تولیدات دامی
دوره ۲۲ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۹
صفحه‌های ۳۳۵-۳۲۵
DOI: 10.22059/jap.2020.292715.623468

تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی با استفاده از مطالعات پویش کل ژنومی جهت شناسایی ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با تعداد نتاج در نژادهای مختلف گوسفند

امیرحسین خلت‌آبادی فراهانی[1*]، حسین محمّدی[2]، محمدحسین مرادی[1]
۱. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
۲. دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۰۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی صفت تعداد نتاج در هر زایش میش به‌عنوان یک صفت تولیدمثلی مهم بود. به این منظور از رکوردهای فنوتیپی هفت نژاد گوسفند وادی، هوی، ایسلندی، فین‌شیپ و رومانوف با باروری بالا و نژادهای تکسل و راهمنی با باروری پایین، برای مطالعه پویش ژنومی بر پایه آنالیز غنی‌سازی به‌منظور شناسایی مکانیسم‌های زیستی استفاده شد. ارزیابی پویش کل ژنومی در بسته GenABEL برنامه R انجام شد. آنالیز غنی‌سازی مجموعه ژنی با بسته نرم‌افزاری goseq برنامه R با هدف شناسایی طبقات عملکردی و مسیرهای زیستی ژن‌های نزدیک در مناطق انتخابی کاندیدا انجام شد. در این پژوهش ژن‌های *BMP5*، *DHCR24*، *BMPR1B*، *ESR1*، *ESR2* و *PLCB1* در نژادهای وادی و رومانوف، ژن‌های *SMAD1*، *SMAD2*، *INSR* و *PTGS2* در نژادهای فین‌شیپ و هوی، ژن‌های *BMP7*، *NCOA1* و *ERBB4* در گوسفند ایسلند، ژن‌های *BMP4*، *MSRB3* و *SPP1* در نژاد تکسل، و ژن‌های *BMP7*، *EGFR* و *KCNMA1* در نژاد راهمنی با تعداد نتاج متولدشده مرتبط بودند. در تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی، تعداد ۳۰ مسیر با صفت تعداد نتاج در هر زایش مرتبط بودند. از بین مسیرهای زیستی شناسایی‌شده، مسیرهای TGF-β signaling pathway، Oxytocin signaling pathway، Estrogen signaling pathway، Prolactin signaling pathway و Insulin signaling pathway نقش مهمی در نرخ تخمک‌ریزی و چند قلوزایی داشتند. با توجه به تأیید مناطق قبلی پویش ژنومی و شناسایی مناطق ژنومی جدید، استفاده از یافته‌های این پژوهش می‌تواند در انتخاب ژنتیکی گوسفند از طریق تعداد نتاج بیش‌تر در هر زایش مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: آنالیز غنی‌سازی، پویش ژنوم، چند قلوزایی، گوسفند، مسیرهای زیستی.

Gene set enrichment analysis using genome-wide association study to identify genes and pathways associated with litter size in various sheep breeds

Amir Hossein Khaltabadi Farahani[1*], Hossein Mohammadi[2], Mohammad Hossein Moradi[1]
1. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran.
2. Former Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
Received: November 28, 2019 Accepted: January 5, 2020

Abstract

The aim of this study was to identify the molecular pathways related to litter size in sheep using gene set enrichment analysis. For this purpose, information of high prolificacy sheep breeds including Wadi, Hu, Icelandic, Finnsheep, and Romanov and low prolificacy including Texel and Rahmani were used for genome wide association studies and gene set enrichment analysis. Genome-wide association study was conducted using GenABEL package of R program. Gene set enrichment analysis was performed with the goseq R package to identify the biological pathways associated with candidate genes. We identified different sets of candidate genes related to litter size: *BMP5*, *DHCR24*, *BMPR1B*, *ESR1*, *ESR2* and *PLCB1* in Wadi and Romanov; *SMAD1*, *SMAD2*, *INSR* and *PTGS2* in Finnsheep and Hu; *BMP7*, *NCOA1* and *ERBB4* in Icelandic; *BMP4*, *MSRB3* and *SPP1* in Texel; *BMP7*, *EGFR* and *KCNMA1* in Rahmani. According to pathway analysis, 30 pathways were associated with the litter size trait. Among biological pathways, the *TGF-β signaling*, *Oxytocin signaling*, *Estrogen signaling*, *Prolactin signaling*, and *Insulin signaling* pathways have significant association with ovulation rate and litter size trait. Overall, this study supported previous results from GWAS for litter size, also revealed additional regions in the sheep genome associated with litter size in sheep. These findings could potentially be useful for selective breeding for more litter size in sheep.

Keywords: Biological pathways, Gene set enrichment analysis, Genome scan, Prolificacy, Sheep.

* نویسنده مسئول Email: a-farahani@araku.ac.ir

مقدمه

گوسفند حیوان مهم تولیدکننده گوشت در نواحی گرمسیری، از جمله کشورهای خاورمیانه است و عملکرد اقتصادی آن بستگی به توانایی رشد و تولیدمثل مطلوب دارد [۱۷]. بیش از ۵۰ میلیون رأس گوسفند در ایران وجود دارد که شامل ۲۷ نژاد و اکوتیپ هستند [۳]. از طرفی تعداد نتاج متولدشده در هر زایش یکی از مهم‌ترین صفت اقتصادی در صنعت پرورش گوسفند است [۲٤]. در واقع یکی از اجزای بیولوژیکی در تولید، صفات تولیدمثلی می‌باشد. لذا بازده پرورش گوسفند به مقدار زیادی تابع توان تولیدمثلی میش‌ها می‌باشد. به‌عبارت دیگر، افزایش تعداد بره‌های متولدشده به‌ازای هر میش در یک سال سبب افزایش بازده تولید در پرورش گوسفند می‌شود. هدف از مطالعات پویش ژنومی که به‌منظور شناسایی وابستگی بین یک نشانگر SNP و یک صفت با استفاده از نشانگرهای با تراکم بالا در سطح ژنوم می‌باشد، پیداکردن جهش‌های مؤثر یا مسبب بوده که بر فنوتیپ یک صفت تولیدی، تولیدمثلی و یا بیماری اثر می‌گذراند. این اطلاعات می‌تواند برای انتخاب به‌کمک نشانگر مفید بوده و به درک مکانیسم مولکولی صفات موردمطالعه کمک نماید [۷].

یکی از مشکلات پژوهش‌های مطالعات پویش ژنومی، استفاده از تصحیح بنفرونی برای جلوگیری از بروز خطای نوع اول است. درحالی‌که پرهیز از خطای نوع اول سبب افزایش خطای نوع دوم می‌شود. یکی از راه‌کارهای مناسب برای حل این مشکل، انجام مطالعات پویش کل ژنومی بر مبنای مسیر است [۲۱]. در واقع در این روش به‌جای انجام تجزیه برای یک SNP یا یک ژن، ارتباط بین صفت موردمطالعه و واریانت‌های ژنتیکی را در یک دسته یا گروه ژنی که به‌طور عملکردی با هم مرتبط هستند، بررسی می‌کند. به‌عبارتی دیگر آنالیز پیوستگی بین یک مجموعه ژنی معنی‌دار زیستی با فنوتیپ مورد آزمون قرار می‌گیرد. در این روش ژن‌هایی موردبررسی قرار می‌گیرند که به‌تنهایی اثر آن‌ها بر صفت موردنظر معنی‌دار نشده و دارای اثرات متوسطی می‌باشند، ولی اثر تجمعی آن‌ها روی صفت دارای اثر معنی‌دار است. برای این‌که بتوان تفسیر درستی از کنار هم قراردادن این ژن‌ها حاصل شود، از مسیرهای زیستی به‌عنوان بستری معنی‌دار که عملکرد مجموع ژن‌ها در آن‌ها یک یا چند هدف واحد را پیگیری می‌کند، استفاده می‌شود [۱٤].

گزارش شده که آنالیز پویش ژنومی بر مبنای مسیر دقت شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر صفت نرخ باروری گاوهای نر را بالا می‌برد، زیرا با استفاده از این روش تمامی نشانگرهای معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ آنالیز می‌شوند و در نتیجه میزان خطای نوع اول و بیش‌برآوردها کاهش پیدا می‌کند [۲۱]. اخیراً مطالعه پویش ژنومی بر مبنای مسیر با استفاده از آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی روی صفت دو قلوزایی در گوسفندان بلوچی انجام شده است. نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز مسیر، منجر به شناسایی ۲۵ طبقه مختلف عملکردی هستی‌شناسی ژن و مسیرهای زیستی KEGG معنی‌دار مرتبط با دو قلوزایی و ژن‌های کاندیدای PTGER3، LDHB، LRRC40، CTH، ANKRD13C و KCNMA1 شده بود [٦].

هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی مناطق ژنومی حاوی مسیرهای زیستی و ژن‌های کاندیدای مرتبط با تعداد نتاج در هر زایش در هفت نژاد گوسفند براساس تجزیه بر مبنای مسیر و با استفاده از روش غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ابتدا فایل‌های تعیین ژنوتیپ با استفاده از تراشه‌های ژنومی همراه با رکوردهای فنوتیپی مرتبط با صفات تولیدمثلی که مربوط به گونه گوسفند بوده و در پایگاه‌های مختلف داده‌های ژنومی (Dryad، NABIC،

Zenodo، Animal Genome) ذخیره شده بودند، استخراج و برحسب اطلاعات مفید گروه‌بندی شدند. درنهایت از اطلاعات مرتبط با تعداد نتاج متولدشده در هر زایش از هفت نژاد مختلف گوسفند وادی (Wadi)، هوی (Hu)، ایسلندی (Icelandic)، فین‌شیپ (Finnsheep)، رومانوف (Romanov)، تکسل (Texel) و راهمنی (Rahmani) استفاده شد [۷ و ۲٤]. از نژادهای وادی، هوی، ایسلندی، فین‌شیپ و رومانوف به‌عنوان نژادهای با باروری بالا و نژادهای تکسل و راهمنی به‌عنوان نژادهای با باروری پایین استفاده شد.

داده‌های مورداستفاده در این پژوهش ابتدا با هدف پویش کل ژنومی جهت شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با تعداد نتاج متولدشده در هر زایش براساس مدل خطی مختلط تک نشانگری تجزیه شده بودند. در مطالعات اولیه از تصحیح بنفرونی برای تعیین آستانه معنی‌داری و جلوگیری از خطای نوع اول استفاده شده بود. با توجه به این‌که در مطالعات مختلف از تراشه‌های با تراکم متفاوت استفاده شده بود. لذا جهت انجام آنالیز پویش کل ژنومی به تراشه‌ای با تراکم همگن نیاز بود، بنابراین لازم بود که کلیه تراشه‌ها به یک تراکم واحد تبدیل شوند. برای این منظور تراشه با تراکم ۵۳۸٦۲ به‌عنوان تراشه مرجع در نظر گرفته شد.

برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاط جمعیتی داخل نژادها با استفاده از آزمون مقیاس‌گذاری چندبعدی (MDS) و براساس بررسی ارتباط میان افراد برمبنای ماتریس همبستگی IBS بین دو فرد در نرم‌افزار PLINK (نسخه ۱/۹) انجام شد. به این منظور در پنجره‌هایی شامل ۵۰ SNP و با حرکت ۵ SNP رو به جلو در هر مرحله، SNPهای دارای r^2 بیش از ۰/۰۵ (دستور --indep-pairwise 50 5 0.05) یکی از SNPها از مجموعه داده‌ها حذف شدند [۲٤]، سپس آزمون MDS روی SNPهای مستقل انجام و ابعاد یک و دو آزمون MDS در آنالیزها استفاده شدند.

نشانگرهای تک‌نوکلئوتیدی که از تمام مراحل کنترل کیفیت شامل نشانگرهای با حداقل فراوانی آللی بالاتر از ۰/۰۵، میزان فراخوانی آللی بالاتر از ۰/۹۵، SNPهایی که در تعادل هاردی- واینبرگ نبودند و SNPهای با موقعیت نامشخص روی کروموزوم، برای آنالیزهای بعدی نگه‌داشته شدند. در نهایت بعد از کنترل کیفیت تعداد ۳۳۷ فرد و تعداد ۳٦۳٤۲ SNP برای آنالیزهای پویش کل ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی باقی ماندند. تعداد افراد باقیمانده در داخل هر یک از نژادها و هم‌چنین نحوه توزیع رکورد فنوتیپی صفت تعداد نتاج متولدشده هر زایش در جدول (۱) ارائه شده است. جهت ارتباط فنوتیپ‌ها با ژنوتیپ‌ها از طرح کنترل موردی نرم‌افزار GenABEL از بسته‌های نرم‌افزاری برنامه R (نسخه ۳/٦/۱) استفاده شد.

جدول ۱. ساختار داده‌ها در هفت نژاد مورد مطالعه

نژاد	تعداد	تک قلو	چند قلوزا
وادی	۵۵	۱۲	٤۳
هوی	۷۷	۱۵	٦۲
ایسلندی	۲۳	۸	۱۵
فین‌شیپ	۳۷	۹	۲۸
رومانوف	۳۸	۹	۲۹
تکسل	۵۹	۳۱	۲۸
راهمنی	٤۸	۱۹	۲۹

آنالیز پویش ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی در سه مرحله تعیین مکان SNPهای معنی‌دار با ژن، ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای زیستی و پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر انجام می‌شود.

SNPهایی که مقدار *P*-value آن‌ها کم‌تر از ۰/۰۵ بود با استفاده از بسته نرم‌افزاری *biomaRt2* در محیط R (نسخه ۳/٦/۱) با دستور ()getBM و با استفاده از رفرانس

ژنومی گوسفند به ژن‌هایی که نشانگر SNP مورد نظر در داخل آن ژن و یا kb ۲۵ بالادست یا پایین‌دست آن ژن قرار داشت، ارتباط داده شدند.

هت تعیین طبقات عملکردی ژنی و مسیرهای متابولیکی و تنظیمی ژن‌های معنی‌دار از پایگاه‌های اطلاعاتی شامل هستی‌شناسی ژن (GO, /http://www.geneontology.org) و مسیرهای زیستی (KEGG, /http://www.genome.jp/kegg) جهت تعیین طبقات عملکردی و مسیرهای زیستی استفاده شد. در این مرحله فرض بر این است که ژن‌هایی که در یک طبقه عملکردی قرار می‌گیرند، می‌توانند به‌عنوان یک گروه از ژن‌هایی که برخی از ویژگی‌های خاص و مشترک دارند مانند شرکت در سه فرایند هستی‌شناسی شامل فرایندهای زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی در نظر گرفته شوند.

ارتباط‌های معنی‌دار مسیرهای عملکردی با صفات مرتبط با تعداد نتاج در هر زایش با استفاده از توزیع فوق هندسی و آماره Fisher's exact test مورد آزمون قرار گرفت. P-value مسیرهای عملکردی که تعداد k ژن معنی‌دار در آن قرار دارد با رابطه محاسبه شد.

رابطه (۱) $$P-value = 1-\sum_{i=1}^{k-1}\frac{\binom{s}{i}\binom{\mathrm{N-S}}{\mathrm{m-i}}}{\binom{N}{m}}$$

که در این رابطه، k، برابر با تعداد ژن‌های معنی‌دار در طبقه عملکردی؛ S، برابر با تعداد کل ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفات مورد بررسی؛ N، برابر با کل تعداد ژن‌هایی که در این مطالعه آنالیز شدند و m، برابر با تعداد کل ژن‌های موجود در مسیر عملکردی است.

غنی‌سازی مجموعه ژنی با استفاده از بسته نرم‌افزاری *goseq* در محیط نرم‌افزار R (نسخه۳/۶/۱) تجزیه شد. بسته *goseq* از آزمون فوق هندسی استفاده می‌کند و برای اختلاف طول ژن‌ها نیز تصحیح انجام می‌شود. برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به‌دست‌آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی آنلاین GeneCards (http://www.genecards.org) و UniProtKB (http://www.uniprot.org) استفاده شد.

نتایج و بحث

تعداد ۲۵۷۵۸ عدد ژن از ۲۷۰۵٤ ژن حاشیه‌نویسی‌شده در گوسفند به‌وسیله نشانگرهای SNP پوشش داده شد که در این میان تعداد ژن‌های معنی‌دار در گوسفندان وادی، هوی، ایسلندی، فین‌شیپ، رومانوف، تکسل و راهمنی به‌ترتیب ۲۸۵۰، ۳۳۸۱، ۳۱۸۸، ۳۰۵۱، ۳۲۸۹، ۲۷۳۳ و ۱۹٤۱ 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 kb ۲۵ قرار گرفت. این ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفت تعداد نتاج در هر زایش برای تجزیه GSEA-SNP انتخاب شدند. تعداد مجموعه‌های ژنی حاصل از پایگاه‌های داده‌ای مختلف شامل ۱٤۱۷، ۱۸۵۳، ۱٤۸۹، ۱۵۷٤، ۱٦٤۳، ۱۲۷٦ و ٦٤۳ طبقات هستی‌شناسی به‌ترتیب در نژادهای وادی، هوی، ایسلندی، فین‌شیپ رومانوف، تکسل و راهمنی به‌دست آمد و ۱۲٤، ۱۳۷، ۱۲۵، ۱۱۰، ۹۳، ۹۷ و ۵۸ مسیر زیستی KEGG به‌ترتیب در نژاد نژادهای وادی، هوی، ایسلندی، فین‌شیپ رومانوف، تکسل و راهمنی مشاهده شد. مسیرهایی که بیش‌تر از سه ژن و کم‌تر از ۳۰۰ ژن داشتند، گزارش شده‌اند.

براساس تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO)، فرایندهای زیستی مختلفی برای ژن‌های مؤثر بر تعداد نتاج متولدشده در هر زایش مشاهده شد که مطابق با نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش‌های پیشین بود [۲۰ و ۲٤]. جزئیات کامل ترم‌های هستی‌شناسی به‌همراه اسامی ژن‌های کاندیدا در جدول (۲) ارائه شده است. نتایج حاصل از این تحلیل نشان‌دهنده این است که ژن‌های BMP5، TEX15 و DHCR24 با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۳٦ با فرایند male genitalia development، ژن‌های ESR1 و ESR2 با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۲۲ با فرایند cellular response to estrogen stimulus و ژن PLCB1 در فرایند زیستی regulation of fertilization مرتبط با تعداد

نتاج در هر زایش هستند، در گوسفندان نژاد وادی و رومانوف مشاهده شد. برخی از ژن‌های این فرایند زیستی در مطالعات مختلف بررسی ژن‌های کاندیدای مرتبط با تولیدمثل به‌خصوص چند قلوزایی در ارتباط می‌باشند. ژن BMP5 نقش کلیدی در رشد و تفرق فولیکولی و تخمک‌اندازی دارد. ارتباط معنی‌داری بین SNP موجود در ژن BMP5 با صفات تعداد نتاج در هر زایش و وزن تولد گزارش شده است [۱۲].

جدول ۲. مهم‌ترین مسیرهای غنی‌شده مرتبط با ژن‌های هدف تعداد نتاج در هر زایش در گوسفندان مختلف جهان

نام مسیر	کل ژن‌های موجود در Term	ژن‌های معنی‌دار	ژن‌های کاندیدای مرتبط	P-adjust
فرایند زیستی				
مسیرهای غنی‌شده در گوسفند وادی و رومانوف				
Male genitalia development (GO:0030539)	۳۳	۷	**BMP5, TEX15, DHCR24**	۰/۰۰۳۶
Smooth muscle tissue development (GO:0060537)	۲۱	٤	**TBX3**	۰/۰۰۱۷
Regulation of fertilization (GO:0009566)	۲۹	٤	**PLCB1, ESR1, ESR2**	۰/۰۰۰۲
Cellular response to estrogen stimulus (GO:0071391)	۱۳	٥	**ESR1, ESR2**	۰/۰۰۲۲
مسیرهای غنی‌شده در گوسفند ایسلند				
Embryonic pattern specification (GO:0009880)	۱٥	٦	**BMP7, ERBB4**	۰/۰۰٤۹
Embryonic skeletal system morphogenesis (GO:0048704)	٦۷	۱۰	**SOX11, NCOA1**	۰/۰۰٤۸
مسیرهای غنی‌شده در گوسفند تکسل				
Positive regulation of cell-substrate adhesion (GO:0010811)	۸٦	۱۱	**MSRB3**	۰/۰۰۱۹
Embryonic digit morphogenesis (GO:0042733)	۹۲	۱٦	**BMP4, ANXA1**	۰/۰۰٤۰
مسیرهای غنی‌شده در گوسفند فین‌شیپ و هوی				
Antral ovarian follicle growth (GO:2000387)	۲٤	٤	**GPR149, ESR1**	۰/۰۱۲٥
Regulation of embryonic development (GO:0045995)	۲٤	۷	**INSR**	۰/۰۳٥۰
Embryonic cranial skeleton morphogenesis (GO:0048701)	۲۳	٦	**SMAD2, SMAD1**	۰/۰۲۲۳
مسیرهای غنی‌شده در گوسفند راهمنی				
Cellular response to estradiol stimulus (GO:0071392)	۳٦	۸	**EGFR, NCOA3, NRIP1**	۰/۰۰۳۰
Positive regulation of apoptotic process (GO:0043065)	٥۹	۱۸	**BMP7, KCNMA1**	۰/۰۰۱۲
اجزای سلولی				
مسیرهای غنی‌شده در گوسفندان مختلف جهان				
Focal adhesion (GO:0005925)	۲۳۲	۳٦	**ANXA1, IGF2R, MPRIP**	۰/۰۰۰۲
Cell-cell junction (GO:0005911)	۱۸۷	۱٤	-	۰/۰۱۲٤
Cell junction (GO:0030054)	۱۹۲	۱۹	**PTPRR**	۰/۰۰۳۷

مطالعات اخیر نشان‌دهنده این است که ژن‌های ESR1 و ESR2 ژن‌های بسیار مهمی هستند که در مکانیسم چندقلوزایی نقش دارند [۱۵]. این ژن‌ها در دو مسیر مختلف فرایند زیستی شامل Regulation of fertilization و Cellular response to estrogen stimulus مشاهده شد. استروژن یکی از دو هورمون جنسی استروئیدی است که به‌وسیله تخمدان ترشح می‌شود و در رشد جنینی، بروز صفات ثانویه جنسی، سیکل باروری شامل شکل‌گیری فولیکول‌ها و بلوغ تخمک‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند. برای تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی هورمون‌های استروئیدی وجود گیرنده‌ها در سلول‌های هدف ضروری می‌باشد. گیرنده‌های استروژن در سلول‌های رحم و واژن و به‌طور اختصاصی در تخمک، سلول‌های گرانولوزا و سلوهای اپیتلیال تخمدان وجود دارند.

ژن‌های BMP7 و ERBB4 با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۴۹ با فرایند embryonic pattern specification و ژن SOX11 با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۴۸ با فرایند embryonic skeletal system morphogenesis در گوسفندان نژاد ایسلند مشاهده شد. BMP7 و ERBB4 دو ژن مهم دیگری مرتبط با چندقلوزایی می‌باشند، که تأثیر این دو ژن در چندقلوزایی در مطالعات اخیر مشاهده است. ارتباط معنی‌داری بین ژن کاندیدای BMP7 با صفات تولیدمثلی تعداد نتاج متولدشده و تعداد نتاج زنده متولدشده گزارش شده است [۱۱]. هم‌چنین ژن کاندیدای BMP7 محرک تقسیم میتوز سلول‌های گرانولوزا بوده و تولید پروژسترون تخمدانی می‌شود. ژن ERBB4 یک ژن درگیر در لانه‌گزینی بوده و در اپیتلیوم رحم چسبندگی آغازین را برعهده دارد. هم‌چنین بلاستوسیست‌های قبل از لانه گزینی، ERBB4 را بیان می‌کنند [۱۰].

فرایندهای زیستی معنی‌دار مشاهده‌شده در نژاد تکسل شامل ژن MSRB3 با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۱۹ با فرایند positive regulation of cell-substrate adhesion و ژن‌های BMP4, ANXA1 با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۴۰ با فرایند embryonic digit morphogenesis مشاهده شدند.

BMP4و MSRB3 دو ژن مهم در ارتباط با صفات تولیدمثلی تأثیرگذار می‌باشند و می‌توانند در صفت چندقلوزایی نیز تأثیرگذار باشند. ارتباط معنی‌داری بین ژن کاندیدای BMP4 با صفت باروری مرتبط با رشد و توسعه فولیکول‌های تخمدانی وجود دارد، به‌طوری‌که در گوسفندان نژاد Garole با باروری بالا و حامل ژن FecB بالاترین مقدار بیان ژن BMP4 در بافت تخمدان در مقایسه با گوسفندان با باروری پایین گزارش شده است [۸].

فرایندهای زیستی مشاهده‌شده در نژادهای فین‌شیپ و هوی شامل ژن‌های GPR149 و ESR1 با سطح معنی‌داری ۰/۰۱۲۵ با فرایند antral ovarian follicle growth، ژن‌های SMAD1 و SMAD2 با سطح معنی‌داری ۰/۰۲۲۳ با فرایند embryonic cranial skeleton morphogenesis و ژن‌های INSR و PTGS2 با سطح معنی‌داری ۰/۰۳۵۰ با فرایند regulation of embryonic development بود.

با تحلیل عملکردی ژن‌های موجود در فرایند زیستی که می‌توانند در وقوع تخمک‌اندازی دخیل باشند شامل ژن‌های SMAD1 و SMAD2 می‌باشند. در توالی‌یابی کل ژنوم ارتباط معنی‌داری بین ژن‌های کاندیدای SMAD1 و SMAD2 مرتبط با صفت تولیدمثلی تعداد نتاج متولدشده در بزهای شیری با باروری بالا نژاد Laoshan (سه بزغاله در هر زایش) [۱۰] و در مطالعه اولیه در گوسفندان نژاد هوی با باروری بالا [۲٤] گزارش شده است. هم‌چنین ارتباط معنی‌داری بین ژن *PTGS2* با صفات کیفی اسپرم شامل جنبایی، حرکات پیش‌رونده اسپرم، تعداد اسپرم در هر انزال و تعداد نرمال بودن در هر انزال گزارش شده است [۱٤]. در مطالعه اولیه آنالیز پویش ژنومی نژاد

فین‌شیپ، ژن *PTGS2* به‌عنوان ژن کاندیدای مرتبط با تعداد نتاج در هر زایش شناسایی شده بود [۲٤]. ژن‌های *EGFR*، *NCOA3* و *NRIP1* با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۳۰ با فرایند cellular response to estradiol stimulus و ژن‌های *BMP7* و *KCNMA1* با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۱۲ با فرایند positive regulation of apoptotic process در گوسفندان نژاد دنبه‌دار راهمنی مشاهده شد.

EGFR و *KCNMA1* دو ژن مهم دیگری مرتبط با چند قلوزایی می‌باشند که در ترم‌های مختلف هستی‌شناسی مشاهده شدند. حذف در ژن کاندیدای *EGFR* سبب نقص در رشد و توسعه جنین و عدم تشکیل جفت می‌شود [۲۳]. در مطالعه‌ای با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای دو قلوزایی در گوسفند بلوچی بر پایه آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی، ژن *KCNMA1* تأثیرگذار گزارش شده است [٦].

علاوه بر این، هستی‌شناسی اجزای سلولی مشترک بین نژادهای مختلف شامل ژن‌های *ANXA1*، *IGF2R* و *MPRIP* با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۰۲ در اجزای سلولی focal adhesion و ژن *PTPRR* با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۳۷ در اجزای سلولی cell junction مشاهده شد. مسیر cell junction یکی از مهم‌ترین مسیرهای مؤثر بر فرایندهای تخمدان معرفی شده است و در مطالعات اخیر در ارتباط با شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر دو قلوزایی در گوسفندان نژاد بلوچی گزارش شده است [٦]. مسیر ذکرشده در حمایت از سوخت‌وساز تخمک در حال رشد، یون‌ها برای تنظیم pH تخمک و cGMP مورد نیاز برای نگهداری و حفظ تخمک در حالت میوزی نقش دارد.

مسیرهای زیستی مرتبط با ژن‌های تولیدمثلی با استفاده از پایگاه داده KEGG موردبررسی قرار گرفته شد که با نتایج برخی از پژوهش‌های قبلی مرتبط با صفات تولیدمثلی مطابقت داشت [۹، ۱۲ و ۱۳]. جزئیات کامل این مسیرهای زیستی به‌همراه اسامی ژن‌های کاندیدا در جدول (۳) ارائه شده است. با بررسی نتایج حاصل‌شده مشاهده می‌شود که ژن‌های *BMP2*، *BMPR1B*، *BMPR2*، *LTBP1*، *TGFB2* و *TGFB3* با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۱۲ با مسیر زیستی TGF-beta signaling pathway، ژن‌های *ADCY2*، *EGFR* و *PTGS2* با سطح معنی‌دار ۰/۰۰۲۳ با مسیر زیستی Oxytocin signaling pathway، ژن‌های *ADCY1* و *MEF2C* با سطح معنی‌داری ۰/۰۲٦۸ با مسیر زیستی Estrogen signaling pathway در گوسفندان وادی، رومانوف، فین‌شیپ، ایسلندی و هوی مشاهده شدند.

تحلیل مسیرهای زیستی KEGG نشان‌دهنده این است که ژن‌های *BMPR-1B*، *BMP2* و *BMPR2* به‌طور معنی‌داری با مسیر زیستی TGF-β در ارتباط می‌باشند. این مسیر زیستی نقش مهمی در مکانیسم تولیدمثلی به‌خصوص تعداد نتاج در هر زایش دارد. در شکل ۱ مسیر سیگنالی TGF-β و ژن‌های مربوطه شناسایی‌شده از پایگاه برخط KEGG ارائه شده است. در بعضی از مطالعات ژنتیکی نشان داده شده که میزان تخمک‌اندازی و تعداد نتاج در هر زایش می‌تواند تحت تأثیر چند ژن بزرگ اثر باشند. سه ژن از اعضای خانواده TGF-β و از لحاظ بیولوژیکی دارای سیستم فعالی می‌باشند که بخش قابل‌توجهی از واریانس صفت چندقلوزایی را در گوسفند تشکیل می‌دهند. این سه دسته ژن باروری عبارتند از ژن گیرنده پروتئین مورفوژنیک استخوان تیپ B، GDF9 و ژن‌های BMP که جزو ابر خانواده TGF-β بوده و بر تنظیم بیان و ترشح هورمون‌های مؤثر بر رشد فولیکولی و نرخ تخمک‌اندازی مؤثرند و توسط تخمک تولید می‌شوند [۲۳].

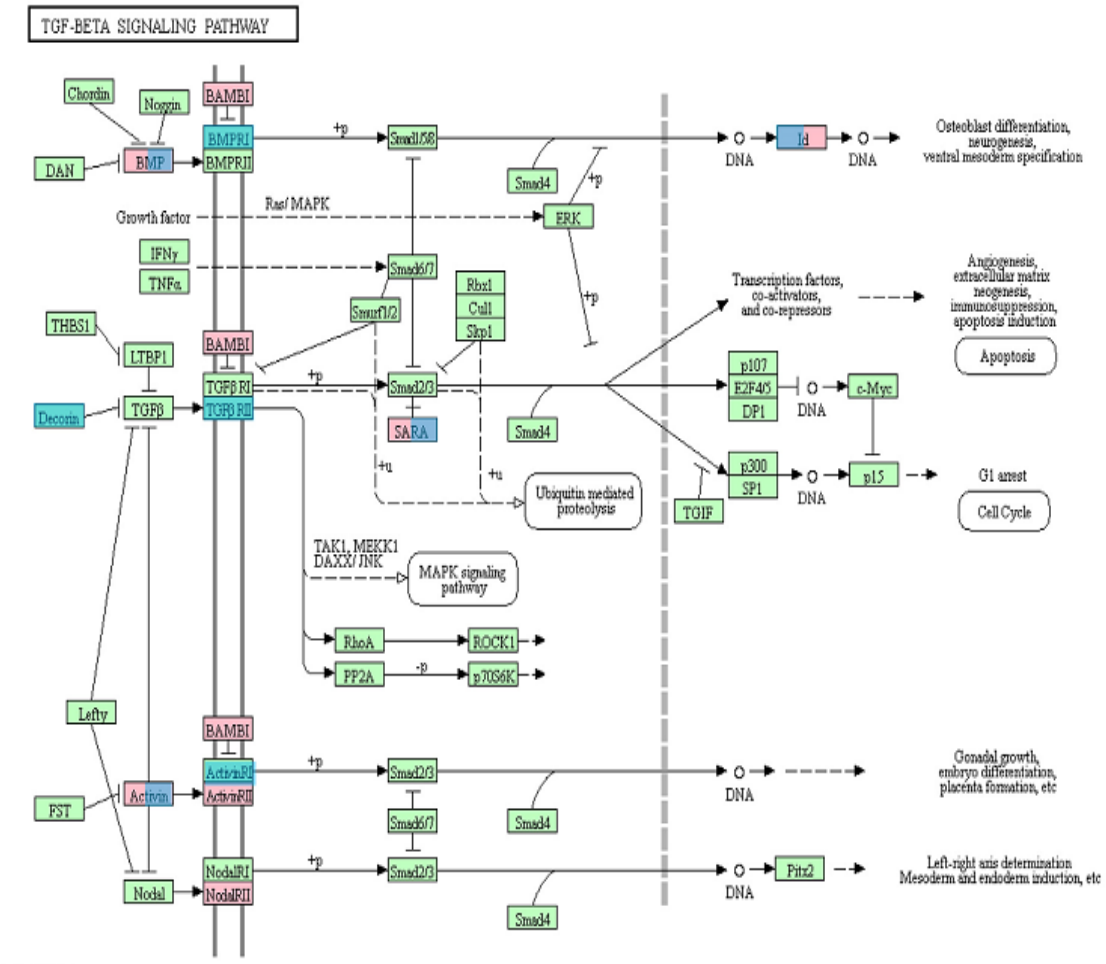
BMPها در توسعه جنین، هموستازی، تکثیر و تفرق الگوهای بافتی مختلف، تمایز سلولی و آپوپتوسیز سلول نقش دارند و BMPR-1B یکی از گیرنده‌های خاص

تیپ-۱ برای لیگاندهای خانواده‌های BMP می‌باشد. در مطالعه اولیه آنالیز پویش ژنومی نژاد وادی ژن *BMPR-1B* به‌عنوان ژن کاندیدای تعداد نتاج در هر زایش گزارش شده بود [۲٤]. هم‌چنین در نژادهای مختلف گوسفندان ایرانی شامل بلوچی [۱٦]، مغانی و قزل [۲] ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی موجود در ژن کاندیدای *BMPR-1B* با دو قلوزایی گزارش شده است. به‌طورکلی، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ژن *BMPR-1B* در گوسفند نژادهای مختلف می‌تواند ژن کاندیدای مؤثری بر صفت تعداد نتاج متولدشده در هر زایش باشد.

ژن‌های *ADCY1* و *MEF2C* نیز به‌طور معنی‌داری با مسیر زیستی Estrogen signaling pathway در ارتباط می‌باشند. این مسیر زیستی از طریق هیپوتالاموس تنظیم‌کننده صفات تولیدمثلی شامل رشد جفت و عملکردهای رحمی، دمای بدن و تنظیم انرژی در بدن است. ارتباط معنی‌داری بین SNP موجود در ژن کاندیدای *ADCY2* با فرایند تحریک هورمون‌های فولیکولی و فاز لوتئیزه و صفات تولیدمثلی شامل سن در اولین تلقیح و سن در اولین زایش گزارش شده است [۲۲]. ژن کاندیدای *MEF2C* در ناحیه ژنومی مؤثر بر تعداد نتاج متولدشده در هر زایش و تعداد نتاج زنده متولد شده قرار دارد [۱۹].

جدول ۳. مهم‌ترین مسیرهای زیستی KEGG مرتبط با ژن‌های هدف تعداد نتاج در هر زایش در گوسفندان مختلف جهان

نام مسیر	کل ژن‌های موجود در Term	ژن‌های معنی‌دار	ژن‌های کاندیدا	P-adjust
مسیرهای غنی‌شده در گوسفندان وادی، رومانوف، فین-شیپ، ایسلندی و هوی				
TGF-β signaling pathway (hsa04350)	٥٤	۲۰	***BMP2, BMP4, BMP5, BMP7, BMP8B, BMPR1B, BMPR2, ACVR1, LTBP1, TGFB2, TGFB3***	۰/۰۰٤
PPAR signaling pathway (hsa03320)	٥۱	۱٦	-	۰/۰۰۳۷
GnRH signaling pathway (hsa04012)	٤۹	۱۳	***PTK2B, GNRHR***	۰/۰۲۹۷
Oxytocin signaling pathway (hsa04921)	۹۳	۳۹	***ADCY2, EGFR, PTGS2***	۰/۰۰۲۳
Estrogen signaling pathway (hsa04915)	۸۹	۲٤	***EGFR, ADCY1, MEF2C***	۰/۰۲٦۸
Estrogen receptor beta (hsa04915)	٦۰	٦	-	۰/۰۱۹۱
AMPK signaling pathway (hsa04152)	۸۰	۲٥	***ACACA, INSR***	۰/۰۰٦۱
MAPK signaling pathway (hsa04010)	٦۷	۲٦	***FGF10, FGF19, FGFR2***	۰/۰۰٥۱
Vascular smooth muscle contraction (hsa04270)	٦۷	۲٥	***ADCY2, ADCY3***	۰/۰۲۱۹
مسیرهای غنی‌شده در گوسفندان تکسل و راهمنی				
ECM-receptor interaction (hsa04512)	٥۰	۲۷	***SPP1***	۰/۰۰٤٥
Prolactin signaling pathway (hsa04917)	٤٥	۱۷	***ESR1, PRL, LHB, LHCGR, STAT5B***	۰/۰۰٤۳
Insulin signaling pathway (hsa04910)	۹٤	۳٤	***KCNMA1, ADCY1***	۰/۰۰۲٦
Insulin secretion (hsa04911)	٥٦	۱۱	***ADCY1, ADCY3***	۰/۰۲۱۰
TNF signaling pathway (hsa04668)	٦۹	۲٤	***TNFRSF1B***	۰/۰۰۳۱



شکل ۱. مسیر سیگنالی TGF-β و ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفت تعداد نتاج در هر زایش که به‌صورت هایلایت مشخص شده‌اند (پایگاه داده KEGG).

هم‌چنین ژن‌های *ESR1*، *PRL*، *LHB*، *LHCGR* و *STAT5B* با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۴۳ با مسیر زیستی Prolactin signaling pathway و ژن *KCNMA1* با سطح معنی‌داری ۰/۰۰۲۶ با مسیر زیستی Insulin signaling pathway در گوسفندان تکسل و راهمنی مشاهده شدند. ژن-های کاندیدای *LHB* و *LHCGR* در ارتباط با مسیر تولید-مثلی گنادوتروپین و گیرنده‌های آن در انسان گزارش شده است [٤]. در مطالعه پویش کل ژنومی در گوسفندان ایرانی لری-بختیاری با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با چندقلوزایی انجام گرفته بود، ژن کاندیدای *LHCGR* به‌عنوان ژن مؤثر بر دوقلوزایی گزارش شده است [۱]. هم‌چنین ارتباط معنی‌داری بین ژن *LHB* با صفات کیفی اسپرم تازه و بعد از ذوب در بزهای نر نژاد بوئر گزارش شده است [۱۸]. ژن *STAT5B* متعلق به خانواده فاکتورهای رونویسی است و اثرات زیستی و تعدیل‌کننده مهمی برای هورمون رشد، گیرنده هورمون رشد، فاکتور رشد شبه‌انسولین و پرولاکتین می‌باشد. این ژن واسطه فعال‌شدن رونویسی و بیان ژن‌های هدف هورمون رشد به‌خصوص IGF-1 و IGFBP3 می‌باشد.

علاوه بر این، مسیرهای زیستی مرتبط با صفات تولیدمثلی شناسایی شد شامل مسیر زیستی GnRH signaling pathway هورمون آزادکننده گنادوتروپین از هورمون‌های هیپوتالاموسی می‌باشد و در بلوغ اووسیت و تخمک‌اندازی نقش دارد [۱۰]. مسیر زیستی AMPK signaling pathway یک تنظیم‌کننده جدید آزادکننده GnRH می‌باشد که نقش کلیدی در بلوغ و تولیدمثل از طریق هورمون‌های LH و FSH در بدن دارد [۱۰]. مسیر زیستی PPAR signaling pathway در آنالیز بیان کل ژنوم در دو نژاد مختلف با باروری بالا و پایین از بافت تخمدان از مسیرهای KEGG معنی‌دار مؤثر بر تعداد نتاج در هر زایش در گوسفند گزارش شده است [۵].

بررسی مناطق ژنومی به‌دست‌آمده با استفاده از پایگاه داده BioMart، GeneCards و UniProtKB نشان داد که بیش‌تر این مناطق شناسایی‌شده روی کروموزوم‌های مختلف با صفات تولیدمثلی در نژادهای مختلف گوسفند مرتبط می‌باشند. با توجه به عملکرد بیولوژیکی مسیرهای شناسایی‌شده در این پژوهش، به‌نظر می‌رسد این ژن‌ها در بروز فنوتیپی صفت تعداد نتاج در هر زایش نقش ایفا می‌کنند، در نتیجه می‌توان کارایی روش تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی برای پویش ژنومی صفات تولیدی اقتصادی به‌خصوص صفت تعداد نتاج در هر زایش را نیز مورد تأیید قرار داد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از نویسندگان اصلی مقاله به‌خاطر فراهم‌نمودن اطلاعات موردنیاز این تحقیق، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Abdoli R, Mirhoseini SZ, Ghavi Hossein-Zadeh N, Zamani P and Gondro C (2018) Genome-wide association study to identify genomic regions affecting prolificacy in Lori-Bakhtiari sheep. Animal Genetics, 49(5): 488-491.
2. Barzegari A, Atashpaz S, Ghabili K, Nemati Z, Rustaei M and Azarbaijani R (2010) Polymorphisms in GDF9 and BMP15 associated with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghezel sheep in Iran. Reproduction in Domestic Animals, 45(4): 666-669.
3. Bohlouli M, Mohammadi H and Alijani S (2013) Genetic evaluation and genetic trend of growth traits of Zandi sheep in semi-arid Iran using random regression models. Small Ruminant Research, 114: 195-201.
4. Casarini L, Santi D and Marino M (2015) Impact of gene polymorphisms of gonadotropins and their receptors on human reproductive success. Reproduction, 150(6): 175-84.
5. Chen HY, Shen H, Jia B, Zhang YS, Wang XH and Zeng XC (2015) Differential gene expression in ovaries of Qira black sheep and Hetian sheep using RNA-Seq technique. PLoS One, 10(3):e0120170.
6. Esmaeili fard SM, Hafezian SH, Gholizadeh M and Abdolahi Arpanahi R (2019) Gene set enrichment analysis using genome-wide association study to identify genes and biological pathways associated with twinning in Baluchi sheep. Animal Production Research, 8(2): 63-80. (In Persian)
7. El-Halawany N, Zhou X, Al-Tohamy AF, El-Sayd YA, Shawky AA, Michal JJ and Jiang Z (2016) Genome-wide screening of candidate genes for improving fertility in Egyptian native Rahmani sheep. Animal Genetics, 1(1): 10.1111/age.12437.
8. Goyal S, Aggarwal J, Dubey PK, Mishra BP, Ghalsasi P, Nimbkar C, Joshi BK and Kataria RS (2017) Expression Analysis of Genes Associated with Prolificacy in FecB Carrier and Noncarrier Indian Sheep. Animal Biotechnology, 28(3): 220-227.
9. La Y, Tang J, Di R, Wang X, Liu Q, Zhang L, Zhang X, Zhang J, Hu W and Chu M (2019) Differential Expression of Circular RNAs in Polytocous and Monotocous Uterus during the Reproductive Cycle of Sheep. Animals, 9(10): E797.
10. Lai FN, Zhai H L, Cheng M, Ma JY, Cheng SF, Ge W, Zhang GL, Wang JJ, Zhang RQ, Wang X, Min LJ, Song JZ and Shen W (2017) Whole-genome scanning for the litter size trait associated genes and SNPs under selection in dairy goat (*Capra hircus*). Scientific Reports, 6: 38096.

11. Li WT, Zhang MM, Li QG, Tang H, Zhang LF, Wang KJ, Zhu MZ, Lu YF, Bao HG, Zhang YM, Li QY, Wuk L and Wu CX (2017) Whole-genome resequencing reveals candidate mutations for pig prolificacy. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 284(1869): 20172437.
12. Li X, Ye J, Han X, Qiao R, Li X, Lv G and Wang K (2019) Whole-genome sequencing identifies potential candidate genes for reproductive traits in pigs. Genomics, 7543(18): 30673-6.
13. Liu C, Ran X, Yu C, Xu Q, Niu X, Zhao P and Wang J (2019) Whole-genome analysis of structural variations between Xiang pigs with larger litter sizes and those with smaller litter sizes. Genomics, 111(3): 310-319.
14. Marques DBD, Bastiaansen JWM, Broekhuijse MLWJ, Lopes MS, Knol EF, Harlizius B, Guimarães SEF, Silva FF and Lopes PS (2018) Weighted single-step GWAS and gene network analysis reveal new candidate genes for semen traits in pigs. Genetics Selection Evolution, 50(1):40.
15. Mencik S, Vukovic V, Spehar M, Modric M, Ostovic M and Kabalin AE (2019) Association between ESR1 and RBP4 genes and litter size traits in a hyperprolific line of Landrace× Large White cross sows. Veterinarni Medicina, 64(03): 109-117.
16. Moradband F, Rahimi G and Gholizadeh M (2011) Association of polymorphism in fecundity genes of GDF9, BMP15and BMPR-1Bwith litter size in Iranian Baluchi sheep. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 9: 1179-1183. (In Persian)
17. Mohammadi H, Moradi Shahrebabak M and Moradi Shahrebabak H (2013) Analysis of Genetic Relationship between Reproductive vs. Lamb Growth Traits in Makooei Ewes. Journal of agricultural science and technology, 15: 45-53.
18. Nikbin S, Panandam JM, Yaakub H and Murugaiyah M (2018) Association of novel SNPs in gonadotropin genes with sperm quality traits of Boer goats and Boer crosses. Journal of applied animal research, 46(1): 459-466.
19. Onteru SK, Fan B, Du ZQ, Garrick DJ, Stalder KJ and Rothschild MF (2012) A whole-genome association study for pig reproductive traits. Animal Genetics, 43(1): 18-26.
20. Patel OV, Bettegowda A, Ireland JJ, Coussens PM, Lonergan P and Smith GW (2007) Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. Reproduction, 133(1): 95-106.
21. Peñagaricano F, Weigel KA, Rosa GJ and Khatib H (2013) Inferring quantitative trait pathways associated with bull fertility from a genome-wide association study. Frontiers Genetics, 3: 307-314.
22. Wang Y, Ding X, Tan Z, Xing K, Yang T, Wang Y, Sun D and Wang L (2018) Genome-wide association study for reproductive traits in a Large White pig population. Animal Genetics, 49(2):127-131.
23. Xie H, Wang H, Tranguch S, Iwamoto R, Mekada E, Demayo FJ, Lydon JP, Das SK and Dey SK (2007) Maternal heparin-binding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(46): 18315-18320.
24. Xu SS, Gao L, Xie XL, Ren, YL, Shen ZQ, Wang F, Shen M, Eyþórsdóttir E, Hallsson JH, Kiseleva T, Kantanen J and Li MH (2018) Genome-Wide Association Analyses Highlight the Potential for Different Genetic Mechanisms for Litter Size Among Sheep Breeds. Frontiers Genetics, 9: 118.