



## Genomic probing of selection signature to detect chromosomal region related to Johne's disease in Holstein cattle

Fateme Navoshki<sup>1</sup>, Hossein Moradi Shahr Babak<sup>2✉</sup>, Ali Sadeghi Sefid Mazgi<sup>3</sup>, Johann Solkner<sup>4</sup>, Mahdi Jvan Nikkhah<sup>5</sup>

1. Department of Animal Sciences, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran.

E-mail: [navoshki@ut.ac.ir](mailto:navoshki@ut.ac.ir)

2. Department of Animal Sciences, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran.

E-mail: [hmoradis@ut.ac.ir](mailto:hmoradis@ut.ac.ir)

3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. E-mail:

[sadeghism@ut.ac.ir](mailto:sadeghism@ut.ac.ir)

4. Department for Sustainable Agricultural Systems University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU).

E-mail: [johann.soelkner@boku.ac.at](mailto:johann.soelkner@boku.ac.at)

5. Department of Animal Science, Ares Campus, University of Tehran, Jolfa, Iran. E-mail: [javannikkhah@yahoo.com](mailto:javannikkhah@yahoo.com)

### Article Info

#### Article type:

Research Article

#### Article history:

Received: 21 November 2023

Received in revised form: 31

January 2024

Accepted: 13 February 2024

Published online: 22 September 2024

#### Keywords:

*Ion disease,*  
*Holstein cow,*  
*selection signatures,*  
*F<sub>ST</sub>,*  
*XP-EHH.*

### ABSTRACT

Selection as a factor increases the frequency of positive mutations in some subpopulations and creates selection signatures in the genome. Identifying the selection signatures in animals aimed at promoting economic traits and reducing diseases is one of the main and most challenging research areas in population genetics. This study aimed to conduct an extensive genome scan using single nucleotide polymorphisms (SNPs) to identify genomic regions under positive selection between diseased and healthy Holstein cattle populations. The data included 145 Holstein cows from Foka. These cows were genotyped using Illumina 30K chips. The cows were divided into diseased (45 cows) and healthy (100 cows) groups.  $F_{ST}$  and XP-EHH statistics were used in this study to identify genomic regions under selection. The genes identified by  $F_{ST}$  statistics in both diseased and healthy populations included RAB37, ZC3H10, ESR1, HSD17B6, KCNC4, and ERBB3. Genes identified by XP-EHH statistics in both diseased and healthy populations included AK1, ATP8A1, BTBD1, C1GALT1, CCDC6, CEP295, CLGN, CLSTN2, EHHADH, ERBB4, FRK, GRID2, GRIP1, and LRP6. Most of the genes identified in this study were related to immunity, diseases such as cancer, lactation, skeletal muscles, estrous cycle, feed consumption, sperm adhesion, and growth, which are among the important biological traits and characteristics of living organisms. Further research using an increased sample size in the population will provide a better understanding of candidate genes for ion disease in cattle. Moreover, the design of successful breeding programs will help reduce the costs associated with this disease.

**Cite this article:** Navoshki, F., Moradi Shahr Babak, H., Sadeghi Sefid Mazgi, A., Solkner, J., Javan Nikkhah, M. (2024). Genomic probing of selection signature to detect chromosomal region related to Johne's disease in Holstein cattle. *Iranian Journal of Animal Science*, 55 (3), 437-450. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2023.364977.653967>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2023.364977.653967>

**Publisher:** The University of Tehran Press.

### Extended Abstract

#### Introduction

Ion's disease, pseudotuberculosis, or paratuberculosis is a chronic infectious disease of the digestive system and small intestines in domestic and wild ruminants caused by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis [1]. The disease is common in cattle and, to some extent, in sheep and goats [2]. The characteristics of this disease include granulomatous enterocolitis and lymphadenitis [3]. Due to the slow

spread of the disease, ion disease occurs in isolation [4]. In cattle, clinical symptoms do not appear until two years of age due to the long incubation period [5]. Ion disease is responsible for significant economic losses in dairy herds worldwide, leading to reduced milk production, increased management costs, and premature culling or death due to clinical disease [7]. The alteration of the pattern of genetic diversity and linkage disequilibrium of the connected loci with a beneficial mutation during selection is called a Selective Sweep. These regions are related to major effect genes and genes affecting production traits and reproduction, making them of special importance as valuable sources of information for further research [8]. Therefore, identifying susceptible and resistant animals to this disease can play a significant and important role in preventing or reducing contamination of cattle farms with this infection. This study aims to identify genomic regions under selection related to this disease in two populations of diseased and healthy Holstein cattle using single nucleotide markers (SNPs).

### Materials and Methods

The present study was conducted at Foka cattle ranch in Isfahan. Initially, in the laboratory, the blood samples of the cows were tested for ion disease with ELISA. Subsequently, the cows were categorized into two groups: sick and healthy, comprising 45 sick cattle and 100 healthy cattle. Both groups were genotyped based on microarrays and SNPchip30k. To ensure the quality of the genotype data, various filtration steps were applied to the raw data using Plink software. To investigate the genomic pattern of positive selection in this disease, theta values for each SNP were calculated using the unbiased  $\theta$  estimator method [10] in the R x64 4.0.4 software environment. Instead of the numerical theta value of each SNP, the average of 5 adjacent SNPs within a 300 kbp range was used to better identify the selection signals. Ancestral alleles were not required to identify the regions under selection [12]. In the XP-EHH test, haplotypes in two populations were compared to consider the variation in the recombination rate across different genomic regions. The R x64 4.0.4 software and rehh package were used to identify selection signals in two populations. After identifying the selected regions, Illumina's gene list was used in the Plink v1.9 software environment to identify the genes related to these regions. To identify important KEGG metabolic pathways, ClueGo version 2.5.6, a Cytoscape plugin that provides biological annotations of genes, was used [13].

### Results

After quality control of the data, 28,749 SNP markers were selected for further analysis. The genomic distribution of  $F_{ST}$  was determined using the win5 method for all SNPs across the genome. The results showed that several genomic regions had high population differences among adjacent SNPs. In this research, 79 genomic regions on 6 chromosomes were identified between the two populations of diseased and healthy cattle. After analyzing the regions under selection, 34 genes were identified in two populations of sick and healthy Holstein cows using  $F_{ST}$  statistics. The XP-EHH statistic indicated the presence of selection in the patient population when it was negative and in the healthy population when it was positive. Regions of the genome with high XP-EHH values were indicative of population differentiation in those genomic regions due to the disease. The results showed that 170 regions on different chromosomes were identified in the healthy population, and 156 genomic regions were identified on different chromosomes in the patient population. After analyzing the selected regions, 50 genes were identified in the diseased population, and 62 genes were identified in the healthy population of Holstein cows using the XP-EHH statistic.

### Conclusion

Most of the genes identified in this study were related to immunity, diseases such as cancer, lactation, skeletal muscles, estrous cycle, feed consumption, sperm adhesion, and growth. These traits are among the important biological characteristics of living organisms. The results of this research, by identifying potential candidate genes related to ion disease and changes in the genome due to the disease, can be used in breeding programs for Holstein cows in the given country.



## کاوش ژنومی نشانه های انتخاب جهت شناسایی مکان های کروموزومی مرتبط با بیماری یون در گاوهای هلشتاین

فاطمه ناوشکی<sup>۱</sup> | حسین مرادی شهربابک<sup>۲</sup> | علی صادقی سفیدمزیگی<sup>۳</sup> | جوهان سولکنر<sup>۴</sup> | مهدی جوان نیکخواه<sup>۵</sup>

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، البرز، ایران: [navoshki@ut.ac.ir](mailto:navoshki@ut.ac.ir)
۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، البرز، ایران، نویسنده مسئول: [hmoradis@ut.ac.ir](mailto:hmoradis@ut.ac.ir)
۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران: [sadeghism@ut.ac.ir](mailto:sadeghism@ut.ac.ir)
۴. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه بوکو، وینا، اتریش: [johann.soelkner@boku.ac.at](mailto:johann.soelkner@boku.ac.at)
۵. گروه علوم دامی، پردیس ارس، دانشگاه تهران، جلفا، ایران: [javannikkhah@yahoo.com](mailto:javannikkhah@yahoo.com)

چکیده	اطلاعات مقاله
انتخاب باعث ایجاد نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم می‌شود. شناسایی نشانه‌های انتخاب در حیوانات در جهت ارتقا صفات اقتصادی و کاهش بیماری‌ها، یکی از اصلی‌ترین و چالش برانگیزترین تحقیقات در زمینه ژنتیک جمعیت است. در این تحقیق، با هدف شناسایی مناطق ژنومی تحت انتخاب مثبت بین جمعیت‌های گاوهای مبتلا به بیماری یون و سالم هلشتاین، پوشش گستره ژنوم با استفاده از چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) انجام شد. این تحقیق بر روی گاوهای گاوداری فوکا در اصفهان بر روی ۱۴۵ راس گاو هلشتاین انجام شد. بر اساس تراشه‌های 30K شرکت ایلومینا تعیین ژنوتیپ و گاوها به دو گروه بیمار و سالم گروه بندی شدند. گروه بیمار شامل ۴۵ راس و گروه سالم شامل ۱۰۰ راس گاو بود. در این مطالعه برای شناسایی مناطق ژنومی تحت انتخاب از دو آماره $F_{ST}$ و $XP-EHH$ استفاده شد. ژن‌های شناسایی شده توسط آماره $F_{ST}$ در دو جمعیت بیمار و سالم شامل $RAB37$ ، $ZC3H10$ ، $ESR1$ ، $HSD17B6$ ، $KCNC4$ ، $ERBB3$ بودند. ژن‌های شناسایی شده توسط آماره $XP-EHH$ در دو جمعیت بیمار و سالم شامل $AK1$ ، $ATP8A1$ ، $BTBD1$ ، $C1GALT1$ ، $CCDC6$ ، $CEP295$ ، $CLGN$ ، $CLSTN2$ ، $EHHADH$ ، $ERBB4$ ، $FRK$ ، $GRID2$ ، $GRIP1$ و $LRP6$ بودند. اکثر ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه با ایمنی، بیماری‌هایی مثل سرطان، شیردهی، ماهیچه‌های اسکلتی، چرخه فعلی، مصرف خوراک، چسبندگی اسپرم و رشد در ارتباط بود، که جزو صفات و ویژگی‌های مهم زیستی جاندار قرار می‌گیرد. مطمئناً مطالعات گسترده‌تر با تعداد نمونه‌های بیشتر، درک بهتری از ژن‌های کاندید برای بیماری یون در گاو و طراحی برنامه‌های اصلاح نژادی موفق در جهت کاهش هزینه‌های ناشی از بیماری، ایجاد خواهد نمود.	<p>نوع مقاله:</p> <p>مقاله پژوهشی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۳۰</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۴</p> <p>تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۷/۰۱</p> <p>کلیدواژه‌ها:</p> <p>بیماری یون، گاو هلشتاین، نشانه-های انتخاب، <math>F_{ST}</math>، <math>XP-EHH</math></p>

**استناد:** ناوشکی، فاطمه؛ مرادی شهربابک، حسین؛ صادقی سفیدمزیگی، علی؛ سولکنر، جوهان و جوان نیکخواه، مهدی (۱۴۰۳). کاوش ژنومی نشانه های انتخاب جهت شناسایی مکان های کروموزومی مرتبط با بیماری یون در گاوهای هلشتاین. نشریه علوم دامی ایران، ۵۵ (۳)، ۴۵۰-۴۳۷. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2024.367917.653972>



## مقدمه

بیماری یون، شبه سل یا پاراتوبرکلوزیس یک بیماری عفونی مزمن دستگاه گوارش و روده‌های کوچک در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی با عامل مایکوباکتریوم/اوبیوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس است (Van der Giessen et al, 1992). بیماری در گاو و تا اندازه‌ای در گوسفند و بز معمول می‌باشد (Kennedy and Benedictus, 2001). از خصوصیات این بیماری آنتروکولیت گرانولوماتوز و لنفادنیت است (Clarke, 1997). به دلیل گسترش آهسته بیماری، وقوع بیماری یون به صورت تک‌گیر است (Chiodini et al, 1984). در گاو با توجه به دوره کمون طولانی، علائم درمانگاهی تا قبل از دو سالگی ظاهر نمی‌شود (Gyles and Theon, 1993). علائم بالینی اولیه، پس از دوره کمون ۲ تا ۱۰ ساله علی‌رغم وجود اشتها به صورت نقصان وزن تدریجی بروز می‌کند. اسهال مزمن یا متناوب از بارزترین علائم بیماری می‌باشد. فرم تحت بالینی این بیماری با اثراتی مثل از دست دادن وزن به صورت پیشرونده، کاهش تولید شیر، کاهش ارزش کشتار و حذف زودرس و نیز اثرات احتمالی بر باروری و سلامت پستان مشاهده شده است (Jones et al, 1997). بیماری یون مسئول خسارات اقتصادی قابل توجهی در گله‌های شیری در سرتاسر جهان به دلیل کاهش تولید شیر، افزایش هزینه‌های مدیریتی و حذف زودرس یا مرگ ناشی از بیماری بالینی است (Smith et al, 2010).

به تغییر الگوی تنوع ژنتیکی و عدم تعادل لینکاژی در جایگاه‌های متصل با یک جهش سودمند در طی انتخاب، جاروب انتخاب (Selective Sweep) می‌گویند. باتوجه به اینکه این مناطق با ژن‌های عمده اثر و ژن‌های موثر بر صفات تولیدی و تولید مثلی به عنوان صفات مهم اقتصادی ارتباط دارند دارای اهمیت ویژه‌ای که برای اجرای تحقیقات بعدی می‌توانند منابع اطلاعاتی مناسبی را در دسترس محققان قرار دهند (Hayes et al, 2009). شناسایی نشانه‌های انتخاب یکی از اصلی‌ترین علایق متخصصان ژنتیک است زیرا می‌تواند اطلاعاتی از دانش پایه در مورد فرآیندهای تکاملی شکل‌دهنده ژنوم‌ها گرفته تا اطلاعات عملکردی در مورد مناطق ژنومی را فراهم کند (Schlötterer, 2003). همچنین امروزه به لطف توالی‌یابی نسل جدید، منابع ژنومی به‌طور تصاعدی در حال رشد هستند و تحلیل‌های کاوش ژنومیک را در گونه‌های مختلف بهبود می‌بخشد. هزاران مارکر در انواع مختلف به‌طور فزاینده‌ای در کاوش ژنومیک استفاده می‌شوند. علاوه بر این، توالی‌های ژنومی نیز به‌طور فزاینده‌ای در دسترس هستند و امکان پردازش بهتر داده‌ها، ارائه محلی‌سازی فیزیکی انواع و بهبود بازسازی هاپلوטיפ و انتساب داده‌ها را فراهم می‌کنند. به‌طور کلی برای داشتن استراتژی مناسب جهت مدیریت موثر منابع ژنتیکی حیوانات مزرعه‌ای، و مدیریت بیماری‌ها در جهت بهبود سودمندی در گله‌ها، نیازمند شناسایی مناطق تحت انتخاب مرتبط با صفات مهم و بیماری‌ها در دام هستیم. با توجه به این که دام‌های متفاوت به لحاظ بیماری و آلوده شدن به باکتری مولد یون رفتارهای متفاوت نشان می‌دهند، و با توجه به این که به لحاظ اقتصادی گاوداری‌ها به خصوص گاوداری‌های صنعتی دچار خسارت‌های فراوانی می‌شوند. لذا شناسایی دام‌های حساس و مقاوم به این بیماری می‌تواند نقش به‌سزا و مهمی در جلوگیری و یا کاهش آلودگی گاوداری‌ها به این عفونت داشته باشد. هدف از این مطالعه شناسایی مناطق ژنومی تحت انتخاب مرتبط با این بیماری در دو جمعیت گاوهای بیمار و سالم هلشتاین با استفاده از نشانگرهای تک نوکلئوتیدی (SNP) می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در گاوداری فکا در اصفهان انجام شد. ابتدا در آزمایشگاه نمونه خون گاوها به لحاظ بیماری یون با الایز انجام و سپس گاوها به دو گروه بیمار و سالم (شامل ۴۵ راس دام بیمار و ۱۰۰ راس دام سالم) تقسیم بندی شدند. هر دو گروه بر اساس ریز آرایه‌ها و SNPchip30k تعیین ژنوتایپ شدند. برای اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتایپ، مراحل مختلف فیلتراسیون بر روی داده‌های اولیه با استفاده از نرم افزار Plink، اعمال شد. شاخص‌های کنترل کیفیت شامل نرخ

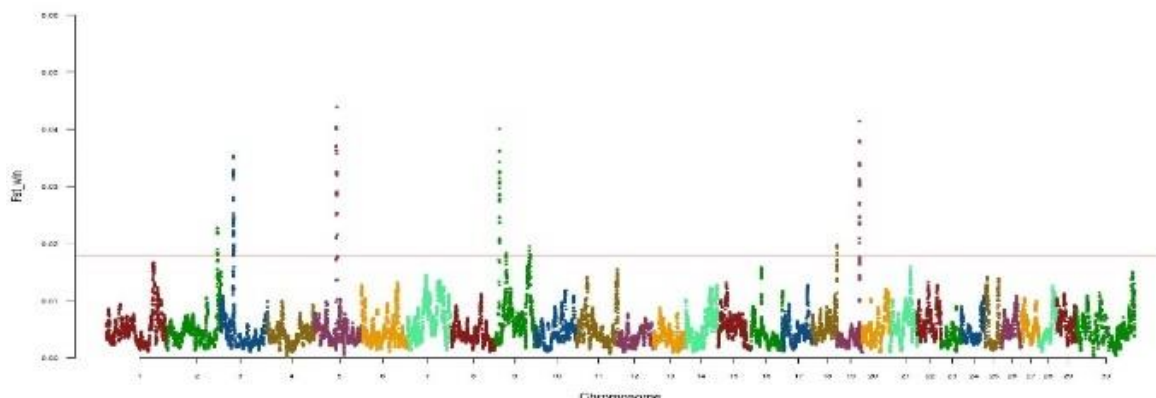
خوانش حیوان، نرخ خوانش SNP، فراوانی آلل کمیاب و تعادل هاردی - واینبرگ بودند. حیوانات با نرخ تعیین ژنوتیپ کمتر از ۹۹ درصد، SNP ها با نرخ تعیین ژنوتیپ کمتر از ۹۹ درصد، فراوانی آلل کمیاب کمتر از ۵ درصد و انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ با سطح معنی داری  $P < 10^{-6}$  کنار گذاشته شدند.

جهت بررسی الگوی ژنومی انتخاب مثبت در این بیماری، ارزش های تتا برای هر SNP به روش برآوردگر ناریب (Weir and Cockerham, 1984) در محیط نرم افزار R x64 4.0.4 محاسبه شد، جهت شناسایی بهتر سیگنال های انتخاب به جای ارزش عددی تتای هر اسنیپ، از میانگین ۵ اسنیپ مجاور به طول ۳۰۰ کیلو جفت باز استفاده شد. تنها ۰.۱٪ اسنیپ هایی که دارای بالاترین میانگین ارزش تتای اسنیپ های مجاور بودند به عنوان نشانه های انتخاب در منطقه ی ژنومی مربوطه شناسایی شدند. یکی دیگر از روش های شناسایی مناطق تحت انتخاب روش XP-EHH که مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی و طول هاپلوتیپی است. آماره XP-EHH توان بالایی در شناسایی مناطق تحت انتخاب دارد (Sabeti et al, 2007). علاوه بر این برای شناسایی مناطق تحت انتخاب به این روش نیاز به مشخص کردن آلل های اجدادی نیست (Utsunomiya et al, 2015). در آزمون XP-EHH هاپلوتایپ ها در دو جمعیت با یکدیگر مقایسه می شوند، تا تنوع در میزان نوترکیبی قسمتهای مختلف ژنوم در نظر گرفته شود. برای شناسایی نشانه های انتخاب در دو جمعیت از نرم افزار R x64 4.0.4 و پکیج rehh در این محیط استفاده شد. نشانگرهایی که ارزش XP-EHH آن ها در صدک ۹۹/۹ بالایی و پایینی بودند به عنوان مناطق تحت انتخاب معرفی شدند. بعد از شناسایی مناطق تحت انتخاب، برای پیدا کردن ژن های مرتبط با این مناطق از ژن لیست شرکت ایلومینا در محیط نرم افزار Plink v1.9 استفاده شد.

برای شناسایی مسیرهای متابولیکی مهم KEGG، ما از ClueGo نسخه ۲,۵,۶ استفاده کردیم که یک افزونه Cytoscape است که تفسیرهای بیولوژیکی از ژن ها را ارائه می دهد (Bindea et al, 2015). ما ژن های کاندید با ارزش بالا را انتخاب کردیم، به استثنای ژن هایی که دارای نمادهای LOC (Locus) و شناسه های ژن هستند. سپس ژن های مهم با استفاده از نرم افزار Cytoscape (Saito et al, 2012) و پلاگین ClueGO 2.5.6 (Bindea et al, 2009) تحت تجزیه و تحلیل غنی سازی عملکردی قرار گرفتند. شناسه نماد به عنوان پارامتر ورودی استفاده شد و B.taurus به عنوان ارگانیزم پس زمینه انتخاب شد. مقادیر  $P < 0.05$ ، پس از تصحیح بنفرونی برای آزمایش چندگانه، از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

## نتایج و بحث

پس از کنترل کیفیت داده ها، در نهایت ۲۸۷۴۹ عدد SNP برای تجزیه و تحلیل های بعدی انتخاب شدند. در این تحقیق، بخش هایی از ژنوم که دارای  $F_{ST}$  بالایی هستند نشان دهنده تمایز بین دو جمعیت بیمار و سالم می باشند که بر اثر بیماری یون به وجود آمده است. توزیع ژنومیک  $F_{ST}$  به روش win5 برای تمام SNP ها بر روی ژنوم انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در چندین منطقه ژنومی SNP های مجاور تفرق جمعیتی بالایی دارند. در این تحقیق، ۷۹ منطقه ژنومی روی ۶ کروموزوم بین ۲ جمعیت بیمار و سالم گاو شناسایی شدند (شکل ۱).



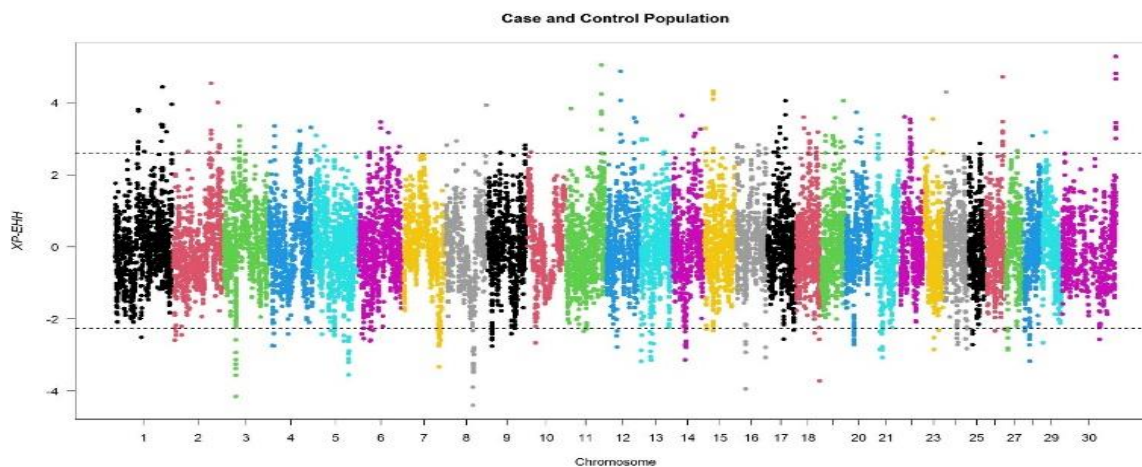
شکل ۲. توزیع ارزش‌های Win5 در سطح ژنوم گاوهای بیمار در مقایسه با گاوهای سالم: موقعیت ژنومی SNP ها بر روی محور X و ارزش FST آن‌ها بر روی محور Y نمایش داده شده است. خط ترسیم شده نشان‌دهنده ۹۹/۹ صدک کروموزوم‌ها است.

پس از بررسی مناطق تحت انتخاب ۳۴ ژن در دو جمعیت بیمار و سالم گاوهای هلشتاین توسط آماره FST شناسایی شد (فایل ضمیمه جدول ۱). بعد از شناسایی ژنهای مرتبط با مناطق تحت انتخاب مسیرهای بیولوژی مرتبط با این ژنها شناسایی شد (جدول ۱).

جدول ۱. مسیرهای شناسایی شده مرتبط با ژنهای آماره FST در دو جمعیت سالم و بیمار گاوهای هلشتاین

Term	PValue	Genes
negative regulation of production of miRNAs involved in gene silencing by miRNA	0.0116	ZC3H10, ESR1
transmembrane signaling receptor activity	0.0129	ERBB3, CD300E, CD300LF
retinol dehydrogenase activity	0.0218	SDR9C7, HSD17B6
TBP-class protein binding	0.0319	NACA, ESR1
basal plasma membrane	0.0319	ERBB3, LDLRAP1
delayed rectifier potassium channel activity	0.0376	KCNC4, KCNA10

بعد از برآورد آماره XP-EHH اگر این آماره منفی باشد، وجود انتخاب در جمعیت بیمار را نشان می‌دهد و اگر مثبت باشد نشان‌دهنده وجود انتخاب در جمعیت سالم است. وجود بخش‌هایی از ژنوم با ارزش‌های XP-EHH بالا، نشان‌دهنده تمایز بین جمعیت‌ها در آن مناطق ژنومی در اثر بیماری است (شکل ۲). نتایج به دست آمده نشان داد که در جمعیت سالم ۱۷۰ منطقه روی کروموزوم‌های مختلف و در جمعیت بیمار ۱۵۶ منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های مختلف شناسایی شد.



شکل ۲. توزیع مقادیر XP-EHH بین دو جمعیت بیمار و سالم. جمعیت بالا مربوط به سالم و جمعیت پایین مربوط به بیمار. خطهای ترسیم شده نشان دهنده ۹۹/۹ صدک کروموزومها است.

پس از بررسی مناطق تحت انتخاب، ۵۰ ژن در جمعیت بیمار و ۶۲ ژن در جمعیت سالم گاوهای هلشتاین توسط آماره XP-EHH شناسایی شد (فایل ضمیمه جدول ۲-۳). بعد از شناسایی ژنهای مرتبط با مناطق تحت انتخاب در دو جمعیت سالم و بیمار مسیرهای بیولوژی مرتبط با این ژنها در دو جمعیت شناسایی شد (جدول ۲).

جدول ۲. مسیرهای شناسایی شده مرتبط با ژنهای آماره xp-ehh در دو جمعیت سالم و بیمار گاوهای هلشتاین

Term	PValue	Genes
جمعیت سالم		
kidney development	0.0149	PKHD1, C1GALT1, RPGRIP1L
protein dephosphorylation	0.0157	PTPRE, PPP4R2, PTPRZ1
positive regulation of synaptic transmission	0.0315	RIMS2, CLSTN2
endoplasmic reticulum	0.0322	CPED1, PKHD1, SLC30A9, ATP8A1, RGMA, CLGN
brain development	0.0424	ZFHX3, MACO1, SPATA5
ATP binding	0.0464	PFKFB3, PCCA, ATP8A1, ERBB4, PIP5KL1, AK1, SPATA5, FRK
ATP metabolic process	0.0509	AK1, SLC25A25
enzyme binding	0.0506	ZFHX3, PCCA, EHHADH
جمعیت بیمار		
identical protein binding	0.0022	ATXN1, TRPA1, BTBD1, RASEF, CCDC6, RBBP8, UBQLN1, ULK1
cytosol	0.0049	NTRK2, CEP295, RASEF, RASGRF1, BAZ2A, PEX1, ATXN1, BTBD1, PPIP5K2, CCDC6, UBQLN1, ULK1, BCL2L14
Pathways of neurodegeneration - multiple diseases	0.0104	ATXN1, ATP5F1B, ULK1, DNAI1, LRP6
regulation of macroautophagy	0.0200	UBQLN1, ULK1
protein C-terminus binding	0.0220	GRIP1, ATXN1, PEX1
Amyotrophic lateral sclerosis	0.0306	ATP5F1B, UBQLN1, ULK1, DNAI1
integral component of postsynaptic density membrane	0.0501	GRID2, SORCS3

در مطالعه حاضر، ما از دو روش مختلف برای شناسایی مناطق تحت انتخاب، برای افزایش دقت استفاده کردیم. ژن‌های شناسایی شده توسط آماره FST در دو جمعیت بیمار و سالم شامل ZC3H10, ESR1, HSD17B6, KCNC4, ERBB3 و NACA بودند. در مطالعه ای بیان ZC3H10 به طور قابل توجهی در سلول‌های فیبروبلاست جنین گاوی (BFF) افزایش یافت. ZC3H10 در مسیرهای مرتبط با ایمنی ناشی از استرس سرما و ژن‌های تنظیم‌شده دخیل در متابولیسم گلوکز و لیپید و انتقال چربی شرکت می‌کند، در نتیجه سازگاری با استرس سرما را تسهیل می‌کند (Wang et al, 2022). در نتیجه، ZC3H10 ممکن است با پاسخ ایمنی ناشی از استرس سرما مرتبط باشد. شواهد قابل توجهی نشان می‌دهد که استرس سرما بر تنظیم ایمنی تأثیر می‌گذارد (Jia et al, 2019). ESR1 این ژن یک گیرنده استروژن و فاکتور رونویسی فعال شده با لیگاند را کد می‌کند (Molli et al, 2008). ESR1 برای مدتی طولانی در سرطان پستان مورد توجه بوده است، اما از نظر بالینی در سرطان آندومتر، تخمدان و سایر انواع سرطان نیز مرتبط است (Sá Filho et al, 2017). HSD17B6 آنزیمی را با فعالیت اکسیدوردوکتاز و اپی‌مراز نسبت به آندروژن‌ها و استروژن‌ها رمزگذاری می‌کند و احتمالاً عملکرد استروئیدی را در دستگاه تناسلی جنس نر تنظیم می‌کند (Huang, 2000). KCNC4 پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن متعلق به کلاس یکسو کننده پروتئین‌های کانال است و یک پروتئین غشایی یکپارچه است که واسطه نفوذپذیری یون پتاسیم وابسته به ولتاژ غشاهای تحریک پذیر است. بیماری‌های مرتبط با KCNC4 شامل اختلال مادرزادی گلیکوزیلاسیون، نوع Iic و آتاکسی نخاعی ۱۳ است (Ghanshani et al, 1992). ERBB3 در گسترش شیردهی و تمایز غده پستانی در دوران بارداری نقش دارد زیرا بیان ژن‌های هدف کلیدی برای شیردهی را تنظیم می‌کند (Marín-Garzón et al, 2021). علاوه بر این، ERBB3 توسط Du و همکاران گزارش شده است (Du et al, 2020). ژن NACA در تنظیم و تمایز سلول‌های میوبلاست و دودمان میوزنیک نقش دارد (Berger et al, 2012).

همچنین ژن‌های شناسایی شده توسط آماره XP-EHH در دو جمعیت بیمار و سالم شامل AK1, ATP8A1, BTBD1, LRP6 و C1GALT1, CCDC6, CEP295, CLGN, CLSTN2, EHHADH, ERBB4, FRK, GRID2, GRIP1 بودند. ژن AK1 انتقال برگشت پذیر گروه فسفات پایانی بین ATP و AMP را کاتالیز می‌کند (Matsuura et al, 1989). آدنیلات کیناز ۱، در گلبول قرمز، عضله اسکلتی و مغز بیان شده و مسئول فسفوریلاسیون AMP در گلبول‌های قرمز و تولید ADP در مسیر متابولیسمی آدنین گوانین است (Gaudet et al, 2021). این ژن یک آنزیم آدنیلات کیناز را کد می‌کند که در متابولیسم انرژی و هموستاز نسبت‌های نوکلئوتیدی آدنین سلولی در بخش‌های مختلف درون سلولی نقش دارد. این ژن در ماهیچه‌های اسکلتی، مغز و گلبول‌های قرمز به شدت بیان می‌شود. جهش‌های خاصی در این ژن که منجر به یک آنزیم ناکافی از نظر عملکرد می‌شود، با یک اختلال ژنتیکی نادر که باعث کم‌خونی همولیتیک غیرسفرسوسیتی می‌شود، مرتبط است. پیوند جایگزین این ژن منجر به چندین نسخه می‌شود که ایزوفرم‌های مختلف را کد می‌کند (Amiri et al, 2013). در مطالعه ای که Sanata و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی بررسی سیستم‌های ژنتیکی، مصرف خوراک، کارایی و عملکرد خوراک در گاو (Bos indicus) انجام دادند مشخص شد ژن ATP8A1 در ضریب تبدیل خوراک، مصرف خوراک باقیمانده و افزایش وزن تأثیر دارد (Santana et al, 2014). ژن BTBD1 با لاشه و صفات رشد در جوجه‌های گوستی مرتبط است (Zhang et al, 2015). BTBD1 یک ژن کد کننده پروتئین است. بیماری‌های مرتبط با BTBD1 عبارتند از نفرومای مزوبلاستیک مادرزادی و فیبروسارکوم دوران کودکی، از جمله مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به پردازش و ارائه آنتی‌ژن با واسطه MHC کلاس I و متابولیسم پروتئین‌ها اشاره کرد. پارالوگ مهم این ژن BTBD2 است (Furukawa et al, 2003). ژن C1GALT1 پروتئینی را کد می‌کند که نقش اصلی را در بسیاری از فرآیندها، مانند رگ زایی، ترومبوز و توسعه هموستاز کلیه ایفا می‌کند (Zhang et al, 2015). در موش‌های جهش یافته با ژن G1GALT1، گلیکوپروتئین‌های تخمک اصلاح



شده نسبت فاکتور رشد به بیان پروتئین مورفوژنتیک استخوان را تغییر می دهند. نسبت بیان تغییر یافته و رشد فولیکول را تغییر می دهد و منجر به تولید فولیکول های بیشتر و چرخه فعلی طولانی تر می شود (Grasa et al, 2015). C1GALT1 می تواند به عنوان یک انکوژن یا یک ژن سرکوب کننده تومور در شرایط مختلف عمل کند. بیان بالای C1GALT1 در بافت های سرطانی کبد یا تومورهای پیشرفته گزارش شده است (Liu et al, 2014). عملکرد ژن CCDC6 منجر به کاهش پیشرفت تومور در اندام ها است. در مطالعه ای سطوح پایین پروتئین CCDC6 را گزارش کرده بودند که با احتمال وقوع تومور در ارتباط بود (Morra et al, 2015). در مطالعه ای که به بررسی اساس ژنتیکی تولید مثل تخمدان گاو شیانگشی و آنگوس می پرداخت نشان داده شد که با توجه به بیان بالاتر CCDC6 در گاو شیانگشی، می توان فرض کرد که احتمال تشکیل تومور در بافت تخمدان گاو شیانگشی در مقایسه با گاو آنگوس کمتر است (Fang et al, 2022). ژن CEP295 در گیر در چندین فرآیند، از جمله همانندسازی سانتریول، تنظیم استیلایسیون پروتئین، اسکلت سلولی میکروتوبول و غشای پلاسمایی واقع است. بیماری های مرتبط با CEP295 شامل میکروسفالی اتوزومال مغلوب اولیه و سندرم Bardet-Biedl 1 است (Chang et al, 2016). این ژن پروتئین را کد می کند که برای تولید بخش دیستال سانتریول های تازه متولد شده با واسطه CENPJ در طول چرخه سلولی ضروری است (Izquierdo et al, 2014). CLGN در اسپرم سازی و ناباروری نقش دارد (McPhaul et al, 1993). در طول اسپرماتوزن به عنوان یک پروتئین پیشرو برای طیف وسیعی از پروتئین هایی که برای چسبندگی اسپرم و نفوذ بعدی به تخمک مهم هستند، عمل می کند. برای مهاجرت طبیعی اسپرم از رحم به داخل مجرای تخمک و برای باروری طبیعی مردان لازم است (Ikawa et al, 2001). CLSTN2 ژنی است که با صفات تولیدمثلی مرتبط است و نقش مهمی در ترویج تکثیر سلول های چربی در بافت چربی احشایی و چربی زیر جلدی دارد و با چاقی پستانداران مرتبط است (Santana et al, 2015). و بیان آن مرتبط است با اختلالات متابولیکی مانند گلوکز، اختلال متابولیسم، اختلال در پانکراس، دیابت قندی، دیابت قندی غیر وابسته به انسولین و دیابت قندی وابسته به انسولین (Mas et al, 2013). این ژن متابولیسم چربی، تکثیر سلول های شبه چربی و با دیابت مرتبط است و بینش بیشتری در مورد نقش متابولیسم لیپید در کنترل فیزیولوژیکی فنوتیپ ارائه می دهد. با این حال، این مسیر متابولیک تنها به بخشی از فیزیولوژی مربوط می شود که صفات لاشه را در گاو گوشتی کنترل می کند و مطالعات بیشتری برای تأیید این نتایج ضروری است (Santana et al, 2015). ژن EHHADH پروتئین کدینگ است و پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن یک آنزیم دو عملکردی است و یکی از چهار آنزیم مسیر بتا اکسیداسیون پراکسی زومی است (Qi et al, 1999). نقص در این ژن علت اصلی اختلالات پراکسیزومال مانند سندرم زلوگر است. از مسیرهای مرتبط با آن می توان به متابولیسم اسیدهای چرب و متابولیسم لیپید پراکسیزومال اشاره کرد (Houten et al, 2012). در مطالعه تشخیص تری گلیسیرید داخل سلولی نشان داد که بیان بیش از حد EHHADH منجر به کاهش قابل توجهی در تری گلیسیرید داخل سلولی می شود (Li et al, 2022). ERBB4 با مرگ و میر جنینی در موش مرتبط است (Tidcombe et al, 2003). این ژن با مسیر ERBB4 معروف است و این مسیر در توسعه و پیشرفت ملانوسیت ها نقش دارد (Choi et al, 2010). جهش در این ژن با سرطان مرتبط است (Ferreira et al, 2008). این ژن پروتئین تیروزین کیناز را کد میکند که نقش اساسی به عنوان گیرنده سطح سلولی برای نوروگولین ها و اعضای خانواده EGF ایفا می کند و رشد قلب، سیستم عصبی مرکزی و غده پستانی، رونویسی ژن، تکثیر سلولی، تمایز، مهاجرت و آپوپتوز را تنظیم می کند (Breitenkamp et al, 2014). ERBB4 با STAT5A در پروموتور CSN2 برای تنظیم رونویسی پروتئین های شیر در طول دوره شیردهی ضروری است (Jeyabalan and Clement, 2016). FRK مرتبط با چرخه سلولی است و قبلاً نشان داده شده بود که با مصرف خوراک و کارایی خوراک در گاوهای گوشتی مرتبط است (Sherman et al, 2010). GRID2 پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن عضوی از خانواده گیرنده های گلوتامات یونوتروپیک است که گیرنده های انتقال دهنده عصبی تحریکی غالب در مغز پستانداران هستند. پروتئین کدگذاری شده یک پروتئین غشایی است که به طور انتخابی در سلول های پورکنژ مخچه بیان می شود

(Bertolini et al, 2022). این ژن منجر به تولید چندین نسخه از آن می شود که ایزوفرم های مختلفی را کد می کند. جهش در این ژن باعث آتاکسی مخچه در انسان می شود (Elegheert et al, 2016). GRIP1 تحقیقات قبلی تعدادی از این ژن ها را شناسایی کرده است که با صفات های تولید مثلی مرتبط هستند (Fortes و همکاران، ۲۰۱۳). به نظر می رسد که GRIP1 در پروتئین های ماتریکس خارج سلولی نقش دارد و در طول رشد جنین ضروری است (Kato et al, 2010). مشخص شده است که انواع ژنتیکی LRP6 با افزایش خطر ابتلا به بیماری آلزایمر در انسان مرتبط است (Shaw et al, 2011). در مدل آمیلوئید موش، کمبود LRP6 باعث افزایش سطح آمیلوئید بنا شده و با ابتلا به آلزایمر مرتبط است (Liu et al, 2014).

## نتیجه گیری

اکثر ژن های شناسایی شده در این مطالعه با ایمنی، بیماری هایی مثل سرطان، شیردهی، ماهیچه های اسکلتی، چرخه فحلی، مصرف خوراک، چسبندگی اسپرم و رشد در ارتباط بود، که جزو صفات و ویژگی های مهم زیستی جاندار قرار می گیرد. نتایج حاصل از این تحقیق با مشخص نمودن ژن های کاندید احتمالی مرتبط با بیماری یون و لوکیشن هایی از ژنوم که در اثر بیماری تغییر پیدا کرده اند، می تواند در برنامه های اصلاح نژادی روی گاوهای هلشتاین در کشور مورد استفاده قرار گیرد. البته با توجه به کامل نبودن اطلاعات مربوط به عملکرد ژن ها در گونه گاو و کوچک بودن جمعیت مورد مطالعه، مطالعات بیشتر با تعداد نمونه های بزرگتر، درک بهتری از ژن های کاندید برای بیماری یون در جمعیت گاو ایجاد خواهد نمود. با توجه به اهمیت پرورش گاو برای تأمین منابع لبنی در کشور و همچنین فراگیری وسیع گاو هلشتاین در جهان، افزایش اطلاعات در این زمینه مطمئناً تأثیر مناسبی بر طراحی استراتژی های اصلاح نژاد در گاوهای کشور دارد.

## REFERENCES

- Amiri, M., Conserva, F., Panayiotou, C., Karlsson, A., & Solaroli, N. (2013). The human adenylyate kinase 9 is a nucleoside mono-and diphosphate kinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(5), 925-931. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.004>
- Berger, F., Berkholz, J., Breustedt, T., Ploen, D., & Munz, B. (2012). Skeletal muscle-specific variant of nascent polypeptide associated complex alpha (skNAC): implications for a specific role in mammalian myoblast differentiation. *European Journal of Cell Biology*, 91(2), 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.10.004>
- Bertolini, F., Moscatelli, G., Schiavo, G., Bovo, S., Ribani, A., Ballan, M., ... & Fontanesi, L. (2022). Signatures of selection are present in the genome of two close autochthonous cattle breeds raised in the North of Italy and mainly distinguished for their coat colours. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 139(3), 307-319. <https://doi.org/10.1111/jbg.12659>
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., ... & Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, 25(8), 1091-1093. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
- Breitenkamp, A. F., Matthes, J., Nass, R. D., Sinzig, J., Lehmkuhl, G., Nürnberg, P., & Herzig, S. (2014). Rare mutations of CACNB2 found in autism spectrum disease-affected families alter calcium channel function. *PLoS One*, 9(4), e95579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095579>
- Chang, C. W., Hsu, W. B., Tsai, J. J., Tang, C. J. C., & Tang, T. K. (2016). CEP295 interacts with microtubules and is required for centriole elongation. *Journal of cell science*, 129(13), 2501-2513. <https://doi.org/10.1242/jcs.186338>
- Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., & Merkal, R. S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell veterinarian*, 74(3), 218-262.
- Choi, J., Young, J. A., & Callaway, E. M. (2010). Selective viral vector transduction of ErbB4 expressing cortical interneurons in vivo with a viral receptor–ligand bridge protein. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences, 107(38), 16703-16708. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006233107>
- Clarke, C. J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of comparative pathology*, 116(3), 217-261. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(97\)80001-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80001-1)
- Du, C., Deng, T. X., Zhou, Y., Ghanem, N., & Hua, G. H. (2020). Bioinformatics analysis of candidate genes for milk production traits in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Tropical animal health and production*, 52, 63-69. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01984-1>
- Elegheert, J., Kakegawa, W., Clay, J. E., Shanks, N. F., Behiels, E., Matsuda, K., ... & Aricescu, A. R. (2016). Structural basis for integration of GluD receptors within synaptic organizer complexes. *Science*, 353(6296), 295-299. <https://doi.org/10.1126/science.aae0104>
- Fang, H., Ao, S., Yun, L., Jianbo, L., Haobang, L., Yang, L., ... & Kangle, Y. (2022). Exploring the Genetic Basis of Xiangxi Cattle Ovary Reproduction: A Rudimentary Study of Ovary Transcriptome in Xiangxi and Angus Cattle. *Pakistan Veterinary Journal*, 42(2).
- Ferreira, M. A., O'Donovan, M. C., Meng, Y. A., Jones, I. R., Ruderfer, D. M., Jones, L., ... & Craddock, N. (2008). Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nature genetics*, 40(9), 1056-1058. <https://doi.org/10.1038/ng.209>
- Fortes, M. R. S., Reverter, A., Kelly, M., McCulloch, R., & Lehnert, S. A. (2013). Genome-wide association study for inhibin, luteinizing hormone, insulin-like growth factor 1, testicular size and semen traits in bovine species. *Andrology*, 1(4), 644-650. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00101.x>
- Furukawa, M., He, Y. J., Borchers, C., & Xiong, Y. (2003). Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nature cell biology*, 5(11), 1001-1007. <https://doi.org/10.1038/ncb1056>
- Gaudet, P., Livstone, M. S., Lewis, S. E., & Thomas, P. D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in bioinformatics*, 12(5), 449-462. <https://doi.org/10.1093/bib/bbr042>
- Ghanshani, S., Pak, M., McPherson, J. D., Strong, M., Dethlefs, B., Wasmuth, J. J., ... & Chandy, K. G. (1992). Genomic organization, nucleotide sequence, and cellular distribution of a Shaw-related potassium channel gene, Kv3. 3, and mapping of Kv3. 3 and Kv3. 4 to human chromosomes 19 and 1. *Genomics*, 12(2), 190-196. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90365-Y](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90365-Y)
- Grasa, P., Ploutarchou, P., & Williams, S. A. (2015). Oocytes lacking O-glycans alter follicle development and increase fertility by increasing follicle FSH sensitivity, decreasing apoptosis, and modifying GDF9: BMP15 expression. *The faseb journal*, 29(2), 525-539. <https://doi.org/10.1096/fj.14-253757>
- Gyles, C.L. and Theon, O.C. (1993). Pathogenesis of Bacterial Infection in Animals. 2nd edition. USA: Ames, Iowa, Iowa State University, pp: 44-54.
- Hayes, B. J., Chamberlain, A. J., Maceachern, S., Savin, K., McPartlan, H., MacLeod, I., ... & Goddard, M. E. (2009). A genome map of divergent artificial selection between *Bos taurus* dairy cattle and *Bos taurus* beef cattle. *Animal genetics*, 40(2), 176-184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01815.x>
- Houten, S. M., Denis, S., Argmann, C. A., Jia, Y., Ferdinandusse, S., Reddy, J. K., & Wanders, R. J. (2012). Peroxisomal L-bifunctional enzyme (Ehhadh) is essential for the production of medium-chain dicarboxylic acids. *Journal of lipid research*, 53(7), 1296-1303. <https://doi.org/10.1194/jlr.M024463>
- Huang, X. F. (2000). Molecular characterization of a first human 3 ( $\alpha \rightarrow \beta$ )-hydroxysteroid epimerase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29452-29457. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000562200>
- Ikawa, M., Nakanishi, T., Yamada, S., Wada, I., Kominami, K., Tanaka, H., ... & Okabe, M. (2001).

- Calmegin is required for fertilin  $\alpha/\beta$  heterodimerization and sperm fertility. *Developmental biology*, 240(1), 254-261. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0462>
- Izquierdo, D., Wang, W. J., Uryu, K., & Tsou, M. F. B. (2014). Stabilization of cartwheel-less centrioles for duplication requires CEP295-mediated centriole-to-centrosome conversion. *Cell reports*, 8(4), 957-965. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.022>
- Jeyabalan, N., & Clement, J. P. (2016). SYNGAP1: mind the gap. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 32. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00032>
- Jia, Z., Chen, A., Wang, C., He, M., Xu, J., Fu, H., ... & Guo, Z. (2019). Amelioration effects of Kaempferol on immune response following chronic intermittent cold-stress. *Research in veterinary science*, 125, 390-396. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.012>
- Jones, T. C., Hunt, R. D., & King, N. W. (1997). Canine distemper. *Veterinary Pathology*, sixth ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 311-315.
- Kato, M., Takaishi, H., Yoda, M., Tohmonda, T., Takito, J., Fujita, N., ... & Chiba, K. (2010). GRIP1 enhances estrogen receptor  $\alpha$ -dependent extracellular matrix gene expression in chondrogenic cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(7), 934-941. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.03.008>
- Kennedy, D. J., & Benedictus, G. (2001). Control of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in agricultural species. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 20(1), 151-179.
- Li, G., Yang, R., Lu, X., Liu, Y., He, W., Li, Y., ... & Fang, X. (2022). RNA-Seq Analysis Identifies Differentially Expressed Genes in the Longissimus dorsi of Wagyu and Chinese Red Steppe Cattle. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 387. <https://doi.org/10.3390/ijms24010387>
- Liu, C. C., Tsai, C. W., Deak, F., Rogers, J., Penuliar, M., Sung, Y. M., ... & Bu, G. (2014). Deficiency in LRP6-mediated Wnt signaling contributes to synaptic abnormalities and amyloid pathology in Alzheimer's disease. *Neuron*, 84(1), 63-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.048>
- Liu, C. H., Hu, R. H., Huang, M. J., Lai, I. R., Chen, C. H., Lai, H. S., ... & Huang, M. C. (2014). C1GALT1 promotes invasive phenotypes of hepatocellular carcinoma cells by modulating integrin  $\beta 1$  glycosylation and activity. *PLoS One*, 9(8), e94995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094995>
- Marín-Garzón, N. A., Magalhães, A. F. B., Schmidt, P. I., Serna, M., Fonseca, L. F. S., Salatta, B. M., ... & Albuquerque, L. G. (2021). Genome-wide scan reveals genomic regions and candidate genes underlying direct and maternal effects of preweaning calf mortality in Nellore cattle. *Genomics*, 113(3), 1386-1395. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.02.021>
- Mas, S., Gassó, P., Bernardo, M., & Lafuente, A. (2013). Functional analysis of gene expression in risperidone treated cells provide new insights in molecular mechanism and new candidate genes for pharmacogenetic studies. *European Neuropsychopharmacology*, 23(4), 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.04.016>
- Matsuura, S., Igarashi, M., Tanizawa, Y., Yamada, M., Kishi, F., Kajii, T., ... & Nakazawa, A. (1989). Human adenylate kinase deficiency associated with hemolytic anemia: a single base substitution affecting solubility and catalytic activity of the cytosolic adenylate kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 10148-10155. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81779-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81779-3)
- McPhaul, M. J., Marcelli, M., Zoppi, S., Griffin, J. E., & Wilson, J. D. (1993). Genetic basis of endocrine disease. 4. The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 76(1), 17-23. <https://doi.org/10.1210/jcem.76.1.8421085>
- Molli, P. R., Singh, R. R., Lee, S. W., & Kumar, R. (2008). MTA1-mediated transcriptional repression of BRCA1 tumor suppressor gene. *Oncogene*, 27(14), 1971-1980. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210839>
- Morra, F., Luise, C., Merolla, F., Poser, I., Visconti, R., Ilardi, G., ... & Celetti, A. (2015). FBXW7

- and USP7 regulate CCDC6 turnover during the cell cycle and affect cancer drugs susceptibility in NSCLC. *Oncotarget*, 6(14), 12697. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3708>
- Qi, C., Zhu, Y., Pan, J., Usuda, N., Maeda, N., Yeldandi, A. V., ... & Reddy, J. K. (1999). Absence of spontaneous peroxisome proliferation in enoyl-CoA hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse liver: Further support for the role of fatty acyl CoA oxidase in PPAR $\alpha$  ligand metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15775-15780. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15775>
- Sá Filho, M. F. D., Gonella-Diaza, A. M., Sponchiado, M., Mendanha, M. F., Pugliesi, G., Ramos, R. D. S., ... & Binelli, M. (2017). Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrous beef cows. *Journal of animal science and biotechnology*, 8(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0211-3>
- Sabeti, P. C., Varilly, P., Fry, B., Lohmueller, J., Hostetter, E., Cotsapas, C., ... & Wellcome Trust Kennedy Karen 67 Jamieson Ruth 64 Stewart John 64. (2007). Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature*, 449(7164), 913-918. <https://doi.org/10.1038/nature06250>
- Saito, R., Smoot, M. E., Ono, K., Ruschinski, J., Wang, P. L., Lotia, S., ... & Ideker, T. (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. *Nature methods*, 9(11), 1069-1076. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2212>
- Santana, M. H. A., Kadarmideen, H., Pant, S., Alexandre, P., Junior, G. O., Gomes, R., ... & Ferraz, J. B. S. (2014, August). Systems genetics investigations for feed intake, feed efficiency and performance in Nellore (*Bos indicus*) Cattle. In *10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*.
- Santana, M. H. D. A., Ventura, R. V., Utsunomiya, Y. T., Neves, H. H. D. R., Alexandre, P. A., Oliveira Junior, G. A., ... & Ferraz, J. B. S. (2015). A genomewide association mapping study using ultrasound-scanned information identifies potential genomic regions and candidate genes affecting carcass traits in Nellore cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 132(6), 420-427. <https://doi.org/10.1111/jbg.12167>
- Schlötterer, C. (2003). Hitchhiking mapping—functional genomics from the population genetics perspective. *Trends in Genetics*, 19(1), 32-38. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)00012-4)
- Shaw, C. A., Li, Y., Wiszniewska, J., Chasse, S., Zaidi, S. N. Y., Jin, W., ... & Szgeti, K. (2011). Olfactory copy number association with age at onset of Alzheimer disease. *Neurology*, 76(15), 1302-1309. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182166df5>
- Sherman, E. L., Nkrumah, J. D., & Moore, S. S. (2010). Whole genome single nucleotide polymorphism associations with feed intake and feed efficiency in beef cattle. *Journal of animal science*, 88(1), 16-22. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1759>
- Smith, R. L., Strawderman, R. L., Schukken, Y. H., Wells, S. J., Pradhan, A. K., Espejo, L. A., ... & Gröhn, Y. T. (2010). Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 93(8), 3513-3524. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2742>
- Tidcombe, H., Jackson-Fisher, A., Mathers, K., Stern, D. F., Gassmann, M., & Golding, J. P. (2003). Neural and mammary gland defects in ErbB4 knockout mice genetically rescued from embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8281-8286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1436402100>
- Utsunomiya, Y. T., Pérez O'Brien, A. M., Sonstegard, T. S., Sölkner, J., & Garcia, J. F. (2015). Genomic data as the “hitchhiker's guide” to cattle adaptation: tracking the milestones of past selection in the bovine genome. *Frontiers in Genetics*, 6, 36. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00036>
- Van der Giessen, J. W. B., Eger, A., Haagsma, J., Haring, R. M., Gaastra, W., & Van Der Zeijst, B. A. M. (1992). Amplification of 16S rRNA sequences to detect Mycobacterium paratuberculosis. *Journal of medical microbiology*, 36(4), 255-263. <https://doi.org/10.1099/00222615-36-4-255>
- Wang, L., Gao, Y., Wang, J., Huang, N., Jiang, Q., Ju, Z., ... & Huang, J. (2022). Selection Signature

- and CRISPR/Cas9-Mediated Gene Knockout Analyses Reveal ZC3H10 Involved in Cold Adaptation in Chinese Native Cattle. *Genes*, 13(10), 1910. <https://doi.org/10.3390/genes13101910>
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*, 1358-1370. <https://doi.org/10.2307/2408641>
- Zhang, H., Shen, L. Y., Xu, Z. C., Kramer, L. M., Yu, J. Q., Zhang, X. Y., ... & Li, H. (2020). Haplotype-based genome-wide association studies for carcass and growth traits in chicken. *Poultry science*, 99(5), 2349-2361. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.01.009>
- Zhang, X., Dong, W., Zhou, H., Li, H., Wang, N., Miao, X., & Jia, L. (2015).  $\alpha$ -2, 8-sialyltransferase is involved in the development of multidrug resistance via PI 3 K/A kt pathway in human chronic myeloid leukemia. *IUBMB life*, 67(2), 77-87. <https://doi.org/10.1002/iub.1351>