University of Tehran Press

Journal of Animal Production

Online ISSN: 2382-994X

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

Genome wide association study based on pathway analysis relate to wool traits in Zandi sheep breed

Hossein Mohammadi[1] | Hossein Moradi Shahrebabak[2] | Mohammad Shamsollahi[3]

1. Corresponding Author, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran. E-mail: H-mohammadi64@araku.ac.ir
2. Department of Animal Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, karaj, Iran. Email: hmoradis@ut.ac.ir
3. Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Ilam, Ilam, Iran. Email: m.hamsolahi@ilam.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 3 April 2023
Received in revised form
25 August 2023
Accepted 26 August 2023
Published online 12 October 2023

Keywords:
Candidate gene
Genome Scan
Pathway analysis
Wool quality
Zandi Sheep

ABSTRACT

Introduction: Identifying of genes with large effects on economically important traits, has been one of the important goal to sheep breeding. Over recent years, advances in DNA-based marker technology have made it possible to identify genomic regions or quantitative trait loci (QTLs) underlying complex traits, such as fleece traits, in sheep. The present study aimed to conduct a genome wide association studies (GWAS) based on gene-set enrichment analysis for identifying the loci associated with wool traits in native Zandi sheep using the 50K arrays.

Material and Methods: A total of 300 Iranian Zandi sheep used in this study came from the Zandi sheep breeding station. Wool sampling coincided with the maximum wool growth prior to the shearing of wool. In order to facilitate sampling, sheep were restrained in a lateral position and true wool from the left mid-side site was cut from a 5×5 cm^2 close to the skin using regular scissors. Each sample was separately packaged and labeled with ear tag number of the sheep. We measured and recorded four wool production traits: staple length (SL), mean fiber diameter (MFD), fiber diameter coefficient of variation (CVFD), and the proportion of fiber that are equal or more than 30 µm (PR), kemp percentage (KEMP%) and outer coat fiber (OCF) were measured. Genomic DNA extraction from sheep blood was performed by the applying a modified salting out protocol and genotyping of the Sheep SNPChip 50 K SNP Bead from Illumina Inc. The gene set analysis consists basically in three different steps: the assignment of SNPs to genes, the assignment of genes to functional categories, and finally the association analysis between each functional category and the phenotype of interest. Genome wide association study was performed with wool 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 50 kb up- and downstream of the gene and bioinformatics analysis was implemented to identify the biological pathways performed in GO, KEEG, DAVID and PANTHER databases. The GO database designates biological descriptors to genes based on attributes of their encoded products and it is further partitioned into 3 components: biological process, molecular function, and cellular component. The KEGG pathway database contains metabolic and regulatory pathways, representing the actual knowledge on molecular interactions and reaction networks. Finally, a Fisher's exact test was performed to test for overrepresentation of the significant genes for each gene-set. In the next step, a bioinformatics analysis was implemented to identify the biological pathways performed in GeneCards databases.

Result and Discussion: The result from genomic control showed weak population stratification with for woot traits among Zandi sheep population. We identified different sets of candidate genes related to wool traits including: *CEP290, PRKCZ, TMTC3, RHPN2, TNFSF4, NLGN1, SPHKAP, PLCE1, FAT1* and *PIK3R4* in Zandi sheep. Some of the found genes, are consistent with some of the previous studies related to reproductive traits. According to pathway analysis, 21 pathways from gene ontology and biological pathways were associated with the wool traits ($P<0.05$). Some of the genes were found are consistent with some prior studies and to be involved biological pathways related to hair follicle development, keratinocytes differentiation, synthesizes an enzyme of threonine kinases, development of epidermal and Wnt signaling pathway.

Conclusion: In total, this study supported previous results from GWAS of wool traits, also revealed additional regions in the sheep genome associated with these economically important traits. These findings could potentially be useful for genetic selection in the breeding programs and can be used to understand the genetic mechanism controlling this trait.

Cite this article: Mohammadi, H., Moradi Shahrebabak, H., & Shamsollahi, M. (2023). Genome wide association study based on pathway analysis relate to wool traits in Zandi sheep breed. *Journal of Animal Production*, 25 (3), 241-254. DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2023.357327.623738

© The Author(s).
DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2023.357327.623738

Publisher: University of Tehran Press.

انتشارات دانشگاه تهران

تولیدات دامی

شاپا الکترونیکی: ۲۳۸۲-۹۹۴x

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

پویش کل ژنومی و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی مرتبط با صفات پشم در گوسفندان نژاد زندی

حسین محمّدی[۱]✉ | حسین مرادی شهربابک[۲] | محمد شمس‌اللهی[۳]

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران. رایانامه: H-mohammadi64@araku.ac.ir

۲. گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: hmoradis@ut.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران. رایانامه:m.hamsolahi@ilam.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۷/۲۰

کلیدواژه‌ها:

آنالیز مسیر

پویش ژنومی

ژن کاندیدا

کیفیت الیاف

گوسفند زندی

چکیده

هدف پژوهش حاضر، شناسایی مناطق ژنومی و ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات پشم از طریق پویش ژنومی برپایه آنالیز مسیر در گوسفند نژاد زندی بود. بدین منظور ۹۶ رأس گوسفند با استفاده از آرایه‌های 50Kتعیین ژنوتیپ شدند و برای هر دام رکوردهای فنوتیپی شامل میانگین قطر الیاف، ضریب تغییرات قطر الیاف، نسبت الیافی که مساوی یا بیش‌تر از ۳۰ میکرومتر قطر الیاف، طول استاپل، نسبت کمپ و نسبت مو در الیاف اندازه‌گیری شد. ارزیابی پویش ژنومی برای صفات در نرم‌افزار GEMMA انجام شد، سپس با استفاده از بسته نرم‌افزاری *biomaRt2* ژن‌های معنی‌داری که در داخل و یا ۵۰ کیلوباز بالا و پایین‌دست نشانگرهای معنی‌دار قرار داشتند، شناسایی گردید. در نهایت، آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی به‌وسیله برنامه برخط KOBAS با هدف شناسایی عملکرد بیولوژیکی ژن‌های کاندیدا انجام شد. در این پژوهش ژن‌های مرتبط با صفات قطر الیاف (*CEP290*، *PRKCZ*، *TMTC3*، *RHPN2* و *TNFSF4*)، طول استاپل (*NLGN1*، *SPHKAP* و *PLCE1*) و نسبت کمپ و مو (*FAT1* و *PIK3R4*) شناسایی شدند. در تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی، تعداد ۲۱ مسیر با صفات پشم شناسایی شدند. از بین مسیرهای زیستی شناسایی‌شده نقش مهمی در رشد و توسعه فولیکول‌های مو، تولید کراتینوسیت‌ها، رشد و توسعه اپیدرمال، سنتز آنزیم‌های تروئونین کینازها و مسیر سیگنال‌دهی Wnt داشتند. با توجه به تأیید نتایج قبلی و شناسایی ژن‌های کاندیدای جدید با عملکرد مولکولی مرتبط با صفات الیاف پشم، نتایج این پژوهش می‌تواند در درک سازوکار ژنتیکی کنترل کننده صفات پشم مورد استفاده قرار گیرد و در انتخاب ژنتیکی گوسفند از طریق کیفیت بالاتر پشم مفید باشد.

استناد: محمّدی، حسین؛ مرادی شهربابک، حسین؛ و شمس‌اللهی، محمد (۱۴۰۲). پویش کل ژنومی و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی مرتبط با صفات پشم در گوسفندان نژاد زندی. *نشریه تولیدات دامی*، ۲۵ (۳)، ۲۴۱-۲۵۴. DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2023.357327.623738

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

۱- مقدمه

در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند جهت بهبود تولید پشم و کیفیت آن صفاتی مانند وزن پشم، میانگین قطر الیاف، طول دسته الیاف، نسبت کمپ و ضریب تنوع آن‌ها مهم‌ترین ملاک‌های انتخاب هستند. نرخ پیشرفت در صفات پشم نسبت به سایر صفات از جمله رشد سرعت کندی داشته است. اکثر صفات پشم دارای وراثت‌پذیری متوسط و بالا هستند، از این‌رو، اگر در برنامه‌های اصلاح نژادی ملاک انتخاب قرار گیرند، می‌توان شاهد تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای در این صفات در طی نسل‌های آینده بود (Wang *et al.,* 2014). اما مشکلاتی وجود دارد که روند انتخاب و بهبود صفات مرتبط با خصوصیات کمی و کیفی پشم بر پایه داده‌های فنوتیپی را کند می‌نماید. اندازه‌گیری بعضی از صفات پشم مانند استحکام الیاف، قطر الیاف و پول استاپل مشکل بوده و پرهزینه می‌باشد. هم‌چنین به‌علت همبستگی‌های ژنتیکی منفی بین صفات تولیدی پشم با صفات تولید مثلی و وزن بدن موجب شده است تا تمایل به مطالعه ژن‌های کاندیدا و مکان‌های ژنومی کنترل کننده صفات کمی (QTL) در بین پژوهش‌گران برای صفات پشم افزایش پیدا کند و از این طریق بتوان مقدار تولید پشم و صفات مرتبط با کیفیت پشم را بهبود داد (Ren *et al.,* 2016).

بررسی‌ها نشان می‌دهد، تا به امروز براساس آخرین نسخه پایگاه ذخیره جایگاه‌های ژنی مؤثر بر صفات کمی (نسخه ۴۹) (https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/OA/index/OA/index, 28 Dec, 2022)، پژوهش‌های اندکی برای شناسایی QTL صفات کمی و کیفی پشم در گونه گوسفند گزارش شده است. به طوری‌که تنها ۱۹۷ QTL مرتبط با صفات کمی و کیفی پشم انجام شده است که عمده مطالعات مکان‌یابی QTLها براساس نشانگرهای ریزماهواره‌ای انجام یافته است که فاصله نشانگرها بسیار طولانی (چندین سانتی‌مورگان) و در نتیجه فاصله اطمینان و صحت QTLهای شناسایی شده پایین می‌باشد.

هدف از مطالعات پویش کل ژنومی (GWAS) که به‌منظور شناسایی ارتباط یا پیوستگی بین یک نشانگر SNP و یک صفت با استفاده از تراشه‌های با تراکم بالا در سطح ژنوم است، پیداکردن جهش‌های مؤثر یا مسببی بوده که بر فنوتیپ یک صفت تولیدی، تولیدمثلی و یا بیماری اثر می‌گذارند. این اطلاعات می‌تواند برای انتخاب به‌کمک نشانگر مفید بوده و به درک معماری ژنتیکی صفات موردمطالعه کمک نماید. در مطالعات پویش کل ژنومی به طور معمول از تصحیح بنفرونی برای تعیین آستانه معنی‌داری و جلوگیری از خطای نوع اول استفاده می‌گردد (Clancey *et al.,* 2019). یکی از خطاهای پژوهش‌های مطالعات پویش ژنومی در نظرگرفتن آستانه معنی‌داری برای جلوگیری از بروز خطای نوع اول است. در حالی‌که پرهیز از خطای نوع اول سبب افزایش خطای نوع دوم و در نظرنگرفتن SNPهای دارای اثر معنی‌دار پایین‌تر از آستانه می‌شود (Marjanovic & Calus, 2020).

۲- پیشینهٔ پژوهش

یک جایگزین مناسب برای حل مشکل درنظرگرفتن آستانه معنی‌داری، انجام مطالعات پویش کل ژنومی بر مبنای مسیر[1] با استفاده از تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی است. در واقع در این روش به‌جای انجام تجزیه برای یک SNP یا یک ژن، ارتباط بین صفت موردمطالعه و واریانت‌های ژنتیکی در یک دسته یا گروه ژنی که به طور عملکردی با هم مرتبط هستند بررسی می‌شود. به‌عبارت دیگر، ارتباط آماری بین یک مجموعه ژنی معنی‌دار با فنوتیپ، مورد آزمون قرار می‌گیرد (Wang *et al.,* 2011).

به‌تازگی، پژوهشی با عنوان مطالعه ارتباط سنجی در سطح ژنوم برپایه تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی برای

1. Pathway-based analysis

شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر نرخ دو قلوزایی در ۹۶ گوسفند بلوچی که براساس نرخ دوقلوزایی بالا و پایین انتخاب شده بودند، موفق به شناسایی ژن‌های کاندیدا شامل *CTH*، *ANKRD13C*، *SRSF11*، *PTGER3*، *LDHB*، *LRRC40* و *NTRK2* روی کروموزوم‌های شماره یک، سه، ۱۰، ۱۵ و ۲۵ شدند. هم‌چنین مسیرهای زیستی پاسخ دفاعی[1]، چسبندگی سلولی[2] و اتصال سلولی[3] گزارش شده بودند، نتایج نشان داد روش پویش ژنومی بر مبنای مسیر کارایی بالاتری برای یافتن مناطق ژنومی و درک بهتری از معماری ژنتیکی صفت تعداد نتاج متولدشده نسبت به آنالیز پویش ژنومی بر پایه تک نشانگری داشت (Esmaeili-Fard *et al.*, 2021).

در مطالعه قبلی پویش ژنومی، آنالیز GWAS برای صفات میانگین قطر الیاف، ضریب تغییرات قطر الیاف و نسبت الیاف که مساوی یا بیش‌تر از ۳۰ میکرومتر قطر الیاف پس از تصحیح بنفرونی منجر به شناسایی نشانگرهایی شد (Mohammadi *et al.*, 2020). پویش پیوستگی ژنومی منجر به شناسایی چهار SNP روی کروموزوم های یک (دو جایگاه) و ۱۳ (دو جایگاه) برای صفت میانگین قطر الیاف، دو SNP روی کروموزوم‌های سه و ۱۱ برای صفت ضریب تغییرات میانگین قطر الیاف و یک SNP روی کروموزوم ۱۱ برای صفت نسبت الیافی که مساوی یا بیش‌تر از ۳۰ میکرومتر هستند، شناسایی شده بود. هم‌چنین هیچ‌گونه نشانگری در آنالیزهای پیوستگی در ارتباط با طول استاپل، نسبت کمپ و نسبت مو در الیاف پشم شناسایی نشده بود (Mohammadi *et al.*, 2020). هدف از انجام پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی و مسیرهای زیستی مرتبط با صفات پشم در گوسفندان نژاد زندی براساس پویش کل ژنوم بر مبنای مسیر بود.

۳- روش‌شناسی پژوهش

از ۳۰۰ گوسفند ماده نژاد زندی با سن تقریبی دو تا سه سال، موجود در دو گله مرکز اصلاح نژاد خجیر واقع در تهران وابسته به سازمان جهاد کشاورزی استان تهران خون‌گیری به‌عمل آمد. مقدار ۷-۵ سی‌سی استحصال‌شده همراه با ۰/۵ میلی‌لیتر EDTA در لوله‌های خلأ با pH ۸-۷/۵ ریخته شد. نمونه‌های گرفته‌شده بلافاصله بعد از شماره‌گذاری و با حفظ شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از میان نمونه‌های اخذشده پس از آنالیز شجره، حیواناتی که کم‌ترین رابطه خویشاوندی را با هم داشتند به تعداد ۹۶ رأس انتخاب شدند. استخراج DNA با استفاده از روش بهینه‌یافته استخراج نمکی از خون کامل انجام شد. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت بالای نمونه‌ها با استفاده از ژل الکتروفورز و نانودراپ، غلظت آن‌ها تا ۵۰ng/µl جهت تعیین ژنوتیپ رقیق شدند. نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های شرکت ایلومینا Ovine SNP50 Bead Chip برای ۵۴۲۴۱ جایگاه نشانگری تعیین ژنوتیپ شدند.

از تمام دام‌های انتخاب‌شده در سن ۱۲ تا ۱۵ ماهگی، قبل از پشم چینی سالیانه، از پهلوی سمت چپ حیوان بعد از دنده سیزدهم و به اندازه کف دست پایین‌تر از مهره‌ها، به ابعاد تقریبی ۵×۵ سانتی‌مترسانتی‌مترمربع نمونه‌برداری پشم انجام گرفت (شکل ۱). ابتدا از هر نمونه سه استاپل به‌طور تصادفی جدا شده و طول هر یک به‌کمک خط‌کش و برحسب سانتی‌متر مطابق با روش استاندارد شماره ۱۹۴۱ ایران اندازه‌گیری شد. سپس میانگین طول سه استاپل محاسبه و با تقریب دو میلی‌متر برای هر نمونه گزارش شد. نمونه‌های پشم گرفته‌شده در آزمایشگاه با مواد شوینده شسته شده و پس از شست‌وشو و خشک‌نمودن نمونه‌ها در شرایط آزمایشگاهی صفات کیفی الیاف طبق پروتکل استاندارد A.S.T.M

1. Defense response
2. Cell adhesion
3. Cell junction

شماره D2130-90 اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری میانگین قطر (MFD)، به طور تصادفی دو تا سه دسته الیاف از داخل نمونه بیرون کشیده و از قسمت میانی آن‌ها به طول حدود ۱۵۰ تا ۲۰۰ میکرومتر برش‌هایی زده و آن‌ها را با استفاده از گلیسرین بر روی لام تثبیت شده و با استفاده از میکروسکوپ پروژکتینا قطر تارهای پشم برحسب میکرومتر اندازه‌گیری شد. میانگین قطر الیاف هر نمونه برحسب ۴۰۰ تار پشم محاسبه گردید. هم‌چنین هنگام قرائت قطر الیاف پشم با استفاده از میکروسکوپ پروژکتینا نوع تار پشم نیز یاداشت‌برداری گردید. در انتها از اطلاعات به‌دست‌آمده سایر صفات موردمطالعه پشم شامل ضریب تغییرات قطر الیاف (CVFD) بر پایه رابطه (۱) (Roldan *et al.,* 2010) و درصد الیاف با قطر مساوی یا بیش‌تر از ۳۰ میکرومتر (PR) محاسبه شد.

رابطهٔ ۱) $$CVfd = \frac{SD}{\overline{X}}$$

که در آن، $CVfd$، ضریب تغییرات قطر الیاف؛ SD، انحراف معیار قطر الیاف و $\overline{X}$ ، میانگین قطر الیاف می‌باشد.

جهت تعیین نسبت کمپ و نسبت مو در الیاف، نمونه‌ها به‌کمک میکروتوم تهیه شدند و تعداد الیاف کمپ در بین ۱۰۰۰ لیف مطابق با روش استاندارد A.S.T.M شماره D2968-83 شمارش شدند. بدین ترتیب قطر لیف و قطر کانال مدولایی لیف اندازه گرفته شد و هر لیفی که قطر کانال مدولا در آن نسبت به قطر لیف بیش از ۶۰ درصد بود به‌عنوان کمپ محسوب گردید. صفات کیفی الیاف پشم که دارای توزیع نرمال نبودند قبل از انجام آنالیز ارتباط ژنومی، برای بهبود توزیع خطای تصادفی تبدیل داده‌ها صورت گرفت.

جدول ۱. آمار توصیفی صفات پشم موردبررسی در گوسفندان زندی

صفات	تعداد	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر	خطای استاندارد
میانگین قطر الیاف (میکرومتر)	۹۶	۲۹/۸۵	۳/۲۵	۲۲/۴۰	۳۹/۰۴	۰/۰۳۲
ضریب تغییرات قطر الیاف (درصد)	۹۶	۴۳/۱۲	۷/۸۴	۱۹/۰	۶۸/۳۵	۰/۷۶۴
نسبت الیافی که قطر مساوی یا بیش‌تر از۳۰ میکرومتر (درصد)	۹۶	۲۷/۰۴	۱۰/۴۲	۱۲/۰۴	۴۳/۱۰	۰/۹۹۸
طول استاپل(سانتی‌متر)	۹۶	۱۱/۲۵	۳/۹۲	۶/۰۰	۱۹/۰۰	۰/۰۳۵
کمپ (درصد)	۹۶	۵/۸۱	۱/۱۶	۱/۸۹	۸/۹۶	۰/۰۱۵
مو (درصد)	۹۶	۲/۳۷	۲/۱۰	۰/۹۷	۹/۳۳	۰/۰۲۰

جهت اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ در تجزیه نهایی، ویرایش داده‌ها و مراحل مختلف کنترل کیفیت با استفاده نرم‌افزار PLINK (نسخه ۱/۹) روی داده‌های اولیه تعیین ژنوتیپ شده انجام شد (Purcell *et al.,* 2007). در نخستین مرحله نمونه‌هایی با بیش از ده درصد ژنوتیپ از دست رفته از آنالیزهای بعدی حذف شدند. سپس از دو عامل فراوانی آللی نادر (MAF) و نرخ تعیین ژنوتیپ (Call rate) برای هر نشانگر SNP محاسبه شده و SNPهایی که در مجموع دام‌ها دارای MAF و Call rate به‌ترتیب کم‌تر از یک درصد و ۹۰ درصد بودند از مراحل بعدی آنالیزها کنار گذاشته شدند. سپس نشانگرهای باقیمانده که به شدت از تعادل هاردی–واینبرگ انحراف داشتند به‌عنوان معیار دیگری از خطای تعیین ژنوتیپ از آنالیز نهایی کنار گذاشته شدند. هم‌چنین SNPهایی که در موقعیت ناشناخته قرار داشتند از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شدند. در نهایت بعد از کنترل کیفیت تعداد ۹۴ رأس دام و تعداد ۴۷۴۱۱ SNP برای آنالیزهای پویش کل ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی باقی ماندند.

برای بررسی وجود اثرات ثابت معنی‌دار با استفاده از رویه GLM در برنامه R (نسخه ۴/۱/۳) عوامل ثابت سال تولد، فصل تولد، تیپ تولد و سال نمونه‌برداری پشم حیوان بررسی شدند. این اثرات ثابت در صورت معنی‌داربودن به‌عنوان

اثرات ثابت در تجریه و تحلیل‌های پویش ژنومی در نظر گرفته شدند. هم‌چنین در این پژوهش برای بررسی وجود یا عدم وجود لایه‌بندی جمعیتی با استفاده از روش کنترل ژنومی از طریق فاکتور تورم کنترل جمعیتی (λ) در نرم‌افزار PLINK بررسی شد. جهت ارتباط فنوتیپ‌ها با ژنوتیپ‌ها از نرم‌افزار GEMMA (Zhou & Stephens, 2012) نسخه ۰/۹۸ استفاده شد. مدل مورداستفاده بر پایه مدل خطی مختلط برپایه رابطه (۲) بود:

رابطهٔ ۲) $$y = Wa + x\beta + Zu + e$$

که در این رابطه، y، بردار مشاهدات فنوتیپی؛ a، بردار اثرات ثابت؛ x، بردار ژنوتیپ‌های نشانگر تحت آزمون؛ u، بردار اثرات پلی‌ژنیک؛ e، بردار اثر باقی‌مانده‌های تصادفی و β، W و Z ماتریس‌های طرح ارتباط‌دهنده است.

شکل ۱. گله گوسفندان نژاد زندی موردمطالعه (تصویر بالا) و محل نمونه‌برداری پشم از سمت چپ دام (تصویر پایین)

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 نرم‌افزاری *biomaRt2* در محیط R و با استفاده از ژنوم مرجع گوسفند (*Oar_v4.0*) به ژن‌هایی که نشانگر SNP موردنظر در داخل آن ژن و یا ۵۰kb بالادست یا پایین‌دست آن ژن قرار داشت، ارتباط داده شدند (Clancey et al., 2019)، 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 (http://www.pantherdb.org) و Reactome (http://www.reactome.org) جهت تعیین طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی استفاده می‌شود. علاوه براین از پایگاه برخط DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov) برای تعیین بهتر دست‌های ژنی استفاده گردید. در این مرحله فرض بر این است که ژن‌هایی که در یک طبقه عملکردی خاص از سه مجموعه ژنی هستی‌شناسی قرار می‌گیرند، می‌توانند به‌عنوان 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[1] و آماره Fisher's exact test مورد آزمون قرار گرفت. تجزیه غنی‌سازی مجموعه ژنی با استفاده از بسته نرم‌افزاری KOBAS (Bu et al., 2021) انجام گردید. در نهایت برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به‌دست‌آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی آنلاین GeneCards (http://www.genecards.org) و UniProtKB (http://www.uniprot.org) استفاده شد.

۴- یافته‌های پژوهش

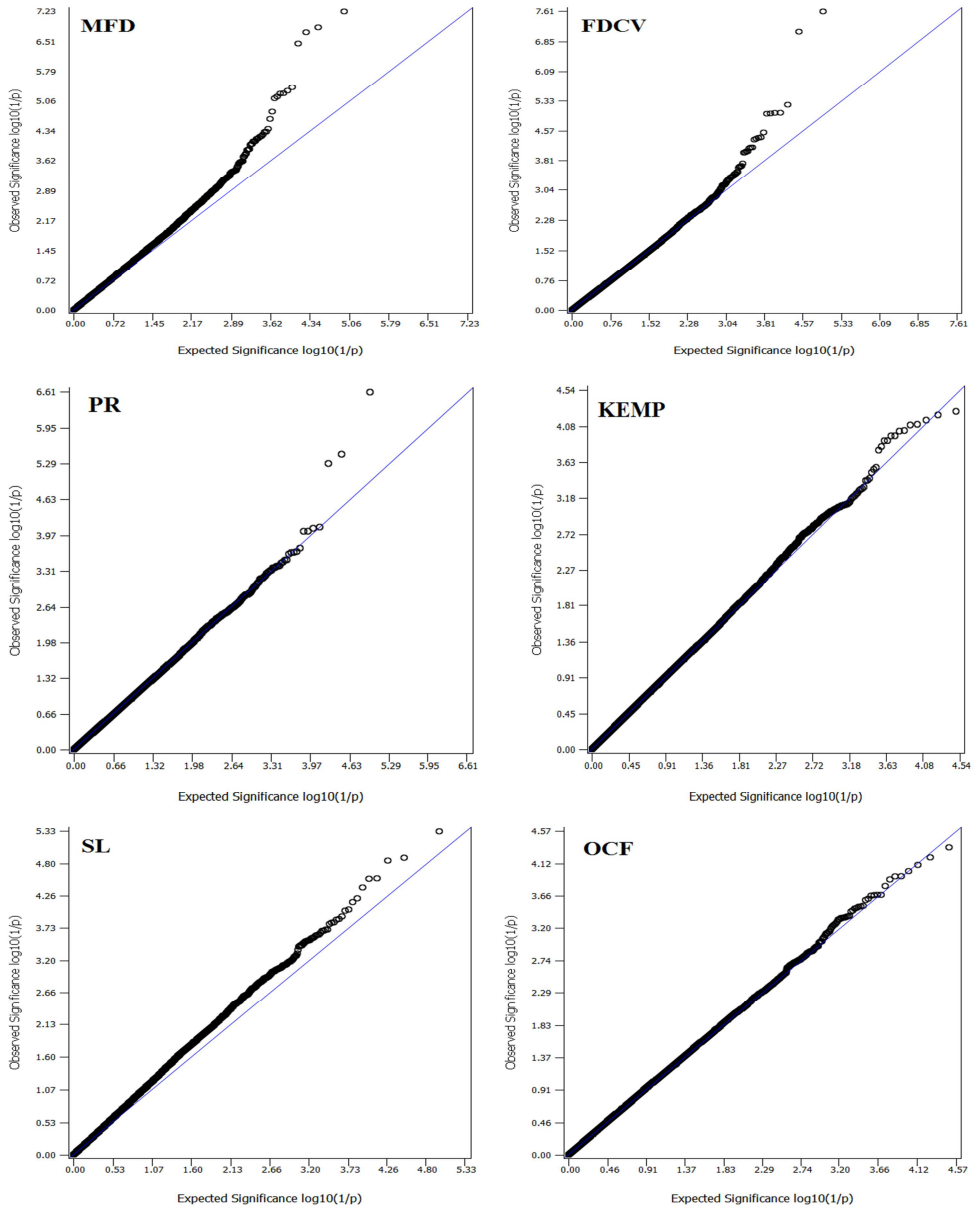
آمار توصیفی صفات پشم موردبررسی در جدول (۱) نشان داده شده است. بررسی اثرات ثابت سال تولد و سال نمونه‌برداری بر روی این صفات نیز نشان داد که اثر سال تولد و سال نمونه‌برداری بر روی سه صفت میانگین قطر الیاف (MDF)، ضریب تغییرات قطر الیاف (CVFD) و طول استاپل (SL) معنی‌دار است، در صفت نسبت الیافی که مساوی یا بیش‌تر از ۳۰ میکرومتر هستند (PR)، صفت نسبت کمپ (KEMP) و صفت نسبت مو در الیاف (OCF) تنها اثر سال تولد معنی‌دار بود.

یکی از نکات موردتوجه در اجرای این پژوهش تعداد کم نمونه‌ها جهت انجام تحقیقات پیوستگی در سطح ژنوم بود. قبل از اجرای آنالیزهای پیوستگی با درنظرگرفتن اثرات ثابت معنی‌دار بر روی هر صفت، فاکتور تورم کنترل جمعیتی (لامبدا) در آنالیزهای پیوستگی محاسبه شد. فاکتور لامبدا از طریق آنالیز پیوستگی در PLINK برای شش صفت موردمطالعه محاسبه شد که برای صفت میانگین قطر الیاف ۱/۰۵۶، صفت ضریب تغییرات قطر الیاف ۱/۰۰، صفت نسبت الیافی که مساوی یا بیش‌تر ار ۳۰ میکرومتر قطر دارند ۰/۹۹۰، صفت طول استاپل ۱/۰۵۲، صفت نسبت کمپ ۱/۰۸۹ و صفت نسبت مو در الیاف پشم ۱/۰۰ بود که همان‌طورکه مشاهده می‌شود تمام صفات تقریباً برابر با ۱ بودند و نشان از عدم وجود لایه‌بندی جمعیتی برای اجرای آنالیزهای پیوستگی بود. پلات‌های Q-Q و منهتن برای شش صفت پشم موردمطالعه در شکل‌های (۲) و (۳) ارائه شده است.

1. Hypergeometric

۴–۱– شناسایی ژن‌های کاندیدا در مناطق ژنومی حاصل از تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی

تعداد ۲۶۱۰۹ عدد ژن از ۲۷۰۵۴ ژن حاشیه‌نویسی‌شده در گوسفند به‌وسیله نشانگرهای SNP پوشش داده شد که در این میان تعداد ژن‌های معنی‌دار در نژاد موردبررسی ۷۶۳ ژن بودند، یعنی حداقل یک نشانگر با P-value کم‌تر از ۰/۰۵ در داخل و یا در بالا یا پایین‌دست این ژن تا فاصله ۵۰ kb قرار گرفت. این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفات پشم برای تجزیه GSEA-SNP انتخاب شدند. تعداد مجموعه‌های ژنی حاصل از پایگاه‌های داده‌ای مختلف شامل ۲۰۹ طبقات هستی‌شناسی (۱۷۸ طبقه فرایند زیستی، ۲۱ طبقه اجزای سلولی و ۱۰ طبقه عملکرد مولکولی) به‌دست آمد و ۱۴ مسیر زیستی KEGG مشاهده شد. مسیرهای که بیش‌تر از سه ژن و کم‌تر از ۳۰۰ ژن داشتند گزارش شده‌اند.



شکل ۲. پلات‌های Q-Q برای صفات پشم. میان قطر الیاف (MFD ضریب تغییرات میانگین قطر الیاف (FDCV)، نسبت الیافی که مساوی یا بیش‌تر از ۳۰ میکرومتر قطر (PR)، طول استاپل (SL)، نسبت کمپ (KEMP) و نسبت مو (OCF)

۵- بحث

در ارتباط با اثرات ثابت، نتایج مشابهی در پژوهش‌های پیشین نیز به‌دست آمده است (داشاب و همکاران، ۱۳۹۱). این پژوهش‌گران اثر سن را بر روی قطر پشم در گوسفند بلوچی ایرانی موردبررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها نشان داد که سن اثر معنی‌داری بر روی قطر پشم داشته به طوری‌که با افزایش سن قطر پشم نیز افزایش پیدا می‌کند. در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان‌دهنده عدم لایه‌بندی جمعیتی در مجموع حیوانات موردمطالعه در این پژوهش بود. در پژوهشی که روی صفات تولید پشم گوسفندان مرینوس چینی انجام شده است، بررسی لایه‌بندی جمعیتی با استفاده پلات‌های Q-Q هیچ لایه‌بندی‌ای گزارش نشده است (Wang *et al.*, 2014).

جزئیات ترم‌های هستی‌شناسی و مسیرهای بیوشیمیایی KEGG به‌همراه اسامی ژن‌های کاندیدا در جدول (۲) ارائه شده است. از مسیرهای مهم و معنی‌دار مرتبط با میانگین قطر الیاف و ضریب تغییرات میانگین قطر الیاف را می‌توان به مسیرهای بیولوژیکی nonmotile cilium assembly، positive regulation of cell proliferation و protein glycosylation اشاره نمود.

جدول ۲. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌داری (P<۰/۰۵) مرتبط با صفات پشم موردبررسی

نام و کد طبقات هستی‌شناسی	نام مسیر هستی‌شناسی	تعداد ژن‌های کاندیدا	ژن‌های کاندیدای موجود	ارزش P- تصحیح‌شده (FDR)
فرایندهای زیستی				
GO: 0042734	presynaptic membrane	۹	MEIS1, GGTA2P, EXT1, RXFP2, FRY	۰/۰۳۱
GO: 0046627	negative regulation of insulin receptor signaling pathway	۱۱	OLFM4, HS6ST3, RNF43, NEBL	۰/۰۲۳
GO: 0090263	positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	۱۴	ZNF280B,UBE2E3, LOC101108519, ANKRD50, LOC105602796	۰/۰۴۸
GO: 1905515	cilium assembly Nonmotile	۲۳	EPHA6, NRXN1, CEP290, ALMS1, PARP11,FGF23, FGF6	۰/۰۳۷
GO:0070613	Regulation of protein processing	۱۷	CAPN14, SPRED2 WDPCP	۰/۰۱۵
GO: 0032926	Positive regulation of synapse assembly	۸	FAT1, FAT4, PITPNB	۰/۰۰۹
GO: 0097711	ciliary basal body-plasma membrane docking	۱۷	EWSR1, GAS2L1 OTUD7A, PIK3R4, PAX9	۰/۰۰۸
GO: 0008284	positive regulation of cell proliferation	۱۴	PRKCZ, FAM19A5, TMEM17	۰/۰۱۹
GO:0097305	Actin polymerization or depolymerization	۶	FGFR1OP2, KIAA1217, FAM107B	۰/۰۲۸
GO:0035556	Calcium channel activity	۱۹	RSU1, TMEM144, MN1, NLGN1, RSPH14	۰/۰۴۹
GO: 0031333	protein-containing complex assemblies	۲۲	LOC105614759, RHPN2, FGF6, KCNA1, NFAM1, GTF3A	۰/۰۱۸
GO: 0002673	Regulation of acute inflammatory response	۲۱	SUDS3, LOC105607461, RPRD1B, GATB	۰/۰۳۸
GO: 0006486	protein glycosylation	۱۳	LOC105612231, CNTN1, UBL3, TMTC3	۰/۰۰۴
GO: 0035269	Protein O-linked mannosylation	۱۷	IREB2, LOC105603166, LRRK1	۰/۰۴۸
GO: 1901800	Regulation of proteasomal protein catabolic processes	۱۱	NLGN1, CNTNAP2	۰/۰۲۶
GO:0035556	Intracellular signal transduction	۶	GRIN2A, GRID2	۰/۰۴۷
اجزای سلولی				
GO:0030054	Cell junction	۱۷	SAMD8, FKBP8, PLCE1	۰/۰۰۳
GO: 0097733	Photoreceptor cell cilium	۹	SEMA3D, TACC3, CMAS	۰/۰۴۱
مسیرهای KEGG				
oas04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	۲۷	POLN, TNFSF4, CD44, GALNTL5	۰/۰۰۲
oas00534	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate heparin	۲۴	CAMTA1, CEP89, FBF1, SPHKAP	۰/۰۳۹

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

ژن کاندیدای CEP290 موجود در مسیر هستی‌شناسی nonmotile cilium assembly بر روی کروموزوم سه در ناحیه ۱۲۴/۲ تا ۱۲۴/۳ مگابازی در گوسفند قرار دارد. این ژن کدکننده پروتئین‌های مرتبط با سانترومرها و cilia در بدن می‌باشد (GenCards). cilia نقش کلیدی در رشد و توسعه فولیکول‌های مو دارد (Lehman *et al.,* 2009). در مطالعه پویش ژنومی با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب در نژادهای مختلف گوسفند جهان، ژن CEP290 گزارش شده است (Fariello *et al.,* 2014). هم‌چنین ژن کاندیدای PRKCZ در مسیر هستی‌شناسی positive regulation of cell proliferation، بر روی کرومزوم ۱۲ در ناحیه ۵۴/۳ تا ۵۴/۴ مگابازی گوسفند قرار دارد. این ژن سنتزکننده آنزیم‌های مرتبط با خانواده سرین/تروئونین کینازها می‌باشد. ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی‌های موجود در ژن‌های مرتبط با پروتئین‌های کینازی با رشد فولیکول‌های مو و ساختار آن در انسان گزارش شده است (Takahashi *et al.,* 2000). ژن کاندیدای TMTC3 که در مسیر هستی‌شناسی protein glycosylation بر روی کرومزوم سه در ناحیه ۱۳۳/۸ مگابازی گوسفند قرار دارد. این ژن از خانواده ژنی TMTC می‌باشد و در پژوهش‌های مختلفی ارتباط آن با صفات کیفی پشم گزارش شده است. در مطالعه پویش کل ژنومی در گوسفندان نژاد Akkraman ترکیه، ارتباط معنی‌داری بین ژن *TMTC3* با طول استاپل گزارش شده است (Arzik *et al.,* 2023).

از دیگر مسیرهای بیولوژیکی معنی‌دار مرتبط با خصوصیات قطر الیاف می‌توان به مسیر protein-containing complex assemblies اشاره کرد که جزو مسیرهای فرایندهای زیستی مرتبط با قطر الیاف می‌باشد و از بین ۲۲ ژن معنی‌دار وجود در این مسیر زیستی، ژن کاندیدای *RHPN2* دارای نقش بیولوژیکی مستقیمی با قطر الیاف داشت. ژن کاندیدای *RHPN2* که در مسیر بیوشیمیایی Rho pathway قرار دارد. این ژن نقش اساسی در تنظیم تفرق سلول‌های کراتینوسیت‌ها از مسیر سیگنال‌دهی Rho دارد (McMullan *et al.,* 2003). در مطالعه پویش ژنومی مرتبط با صفات پشم در گوسفندان نژاد چینی، ژن کاندیدای *RHPN2* مرتبط با صفت میانگین قطر الیاف گزارش شده است (Zhao *et al.,* 2021).

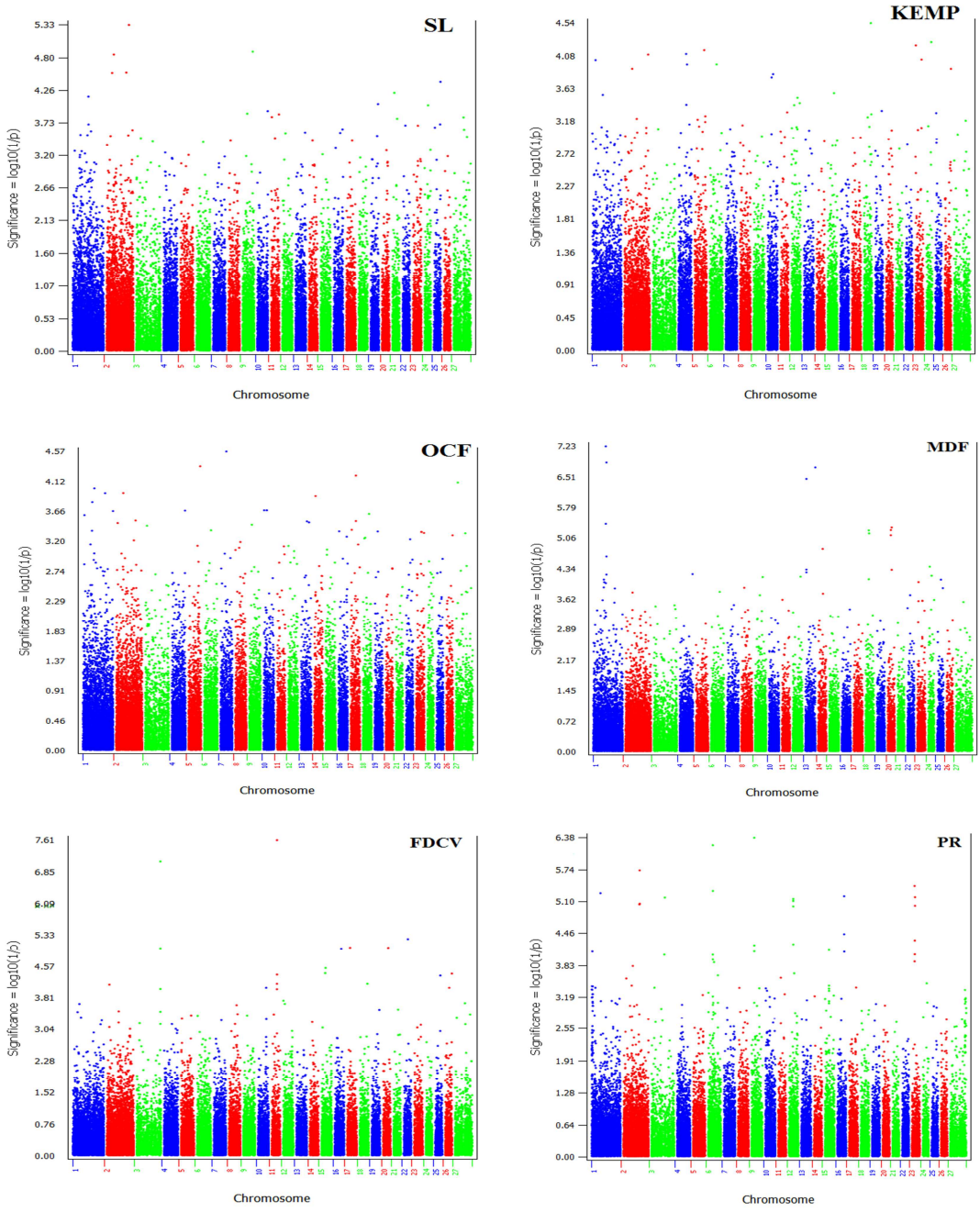
مسیر Cytokine-cytokine receptor interaction با تعداد ۲۷ ژن معنی‌دار از دیگر مسیرهایی بود که در ارتباط با ضریب تغییرات میانگین قطر الیاف و نسبت الیافی که مساوی یا بیش‌تر از ۳۰ میکرومتر شناسایی شد. این مسیر در مسیر KEGG طبقه‌بندی می‌شود. از بین ژن‌های معنی‌دار در این مسیر، ژن کاندیدای *TNFSF4* در مطالعات قبلی پویش ژنومی در گوسفندان مرینوی اسپانیایی با هدف شناسایی مناطق ژنومی تحت انتخاب مثبت، گزارش شده است (Megdiche *et al.,* 2019). ژن کاندیدای TNFSF4 در بیوسنتز هپاران سولفات و هپارین نقش دارد. این ژن نقش تنظیمی در فرایندهای آپوپتوزیس، رشد و تفرق سلولی دارند. کراتیونوسیت‌ها محصول اصلی تولیدی از سایتوکین‌ها هستند که نقش مهمی در استقامت و ریشه مو دارند (Liu *et al.,* 2018).

از مسیرهای اصلی معنی‌دار مرتبط با طول استاپل Regulation of protein processing و Calcium channel activity به‌دست آمد که جزء فرایندهای زیستی می‌باشند، از بین ژن‌های کاندیدای موجود در این مسیرها، ژن‌های کاندیدای *NLGN1* و *WDPCP* بیش‌ترین ارتباط را داشتند. ژن‌های کاندیدای NLGN1 و WDPCP در رشد و تفرق کراتیونسیت‌ها نقش کلیدی دارند (Gay *et al.,* 2015).

از مسیرهای KEGG معنی‌دار مرتبط با طول استاپل می‌توان به مسیر-Glycosaminoglycan biosynthesis heparan sulfate heparin اشاره نمود. از بین ۲۴ ژن معنی‌دار در این مسیر ژن کاندیدای *SPHKAP* در مطالعات قبلی پویش ژنومی در ارتباط با صفات کیفی الیاف در نژاد Inner Mongolia Cashmere مرتبط با صفت طول تار الیاف گزارش شده است (Wang *et al.,* 2021).

شاید بتوان مسیر Cell junction که جزو هستی‌شناسی اجزای سلولی است را یکی از مهم‌ترین مسیرهای مؤثر بر

فرایند کیفی الیاف پشم دانست. در این مسیر ژن کاندیدای *PLCE1* در مطالعات قبلی پویش ژنومی با صفت طول استاپل گزارش شده است. ژن *PLCE1* تنظیم‌کننده فعالیت فاکتور Ras guanine-exchange می‌باشد که نقش مهمی در رشد و توسعه اپیدرمال پوستی دارد. در مطالعه توالی‌یابی کل ژنوم در نژادهای مختلف گوسفند (Merino, Qinghai, Aohan)، ژن *PLCE1* مرتبط با میانگین قطر الیاف و طول استاپل گزارش شده است (Zhao *et al.*, 2021).



شکل ۳. پلات‌های منهتن حاصل از مطالعات پویش کل ژنومی برای صفات پشم. میان قطر الیاف (MFD) ضریب تغییرات میانگین قطر الیاف (FDCV)، نسبت الیافی که مساوی یا بیش‌تر از ۳۰ میکرومتر (PR)، طول استاپل (SL)، نسبت کمپ (KEMP) و نسبت مو (OCF).

مسیر Positive regulation of synapse assembly که جزو مسیرهای معنی‌دار مرتبط با نسبت کمپ به‌دست آمد حاوی هشت ژن در این مجموعه ژنی بود که از این بین ژن کاندیدای *FAT1* مرتبط با درصد کمپ می‌توان در نظر گرفت. ژن *FAT1* جزئی از خانواده ژنی FAT با ۱۱ عضو می‌باشد که دارای نقش انتقالی هستند. خانواده ژنی FAT که بیش‌تر در جمعیت‌های انسانی مورد تمایز و انتخاب قرار گرفته‌اند، نقش‌های متنوعی در مکانیسم‌های زیستی دارند. در مطالعه پویش ژنومی در گوسفندان مرینوی چینی ژن *FAT1* مرتبط با صفت پیچش و جهت‌گیری فولیکول مو گزارش شده است (Ma *et al.,* 2020).

مسیر دیگر معنی‌دار مرتبط با صفت نسبت کمپ و نسبت مو در الیاف را می‌توان ciliary basal body-plasma membrane docking نام برد که از بین ۱۷ ژن، ژن کاندیدای *PIK3R4* در مطالعه ژنومی با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب مثبت در گوسفندان نژاد قزل، مغانی و افشاری، ژن کاندیدای PIK3R4 مرتبط با قطر الیاف پشم گزارش شده است (Mohamadipoor Saadatabadi *et al.,* 2021).

با بررسی منابع انجام‌شده، پژوهش حاضر اولین مطالعه پویش کل ژنومی برپایه آنالیز مسیر مرتبط با صفات پشم در گوسفندان بومی بوده است، به همین خاطر در تجزیه و تحلیل‌ها تلاش گردید از آزمون‌های پر کاربرد و سخت‌گیرانه برای شناسایی مسیرهای زیستی معنی‌دار استفاده گردد. باید توجه کرد که یکی از محدودیت‌های اجرای مطالعات پویش ژنومی، کافی نبودن تعداد رکوردهای فنوتیپی و جمعیت غیر خویشاوند برای آنالیز پیوستگی می‌باشد که منجر به افزایش خطای نوع اول یا به عبارتی شناسایی نشانگرهای معنی‌دار مثبت کاذب می‌شود. با توجه به تعداد کم نمونه مورداستفاده در پژوهش حاضر نیز باید در استفاده از ژن‌های کاندیدای شناسایی‌شده مرتبط با صفات پشم در برنامه‌های اصلاحی با احتیاط عمل کرد. البته می‌توان با ادغام داده‌های پژوهش‌های مشابه جدید و استفاده از آنالیزهای آماری جامع‌تر برای تأیید نتایج پژوهش حاضر استفاده کرد. به‌طورکلی مسیرهای شناسایی‌شده در این پژوهش می‌تواند ما را به سمت ژن‌های مؤثر بر صفات هدایت کند و بررسی بیش‌تر نواحی مهم ژنومی شناسایی شده، به‌ویژه مناطقی که به‌طور همزمان با چند صفت مرتبط با پشم بصورت مشترک معنی‌دار هستند، با استفاده از آزمون‌های آزمایشگاهی مختلف می‌تواند در تأیید نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش مؤثر باشند.

۶- نتیجه‌گیری و پیشنهادها

با توجه به‌عملکرد بیولوژیکی مسیرهای شناسایی‌شده در این پژوهش، به‌نظر می‌رسد ژن‌های شناسایی‌شده (*CEP290*، *PRKCZ*، *TMTC3*، *RHPN2*، *NLGN1*، *FAT1* و *PIK3R4*) در بروز فنوتیپی صفات مرتبط با کیفیت پشم نقش ایفا می‌کنند، در نتیجه می‌توان کارایی روش تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی برای پویش ژنومی صفات تولیدی اقتصادی را نیز مورد تأیید قرار داد. در نهایت با وجود اهمیت و مفیدبودن این بررسی در پیشبرد کارهای اصلاحی کشور، با توجه با این‌که این کار جزو اولین بررسی‌ها در ارزیابی ژنومیکی صفات مرتبط با کیفیت پشم در گوسفند در این سطح است، نتایج این پژوهش از دیدگاه علمی در سطح کشور می‌تواند اهمیت زیادی داشته باشد.

۷- تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک به‌خاطر فراهم‌نمودن امکانات لازم برای انجام پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸- تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۹- منابع

داشاب؛ غلامرضا، اسلمی‌نژاد؛ علی‌اصغر، نصیری؛ محمدرضا، اسماعیل‌زاده کشکوئیه؛ علی و علی ساقی؛ داود (۱۳۹۱). تجزیه جایگاه های ژنی(QTL) ، مؤثر بر صفات کمی و کیفی الیاف پشم در گوسفند بلوچی. *مجله علوم دامی ایران*، ۴۳ (۴)، ۵۳۹-۵۵۲.

References

Arzik, Y., Kizilaslan, M., Behrem, S., White, S.N., Piel, L.M.W., & Cinar, M.U. (2023). Genome-Wide Scan of Wool Production Traits in Akkaraman Sheep. *Genes,* 14, 713.

Bu, D., Luo, H., Huo, P., Wang, Z., Zhang, S., Liu, L., & 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., & Neibergs, 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.

Dashab, G., Aslaminejad, A., Nasiri, M.R., Esmailizadeh, A., & Alisaghi, D. (2013). Analysis of Quantitative Trait Loci for Wool Traits in Baluchi Sheep. *Iranian Journal of animal Science,* 4, 539-552. (In Persian)

Esmaeili-Fard, S.M., Gholizadeh, M., Hafezian, S.H., & Abdollahi-Arpanahi, R. (2021). Genome-wide association study and pathway analysis identify NTRK2 as a novel candidate gene for litter size in sheep. *PLoS One,* 1, e0244408.

Fariello, M.I., Servin, B., Tosser-Klopp, G., Rupp, R., & Moreno, C. (2014). International Sheep Genomics Consortium; San Cristobal M, Boitard S. Selection signatures in worldwide sheep populations. *PLoS One,* 8, e103813.

Gay, D.L., Yang, C.C., Plikus, M.V., Ito, M., Rivera, C., Treffeisen, E., Doherty, L., Spata, M., Millar, S.E., & Cotsarelis, G. (2015). CD133 expression correlates with membrane betacatenin and E-cadherin loss from human hair follicle placodes during morphogenesis. *Journal of Investigative Dermatology,* 1, 45-55.

Lehman, J.M., Laag, E., Michaud, E.J., & Yoder, B.K. (2009). An Essential Role for Dermal Primary Cilia in Hair Follicle Morphogenesis. *Journal of Investigative Dermatology,* 129, 438-448.

Liu, C., Sello, C.T., Sun, Y., Zhou, Y., Lu, H., Sui, Y., Hu, J., Xu, C., Sun, Y., & Liu, J. (2018). De Novo Transcriptome Sequencing Analysis of Goose (Anser anser) Embryonic Skin and the Identification of Genes Related to Feather Follicle Morphogenesis at Three Stages of Development. *International Journal of Molecular Sciences,* 10, 3170.

Ma, G.W., You, X., & Yang, H. (2020). Polymorphisms and association of FAT1 gene with wool quality traits in Chinese Merino sheep. *Czech Journal of Animal Science*, 65, 31-39.

Marjanovic, J., & 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.

McMullan, R., Lax, S., Robertson, V.H., Radford, D.J., Broad, S., Watt, F.M., Rowles, A., Croft, D.R., Olson, M.F., & Hotchin, N.A. (2003). Keratinocyte differentiation is regulated by the rho and ROCK signaling pathway. *Current Biology,* 24, 2185-2189.

Megdiche, S., Mastrangelo, S., Ben Hamouda, M., Lenstra, J.A., & Ciani, E. (2019). A combined multi-cohort approach reveals novel and known genome-wide selection signatures for wool traits in Merino and Merino-derived sheep breeds. *Frontiers in Genetics,* 10, 1025.

Mohammadi, H., Rafat, S.A., Moradi Shahrbabak, H., Shodja, J., & Moradi, M.H. (2020). Genome-wide association study and gene ontology for growth and wool characteristics in Zandi sheep. *Journal of Livestock Science and Technologies,* 8(2), 45-55.

Mohamadipoor Saadatabadi, L., Mohammadabadi, M., Amiri Ghanatsaman, Z., Babenko, O., Stavetska, R., Kalashnik, O., Kucher, D., Kochuk-Yashchenko, O., & Asadollahpour Nanaei, H. (2021). Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in iranian sheep breeds. *BMC Veterinary Research,* 17(1), 369.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M., & Sham, P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics,* 3, 559-575.

Ren, X., Yang, G.L., Peng, W.F., Zhao, Y.X., Zhang, M., Chen, Z.H., Wu, F.A., Kantanen, J., Shen, M., & Li, M.H. (2016). A genome-wide association study identifies a genomic region for the polycerate phenotype in sheep (Ovis aries). *Scientific Reports,* 6, 21111.

Roldan, D.L., Dodero, A.M., Bidinost, F., Taddeo, H.R., Allain, D., Zhang, M., & Li, S. (2010). Merino sheep: a further look at quantitative trait loci for wool production. *Animal*, 4, 1330-1340.

Takahashi, T., Kamimura, A., Shirai, A., & Yokoo, Y. (2000). Several Selective Protein Kinase C Inhibitors Including Procyanidins Promote Hair Growth. *Characterization of Reconstructed Skin Models,* 13, 133-142.

Wang, L., Jia, P., & Wolfinger, R.D. (2011). Gene set analysis of genome-wide association studies: Methodological issues and perspectives. *Genomics,* 98, 1-8.

Wang, Z., Zhang, H., Yang, H., Wang, S., Rong, E., Pei, W., Li, H., & Wang, N. (2014). Genome-wide association study for wool production traits in a Chinese Merino sheep population. *PLoS One,* 9, e107101.

Young, M.D., Wakefield, M.J., Smyth, G.K., & Oshlack, A. (2010). Method gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. *Genome Biology,* 11, 14-23.

Zhao, H., Zhu, S., Guo, T., Han, M., Chen, B., Qiao, G., Wu, Y., Yuan, C., Liu, J., Lu, Z., Sun, W., Wang, T., Li, F., Zhang, Y., Hou, F., Yue, Y., & Yang, B. (2021). Whole-genome re-sequencing association study on yearling wool traits in Chinese fine-wool sheep. *Journal of Animal Science*, 9, skab210.

Zhou, X., & Stephens, M. (2012). Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nature Genetics,* 44, 821.