

مطالعه پوشش ژنومی و آنالیز مسیرهای زیستی برای شناسایی ژن‌های موثر بر رنگ پوشش در گوسفندان لری-بختیاری

حسین محمدی^{۱*}، محمد حسین مرادی^۲ و امیر حسین خلت آبادی فراهانی^۲

۱ و ۲. استادیار و دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۷)

چکیده

رنگ پوشش، یکی از صفات مهم اقتصادی در گوسفند بوده و همچنین می‌تواند در شناسایی و تعیین خصوصیات نژادی مورد استفاده قرار گیرد. هدف پژوهش حاضر، مطالعه پوشش کل ژنوم و آنالیز مسیرهای زیستی بر مبنای تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی جهت شناسایی جایگاه‌ها و ژن‌های مرتبط با صفت رنگ پوشش گوسفندان لری-بختیاری بوده است. پوشش کل ژنوم بر اساس روش مورد-شاهدی در برنامه PLINK نسخه ۱/۹۰ انجام شد. آنالیز غنی‌سازی مجموعه ژنی با بسته نرم‌افزاری *goseq* برنامه R نسخه ۳/۶/۱ با هدف شناسایی سطوح عملکردی و مسیرهای زیستی ژن‌های نزدیک در مناطق انتخابی کاندیدا انجام شد و در نهایت برای آنالیز بیوانفورماتیکی از پایگاه‌های برخط GO، Metacyc، KEGG، Reactome و Panther استفاده گردید. در این پژوهش نشانگر تک نوکلئوتیدی معنی‌دار روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۶، ۹، ۱۰ و ۱۶ شناسایی شدند که با ژن‌های *EDNRB*، *PDGFRA*، *TCF25* و *TYRP1* مرتبط بودند. در آنالیز غنی‌سازی مجموعه ژنی تعداد ۵ مسیر هستی‌شناسی ژنی با صفت رنگ پوشش مرتبط بودند ($P < 0.05$). از این بین، مسیرهای Regulation of protein tyrosine kinase activity، Regulation of protein kinase A signaling، Activation of protein kinase activity و توسعه ملانوسیت‌ها و تنظیم رنگدانه‌ها در بدن داشتند. با توجه به تأیید ارتباط برخی از مناطق ژنومی شناسایی شده در تحقیق حاضر با رنگ پوشش در گوسفند و بعضی گونه‌های دیگر و همچنین شناسایی مناطق ژنومی جدید، ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند به عنوان ژن‌های کاندیدا برای مطالعات تکمیلی و نهایتاً در انتخاب ژنتیکی رنگ پوشش در گوسفند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پوشش ژنومی، رنگ پوشش، گوسفند، مسیرهای زیستی.

Genome-wide association study and pathway analysis for identifying the genes associated with coat color in Lori-Bakhtiari sheep breed

Hossein Mohammadi¹, Mohammad Hossein Moradi² and Amir Hossein Khaltabadi Farahani²

1, 2. Assistant Professor and Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Environmental Science, Arak University, Arak, Iran

(Received: Sep. 06, 2021 - Accepted: Mar. 08, 2022)

ABSTRACT

Coat color is one of the important economic traits in sheep and it can be used for breed identification and characterization as well. The aim of the present study was to perform genome wide association study (GWAS) and pathway analysis based on gene set enrichment analysis for identifying the loci associated with coat color in Lori-Bakhtiari sheep breed. The GWAS was carried out using PLINK v. 1.90. The gene enrichment analysis was performed by *goseq* R package in R v.3.6.1 with the aim of identifying functional clusters and biological pathways of the genes in selected candidate regions and finally, for bioinformatics analysis we used online databases and softwares of GO, Metacyc, KEGG, Reactome and panther. In this study significant SNP markers were identified on chromosomes 1, 2, 6, 9, 10, and 16 that overlapped with *EDNRB*, *PDGFRA*, *TCF25*, and *TYRP1* genes. According to pathway analysis, four GO pathways were associated with the coat color trait ($P < 0.05$). Among these pathways, regulation of protein tyrosine kinase activity, regulation of protein kinase A signaling and activation of protein kinase activity biological pathways, were previously reported to have an important role on the melanocyte development and coat pigmentation. Considering that the genomic regions identified in the current study have been confirmed to be associated with coat color in sheep and other species in previous reports, as well as the identification of some novel putative regions, the identified candidate genes in our study could be further studied and eventually used in genetic selection for coat color in sheep.

Keywords: Biological pathways, Coat color, Genome-wide association study, Sheep.

* Corresponding author E-mail: mohammadi13371364@gmail.com

مقدمه

بخش مهمی از تولیدات دامی صنعت پرورش گوسفند کشور را، پشم تشکیل می‌دهد. استفاده از این محصول در تولید فرش‌های نفیس و ارزشمند ایرانی، اهمیت سرمایه‌گذاری و انجام پژوهش در جهت بهبود کیفیت آن را نشان می‌دهد. اگرچه هدف اصلی پرورش گوسفند در ایران تولید گوشت است ولی نباید از اهمیت و سهم الیاف دامی در اقتصاد کشور غافل بود، چرا که در کنار تولید گوشت می‌توان به تولید پشم که دامدار برای آن متحمل هزینه و زحمت اضافی نمی‌شود، نگاه ویژه‌ای داشت (Mohammadi & Sadeghi, 2010). میزان تولید پشم در نژادهای بومی کشور بیش از ۷۶ هزار تن می‌باشد که با حذف ناخالصی‌ها، پشم حاصله نزدیک به ۳۶ هزار تن در سال خواهد شد (Farahvash et al., 2009).

رنگ پشم یکی از ویژگی‌های مهم این محصول دامی است که در کنار کیفیت تارها در تعیین قیمت و کاربرد آن نقش بسزایی دارد. رنگ سفید پشم نقش ارزنده‌ای در قالی‌بافی دارد، چرا که چنانچه پشم سیاه یا لکه‌دار سیاه باشد در فرآیند رنگرزی به سختی و به میزان اندک رنگ می‌پذیرد. بهترین حالت این صفت آن است که رنگ پشم روشن و خصوصاً به صورت سفید یکدست (بدون لکه) باشد (Amin et al., 2018).

نژاد گوسفند لری-بختیاری یکی از نژادهای سنگین وزن و ممتاز کشور از نظر صفات تولیدی بوده و دارای جمعیتی بیش از ۱/۷ میلیون رأس می‌باشد. محل اصلی پرورش این نژاد استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد ولی به سبب ویژگی‌های ممتاز آن در سایر استان‌های همجوار نیز پرورش می‌یابد (Vantankhah et al., 2008). رنگ غالب گوسفندان این نژاد، بدن سفید با لکه‌های اختصاصی سیاه در صورت، پوزه، گوش و اطراف چشم است، ولی درصدی از آنها دارای رنگ قهوه‌ای تیره تا روشن و در اصطلاح قنقر یا بور می‌باشند (Abedi Dehsheikh & Muhaghegh-Dolatabady, 2017).

اهمیت استفاده از رنگ‌های طبیعی در تولید فرش‌های دستباف، کنترل و مدیریت جمعیت دامی برای تولید گوسفندانی با رنگ پشم مطلوب در صنعت تولید

الیاف پشمی کشور، بسیار ارزشمند است که این امر به عنوان یکی از نیازهای جامعه دامپروری کشور باید مورد پژوهش قرار گیرد. از اینرو استفاده از علوم نوین اومیکس همچون ژنومیکس برای بهبود عملکرد تولید این محصول از لحاظ کمی و کیفی ضروری به نظر می‌رسد.

هدف از مطالعات پویش ژنومی (GWAS)^۱ که با شناسایی ارتباط بین نشانگرهای SNP و صفت مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای با تراکم بالا در سطح ژنوم همراه است، پیدا کردن جهش‌های مؤثر یا مسببی می‌باشد که بر فنوتیپ صفت مورد نظر اثر می‌گذراند. این اطلاعات می‌تواند برای انتخاب به کمک نشانگر مفید بوده و به درک مکانیسم مولکولی صفات مورد مطالعه کمک نماید (El-Halawany et al., 2016). یکی از عیوب مطالعات GWAS در نظر گرفتن آستانه معنی‌داری محافظه کارانه برای جلوگیری از اشتباه کاذب است، در حالیکه پرهیز از اشتباه نوع اول باعث افزایش خطای نوع دوم می‌گردد. لذا برای حل این مشکل، یکی از راه‌حل‌ها، استفاده از آنالیزهای غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی می‌باشد. در واقع در این روش به جای انجام تجزیه برای یک SNP یا یک ژن، ارتباط بین صفت مورد مطالعه و واریانت‌های ژنتیکی را در یک دسته یا گروه ژنی که به طور عملکردی با هم مرتبط هستند، بررسی می‌کند. به عبارتی دیگر آنالیز پیوستگی بین یک مجموعه ژنی معنی‌دار زیستی با فنوتیپ مورد آزمون قرار می‌گیرد. در حقیقت در این روش به دنبال ژن‌هایی هستیم که به تنهایی اثر آنها بر صفت مورد نظر معنی‌دار نشده، ولی اثر جمعی آنها روی صفت دارای اثر معنی‌دار است (Marques et al., 2018).

برای اولین بار Kijas et al. (2013) با مطالعه پویش کل ژنومی با هدف بررسی ژن‌های مؤثر بر رنگ پوشش سفید یکدست در مقابل سیاه یکدست در ۴۲ رأس گوسفندان نژاد Manchega و Rasa Aragonesa، ژن کاندیدی *MC1R* را گزارش نمودند. همچنین *Gebreselassie et al.* (2020) با مطالعه پویش کل ژنومی در ۷۵ رأس گوسفندان Tan چینی، با گروه‌بندی دام‌ها به دو دسته سفید یکدست و سفید

استخراج DNA با استفاده از روش بهینه یافته استخراج نمکی از خون کامل انجام شد. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت بالای نمونه‌ها، غلظت آنها تا $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ جهت تعیین ژنوتیپ رقیق شد. تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها در مرکز ژنومیکس و تولیدمثل Invermay در کشور نیوزلند با استفاده از آرایه‌های Illumina OvineSNP50K BeadChip و با بکارگیری پروتکل استاندارد شرکت ایلومینا (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) انجام شد (Moradi *et al.*, 2012). برای کنترل کیفیت داده‌های تعیین ژنوتیپ شده از معیارهای میزان فراخوانی ژنوتیپ‌ها (Call Rate) و فراوانی آللی نادر (MAF) استفاده می‌شود. در ابتدا نمونه‌هایی که میزان فراخوانی ژنوتیپی آنها کمتر از ۹۰ درصد بود، شناسایی و حذف شدند. در مرحله بعد نشانگرهایی که فراوانی آللی نادر (MAF) در آنها کمتر از ۲ درصد بود و همچنین نشانگرهایی که نرخ فراخوانی ژنوتیپی کمتر از ۹۵ درصد داشتند، شناسایی و حذف شدند (Moradi *et al.*, 2012). در نهایت برای SNP‌های باقیمانده، آنهایی که در تعادل هاردی-واینبرگ قرار نداشتند به عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ (Teo *et al.*, 2007) کنار گذاشته شدند. مراحل مختلف کنترل کیفیت با استفاده از نرم‌افزار PLINK نسخه ۱/۹ (<http://pnu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) انجام شد (Purcell *et al.*, 2007).

با لکه‌های سیاه در قسمت سر، ژن‌های کاندیدای *ASIP* و *TCF25*، *MC1R* را شناسایی کردند.

در پژوهشی دیگری که اخیراً با عنوان مطالعه پیوستگی در سطح ژنوم برای شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر رنگ پوشش در ۴۸ رأس گاوهای Vrindavani انجام شده بود، موفق به شناسایی ژن‌های کاندیدای *CACNA2D1*، *FGF18*، *BDNF* و *HGF* روی کروموزوم‌های شماره ۴، ۱۵ و ۲۰ شده‌اند (Chhotaray *et al.*, 2021).

هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی مناطق ژنومی، مسیرهای زیستی و ژن‌های کاندیدای ایجاد کننده رنگ پوشش گوسفندان لری-بختیاری بر اساس پویس کل ژنوم و آنالیز مسیرهای زیستی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری، تعیین ژنوتیپ و کنترل کیفیت:

در پژوهش حاضر، از اطلاعات ۴۵ رأس گوسفندان نژاد لری-بختیاری مربوط به ایستگاه اصلاح نژاد شولی و دو گله مردمی واقع در شهرستان شهرکرد استفاده شد (Moradi *et al.*, 2012). تعداد نمونه مورد استفاده در تحقیق حاضر، تنها نمونه‌های تعیین ژنوتیپ شده دارای رکورد مرتبط با رنگ پوشش در گوسفندان نژاد لری بختیاری بود.

دسته‌بندی رنگ پوشش در این نمونه‌های گوسفندان لری-بختیاری در دو گروه: یکدست سفید بدن و گروه دوم سفید و سیاه بودند (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر رنگ پوشش در گوسفندان نژاد لری-بختیاری. چپ: رنگ پوشش سفید و راست: سفید و سیاه.

Figure 1. The image of coat color in Lori-Bakhtiari sheep breed. Left: white coat color and Right: white and black coat color.

نتایج و بحث

از مجموع ۴۹۳۹۵ نشانگر به کار رفته در این تحقیق (بعد از به‌روز نمودن جایگاه نشانگرها بر اساس ژنوم مرجع Oar نسخه ۳/۱)، ۴۳۰۰۹ نشانگر توانستند مراحل مختلف کنترل کیفیت را بگذرانند. به طور کلی ۲۳۹۹ نشانگر به دلیل حداقل فراوانی آلی کمتر از ۰/۰۲، ۳۹۴۳ نشانگر به دلیل نرخ فراوانی ژنوتیپی کمتر از ۹۵٪ در هر نمونه، ۴۴ نشانگر به دلیل عدم تعادل هاردی واینبرگ و ۲ نمونه به دلیل نرخ فراوانی ژنوتیپی کمتر از ۹۰٪ حذف شدند. مراحل مختلف ویرایش داده‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنین از ۴۳ نمونه باقیمانده پس از کنترل کیفی، ۳ نمونه به علت عدم قرار گرفتن در دو گروه رنگ پوشش (۲۵ رأس شاهد و ۱۵ رأس مورد) نیز از آنالیز پیوستگی ژنومی حذف شدند.

جدول ۱. توصیف مراحل کنترل کیفیت داده‌های حاصل از

گوسفندان لری-بختیاری

Table 1. Description of the quality control steps in Lori-Bakhtiari sheep breed

Number of Animals	45
Excluding Animals with 90% Call rate	2
Remaining Animals	43
Number of SNPs	49395
Excluding SNPs $\leq 2\%$ MAF over all animals	2399
Excluding SNPs $\leq 95\%$ Call rate over all animals	3943
Excluding SNPs with deviation from HW (< 0.000001)	44
Remaining SNPs	43009

در این پژوهش مطالعه پویش کل ژنوم با تجزیه و تحلیل غنی‌سازی و مجموعه ژنی جهت شناسایی سطوح عملکردی و ساز و کارهای مولکولی مرتبط با رنگ پوشش در گوسفند لری-بختیاری انجام گردید. پلات منهن مرتب با صفت رنگ پوشش در شکل ۲ ارائه شده است.

تعداد ۲۵۷۰۰ عدد ژن از ۲۷۰۵۴ ژن حاشیه‌نویسی شده در گوسفند به وسیله نشانگرهای SNP پوشش داده شده بودند که در این میان تعداد ۱۴۵۷ SNP معنی‌دار ($P < 0.05$) بدست آمد و در داخل یا بالا و پایین دست (۳۰۰kb) این SNPها ۱۵۶۰ ژن موجود بودند و با رنگ پوشش در گوسفندان لری-بختیاری مرتبط بودند. علاوه بر این

آنالیز پویش ژنومی بر اساس غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی

در این تحقیق جهت انجام آنالیز پویش کل ژنوم از روش موردی-شاهد^۱ نرم‌افزار PLINK (نسخه ۱/۹) بر اساس رنگ پوشش سفید (شاهد) و دسته دوم حیوانات با رنگ پوشش سفید و سیاه (موردی) استفاده شد (Gebreselassie *et al.*, 2020).

آنالیز پویش ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی در سه مرحله انجام شد: (۱) تعیین مکان SNPهایی که مقدار *P*-value آنها کمتر از ۰/۰۵ بود، با استفاده از بسته نرم‌افزاری *biomaRt2* (Durinck *et al.*, 2009) در محیط R نسخه ۳/۶ انجام شد. بعد از تعیین مکان SNPهای معنی‌دار، با استفاده از ژنوم مرجع گوسفند (نسخه *Oar_3.1*)، ارتباط این SNPها با ژن‌هایی که نشانگر SNP موردنظر در داخل آن ژن و یا 300 kb بالادست یا پایین دست آن ژن قرار داشت مشخص گردید (Esmaeili-Fard *et al.*, 2019). با توجه به اینکه تفسیر عملکردی ژنوم گوسفند هنوز به طور کامل تکمیل نشده است، لذا مناطق اورتولوگوس ژنوم انسان نیز با استفاده از جستجو در پایگاه اطلاعاتی آنلاین Ensembl Genes Database 104 مورد بررسی قرار گرفت. (۲) ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیولوژیکی با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی شامل هستی‌شناسی ژن (GO, <http://www.geneontology.org>)، مسیرهای بیوشیمیایی (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg>)، Panther (http://www.pantherdb.org)، Metacyc (http://www.metacyc.org) و Reactome (http://www.reactome.org) بررسی شد. (۳) پویش کل ژنوم بر پایه آنالیز مسیر با استفاده از توزیع فوق هندسی^۲ و آماره Fisher's exact test مورد آزمون قرار گرفت (Peñagaricano *et al.*, 2013). برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به دست آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی آنلاین GeneCards (http://www.genecards.org) و UniProtKB (http://www.uniprot.org) استفاده شد.

1. Case-control

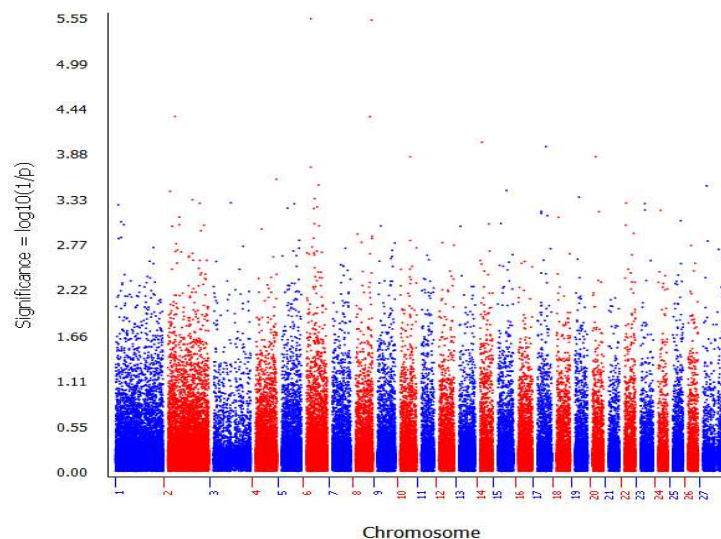
2. Hypergeometric

ضریب غنی‌سازی هستند که در گوسفندان نژاد لری-بختیاری مشاهده می‌شود.

جایگاه ژن کاندیدای *EDNRB* (Endothelin receptor B) در انسان روی کروموزوم ۱۳ و در گوسفند روی کروموزوم ۱۰ در ناحیه ژنگانی ۵۷/۲۱ تا ۵۷/۲۴ مگابازی قرار داشته و نقش کلیدی در رشد و توسعه ملانوسیت‌ها و تنظیم رنگدانه‌ها دارد (Lu et al., 2016). در مطالعه‌ای جهت بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن کاندیدای *EDNRB* با رنگ پوشش سفید-سیاه در سگ نژاد Border Collies، آنالیز توالی این ژن نشان داد که سگ‌های سفید حامل یک جهش در موقعیت ۱۹۳ و جابجایی آلانین به آسپارتیک اسید در اگزون شماره ۴ ژن *EDNRB* می‌باشد (Metallinos & Rine, 2000). همچنین در مطالعه پویس ژنومی مرتبط با رنگ پوشش در خوک‌های نژاد Diannan، ژن کاندیدای *EDNRB* با رنگ پوشش سیاه-لکه‌های سفید در اندام حرکتی گزارش شده است (Lu et al., 2016).

جهت شناسایی ژن‌های مرتبط با رنگ پوشش، مناطق ژنومی اورتولوگوس در انسان مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد مجموعه‌های ژنی حاصل از پایگاه‌های داده‌ای مختلف شامل ۸۵۶ سطوح هستی‌شناسی و مسیر زیستی PANTHER و مسیر Reactome بود. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود تعداد ۴ گروه عملکردی در هستی‌شناسی فرآیندهای زیستی، با صفت رنگ پوشش دارای ارتباط هستند ($P < 0.05$).

نتایج حاصل از این تحلیل نشان‌دهنده این است که ژن *EDNRB* با فرآیند positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein regulation of protein tyrosine kinase activity با فرآیند *TYRP1* regulation of protein kinase A signaling activation of protein kinase activity با فرآیند *TCF25* و ژن *PDGFRA* در activity مرتبط با رنگ پوشش با بیشترین مقدار



شکل ۲. پلات منهن برای صفت رنگ پوشش در گوسفند لری-بختیاری. محور X مکان نشانگرها روی کروموزوم‌ها و محور Y منفی لگاریتم بر مبنای ۱۰ ارزش P-value

Figure 2. Manhattan plot for coat color trait in lori-bakhtiari sheep. X axis, SNP positions on chromosomes, Y axis, Log10 P-value

جدول ۲. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار ($P < 0.05$) مرتبط با صفت رنگ پوشش

Table 2. Gene set enrichment analysis significantly ($P < 0.05$) associated with coat color

GO term	Description GO	P-Value	Candidate gene	Nearest SNP	Minor Allele Frequency SNP
GO: 0042531	Positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein	3.2E-2	<i>EDNRB</i>	OAR10_57924852.1	0.15
GO: 0061097	Regulation of protein tyrosine kinase activity	2.7E-2	<i>TYRP1</i>	s46023.1	0.26
GO: 0010738	Regulation of protein kinase A signaling	1.3E-2	<i>TCF25</i>	OAR14_15485140.1	0.33
GO: 0032147	Activation of protein kinase activity	4.6E-2	<i>PDGFRA</i>	s13781.1	0.28

گوسفندی و در ناحیه بین ۸۰/۶۰ و ۸۰/۶۲ مگابازی قرار گرفته است. این ژن از مهمترین عوامل تنظیمی در مسیر بیوشیمیایی ملانوزن بوده و بر ساخت رنگدانه درون ملانوسیت‌ها و نسبت یوملانین اثرگذار است. بطوری‌که با افزایش فعالیت تیروزیناز در مقایسه با فعالیت تیروزیناز کمتر، طیف رنگی پوششی تیره‌تری را نشان می‌دهند (Zheng *et al.*, 2020). تنوع در صفت رنگ پوشش ناشی از وجود یا عدم وجود، تفاوت در توزیع و فعالیت‌های بیوشیمیایی در دو نوع ملانین (یوملانین و فی ملانین) می‌باشد. در مطالعه‌ای با بررسی پروفایل ترانسکریپتوم روی گوسفندان نژاد تبتی با هدف شناسایی ژن‌های مرتبط با رنگ پوست سفید در مقابل سیاه، ژن *TYRPI*، با بیان بالاتری در گروه فنوتیپی با رنگ پوشش سفید گزارش شده است (Wu *et al.*, 2021).

در مطالعه‌ای با بررسی چندشکلی‌های ژن *TYRPI* با آللینیسیم، جهش c.218T>A اگزون دوم باعث می‌شود که اسید آمینه متیونین در موقعیت ۷۳ به اسید آمینه لیزین تغییر یابد و همچنین جهش c.361G>A منجر به تغییر اسید آمینه آسپارتیک به اسید آسپارژین در موقعیت ۱۲۱ می‌شود که هر دو جهش باعث تغییر پروتئین و ایجاد آللینیسیم در انسان می‌شوند (Marcon & Maia, 2019). زالی (آللینیسیم)، یک اختلال رنگدانه-ای است که به دلیل نبود رنگدانه ملانین در پوست و مو به وجود می‌آید. اختلالی که باعث بروز این عارضه می‌شود، یک عدم تبدیل در آنزیم و یا ناتوانی در تولید رنگدانه است. در مکانیسم تولید رنگدانه، تیروزین باید به دوپاکوئینین (DOPA Quinone) تبدیل شود، این تبدیل توسط آنزیم تیروزیناز انجام می‌شود، حال اگر در این ژن جهشی رخ دهد این تبدیل مختل شده و دیگر رنگدانه‌ای توسط سلول‌های ملانوسیت تولید نمی‌شود و آللینیسیم به وجود می‌آید (Kamaraj & Purohit, 2014).

در تجزیه و تحلیل‌های غنی‌سازی مجموعه ژنی تلاش گردید از آزمون‌های پر کاربرد و سختگیرانه‌ای همچون Panther (<http://www.pantherdb.org>)، Reactome و Metacyc (<http://www.metacyc.org>) و tyrosinase-related (*TYRPI*) (protein 1) روی کروموزوم ۹ انسان و کروموزوم ۲

ژن *PDGFRA* (platelet derived growth factor receptor alpha) در انسان روی کروموزوم ۴ می‌باشد و در ناحیه بین ۷۶/۸۸ و ۷۶/۹۳ مگا جفت‌باز روی کروموزوم ۶ گوسفندی قرار گرفته است و جزئی از خانواده ژنی فاکتور رشد بوده و کدکننده گیرنده آنزیم تیروزین کیناز می‌باشد (Genecards). به طوری‌که با افزایش فعالیت پروتئین کیناز سبب تولید یوملانین می‌گردد و در نتیجه تولید رنگ‌های سیاه/قهوه‌ای را کنترل می‌کند. با کاهش عملکرد یوملانین رنگ پوشش سفید ایجاد می‌شود. در مطالعه پویش کل ژنومی در ارتباط با تنوع رنگ پوشش در بزهای نژاد مرخز، ژن کاندیدای *PDGFRA* مرتبط با رنگ پوشش سفید گزارش شده است (Nazari-Ghadikolaei *et al.*, 2018). ایجاد رنگ پوشش سفید می‌تواند در اثر وجود نواقصی در مراحل مختلف توسعه ملانوسیت‌ها از جمله تکثیر و تمایز، زنده‌مانی، مهاجرت، جایگزینی فولیکول‌های پشم و بازسازی سلول بنیادی ملانوسیت‌ها بروز یابد. در مطالعه پویش کل ژنوم با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با رنگ پوشش گاوهای هلشتاین ارتباط معنی‌داری بین ژن *PDGFRA* با رنگ پوشش سیاه-سفید گزارش کردند (Fan *et al.*, 2014).

ژن *TCF25* (transcription factor 25) روی کروموزوم ۱۶ انسان و در ناحیه بین ۱۵/۴۶ و ۱۵/۴۷ مگا جفت‌باز روی کروموزوم ۱۴ گوسفندی قرار گرفته است و این ژن جزو خانواده فاکتورهای رونویسی است (GeneCards). ژن *TCF25* یک عامل محدود کننده در ساخت ملانین در مسیر ملانوزن می‌باشد و در نتیجه کاهش تولید رنگدانه‌های سیاه می‌گردد (Genecards). در مطالعه‌ای پویش کل ژنومی در گوسفندان چینی، ژن *TCF25* مرتبط با رنگ پوشش سفید-لکه‌های سیاه سر گزارش شده است. ژن کاندیدای *TCF25* نزدیک به مکان ژنومی، ژن گیرنده ملانوکوریتن-۱ (MC1R) (کروموزوم ۱۴، ناحیه ۱۵/۴۸ مگابازی) و در عدم تعادل پیوستگی با این ژن کلیدی قرار دارد که نقش مهمی در تنوع رنگ پوشش می‌باشد (XiaoWei *et al.*, 2020).

ژن کاندیدای *TYRPI* (tyrosinase-related protein 1) روی کروموزوم ۹ انسان و کروموزوم ۲

نتیجه‌گیری

با توجه به عملکرد بیولوژیکی ژن‌های شناسایی شده در این پژوهش، به نظر می‌رسد این ژن‌ها در بروز فنوتیپی صفت مرتبط با رنگ پوشش نقش ایفا می‌کنند، در نتیجه می‌توان کارآیی روش تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی برای پوشش ژنومی صفات تولیدی اقتصادی را نیز مورد تأیید قرار داد. از طرفی در این تحقیق به دلیل عدم دسترسی به رکوردهای فنوتیپی و اطلاعات ژنوتیپی تعداد دام بیشتر و تعیین ژنوتیپ افراد با آرایه ژنومی با تراکم بالاتر، مطالعات تکمیلی در سایر نژادهای گوسفندان بومی کشور نیز می‌تواند در این زمینه کاربردی باشد.

سپاسگزاری

از مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور به خاطر در اختیار گذاشتن دام‌های تحت پوشش و مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، شرکت مبارک‌اندیش و مرکز AgResearch نیوزلند بابت حمایت‌های مالی و آزمایشگاهی در تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، تشکر و قدردانی می‌گردد.

که یکی از محدودیت‌های اجرای مطالعات پوشش 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 (Seabury *et al.*, 2017). با توجه به تعداد کم نمونه مورد استفاده در پژوهش حاضر نیز باید در استفاده از ژن‌های کاندیدای شناسایی شده مرتبط با رنگ پوشش در برنامه‌های اصلاحی با احتیاط عمل کرد. البته می‌توان با ادغام داده‌های تحقیقات مشابه جدید و استفاده از آنالیزهای آماری جامع‌تر برای تأیید نتایج پژوهش حاضر استفاده کرد. بررسی بیشتر نواحی مهم ژنومی شناسایی شده و نواحی مختلف ژن‌های کاندیدا، با استفاده از آزمون‌های آزمایشگاهی مختلف (PCR و Real-time) می‌تواند در تأیید نتایج بدست آمده در این پژوهش مؤثر باشند. نکته مهم و قابل تأمل دیگر این است که در تعیین رنگ پوشش حیوان، اثر متقابل ژن‌های رنگ نقش مهمی را دارند. به همین دلیل برای درک صحیح این مکانیسم بایستی علاوه بر شناخت ژن کاندیدای تأثیرگذار، آثار متقابل دیگر ژن‌ها هم در نظر گرفته شود.

REFERENCES

1. Abedi Dehsheikh, M., & Muhaghegh-Dolatabady, M. (2010). Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the ovine melanocortin-1 receptor (MC1R) gene in Lori-Bakhtiari sheep. *Iranian Journal of Animal Science*, 47 (4), 571-577. (In Farsi)
2. Amin, M., Masoudi, A. A., Amirinia, C., & Emrani, H. (2018). Molecular study of the extension locus in association with coat colour variation of Iranian indigenous sheep breeds. *Russian Journal of Genetics*, 54(4), 464-471.
3. Chhotaray, S., Panigrahi, M., Bhushan, B., Gaur, G. K., Dutt, T., Mishra, B. P., & Singh, R. K. (2021). Genome-wide association study reveals genes crucial for coat color production in Vrindavani cattle. *Livestock Science*, 247, 104476.
4. Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E., & Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols*, 4, 1184-1191.
5. El-Halawany, N., Zhou, X., Al-Tohamy, A. F., El-Sayd, Y. A., Shawky, A. A., Michal, J. J., & 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.
6. Esmacili-Fard, S. M., Hafezian, S. H., Gholizadeh, M., & Abdollahi-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 Farsi)
7. Fan, Y., Wang, P., Fu, W., Dong, T., Qi, C., Liu, L., Guo, G., Li, C., Cui, X., Zhang, S., Zhang, Q., Zhang, Y., & Sun, D. (2014). Genome-wide association study for pigmentation traits in Chinese Holstein population. *Animal Genetics*, 45(5), 740-4.
8. Farahvash, T., Nazer Adl, K., & Bayeriyar, M. (2009). *Practical Technology of Wool and Skin*. (1st edi.). Yavarian Publication, 156 pp.
9. Gebreselassie, G., Liang, B., Berihulay, H., Islam, R., Abied, A., Jiang, L., Zhao, Z., & Ma, Y. (2020). Genomic mapping identifies two genetic variants in the MC1R gene for coat colour variation in Chinese Tan sheep. *PLoS One*, 15(8), e0235426.

10. Kamaraj, B., & Purohit, R. (2014). Mutational analysis of oculocutaneous albinism: a compact review. *BioMed Research International*, 2, 905472.
11. Kijas, J. W., Serrano, M., McCulloch, R., Li, Y., SalcesOrtiz, J., Calvo, J. H., & Pérez-Guzmán, M. D. (2013). Genome wide association for a dominant pigmentation gene in sheep. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, (6), 468-75.
12. Lu, M. D., Han, X. M., Ma, Y. F., Irwin, D. M., Gao, Y., Deng, J. K., Adeola, A. C., Xie, H. B., & Zhang, Y. P. (2016). Genetic variations associated with six-white-point coat pigmentation in Diannan small-ear pigs. *Scientific Reports*, 8(6), 27534.
13. Marques, D. B. D., Bastiaansen, J. W. M., Broekhuijse, M. L. W. J., Lopes, M. S., Knol, E. F., Harlizius, B., Guimarães, S. E. F., Silva, F. F., & Lopes, P. S. (2018). Weighted single-step GWAS and gene network analysis reveal new candidate genes for semen traits in pigs. *Genetics Selection Evolution*, 50(1), 40.
14. Marcon, C. R., & Maia, M. (2019). Albinism: epidemiology, genetics, cutaneous characterization, psychosocial factors. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 94, 503-520.
15. Metallinos, D., & Rine, J. (2000). Exclusion of EDNRB and KIT as the basis for white spotting in Border Collies. *Genome Biology*, 1(2), 0004.
16. Mohammadi, H., & Sadeghi, M. (2010). Estimation of genetic parameters for growth and reproduction traits and genetic trends of growth traits in Zel sheep breed under rural production system. *Iranian Journal of Animal Science*, 41(3), 231-241. (In Farsi)
17. Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds K. G., & McEwan, J. C. (2012). Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. *BMC Genetics*, 13, 10.
18. Nazari-Ghadikolaei, A., Mehrabani-Yeganeh, H., Miarei-Aashtiani, S. R., Staiger, E. A., Rashidi, A., & Huson, H. J. (2018). Genome-wide association studies identify candidate genes for coat color and mohair traits in the Iranian Markhoz goat. *Frontiers in Genetics*, 4(9), 105.
19. Peñagaricano, F., Weigel, K. A., Rosa, G. J., & Khatib, H. (2013). Inferring quantitative trait pathways associated with bull fertility from a genome-wide association study. *Frontiers in Genetics*, 3, 307-314.
20. Purcell, S., Neale B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., & Bender, D. (2007). PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *The American Journal of Human Genetics*, 81, 559-575.
21. Seabury, C. M., Oldeschulte, D. L., Saatchi, M., Beever, J. E., Decker, J. E., & Taylor, J. F. (2017). Genome-wide association study for feed efficiency and growth traits in U.S. beef cattle. *BMC Genomics*, 18(1), 386-396.
22. Teo, Y. Y, Fry, A. E, Clark, T. G., Tai, E.S., & Seielstad, M. (2007). On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Human Genetics*, 71, 701-703.
23. Vatankhah, M., Talebi, M. A., & Edriss, M. A. (2008). Estimation of genetic parameters for reproductive traits in Lori-Bakhtiari sheep. *Small Ruminant Research*, 74, 216-220.
24. Wu, Z. Y., Li, L., Fu, Y. H., Wang, S., An, Q. M., Tang, X. H., Du, X. Y., & Zhou, F. (2021). Identification of differentially expressed genes between white and black skin tissues by RNA-Seq in the Tibetan sheep (*Ovis arises*). *Pakistan Journal of Zoology*, 53(2), 721-731.
25. Xiaowei, W., Yi, F., Xiaoming, M. A., Lina, M. A., Caijuan, Y. U. E., Jin, W., Zhengwei, Z., & Qing, M. A. (2020). Quantitative analysis of mRNA expression of Tan sheep coat color candidate genes MC1R and TCF25. *Journal Acta Agriculture*, 32(8), 1351-1356.
26. Zheng, X., Zhang, B., Zhang, Y., Zhong, H., Nie, R., Li, J., Zhang, H., & Wu, C. (2020). Transcriptome analysis of feather follicles reveals candidate genes and pathways associated with pheomelanin pigmentation in chickens. *Scientific Reports*, 10(1), 12088.