



Genomic association study to identify candidate genes for early growth traits in chickens

Zeinab Asgari^{1✉}, Alireza Ehsani², Ali Akbar Masoudi³, Rasoul Vaez Torshizi⁴

1. Corresponding Author, Department of Animal Sciences, Agricultural Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: zeynab.asgari93@gmail.com
2. Department of Animal Science, Agricultural Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: alireza.ehsani@modares.ac.ir
3. Department of Animal Science, Agricultural Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: masoudia@modares.ac.ir
4. Department of Animal Science, Agricultural Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: rasoul@modares.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	<p>So far, several methods have been used to identify genetic factors affecting polygenic traits. Common methods are least squares regression analysis, maximum likelihood regression analysis, and Bayesian. The superiority of Bayesian methods over other methods is that it is possible to use all SNPs in the model simultaneously. The simultaneous presence of markers can prevent overestimation of marker effects and increase the probability of identifying true positive SNPs. Therefore, in the present study, the BayesCpi method was used to identify SNPs related to body weight at early stages of growth (i.e. body weight at week 2) in an F2 population of mixed chickens. For this purpose, the Illumina 60K SNP bead chip was used to genotype the present population, including 312 chickens from the F2 population. According to the results of the analysis, 16 SNPs with a Bayes Factor (BF) between 20 and 150 were known and suggested as markers for body weight at early age. Results of post-GWAS showed that these SNPs were distributed across 4 chromosomes and were located close to, or inside the 16 genes. Among the identified genes, 12 genes were protein-encoding and 4 were noncoding RNAs. To identify genes associated with each SNP in candidate regions, 0.5 Mb around each significant SNP was considered.</p>
Article history: Received: 5 July 2023 Received in revised form: 18 April 2024 Accepted: 1 October 2023 Published online: 20 April 2024	
Keywords: <i>Genome-wide association study,</i> <i>Chicken,</i> <i>Single nucleotide polymorphism,</i> <i>Bayesian method,</i> <i>Candidate gene.</i>	

Cite this article: Asgari, Z., Ehsani, A.R., Masoudi, A.A. & Vaez Torshizi, R. (2024). Genomic association study to identify candidate genes for early growth traits in chickens. *Iranian Journal of Animal Science*, 55 (4), 283-300. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2024.372924.654003>



© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2024.372924.654003>

Extended Abstract

Introduction

Many crucial traits in chickens are quantitative and influenced by numerous genes, hence making their improvement vital. In this regard, genome-wide association studies (GWAS) have successfully uncovered single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with these traits, aiming to elucidate regions contributing to their heritability. Utilizing GWAS findings facilitates the identification of candidate regions for genomic selection programs. Bayesian inference, a method employing all markers simultaneously, mitigates issues like false positives and overestimation of the effects of Quantitative Trait Loci (QTLs) and SNPs. Additionally, employing an F2 population enhances mapping accuracy. Hence, this study aims to identify genes influencing early-stage body weight in chickens using the Bayes CPI method within an F2 population of crossbred chickens

Background and objectives

In the present study, the Bayes Cpi method was utilized to identify SNPs associated with body weight during the early stages of growth (i.e., body weight at week 2) in an F2 population of mixed chickens. For this purpose, the Illumina 60K SNP bead chip was employed to genotype the population, comprising 312 chickens from the F2 generation

Materials and method

Initially, phenotypic data were collected from the offspring of the F2 generation. This F2 population was bred from crosses between a commercial broiler line (Arian (AA)) and Orumieh Iranian native fowl (NN). Arian chickens were selected for their body weight and meat quality traits, while native chickens were chosen for their natural resilience to diseases and pathogens. After 23 generations of strong selection, 450 F2 chickens were produced in 6 different hatches and utilized for testing. Each bird underwent weighing weekly after an 8-hour fasting period, individually assessed using a digital scale with a capacity of 50 kg and a measurement accuracy of 1 gram. Subsequently, genotyping was conducted on a random subset of 312 birds from the F2 generation using Illumina 60k SNP chips. Finally, the data underwent analysis using a mixed regression model and the GS3 software. The nearest genes to the proposed marker SNPs were identified using the NCBI website, considering 0.5 Mbp around each SNP

Result

Applying a significant threshold of Bayes factor ranging from 20 to 150, we identified 16 significant SNPs associated with body weights at 2 weeks of age, which were located near or within 16 genes distributed over 4 different chromosomes. These genes exhibit various metabolic functions contributing to the growth and weight gain of the body. They were categorized based on their roles: one group involved in Wnt signaling, another in the development of the nervous system, and others in different metabolic pathways, biosynthesis of various compounds, body metabolism, and substance transfer. The CACNA1C gene is implicated in two pathways. Additionally, the GALNTL6 gene plays a role in the protein glycosylation pathway, which facilitates protein modification.

Conclusion

This study identified 16 SNP markers associated with body weight at 2 weeks, shedding light on genes affecting early chicken growth. Chromosomes 1 and 4 emerged as key contributors to chicken genome variation at week 2 of age.



مطالعه ارتباط ژنومی برای شناسایی ژن‌های کاندیدا در مراحل اولیه رشد در مرغ

زینب عسگری^۱ | علیرضا احسانی^۲ | علی اکبر مسعودی^۳ | رسول واعظ ترشیزی^۴

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: zeynab.asgari93@gmail.com

۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: alireza.ehsani@modares.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: masoudia@modares.ac.ir

۴. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: rasoult@modares.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>نوع مقاله:</p> <p>مقاله پژوهشی</p>	<p>تاکنون روش‌های متعددی برای شناسایی فاکتورهای ژنتیکی مؤثر بر صفات پلی ژنیک مورد استفاده قرار گرفته است. روش‌های رایج استفاده شده شامل آنالیز رگرسیون مبتنی بر حداقل مربعات، آنالیز رگرسیونی مبتنی بر حداکثر درست‌نمایی و روش‌های بیزی می‌باشد. از برتری روش‌های بیزی نسبت به سایر روش‌ها می‌توان به امکان استفاده هم‌زمان از کل مارکرها در مدل اشاره نمود که منجر به جلوگیری از بیش برآورد اثرات نشانگرها شده و احتمال شناسایی SNP‌های مثبت واقعی را افزایش می‌دهد. از این‌رو، در مطالعه حاضر برای شناسایی SNP‌های مرتبط با وزن بدن در سنین اولیه (۲ هفتگی)، در یک جمعیت F₂ از مرغان آمیخته، از روش بیز Cpi استفاده شد. سپس، برای تعیین ژنوتیپ جمعیت حاضر شامل ۳۱۲ مرغ F₂، چیپ‌های تجاری Illumina 60K استفاده گردید. در نهایت، ۱۶ مارکر SNP که دارای فاکتور بیز بین ۲۰ تا ۱۵۰ بودند، به‌عنوان مارکرهای پیشنهادی برای وزن بدن در این سن در نظر گرفته شد. این SNP‌ها بر روی ۴ کروموزوم توزیع شده‌اند و به‌صورت سببی و یا به‌واسطه وجود عدم تعادل پیوستگی با ۱۶ ژن ارتباط نزدیک دارند. از ژن‌های شناسایی شده ۱۲ ژن، کدکننده پروتئین و ۴ ژن RNA غیرکدکننده می‌باشند. برای شناسایی ژن‌های مرتبط با هر SNP در مناطق کاندیدا، ۰/۵ Mb اطراف هر SNP معنی‌دار در نظر گرفته شد.</p>
<p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۴</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۱/۳۰</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۱</p> <p>تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۱۰/۰۱</p>	
<p>کلیدواژه‌ها:</p> <p>مطالعه پویای ژنوم، مرغ، چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی، روش بیزی، ژن‌های کاندیدا.</p>	

استناد: عسگری، زینب؛ احسانی، علیرضا؛ مسعودی، علی اکبر و واعظ ترشیزی، رسول (۱۴۰۳). مطالعه ارتباط ژنومی برای شناسایی ژن‌های کاندیدا در مراحل اولیه رشد در مرغ. نشریه علوم دامی ایران، ۵۵ (۴)، ۳۰۰-۲۸۳. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2024.372924.654003>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2024.372924.654003>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

بیشتر صفات مهم و اقتصادی در مرغ کمی هستند (Wang et al., 2012). صفت وزن بدن به‌عنوان یک صفت کمی تحت تأثیر تعداد بسیار زیادی ژن با اندازه و نوع اثر متفاوت بوده که بر شکل‌گیری فنوتیپ این صفت مؤثر هستند. از این‌رو، با توجه به اهمیت بالای صفات رشد و وزن بدن در طیور، یکی از مهم‌ترین اهداف مدنظر در برنامه‌های اصلاح نژاد طیور، بهبود این صفات از طریق شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر صفات کمی (QTL) می‌باشد (Goddard and Hayes, 2009).

ترکیب انتخاب طبیعی و مصنوعی برای صفات تولیدی در مرغ در طول زمان می‌تواند نشانه‌هایی (نشانه‌های ژنتیکی) را در ژنوم باقی بگذارد (Walugembe et al. 2018; Weng et al. 2020). ثابت شده است که انتخاب مصنوعی به‌طور قابل‌توجهی مکان‌های ژنومی مرتبط با صفت تحت انتخاب را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث افزایش هموزیگوسیتی در نشانه‌های ژنتیکی خاص می‌شود (Kim et al. 2018); از این‌رو، به نقشه‌برداری مکانیسم‌های علی مرتبط با صفات اقتصادی مهم در ژنوم کمک کند (Ma et al. 2018). در این راستا، مطالعات پویش ژنومی (GWAS^۱) عملکرد موفقی برای کشف این نشانه‌های ژنتیکی مانند پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP^۲) مؤثر بر صفات کمی و شناسایی ارتباط این نشانه‌ها با فنوتیپ صفات کمی داشته‌اند (Ahsan, 2014; Maher 2008). این مطالعات شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات اقتصادی مهم را در جمعیت‌های دام نیز تسهیل می‌کنند (Saravanan et al. 2020). بنابراین هدف از مطالعات پویش ژنوم با استفاده از چیپ‌هایی با تراکم بالای SNP را می‌توان شناسایی مناطقی دانست که می‌توانند وراثت‌پذیری صفات را توضیح دهند (Maher, 2008) و به دنبال آن مناطق کاندیدا را در برنامه‌های انتخاب ژنومی شناسایی کنند (Costa et al., 2015).

شناسایی این مناطق نیز می‌تواند پاسخ به انتخاب را در برنامه‌های اصلاحی افزایش دهند (Sewalem et al., 2002).

علاوه بر این، در اکثر مطالعات اصلاح نژاد دام اهمیت روش‌های آماری استفاده‌شده جهت شناسایی نشانه‌های ژنتیکی مدنظر می‌باشد (Asgari et al., 2021). روش‌های مختلفی برای انجام مطالعات GWAS استفاده‌شده است؛ مانند حداقل مربعات (Costa et al. 2015)، مدل مؤلفه‌های واریانس (Kang et al. 2010) و مدل‌های خطی مختلط (Zhang et al. 2010). روش دیگر مورد استفاده برای بررسی اثر SNP‌ها استنتاج بیزی مبتنی بر تکنیک نمونه‌گیری گیبس می‌باشد. در این روش همه نشانه‌ها هم‌زمان باهم وارد آنالیز می‌شوند (Costa et al., 2015); بنابراین، مشکلاتی نظیر میزان بالای نتایج مثبت کاذب و بیش برآورد اثرات QTL‌ها و SNP‌ها با استفاده از این روش کاهش می‌یابد (Peters et al., 2012) و امکان ایجاد تفاوت در معماری ژنتیکی (توزیع اثرات نشانه‌گر) صفات را فراهم می‌کند (Wolc and Dekkers, 2022). در تأیید این موضوع، ویلیام و همکاران به دنبال یک مطالعه شبیه‌سازی نشان دادند که روش بیزی با استفاده از دو مرحله شامل غربالگری و انتخاب مدل تا حد زیادی مثبت‌های کاذب را کاهش داده، درحالی‌که به همان میزان توانایی شناسایی SNP‌های مثبت واقعی را افزایش می‌دهد. در واقع کاربرد و انعطاف‌پذیری روش‌های بیزی را با دو مطالعه موردی نشان دادند که در یک مورد، شش نشانه‌گر SNP را شناسایی کردند که دو مورد از آن‌ها در ژن‌های شناسایی‌شده در انتشارات قبلی مرتبط با موضوع، شناسایی‌شده بود (Williams et al. 2023). کاستا و همکاران (۲۰۱۵) نیز از روش بیزی برای شناسایی SNP‌های مهم برای اصلاح نژاد تلیسه و سن در اولین زایش استفاده کردند که منجر به شناسایی دو مجموعه SNP شامل ۴۲ و ۱۹ نشانه‌گر مرتبط با این دو صفت شدند که به ترتیب ۱۱/۳۵ و ۶/۴۲ درصد از واریانس فنوتیپی این صفات را توضیح می‌دادند (Costa et al., 2015).

بنابراین، با توجه به کاهش میزان خطا و بهبود دقت نقشه‌برداری با استفاده از جمعیت F₂ (Ledur et al., 2010)، مطالعه حاضر، با هدف شناسایی ژن‌های مؤثر بر صفت وزن بدن در مراحل اولیه رشد با استفاده از روش Bayes cp_i در یک جمعیت F₂ از مرغان آمیخته، انجام گرفت.

1 Quantitative Trait Locus

2. Genome-Wide Association Study

3 Single-nucleotide polymorphism

روش‌شناسی پژوهش

داده‌های فنوتیپی

در این پژوهش، از داده‌های فنوتیپی پرند‌های آمیخته نسل دوم (F₂) در مرکز تحقیقات پرورش طیور دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس واقع در محله پیکان شهر و خیابان پژوهش، از تلاقی دوطرفه لاین گوشتی آرین (۲۶ مرغ و ۲۳ خروس) با رشد سریع (AA) و ۷۹ مرغ بومی (۴۰ مرغ و ۳۹ خروس) استان آذربایجان غربی (NN) استفاده شد. پرندگان سویه آرین از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد مرغ آرین واقع در بابل کنار-شهرستان بابل (از توابع استان مازندران، ایران) و پرندگان بومی از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی استان آذربایجان غربی واقع در ارومیه، با سن مشابه (تقریباً ۱۳ هفته)، در اسفند ۱۳۹۰ به سالن مرغداری دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شدند. از ویژگی مرغان بومی آذربایجان غربی، به‌عنوان یک نژاد دومنظوره (تخم‌گذار و گوشتی)، رشد آهسته و ظرفیت ایمنی بالای بدن را می‌توان نام برد. پرندگان نسل اول (F₁) حاصل تلاقی ♂ AA × NN ♀ و ♀ AA × NN ♂ بودند. سپس، هرکدام از نرهای F₁ حاصل تلاقی متقابل یا معکوس، به‌طور متوسط با ۸/۴ قطعه از ماده‌های دیگر خانواده‌ها جفت‌گیری کردند. درنهایت، برای ایجاد پرند‌های نسل دوم (F₂) تخم‌مرغ‌ها پس از وزن‌کشی و ارزیابی اولیه به دستگاه جوجه‌کشی منتقل شدند و بر اساس تنظیم دما، رطوبت و چرخش تخم‌مرغ‌ها، پس از ۲۱ روز جوجه‌های نسل دوم متولد شدند. برای ایجاد جوجه‌های نسل دوم شش نوبت (شش هج) جوجه‌کشی انجام گرفت، در مجموع ۴۰۰ مرغ در نسل F₂ ایجاد شد و برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

جوجه‌های نسل F₂ از یک تا هفت‌روزگی به‌صورت گروهی نگهداری و به‌وسیله دان خوری و آب‌خوری کله‌قندی تغذیه شدند و از هشت‌روزگی تا پایان دوره (۱۲ هفته) در قفس‌های انفرادی با ابعاد ۳۰×۴۰×۴۰ سانتی‌متر دارای دان خوری انفرادی و آب‌خوری نیپل پرورش یافتند. در طول دوره پرورش، غذا و آب به‌صورت نامحدود در اختیار پرندگان بود. برای تغذیه این مرغ‌ها از خوراک جوجه‌های گوشتی آماده خریداری شده (شامل سه جیره آغازین (دو هفته)، رشد (از دو تا هفت هفته) و پایانی (از هشت تا ۱۲ هفته)) از کارخانه خوراک دام استفاده شد. برنامه نوری در هفته اول ۲۴ ساعت روشنایی و در ادامه ۲۲ ساعت روشنایی و دو ساعت تاریکی بود. درجه حرارت سالن در روز اول ۳۳ درجه سانتی‌گراد و به‌تدریج به‌صورت هفتگی کاهش یافت و درنهایت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد ثابت ماند. وزن تمام مرغ‌های به‌صورت هفتگی و انفرادی ثبت گردید. پرند‌ها با وزن‌های کمتر از یک کیلوگرم با استفاده از ترازوی آزمایشگاهی دیجیتالی، به ظرفیت یک کیلوگرم و دقت اندازه‌گیری ۰/۰۱ گرم توزین شدند. پرند‌ها با وزن‌های بیشتر از یک کیلوگرم نیز با استفاده از ترازوی دیجیتالی، به ظرفیت ۵۰ کیلوگرم و دقت اندازه‌گیری ۱ گرم توزین شدند. به‌منظور خالی شدن دستگاه گوارش پرند‌ها و افزایش دقت کار، قبل از هر وزن‌کشی ۸ ساعت گرسنگی برای پرند‌ها اعمال شد. برای مطالعه حاضر از داده‌های ثبت‌شده برای وزن بدن (گرم) در سنین ۲ هفته‌گی، استفاده گردید.

داده‌های ژنوتیپی

داده‌های ژنوتیپی شامل نمونه‌های خون از مرغ‌های نسل F₂ بودند. استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون کامل (گلبول قرمز دارای هسته) به روش بهینه‌شده و تغییریافته نمکی انجام گردید. بعد از تعیین کیفیت و کمیت نمونه DNA استخراج‌شده به دو روش الکتروفورز و اسپکتروفتومتری، درنهایت ۳۱۲ نمونه با همکاری شرکت کاپ و دانشگاه آرهوس دانمارک و با استفاده از چیپ‌های تجاری Illumina 60k SNP chip تعیین ژنوتیپ شدند (Emrani, 2016). برای هر نمونه ۵۴۳۴۰ مارکر SNP تعیین ژنوتیپ شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار plink نسخه ۱٫۹ کنترل کیفیت داده‌ها انجام گرفت و تعدادی از SNP‌ها به دلیل خطای تعیین ژنوتیپ بیشتر از ۱۰٪ و فراوانی آلی جزئی کمتر از ۵٪ از داده‌ها حذف گردید. همچنین نمونه‌ها با نرخ

فراخوانی کمتر از ۹۰ درصد و مارکرها با انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ (10^{-6}) از مجموعه داده حذف گردید. در نهایت تعداد ۴۳۵۸۸ مارکر SNP و تعداد ۲۹۴ پرند برای این آنالیز استفاده شد.

آنالیز داده‌ها

به منظور آنالیز داده از نرم‌افزار GS3 استفاده شد (<https://github.com/alegarra/g3>; ۲۰۱۱). برای برآورد اثر SNPها از BayesCpi استفاده گردید (Varona Aguado *et al.*, 2001). مقادیر واریانس پلی ژنتیک و واریانس باقی مانده اولیه با استفاده از نرم‌افزار DMU محاسبه (Madsen and Jensen, 2002) و نمونه‌گیری با فرایند زنجیره مارکوف مونت کارلو انجام شد. در نهایت آنالیز با ۱۰۰,۰۰۰ زنجیره مارکوف و ۲۰۰۰۰ دور سوخته انجام گردید و نتایج در هر ۱۰ چرخه ذخیره شدند. به وسیله پلات رسم شده از تراکم پسین واریانس ژنتیکی و باقی مانده، همگرایی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. پلات‌های مورد نظر نیز با استفاده از زبان برنامه‌نویسی R رسم گردید (version 3.3.2; R Core Team, 2016). در مطالعه حاضر، از مدل رگرسیونی چند مارکری زیر برای آنالیز داده‌ها استفاده شد که در این مدل اثرات جنس و هج به عنوان اثرات ثابت و اثرات پلی ژنتیک و نشانگرها به عنوان اثرات تصادفی در مدل گنجانده شدند. مدل استفاده شده به صورت زیر می‌باشد:

$$y = Xb + Zu + Wg + e \quad \text{رابطه (۱)}$$

در مدل ذکر شده، y بردار مشاهدات (وزن پرند در ۲ هفتگی)، X ماتریس یک طرح که اثرات سیستماتیک را به مشاهدات مرتبط می‌سازد، b بردار اثرات سیستماتیک، Z ماتریس طرحی که اثرات تصادفی را به مشاهدات مرتبط می‌سازد، u بردار اثرات تصادفی پلی ژنتیک افراد موجود در شجره، W یک ماتریس ($n*s$) شامل ژنوتیپ SNPها (s) برای هر پرند (n)، g بردار تصادفی از اثرات مارکر SNP و e بردار تصادفی اثرات باقی مانده می‌باشد.

با توجه به اینکه با استفاده از روش بی‌امکان برآورد p -value وجود ندارد، برای بررسی معنی‌داری اثرات SNP، از فاکتور بی‌بی (BF) بجای p -value استفاده می‌شود (Varona Aguado *et al.*, 2001) که به صورت زیر محاسبه گردید:

$$BF = \left(\frac{p}{1-p} \right) \left(\frac{\pi}{1-\pi} \right) \quad \text{رابطه (۲)}$$

P

احتمال پسین از اثر SNPهایی است که به آن‌ها یک اثر غیر صفر اختصاص داده می‌شود، π احتمال پیشین از SNPهایی است که در آنالیزها قرار می‌گیرند (Kass and Raftery, 1995). در روش بی‌بی تعداد زیادی از نشانگرها را می‌توان به طور هم‌زمان تجزیه و تحلیل کرد (Costa *et al.*, 2015)، بنابراین به تصحیح بنفرونی نیاز نیست.

در مطالعات مختلف از ۳ مقیاس برای تشخیص معنی‌داری SNPها، استفاده می‌شوند (Varona Aguado *et al.*, 2001) شامل، (۱) BF بین ۳ و ۲۰ که شواهد ضعیفی برای معنی‌داری SNPها ارائه می‌دهد، (۲) BF بین ۲۰ و ۱۵۰ که شواهد قوی برای معنی‌داری SNPها ارائه می‌دهد و (۳) $BF < 150$ که شواهد خیلی قوی برای معنی‌داری SNP ارائه می‌دهد. برای این صفت SNP با $BF > 150$ یافت نشد، از این رو، SNPهایی با BF بین ۲۰ تا ۱۵۰ که در برخی مطالعات به عنوان نقاط ژنومی پیشنهادی از آن‌ها نام برده می‌شود، در نظر گرفته شدند.

1 Bayes Factor

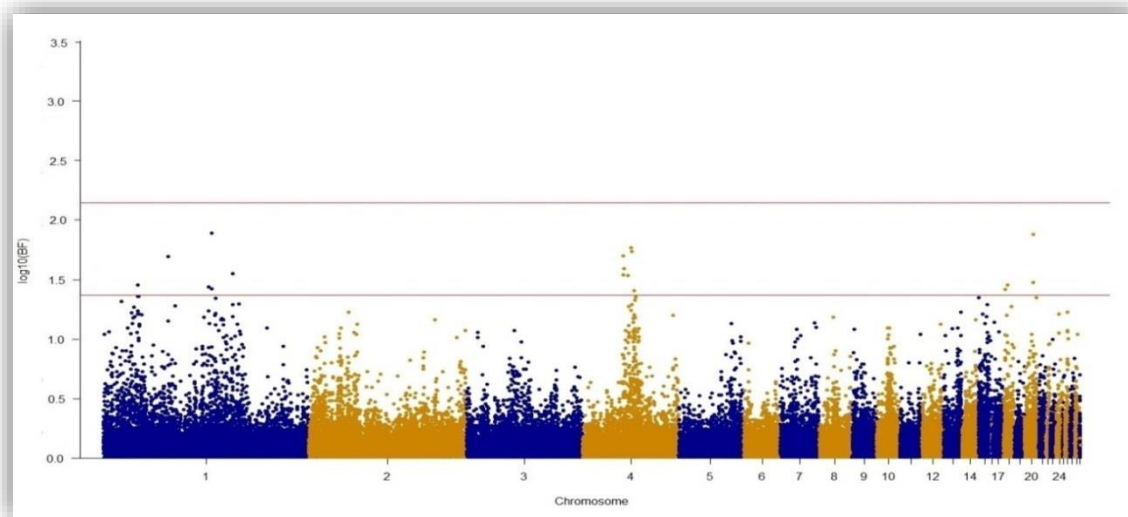
2 Bonferroni

تجزیه و تحلیل پس از GWAS

نزدیک‌ترین ژن‌ها به مارکر SNP‌های پیشنهادی با استفاده از Map Viewer از سایت ncbi شناسایی شدند (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). برای شناسایی ژن‌های کاندیدا، 0.5 Mbp اطراف هر SNP در نظر گرفته شد؛ بنابراین، برای مارکرهایی که داخل ژن قرار نداشتند، نزدیک‌ترین ژن به مارکر که در فاصله ۲۵۰ Kbp بالا یا پایین ژن قرار داشت، معرفی و در صورتی که SNP داخل ژن قرار داشت، ژن کاندیدا (بافاصله صفر) ذکر شد. از پایگاه داده (<https://www.uniprot.org>) Uniprot برای بررسی وظایف مولکولی و از پایگاه داده Animal QTL برای بررسی ارتباط بین SNP‌ها و QTLها (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>) استفاده گردید. همچنین برای مطالعه مسیرهای بیوشیمیایی ژن‌های کاندیدا پایگاه (<https://www.genome.jp/kegg>) KEGG استفاده شد.

یافته‌های پژوهش و بحث

برای وزن بدن در سن ۲ هفتگی، ۱۷ مارکر SNP به‌عنوان مارکرهای پیشنهادی در نظر گرفته شد. این مارکرها یک بیز فاکتور بین ۲۰ تا ۱۵۰ داشتند. جهت تعیین جایگاه احتمالی SNP‌ها روی کروموزوم‌های مرغ نمودار manhattan با زبان برنامه‌نویسی R (version 3.3.2; R Core Team, 2016) رسم شد (شکل ۱). مارکرهای پیشنهاد شده داخل یا نزدیک ۱۶ ژن بوده و بر روی ۴ کروموزوم توزیع شده‌اند. از این تعداد، ۱۲ ژن کد کننده پروتئین و ۴ ژن ncRNA هستند (MIR135A2, LOC769128, LOC101751953, LOC107054740). ژن‌های ncRNA با توالی‌های RNA کوچک و غیر کد کننده، معمولاً اطلاعاتی را برای پروتئین‌سازی حمل نمی‌کنند، اما می‌توانند وظایف مهمی در سلول داشته باشند. یکی از این وظایف ویرایش بیان ژن بعد از رونویسی در موجودات چند سلولی است (Costa et al., 2015). در جدول ۱ مارکر SNP‌های معنی‌دار، ژن‌های کاندیدا برای هر مارکر و موقعیت هر مارکر در کروموزوم ذکر شده است.



شکل ۱. نمودار manhattan برای وزن بدن در سن دو هفتگی. محور X موقعیت مارکر بر روی کروموزوم‌ها در ژنوم و محور Y، لگاریتم بر مبنای ۱۰ بیز فاکتور ($\log_{10}(BF)$) مارکرها را نشان می‌دهد. آستانه معنی‌داری بین $\log_{10}(30) = 1.30$ و $\log_{10}(150) = 2.176$ در نظر گرفت شد.

ژن‌های شناسایی شده در این پژوهش با داشتن عملکردهای متابولیکی مختلف هر کدام به نحوی در رشد و افزایش وزن بدن مؤثر می‌باشند. ژن‌ها مطابق با عملکرد متابولیکی خود گروه‌بندی شدند: یک گروه در سیگنالینگ *Wnt* دخالت دارند (*DKK2, LEF, TNKS, WDFY3*)، گروه‌های بعدی به ترتیب در رشد سیستم عصبی (*APP*)، مسیرهای متابولیکی مختلف

(*MYH10*, *ARHGAP24*)، بیوستت ترکیبات مختلف و متابولیسم بدن (*TMPRSS15*) و انتقال مواد (*NKAIN4*)، *SLC16A7*) درگیر می‌باشند. ژن *CACNA1C* در دو مسیر انتهایی دخالت دارد. عمل شناسایی شده برای ژن *GALNTL6* شرکت در مسیر گلیکوزیلاسیون پروتئین است که به‌عنوان بخشی از تغییر و تبدیلی پروتئین محسوب می‌شود. یکی از خانواده‌های بزرگ مولکول‌های سیگنالینگ رشد، پروتئین‌های Wnt هستند. ژن‌های درگیر در سیگنالینگ Wnt، با تنظیم این مسیر در رشد و نمو بدن چه در دوران جنینی و چه در دوران بلوغ نقش عمده‌ای ایفا می‌کنند (Cadigan and Liu, 2006). این ژن‌ها خانواده بزرگی از پروتئین‌های ترشح‌کننده فاکتورهای رشد را کدگذاری می‌کنند که در رشد و نمو حیوانات در همه مراحل نقش اساسی دارند (Clevers, 2006).

جدول ۱. مارکرهای پیشنهادی، موقعیت و ژن‌های کاندیدا برای وزن بدن در سن دو هفتگی

فاصله ژن کاندیدا از نشانگر (base pair)	نزدیک‌ترین ژن به مارکر	Bayes Factor	موقعیت SNP روی کروموزوم	کروموزوم	مارکر SNP‌های معنی‌دار
.	<i>APP</i>	۷۷/۳۱۷	۱۰۲۶۹۵۲۰۹	۱	Gga_rs14866428
۱Kb ^U	<i>MIR133A2</i>	۷۵/۲۴۳	۸۳۲۸۱۷۳	۲۰	Gga_rs312508259
.	<i>ARHGAP24</i>	۵۶/۳۹	۴۶۵۴۰۹۴۶	۴	Gga_rs14462489
.	<i>WDFY3</i>	۵۲/۰۴	۴۷۱۶۷۵۳۱	۴	Gga_rs315925567
۷۸/۸Kb ^U	<i>LEF</i>	۴۷/۳	۳۸۲۹۵۵۰۶	۴	Gga_rs312288120
.	<i>CACNA1C</i>	۴۶/۵	۶۱۵۴۹۹۳۹	۱	Gga_rs314045209
.	<i>LOC769128</i>	۳۵/۵۵	۳۹۶۵۰۷۹۵	۴	Gga_rs13516840
.	<i>LOC101751953</i>	۳۱/۹	۱۲۳۱۴۸۲۳۳	۱	Gga_rs13934188
۲Kb ^U	<i>Dkk2</i>	۳۱/۱۴	۳۸۵۳۶۲۶۶	۴	Gga_rs14453946
.	<i>GALNTL6</i>	۳۰/۸	۴۳۴۴۲۵۲۱	۴	Gga_rs16397691
.	<i>NKAIN4</i>	۲۶/۳۵	۸۹۲۴۲۵۹	۲۰	Gga_rs315442611
.	<i>SLC16A7</i>	۲۵/۰۴	۳۲۰۴۵۵۷۷	۱	Gga_rs15226971
.	<i>LOC107054740</i>	۲۵/۰۴	۳۸۹۶۸۷۲	۱۸	Gga_rs314050929
۱۶۵/۵Kb ^U	<i>TMPRSS15</i>	۲۳/۸۷	۹۹۷۹۷۸۴۳	۱	Gga_rs15359858
۹۲/۸Kb ^U	<i>MYH10</i>	۲۲/۵۱	۱۶۷۱۸۲۹	۱۸	Gga_rs316260652
۹۷/۸Kb ^U	<i>TNKS</i>	۲۱/۹۵	۴۹۶۰۳۶۵۵	۴	Gga_rs317075955

^U نشان‌دهنده‌ی بالادست (upstream) ژن است.

یکی از فاکتورهای تنظیم‌کننده فعالیت سیگنالینگ Wnt در سطح خارج سلولی، ژن‌های خانواده DKK می‌باشد (He et al., 2004). در مراحل افتراق استوبلاست به ماتریس معدنی ژن *DKK2* دخالت دارد و در زمان تمایز استوبلاست مغز استخوان، از بین مولکول‌های Wnt بیان *Wnt7b* افزایش می‌یابد. از طرفی بیان شده است که در شرایط آزمایشگاهی کمبود *DKK2* می‌تواند بر بیان استوکلسین و استئوپتین اثرات قابل توجهی بگذارد (Li et al., 2005). استوکلسین که توسط استوبلاست تولید می‌شود، به معدنی شدن استخوان کمک می‌کند. استئوپتین نیز در تمایز myoblasts به شکل myotubes و در نهایت فیبرهای عضلانی نقش دارد و بر همجوشی myoblast اثر مثبت می‌گذارد (Uaesoontrachoon et al., 2008). در مدل‌های متعدد توسعه و مورفوژنز، اهمیت عملکرد *LEF* در سیگنال‌دهی Wnt به اثبات رسیده است (Filali et al., 2002). فاکتور رونویسی *TCF/LEF* مهم‌ترین واسطه‌های نقطه انتهایی سیگنالینگ Wnt/Wingless در کل چند سلولی‌ها هستند. ژن *WDFY3* از دیگر تنظیم‌کنندگان مرکزی مهم‌ترین مسیر سیگنالینگ رشد و نمو یعنی مسیر سیگنالینگ Wnt می‌باشد. این ژن سیگنالینگ Wnt را از طریق حذف توده‌های *DVL3* تنظیم می‌کند که احتمالاً روشی وابسته به اتوفازای است. این روند ممکن است برای تعیین اندازه مغز در طی رشد جنینی مهم باشد (Kadir et al., 2016). مسیر سیگنالینگ Wnt/ β -catenin در رشد جنینی و هموستاز بافت در بزرگسالان نقش اساسی دارد و تنظیم این مسیر با سرطان مرتبط است.

اکسین یک جز محدودکننده غلظت از مجموعه تخریب β -catenin می‌باشد و ثابت آن توسط تانکیراز تنظیم می‌شود (Zhang *et al.*, 2011). تانکیراز آنزیمی است که توسط ژن TNKS کد می‌شود. همچنین، نگهداری تلومر برای رشد مداوم سلول‌های توموری ضروری است. در بیشتر تومورهای انسانی، تلومرها توسط تلومراز، یک ترانس کریپتاز معکوس حفظ می‌شوند. تانکیراز، از طریق تعامل با TRF1، به‌طور مثبت طول تلومر را تنظیم می‌کند (Cook *et al.*, 2002). در مطالعات قبلی مارکرهای Gga_rs312288120 و Gga_rs14453946 و ژن‌های کاندیدا برای این مارکرها یعنی DKK2 و LEF برای وزن بدن در سن ۳ هفته‌گی نیز شناسایی شده‌اند (Asgari *et al.*, 2021).

ژن APP به‌عنوان یک گیرنده سطح سلول عمل می‌کند و در سطح سلول‌های عصبی عملکردهای فیزیولوژیکی مربوط به رشد نورون‌ها، چسبندگی نورون‌ها و آکسونوژن را انجام می‌دهد. برهم‌کنش بین مولکول‌های APP بر روی سلول‌های همسایه باعث پیشرفت سیناپتوژن می‌شود (Baumkötter *et al.*, 2014). این ژن ممکن است از طریق کاهش یون مس، در هموستاز مس/استرس اکسیداتیو نقش داشته باشد. همچنین، رشد نورون‌ها را از طریق اتصال به اجزای ماتریکس خارج سلولی مانند هپارین و کلاژن I و IV تنظیم می‌کند (Cappai *et al.*, 2005).

ژن‌های TMPRSS15 و CACNA1C با شرکت در بیوسنتز ترکیبات مختلف و متابولیسم بدن در رشد اثر دارند. پروتئین کد شده توسط ژن TMPRSS15 انتروپیتیداز است که این آنزیم با تجزیه پروپیتید اسیدی از تریپسینوژن آن را از تریپسینوژن غیرفعال به تریپسین فعال تبدیل می‌کند (Yamashina, 1956) پرو آنزیم‌های دیگر از جمله کیموتریپسینوژن، پروکربوکسی پیتیدازها و پرولاستازها را فعال می‌کند؛ بنابراین، باعث جذب اسیدهای آمینه و تری‌گلیسیرید می‌شود (Kitamoto *et al.*, 1994). همچنین بیان شده است که ژن CACNA1C نقش مهمی در ترشح انسولین در پرندگان دارد (Xu *et al.*, 2011). آنزیم‌های نامبرده در هضم خوراک و تنظیم قند خون اثر دارند. انسولین در پاسخ به افزایش غلظت گلوکز خون از سلول‌های بتا جزایر پانکراس ترشح می‌شود (Rorsman, 2005). علاوه بر تنظیم ترشح انسولین توسط ژن CACNA1C، این ژن ورود یون‌های کلسیم به سیتوپلاسم را وساطت می‌کند و در نتیجه باعث آزاد شدن کلسیم از سارکوپلاسم می‌شود (Fu *et al.*, 2014). پروتئین کد شده توسط آن برای رشد طبیعی قلب، تنظیم طبیعی ریتم قلب (Splawski *et al.*, 2004)، انقباض طبیعی سلول‌های عضلانی صاف در رگ‌های خونی و روده ضروری می‌باشد (Nystoriak *et al.*, 2017).

دیگر ژن‌ها شامل NKAIN4 و SLC16A7 در انتقال مواد درگیر می‌باشد. ژن NKAIN4 در تنظیم انتقال یون سدیم درگیر بوده (Gaudet *et al.*, 2011) که سدیم به‌نوبه خود عمل اعصاب و عضلات را تقویت می‌کند و در انقباض عضلات نیز مؤثر است. ژن SLC16A7 نیز انتقال‌دهنده مونوکربوکسیلات متصل به پروتون می‌باشد. از طرفی حمل‌ونقل سریع بسیاری از مونوکربوکسیلات‌ها مانند لاکتات، پیروات، اکسو اسیدها با شاخه‌های منشعب حاصل از لوسین، والین، ایزولوسین و اجسام کتون شامل استو استات، بتا هیدروکسی بوتیرات و استات را از طریق غشای پلازما کاتالیز می‌کند (Lin *et al.*, 1998).

آخرین گروه از ژن‌ها (MYH10, ARHGAP24) با شرکت در مسیرهای متابولیکی مختلف، رشد و افزایش بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهند. پروتئین کد شده به‌وسیله ژن ARHGAP24 در قطبیت سلول، مورفولوژی سلول و سازمان اسکلت سلولی درگیر می‌باشد. این ژن به‌عنوان یک فعال‌کننده GTPase برای GTPase از نوع Rac با تبدیل آن به یک حالت غیرفعال GDP عمل می‌کند. با غیرفعال کردن Rac در پایین‌دست Rho، بازسازی اکتین را کنترل می‌کند (Su *et al.*, 2004). پروتئین Myosin-10 توسط ژن MYH10 کد می‌شود. به نظر می‌رسد که میوزین سلولی در سیتوکینزیس، شکل سلول و عملکردهای ویژه‌ای مانند ترشح و پوشش دهی نقش دارد. این پروتئین با LARP6 در تثبیت mRNAهای کلاژن نوع I برای CO1A1 و CO1A2 نقش دارد. همچنین در طول گسترش سلول، در سازمان‌دهی مجدد اسکلت سلولی، تشکیل تماس کانونی (در قسمت مرکزی اما نه حاشیه سلول‌های در حال گسترش) و گسترش لامپودی نقش مهمی دارد (Cai *et al.*, 2010).

همان‌طور که در مطالعه پیشین منتشرشده از این پژوهش نیز اشاره شده است، برای این صفت SNP با $BF > 150$ ، که نشان‌دهنده وجود شواهد قوی برای ارتباط SNP با صفت تحت مطالعه است، یافت نشد (Asgari *et al.*, 2021). همچنین،

در مطالعه GWAS مشابه که با استفاده از روش مدل خطی تعمیم‌یافته و مدل خطی مختلط برای صفات رشد انجام گرفته است، مارکر SNP معنی‌داری برای سنین ابتدایی رشد گزارش نشده است. این می‌تواند به سبب واریانس محیطی بالا در اوایل دوره و اثراتی مثل اثرات مادری باشد. دلیل دیگری که می‌توان برای آن بیان کرد این است که در سنین اولیه اثرات غیر افزایشی ژن‌ها نسبت به اثرات افزایشی سهم بیشتری از واریانس ژنتیکی را توضیح می‌دهند. به طوری که در پژوهش انجام شده در سال ۲۰۰۴ نیز مشخص گردید در مرغ، تنظیم ژنتیکی رشد در سنین اولیه و سنین پایانی متفاوت است. همچنین نشان داده شده است که ایستازی بر رشد اولیه بسیار مؤثر بوده، درحالی که اهمیت آن در اواخر رشد کمتر می‌باشد (Carlborg et al., 2004). علاوه بر این، به دنبال تخمین سهم نسبی اثرات افزایشی، غالبیت و ایستازی برای رشد مشخص شده است که ایستازی سهم بیشتری از واریانس ژنتیکی را اوایل رشد و اثرات ژنتیک افزایشی قسمت بیشتری از واریانس ژنتیکی را در مراحل بعدی زندگی توضیح می‌دهند (Carlborg et al., 2003).

از بین مارکرهای پیشنهادی ۶ مارکر SNP در کروموزوم ۱ و ۷ مارکر SNP در کروموزوم ۴ قرار دارند. مارکرهای شناسایی شده در کروموزوم ۴ در موقعیت ۳۸/۲۹ Mbp، ۳۸/۵ Mbp، ۳۹/۶ Mbp، ۴۳/۴ Mbp، ۴۶/۵ Mbp و ۴۷/۱ Mbp و ۴۹/۶ Mbp قرار گرفته‌اند. قرار داشتن این مارکرها در فاصله نزدیک به هم می‌تواند نشانه‌ای از وجود QTL در این موقعیت باشد. در مطالعات گذشته نیز چندین QTL نزدیک یا پیرامون این مارکرها گزارش شده است. این QTLها در موقعیت ۴۶/۷-۴۶/۸ Mbp (Van Kaam et al., 1998)، ۴۶/۷-۵۱/۶ Mbp (Kerje et al., 2003) و ۴۶/۷-۸۸/۴ Mbp (Sewalem et al., 2002) قرار دارند؛ بنابراین با توجه به نتایج پژوهش حاضر و یافته‌های گذشته می‌توان ناحیه کروموزومی بین ۳۸ تا ۴۹ Mbp را یک ناحیه تأثیرگذار بر وزن بدن در سنین پایین دانست. از طرفی نتایج پژوهش حاضر، با این ادعا که ماکرو کروموزوم‌ها بیشترین تأثیر را در رشد و افزایش وزن بدن دارند (Asgari et al., 2021; Xie et al., 2012)، مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

استفاده از روش Bayes cpi برای شناسایی نشانگرهای معنی‌دار، باعث ارائه ۱۷ مارکر SNP به‌عنوان مارکرهای پیشنهادی برای وزن بدن در سن ۲ هفتگی شد. این SNPها اطلاعات مناسبی، برای کمک به شناخت ژن‌های مؤثر بر صفت وزن بدن در سنین ابتدایی مرغ ارائه می‌دهند. نتایج پژوهش حاضر فهرستی از ژن‌های کاندیدا برای وزن بدن در سنین ابتدایی را ارائه کرده است که احتمالاً نتایج آن برای بهبود سرعت رشد مرغ با استفاده از روش انتخاب ژنومی و انتخاب بر مبنای نشانگر یا ژن مفید واقع شود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان کروموزوم ۱ و کروموزوم ۴ را مهم‌ترین کروموزوم‌های ژنوم مرغ دانست که جایگاه QTLهای مؤثر بر صفات رشد و وزن بدن در سنین پایین هستند. نتایج تحقیق حاضر در مورد نقش ماکرو کروموزوم‌ها در کنترل رشد با مطالعات پیشین مطابقت دارد. با توجه به معنی‌دار نشدن مارکر در سطوح معنی‌داری بالا یعنی $BF > 150$ ، برای تشخیص عوامل مؤثر بر وزن بدن در سنین پایین استفاده از مدل‌هایی که اثرات افزایشی را هم در مدل در نظر می‌گیرند پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از همکاری کارکنان مرکز پرورش نژاد لاین آرین و مرکز پرورش پرندگان بومی آذربایجان غربی جهت واگذاری والدین مرغ‌های F_1 به دانشگاه تربیت مدرس، قدردانی می‌شود. پروفسور یوست یونسن از دانشگاه آرهوس دانمارک به جهت همکاری در تعیین ژنوتیپ‌ها داده‌ها و از کنسرسیوم کاب-وتنرس به جهت در اختیار قرار دادن چیپ تجاری قدردانی می‌گردد. در نهایت از کلیه دانشجویان گرامی جهت جمع‌آوری داده‌ها تشکر می‌نمایم.

دستورالعمل رفاه حیوانات

کلیه مراحل آزمایشی پرندگان در این پژوهش، مطابق دستورالعمل‌های استاندارد نگهداری و رفاه حیوانات بوده و به تایید کمیته مراقبت از حیوانات دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی با شماره نامه ۱۳۲۹۷۳۴ رسیده است.

REFERENCES

- Ahsan, M. (2014). Mapping and functional characterization of candidate genes and mutations for chicken growth. Ph.D. thesis, Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- Asgari, Z., Ehsani, A., Masoudi, A.A, and Vaez Torshizi, R. (2021). Bayes factors revealed selection signature for time to market body weight in chicken: a genome-wide association study using BayesCpi methodology. *Ital. J. Anim. Sci.* 20, 1468-1478. <https://doi.org/10.1242/jcs.02826>.
- Baumkötter, F., Schmidt, N., Vargas, C., Schilling, S., Weber, R., Wagner, K., Fiedler, S., Klug, W., Radzimanowski, J. and Nickolaus, S. (2014). Amyloid precursor protein dimerization and synaptogenic function depend on copper binding to the growth factor-like domain. *J. Neurosci.* 34, 11159-11172. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0180-14.2014>.
- Cadigan, K.M, and Liu, Y.I. (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J. Cell Sci.* 119(3), 395-402. <https://doi.org/10.1242/jcs.02826>.
- Cai, L., Fritz, D., Stefanovic, L. and Stefanovic, B. (2010). Nonmuscle myosin-dependent synthesis of type I collagen. *J. Mol. Bio.* 401, 564-578. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.057>.
- Carlborg, Ö, Hocking, P.M., Burt, D.W, and Haley, C.S. (2004) Simultaneous mapping of epistatic QTL in chickens reveals clusters of QTL pairs with similar genetic effects on growth. *Genet. Res.* 83(3):197–209. <https://doi.org/10.1017/s0016672304006779>.
- Carlborg, Ö., Kerje, S., Schütz, K., Jacobsson, L., Jensen, P. and Andersson, L. (2003). A global search reveals epistatic interaction between QTL for early growth in the chicken. *Genome Res.* 13(3):413-421.
- Cappai, R., Cheng, F., Ciccotosto, G.D., Needham, B.E., Masters, C.L., Multhaup, G., Fransson, L.Å, and Mani, K. (2005). The amyloid precursor protein (APP) of Alzheimer disease and its paralog, APLP2, modulate the Cu/Zn-Nitric Oxide-catalyzed degradation of glypican-1 heparan sulfate in vivo. *JBC.* 280, 13913-13920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409179200>.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>.
- Cook, B.D., Dynek, J.N., Chang, W., Shostak, G. and Smith, S. (2002). Role for the related poly (ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *MCB.* 22, 332-342. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.1.332-342.2002>.
- Costa, R.B., Camargo, G.M., Diaz, I.D., Irano, N., Dias, M.M., Carvalheiro, R., Boligon, A.A., Baldi, F., Oliveira, H.N, and Tonhati, H. (2015). Genome-wide association study of reproductive traits in Nellore heifers using Bayesian inference. *Genet. Sel.* 47(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0146-0>.
- Emrani, H. (2016). Genome Wide Association Study(GWAS) for Growth traits and Ascites Syndrome in Iranian chicken. Ph.D. thesis, Tarbiat Modarres University Faculty of Agriculture.
- Filali, M., Cheng, N., Abbott, D., Leontiev, V. and Engelhardt, J.F. (2002). Wnt-3A/ β -catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *JBC.* 277, 33398-33410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107977200>.
- Fu, Y., Westenbroek, R.E., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (2014). Basal and β -adrenergic regulation of the cardiac calcium channel CaV1. 2 requires phosphorylation of serine 1700. *PNAS.* 111. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419129111>.
- Gaudet, P., Livstone, M.S., Lewis, S.E, and Thomas, P.D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief. Bioinform.* 12, 449-462.

- <https://doi.org/10.1093/bib/bbr042>.
- Goddard, M.E. and Hayes, B.J. (2009). Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Reviews Genetics*, 10, 381–391. <https://doi.org/10.1038/nrg2575>.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K. and Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. *J. Dev.* 131(8), 1663-1677. <https://doi.org/10.1242/dev.01117>.
- Kadir, R., Harel, T., Markus, B., Perez, Y., Bakhrat, A., Cohen, I., Volodarsky, M., Feintsein-Linial, M., Chervinski, E. and Zlotogora, J. (2016). ALFY-controlled DVL3 autophagy regulates Wnt signaling, determining human brain size. *PLoS Genet.* 12, e1005919. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005919>.
- Kang, H.M., Sul, J.H., Service, S.K., Zaitlen, N.A., Kong, S.Y., Freimer, N.B., Sabatti, C. and Eskin, E. (2010). Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nat Genet.* 42(4):348–354.
- Kass, R.E. and Raftery, A.E. (1995). Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association*, 90(430), 773-795.
- Kim, K., Jung, J., Caetano-Anolles, K., Sung, S., Yoo DAhn, Choi, B.H., Kim, H-C., Jeong, J-Y., Cho, Y-M. and Park, E-W. (2018). Artificial selection increased body weight but induced increase of runs of homozygosity in Hanwoo cattle. *PLoS One.* 13(3):e0193701.
- Kerje, S., Carlborg, Ö., Jacobsson, L., Schütz, K., Hartmann, C., Jensen, P. and Andersson, L. (2003). The twofold difference in adult size between the red junglefowl and White Leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs. *Anim. Genet.* 34(4), 264-274. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.01000.x>.
- Kitamoto, Y., Yuan, X., Wu, Q., McCourt, D.W. and Sadler, J.E. (1994). Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains. *PNAS.* 91, 7588-7592. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7588>.
- Ledur, M., Navarro, N. and Pérez-Enciso, M. (2010). Large-scale SNP genotyping in crosses between outbred lines: how useful is it and quest. *Hered.* 105(2), 173-182. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.149>.
- Li, X., Liu, P., Liu, W., Maye, P., Zhang, J., Zhang, Y., Hurley, M., Guo, C., Boskey, A. and Sun, L. (2005). Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat. Genet.* 37(9), 945-952. <https://doi.org/10.1038/ng1614>.
- Lin, R.-Y., Vera, J.C., Chaganti, R.S. and Golde, D.W. (1998). Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *JBC.* 273, 28959-28965. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.44.28959>.
- Ma, Y., Gu, L., Yang, L., Sun, C., Xie, S., Fang, C., Gong, Y. and Li S. (2018). Identifying artificial selection signals in the chicken genome. *Plos one* 13, e0196215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196215>.
- Madsen, P. and Jensen, J. (2002). A package for analysing multivariate mixed models. Tjele (Denmark): Danish Institute of Agricultural Sciences (DIAS).
- Maher, B. (2008). Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature*, 456(7218), 18-21.
- Nystoriak, M.A., Nieves-Cintrón, M., Patriarchi, T., Buonarati, O.R., Prada, M.P., Morotti, S., Grandi, E., Fernandes, J.D.S., Forbush, K. and Hofmann, F. (2017). Ser1928 phosphorylation by PKA stimulates the L-type Ca²⁺ channel CaV1. 2 and vasoconstriction during acute hyperglycemia and diabetes. *Sci. Signal.* 10(463), 9647. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf9647>.
- Peters, S., Kizilkaya, K., Garrick, D., Fernando, R., Reecy, J., Weaber, R., Silver, G. and Thomas, M. (2012). Bayesian genome-wide association analysis of growth and yearling ultrasound measures of carcass traits in Brangus heifers. *J. Anim. Sci.* 90(10), 3398-3409. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-4507>.
- Rorsman, P. (2005). Insulin secretion: function and therapy of pancreatic beta-cells in diabetes.

- BJDVD. 5, 187-191. <https://doi.org/10.1177/14746514050050040201>.
- Sewalem, A., Morrice, D.M., Law, A., Windsor, D., Haley, C.S., Ikeobi, C.O, and Hocking, P.M. (2002). Mapping of quantitative trait loci for body weight at three, six, and nine weeks of age in a broiler layer cross. *Poult. Sci.* 81(12), 1775-1781. <https://doi.org/10.1093/ps/81.12.1775>.
- Splawski, I., Timothy, K.W., Sharpe, L.M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P.J., Joseph, R.M, and Condouris, K. (2004). CaV1. 2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119, 19-31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.011>.
- Su, Z.-J., Hahn, C.N., Goodall, G.J., Reck, N.M., Leske, A.F., Davy, A., Kremmidiotis, G., Vadas, M.A, and Gamble, J.R. (2004). A vascular cell-restricted RhoGAP, p73RhoGAP, is a key regulator of angiogenesis. *PNAS.* 101. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404631101>.
- Team, R.C., 2018. R: A Language and environment for Statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/index.htm/>.
- Uaesoontrachoon, K., Yoo, H.-J., Tudor, E.M., Pike, R.N., Mackie, E.J, and Pagel, C.N. (2008). Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40(10), 2303-2314. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.03.020>.
- Van Kaam, J., Van Arendonk, J., Groenen, M., Bovenhuis, H., Vereijken, A., Crooijmans, R., Van der Poel, J. and Veenendaal, A. (1998). Whole genome scan for quantitative trait loci affecting body weight in chickens using a three generation design. *Livest. Prod. Sci.* 54(2), 133-150. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-33-2-133>.
- Saravanan, K., Panigrahi, M., Kumar, H., Bhushan, B., Dutt, T. and Mishra, B. (2020), Selection signatures in livestock genome: A review of concepts, approaches and applications. *Livest. Sci.* 241, 104257.
- Varona Aguado, L., García Cortés, L.A, and Perez Enciso, M. (2001). Bayes factors for detection of quantitative trait loci. *Genet. Sel.* 33, 133-152. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-33-2-133>.
- Walugembe, M., Bertolini, F., Dematawewa, C.M.B., Reis, M.P., Elbeltagy, A.R., Schmidt, C.J., Lamont, S.J. and Rothschild, M.F. (2018). Detection of selection signatures Among Brazilian, Sri Lankan, and Egyptian chicken populations under different environmental conditions. *Front Genet.* 9:737.
- Wang, S., Hu, X., Wang, Z., Li, X., Wang, Q., Wang, Y., Tang, Z. and Li, H. (2012). Quantitative trait loci associated with body weight and abdominal fat traits on chicken chromosomes 3, 5 and 7. *GMR.* 11(11), 956-965. <https://doi.org/10.4238/2012.April.19.1>.
- Weng, Z., Xu, Y., Li, W., Chen, J., Zhong, M., Zhong, F., Du, B., Zhang, B. and Huang, X. (2020). Genomic variations and signatures of selection in Wuhua yellow chicken. *PLoS One.* 15(10): e0241137.
- Williams, J., Xu, S. and Ferreira, M.A. (2023). BGWAS: Bayesian variable selection in linear mixed models with nonlocal priors for genome-wide association studies. *BMC bioinformatics.* 24, 194.
- Wolc, A. and Dekkers, J.C. (2022). Application of Bayesian genomic prediction methods to genome-wide association analyses. *Genet. Sel.* 54, 31.
- Xie, L., Luo, C., Zhang, C., Zhang, R., Tang, J., Nie, Q., Ma, L., Hu, X., Li, N., Da, Y., and Zhang, X. (2012). Genome-wide association study identified a narrow chromosome 1 region associated with chicken growth traits. *PLoS One.* 7(2):e30910.
- Xu, Y.p., Liang, L. and Wang, X.M. (2011). The levels of Pdx1/insulin, Cacna1c and Cacna1d, and β -cell mass in a rat model of intrauterine undernutrition. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med.* 24, 437-443. <https://doi.org/10.3109/14767058.2010.497571>.
- Yamashina, I. (1956). The action of enterokinase on trypsinogen. *BBA.* 20, 433-434. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(56\)90329-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(56)90329-8).
- Zhang, Y., Liu, S., Mickanin, C., Feng, Y., Charlat, O., Michaud, G.A., Schirle, M., Shi, X., Hild,

M. and Bauer, A. (2011). RNF146 is a poly (ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* 13, 623-629. <https://doi.org/10.1038/ncb2222>.