang Z., Xu L. and Chang T. 2019. Identification of muscle specific candidate genes in Simmental beef cattle using imputed next generation sequencing. *PLoS ONE*, 14(10), e0223671.

Bu, D., Luo, H., Huo, P., Wang, Z., Zhang, S., He, Z., Wu, Y., Zhao, Liu, L. and Guo, J. 2021. KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic Acids Research*, 49, 317–325.

Clancey, E., Kiser, J. N., Moraes, J. G. N., Dalton, J. C., Spencer, T. E. and Neiberger, H.

- L. 2019. Genome-wide association analysis and gene set enrichment analysis with SNP data identify genes associated with 305-day milk yield in Holstein dairy cows. *Animal Genetics*, (3), 254-258.
- Chuluun-Erdene A., Sengeragchaa O., Altangerel T. A., Sanjmyatav P., Dagdan B., Battulga S., Enkhbat L., Byambasuren N., Malchinkhuu M. and Janlav M. 2020. Association of Candidate Gene Polymorphism with Metabolic Syndrome among Mongolian Subjects: A Case-Control Study. *Medical Sciences (Basel)*, 8(3), 38.
- Easa A. A., Selionova M., Aibazov M., Mamontova T., Sermyagin A., Belous A., Abdelmanova A., Deniskova T. and Zinovieva N. 2022. Identification of Genomic Regions and Candidate Genes Associated with Body Weight and Body Conformation Traits in Karachai Goats. *Genes*, 13, 1773.
- Edgar, A. J., Birks, E. J., Yacoub, M. H. and Polak, J. M. 2001. Cloning of dexamethasone-induced transcript: A novel glucocorticoid-induced gene that is upregulated in emphysema. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 25, 119-124.
- Esmaeili-Fard, S. M., Gholizadeh, M., Hafezian, S. H. and R. Abdollahi-Arpanahi. 2021. Genome-wide association study and pathway analysis identify NTRK2 as a novel candidate gene for litter size in sheep. *PLoS One*, 16(1), e0244408.
- Ghiasi, H. and Abdollahi-Arpanahi, R. 2021. The candidate genes and pathways affecting litter size in sheep. *Small Ruminant Research*, 205, 106546.
- Guo J., Jiang R., Mao A., Liu G. E., Zhan S., Li L., Zhong T., Wang L., Cao J., Chen Y., Zhang G. and Zhang H. 2021. Genome-wide association study reveals 14 new SNPs and confirms two structural variants highly associated with the horned/poled phenotype in goats. *BMC Genome*, 22, 10.
- Gu B., Sun R., Fang X., Zhang J., Zhao Z., Huang D., Zhao Y. and Zhao Y. 2022. Genome-Wide Association Study of Body Conformation Traits by Whole Genome Sequencing in Dazu Black Goats. *Animals*, 12, 548.
- Hinrichs, A. L., Larkin, E. K. and Suarez, B. K. 2009. Population Stratification and Patterns of Linkage Disequilibrium. *Genetic Epidemiology*, 33, 88-92.
- Johnston, S. E., McEwan, J. C., Pickering, N. K., Kijas, J. W., Beraldi, D., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M. and J. Slate. 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, 2555-2566.
- Jiang J., Cole J. B., Freebern E., Da Y., VanRaden P. M. and Ma L. 2019. Functional annotation and Bayesian fine-mapping reveals candidate genes for important agronomic traits in Holstein bulls. *Communications Biology*, 2, 212
- Le T. H., Christensen O. F., Nielsen B. and Sahana G. 2017. Genome-wide association study for conformation traits in three Danish pig breeds. *Genetic Selection Evolution*, 49(1), 12.
- Luigi-Sierra M. G., Landi V., Guan D., Delgado J. V., Castelló A., Cabrera B., Mármol-Sánchez E., Alvarez J. F., Gómez-Carpio M., Martínez A., Such X., Jordana J. and Amills M. 2020. A genome-wide association analysis for body, udder, and leg conformation traits recorded in Murciano-Granadina goats. *Journal of Dairy Science*, 103(12), 11605-11617.
- Marjanovic, J. and Calus, M. P. L. 2020. Factors affecting accuracy of estimated effective number of chromosome segments for numerically small breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 138, 151-160.
- Martin P. M., Palhière I., Ricard A., Tosser-Klopp G. and Rupp R. 2016. Genome Wide Association Study Identifies New Loci Associated with Undesired Coat Color Phenotypes in Saanen Goats. *PLoS ONE*, 11, 15.

- Moaeen-Ud-Din, M., Danish Muner, R. and Khan M. S. 2022. Genome wide association study identifies novel candidate genes for growth and body conformation traits in goats. *Scientific Reports*, 12(1), 9891.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M. A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P. I., Daly M. J. and Sham P. C. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559-75.
- Taiwo G.A., Idowu M., Denvir J., Cervantes A.P. and Ogunade I.M. 2022. Identification of Key Pathways Associated With Residual Feed Intake of Beef Cattle Based on Whole Blood Transcriptome Data Analyzed Using Gene Set Enrichment Analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 848027.
- Tilahun Y., Gipson T. A., Alexander T., McCallum M. L. and Hoyt P. R. 2020. Genome-Wide Association Study towards Genomic Predictive Power for High Production and Quality of Milk in American Alpine Goats. *International Journal of Genome*, 1, 12.
- Wang, L, Jia, P. and Wolfinger, R. D. 2011. Gene set analysis of genome-wide association studies: Methodological issues and perspectives. *Genomics* 98, 1–8.
- Yang B. G., Yuan Y., Zhou D. K., Ma Y. H., Mahrous K. F., Wang S. Z., He Y. M., Duan X. H. and Zhang G. 2021. Genome-wide selection signal analysis of Australian Boer goat reveals artificial selection imprinting on candidate genes related to muscle development. *Animal Genetics*, 52, 550–555.
- Zhang, L., Wang, F., Gao, G., Yan, X., Liu, H., Liu, Z., Wang, Z., He, L., Lv, Q., Wang, Z., Wang, R., Zhang, Y., Li, J. and Su R. 2021. Genome-Wide Association Study of Body Weight Traits in Inner Mongolia Cashmere Goats. *Frontiers Veterinary Science*, 8, 752746.
- Zhou, X. and Stephens, M. 2012. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nature Genetics*, 44, 821.