



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

## Selection signatures associated with the number of lambs per lambing in Baluchi ewes

M. M. Kasiriyani<sup>1</sup>, M. Gholizadeh<sup>2\*</sup>, Gh. Rahimi-Mianji<sup>3</sup>, M. H. Moradi<sup>4</sup>

1. Former Ph.D. Student, Department of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Professor, Department of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
4. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

(Received: 18-12-2021 – Accepted: 16-02-2022)

**Introduction:** The number of lambs per lambing is one of the most important reproductive traits in sheep. Many studies have reported that genetic mechanisms play an important role in the variation of litter size in sheep. Selection for higher litter size in sheep has led to a variation of this trait within and across different breeds. Natural and artificial selection related to adaptation and economic traits, such as litter size, results in changes at the genomic level which leads to the appearance of selection signatures. Detection of these regions provides an opportunity for a better understanding of genetic mechanisms underlying the phenotypic variation of litter size in sheep. Several tests including the linkage disequilibrium-based approach, site frequency spectrum, and population differentiation-based approach have been developed to explore the footprints of selection in the genome. This study aimed to identify selection signatures in Baluchi sheep to investigate the genes annotated in these regions as well as the biological pathways involved. For this purpose, XP-EHH and  $F_{ST}$  analyses were conducted using the genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs).

**Materials and methods:** In this study, data from 96 Baluchi ewes genotyped using Illumina Ovine SNP50K BeadChip were used to identify genomic regions under selection associated with litter size in sheep. Phenotypic and pedigree data were collected at the Abbasabad Sheep Breeding Station. Based on records on different litters, ewes were divided into two groups: the case (two lambs per litter) and control (one lamb per litter).

Quality control was conducted using the Plink software. The markers or individuals were excluded from the further study based on the following criteria: unknown chromosomal or physical location, call rate  $<0.95$ , missing genotype frequency  $>0.05$ , minor allele frequency (MAF)  $<0.05$ , and a  $P$ -value for Hardy–Weinberg equilibrium test less than  $10^{-6}$ . To identify the signatures of selection, two statistical methods of  $F_{ST}$  and XP-EHH were used under  $F_{ST}$  and EHH software packages, respectively. We also calculated unbiased estimates of  $F_{ST}$ . Because the results were strongly correlated with the  $F_{ST}$  results, unbiased estimates have not been reported. In our study, all the SNPs ranking above 0.1 percentile of the distribution of test statistics were selected as candidates for the signature of selection. Gene ontology analysis for identified genes was performed using DAVID online database.

**Results and discussion:** We used the  $F_{ST}$  and XP-EHH statistics to identify genomic regions that have been under positive selection associated with litter size in Baluchi sheep. Using  $F_{ST}$  approach, we identified 14 genomic regions on chromosomes 1 and 2 (two regions per chromosome), 3, 7, 9, 14, 18, 22, 23 (one region per chromosome), and X chromosome (three regions). Also, XP-EHH analysis identified nine genomic regions on chromosomes 2, 12, 13, and 22 (one region per chromosome), 7 (three regions), and X (two regions). Some of the genes located in identified regions under selection were associated with the number of lambs per lambing (ACVR1 and TGIF1), ovarian and follicle growth (DDX24), and fertility (FOXH1). Bone morphogenetic proteins are

\* Corresponding author: m.gholizadeh@sanru.ac.ir



critical regulators of chondrogenesis during development which transduce their signals through three type I receptors namely BMPRI1A, BMPRI1B, and ACVR1/ALK2. TGIF1 is highly expressed in sheep ovaries suggesting that TGIF1 plays an important role in ewe reproduction. Also, TGF- $\beta$ /SMAD signaling is critical in reproductive processes such as follicular activation, ovarian follicle development, and oocyte maturation. It has been evidenced that Ddx24 is highly expressed in sheep uterus affecting the development of ovaries and follicles. Foxh1 was first introduced as a transcriptional partner for Smad proteins and has been reported to play an important role in embryonic development. Results of gene ontology analysis identified two biological pathways namely defense response and cell motility which play an important role in the ovulation rate and the number of lambs per lambing. Reproductive activity and immune defenses can be mutually constraining, with increased reproductive activity limiting immune function and immune system activation leading to decreased reproductive function.

**Conclusions:** The results of this study identified candidate genes involved in the regulation of litter size in sheep suggesting that ACVR1 and TGIF1 genes can be considered as candidate genes related to the number of lambs per litter in sheep breeding programs to improve reproductive performance.

**Keywords:**  $F_{ST}$  statistics, XP-EHH statistics, Number of lambs per lambing, Baluchi sheep, Selection signatures

#### How to cite this article:

Kasiriyani M. M., Gholizadeh M., Rahimi-Mianji Gh. and Moradi M. H. 2022. Selection signatures associated with the number of lambs per lambing in Baluchi ewes. *Animal Production Research*, 11(4): 47-60. doi: 10.22124/AR.2023.21129.1665



## مقاله پژوهشی

### نشانه‌های انتخاب مرتبط با صفت تعداد بزه در هر نوبت زایش میش‌های بلوچی

محمد مهدی کثیریان<sup>۱</sup>، محسن قلی زاده<sup>۲\*</sup>، قدرت الله رحیمی میانجی<sup>۳</sup>، محمد حسین مرادی<sup>۴</sup>

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷)

## چکیده

تعداد بزه در هر زایش، یکی از مهم‌ترین صفات اقتصادی و تولیدمثلی در گوسفند است. در این پژوهش از داده‌های ۹۶ رأس میش نژاد بلوچی تعیین ژنوتیپ شده با استفاده از ریزآرایه‌های نانویی گوسفندی ۵۰K برای شناسایی نواحی ژنومی مورد انتخاب مرتبط با تعداد بزه در هر زایش در گوسفند استفاده شد. میش‌ها بر اساس داده‌های فنوتیپی پنج شکم زایش به دو گروه مورد (دوقلوزا) و شاهد (تک‌قلوزا) تقسیم شدند. برای شناسایی نشانه‌های انتخاب از آماره‌های  $F_{ST}$  و  $XP-EHH$  به ترتیب در بسته نرم‌افزاری  $F_{ST}$  و  $EHH$  و برای تجزیه هستی‌شناسی ژن‌های شناسایی شده در مناطق مورد انتخاب از پایگاه داده DAVID استفاده شد. نتایج این پژوهش منجر به شناسایی ۱۴ ناحیه ژنومی روی کروموزوم‌های ۱ و ۲ (دو ناحیه برای هر کدام)، ۳، ۷، ۹، ۱۴، ۱۸، ۲۲ و ۲۳ (هر کدام یک ناحیه) و کروموزوم X (۳ ناحیه) با آماره  $F_{ST}$  و ۹ ناحیه ژنومی روی کروموزوم‌های ۲، ۱۳، ۱۲، ۲ و ۲۲ (یک ناحیه برای هر کدام)، ۷ (سه ناحیه) و X (دو ناحیه) با آماره  $XP-EHH$  شد. برخی از ژن‌های شناسایی شده در مناطق مورد انتخاب با تعداد بزه در هر زایش ( $ACVR1$  و  $TGIF1$ )، رشد تخمدان و فولیکول ( $DDX24$ ) و باروری ( $FOXH1$ ) مرتبط بودند. در مسیرهای زیستی شناسایی شده، دو مسیر پاسخ دفاعی و تحرک سلولی دارای نقش مهمی در نرخ تخم‌کری و تعداد بزه در هر زایش بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن‌های  $ACVR1$  و  $TGIF1$  را می‌توان به عنوان ژن‌های کاندید مرتبط با تعداد بزه در هر زایش در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند در نظر گرفت.

**واژه‌های کلیدی:** آماره  $F_{ST}$ ، آماره  $XP-EHH$ ، تعداد بزه در هر زایش، گوسفند بلوچی، نشانه‌های انتخاب

\* نویسنده مسئول: m.gholizadeh@sanru.ac.ir

## مقدمه

با توجه به شرایط اجتماعی و اقتصادی مناطق گرم، خشک و بیابانی، امرار معاش بخش بزرگی از جمعیت این مناطق به وسیله نژادهای بومی نشخوارکنندگان کوچک، به ویژه گوسفند، تأمین می‌شود (Kosgey et al., 2006). یکی از مهم‌ترین و پرجمعیت‌ترین گوسفندان ایرانی، گوسفند بلوچی است (Jafaroghli et al., 2019). این گوسفندان بیشترین نیازهای زندگی عشایر و دامداران را تأمین می‌کنند.

در سراسر جهان بیش از ۱۱۵۵ نژاد گوسفند اهلی وجود دارد که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای از نظر صفات تولیدی و تولیدمثلی دارند. این امر به ویژه برای تعداد بزه‌های متولد شده در هر نوبت بهره‌دهی، که یک صفت کنترل کننده کلیدی در بهره‌وری تولیدمثلی است، صادق است (Dolebo et al., 2019).

بازده تولیدمثل یکی از عوامل موثر بر میزان سودآوری حاصل از پرورش گوسفند در گله‌های متمرکز و نیمه متمرکز است (Pourtahmasebian Ahrabi et al., 2020). تعداد بزه در هر زایش با وراثت‌پذیری پایین، به عنوان یک هدف تولیدمثلی در برنامه‌های مختلف اصلاح نژادی گنجانده می‌شود (Abdoli et al., 2019). مقادیر بالای وراثت‌پذیری صفات تولیدمثلی در نژاد لاکان و سوئدی گزارش شده است که احتمالاً از تفکیک و جدا شدن ژن‌های با اثر عمده مرتبط با باروری بالا در آن جمعیت‌ها ناشی شده است (Zhou et al., 2018). تعداد بزه در هر زایش، یک صفت پیچیده و درگیر با چند فرآیند زیستی از جمله ترشح هورمون، رشد فولیکول، تخم‌کری، لقاح، باروری و رشد جنین است. ژن‌های درگیر با فرآیندهای رشد جنین و زنده‌مانی جنین به‌طور مستقیم و غیرمستقیم با تعداد بزه در هر زایش ارتباط دارند (Ma et al., 2019). توسعه جنین به خاطر فضایی که در رحم اشغال می‌کند با صفت تعداد بزه مرتبط است. ظرفیت رحم نیز یکی از مؤلفه‌های مهم در بقای جنین قبل از تولد است (Nosrati et al., 2018). توانایی رحم در نگهداری، محافظت و رشد جنین در دوران آبستنی مهم و ضروری است (Dolebo et al., 2019). در گونه گوسفند، تنوع زیادی در میزان تخم‌کری و همچنین تعداد بزه در هر زایش در بین و داخل نژادها مشاهده می‌شود که ناشی از وجود تنوع ژنتیکی در داخل و

بین نژادها است (Zhou et al., 2018). همچنین دوقلوزایی تحت تأثیر عوامل غیر ژنتیکی نیز قرار می‌گیرد. استفاده از مدل تابعیت لجستیک به منظور بررسی آثار ثابت محیطی بر صفت تولیدمثلی می‌ش‌های نژاد بلوچی نشان داده است که عوامل محیطی سال تولد، سن می‌ش هنگام زایش بزه‌ها و همچنین وزن هنگام تولد بزه‌ها دارای اثر معنی‌داری بر احتمال دوقلوزایی هستند و این احتمال با افزایش سن می‌ش در هنگام زایش بیشتر می‌شود (Farhangfar et al., 2007).

انتخاب می‌تواند منجر به تغییر فراوانی یک آلل در یک جمعیت شود که نتیجه آن، تفرق در بین جمعیت‌ها در مناطق ژنومی مورد انتخاب است. بنابراین تفاوت چشمگیر در فراوانی آللی بین جمعیت‌ها می‌تواند به عنوان نشانه‌هایی از انتخاب مثبت در جایگاه‌های ژنگانی مربوطه به‌شمار آید. در اثر انتخاب، افزون بر آلل مرتبط با ژن مطلوب، جایگاه‌های خنثی که در نزدیکی آلل مطلوب قرار دارند نیز به همراه آلل مطلوب در ژنگان ابقاء می‌شوند و در نتیجه، فراوانی یک هاپلوتایپ خاص در ناحیه مورد انتخاب افزایش و تنوع هاپلوتیپی در آن ناحیه، کاهش پیدا می‌کند. این تغییر فراوانی آللی در یک جمعیت و فراوانی یک هاپلوتایپ خاص در یک ناحیه، نشانه‌های انتخاب نام دارد (Akey et al., 2002).

یکی از مزایای اصلی ردیابی نشانه‌های انتخاب، امکان اجرای آن تنها با استفاده از اطلاعات مولکولی در غیاب رکوردهای فنوتیپی است (Nosrati et al., 2018). بر پایه ساز و کار عملکرد شناسایی نشانه‌های انتخاب، روش‌های متفاوتی برای شناسایی نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم وجود دارد: آزمون‌های آماری بر پایه تمایز ژنگانی جمعیت‌ها مانند  $F_{ST}$  و FLK (Fariello et al., 2018)، آزمون‌های آماری مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی و طول هاپلوتیپی مانند LRH، iHS، XP-EHH و  $R_{sb}$ ، آزمون‌های آماری مبتنی بر توزیع فراوانی آللی مانند آزمون‌های Fay and Wu's D و Tajima's D (Purcell et al., 2007)، آزمون‌های آماری مبتنی بر کاهش مکانی تنوع ژنتیکی مانند آزمون ZHp و آزمون‌های آماری مبتنی بر جهش‌های تغییردهنده عملکرد مانند  $\omega = Dn/Ds$  (Xu et al., 2018) از این روش‌ها هستند.

زایش در گوسفند انجام نشده است. بنابراین، هدف از این تحقیق، شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با تعداد بزه در هر زایش در گوسفند نژاد بلوچی با استفاده از پویش نشانه‌های انتخاب است.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و کنترل کیفیت: در این تحقیق، از داده‌های تعیین ژنوتیپ شده مربوط به ۹۶ رأس میش نژاد بلوچی (Gholizadeh *et al.*, 2015) که با استفاده از آرایه‌های Illumina Ovine SNP50K BeadChip و با به‌کارگیری شیوه‌نامه استاندارد شرکت ایلومینا (www.illumina.com) تعیین ژنوتیپ شده بودند استفاده شد. اندازه نمونه با توجه به اندازه جمعیت حاضر در این مرکز که دارای رکورد زایش بودند (وفور میش‌هایی که در گله دوقلوزایی داشتند) و همچنین با در نظر گرفتن کمترین رابطه خویشاوندی بین حیوانات انجام شد. برای شناسایی نواحی مورد انتخاب، ابتدا پس از بررسی صفت تعداد بزه به ازای هر زایش در پنج شکم زایش، میش‌هایی که در هر پنج شکم زایش، دوقلوزا و یا چندقلوزا بودند در گروه مورد و میش‌هایی که در هر پنج شکم زایش تک‌قلوزا بودند در گروه شاهد قرار گرفتند. ۵۶ نمونه (تک‌قلوزا) در گروه شاهد و ۴۰ نمونه (دوقلوزا) در گروه مورد قرار گرفتند. کنترل کیفیت و معیار حذف عبارت بودند از:

SNP call rate < ۰/۹۵، MAF < ۰/۰۵ و sample call rate < ۰/۹۵ (Xu *et al.*, 2018). همچنین‌های نشانگرهایی که در تعادل هاردی-واینبرگ نبودند ( $P < 10^{-6}$ ) به عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ کنار گذاشته شدند. مراحل مختلف کنترل کیفیت روی داده‌های اولیه با نرم افزار PLINK 1.07 (Purcell *et al.*, 2007) انجام شد.

ردیابی نشانه‌های انتخاب: در این مطالعه برای شناسایی نشانه‌های انتخاب مرتبط با تعداد بزه در هر زایش در سطح ژنوم از آماره  $F_{ST}$  و XPEHH استفاده شد.

آزمون  $F_{ST}$ : آماره  $F_{ST}$  مناطقی از ژنومی را که در دو جمعیت مورد-کنترل (تک‌قلوزا و دوقلوزا) به‌صورت متمایز و واگرا هدف انتخاب قرار گرفته‌اند را شناسایی می‌کند. آزمون تمایز جمعیتی  $F_{ST}$  به روش رایت (Weir and Cookerham, 1984) محاسبه شد. فرم پایه آماره  $F_{ST}$  به روش رایت بر پایه تفرق جمعیتی به صورت زیر است:

در پژوهشی، نشانه‌های انتخاب روی کروموزوم X در سه نژاد گوسفند سانتی، دوپر و آلمانی با آماره XP-EHH و  $F_{ST}$  بررسی شد که در نتیجه، ژن BMP15 مرتبط با باروری گزارش شد (Yan *et al.*, 2019). نشانه‌های انتخاب با مطالعه ژنومی بین نژاد گوسفند با باروری بالا (رومانو) (چهار رأس) و نژادهای گوسفند با باروری پایین نظیر آصف (یک رأس)، آواسی (یک رأس)، کمبریج (هفت رأس) و انگلیسی (یک رأس) بررسی شد و ژن LEPR و KIF5 مرتبط با تعداد بزه در هر زایش با آماره‌های  $F_{ST}$  و XP-EHH گزارش شد (Nosrati *et al.*, 2018). تنوع ژنومی، ساختار جمعیت و نشانه‌های انتخاب در چهار نژاد گوسفند بومی چین با آماره‌های  $F_{ST}$  و XP-EHH بررسی و دو ژن NF1 و BMP1B مرتبط با تعداد بزه در هر زایش و سه ژن SPP1، TSHR و UNC5 مرتبط با صفت تولیدمثلی گزارش شدند (Dolebo *et al.*, 2019). تحقیقات زیادی برای شناسایی ساختار ژنوم و مناطق ژنومی مؤثر بر صفات چندقلوزایی در گوسفند بلوچی با استفاده از نشانگرهای متراکم انجام شده است (Pasandideh *et al.*, 2017; Esmaili fard *et al.*, 2019; Taghizadeh *et al.*, 2020). همچنین مطالعات متعددی برای تجزیه و شناسایی نشانه‌های انتخاب در نژادهای گوسفند ایران صورت گرفته است (Nosrati *et al.*, 2018; Manzari *et al.*, 2019; Moradi *et al.*, 2012). گزارش‌های متعدد از نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم در بین نژادهای مختلف گوسفند نشان می‌دهد که ساز و کار ژنتیکی کنترل کننده این صفت در بین نژادهای مختلف می‌تواند متفاوت باشد. فشار انتخاب روی ژن‌های مؤثر بر صفات تولیدمثلی بسیار متفاوت است. اگر نواحی مورد انتخاب به‌طور قابل توجه با صفات تولیدمثلی و تعداد بزه در هر زایش مرتبط باشد به عنوان یک شاخص برای بهبود ژنتیکی صفت تعداد بزه در هر زایش در گونه گوسفند استفاده می‌شود (Nosrati *et al.*, 2018).

انتخاب برای صفت دوقلوزایی در گوسفند بلوچی طی نسل‌های گذشته می‌تواند منجر به ایجاد نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم شده باشد که بررسی و ردیابی این نشانه‌ها می‌تواند در شناسایی این نواحی و ژن‌های کاندیدای مؤثر بر تعداد بزه در هر زایش مفید باشد. تاکنون تحقیق در زمینه بررسی نشانه‌های انتخاب مرتبط با تعداد بزه در هر

نیز فراوانی و فاصله بین نشان‌گرها مقایسه می‌کند. این روش، هاپلوتایپ‌ها را بین دو جمعیت با هم مقایسه می‌کند تا به این ترتیب، تنوع در نرخ نوترکیبی‌ها نیز کنترل شود. بنابراین، داده‌های پرت به عنوان نشانه‌های انتخاب در یک جمعیت خاص محسوب می‌شوند (Moradi *et al.*, 2012). برآورد آماره XP-EHH نیازمند محاسبه EHH در هر جمعیت است. به صورت زیر محاسبه می‌شود (Manzari *et al.*, 2019):

$$EHH(x) = \frac{\sum_{i=1}^G \binom{n_i}{2}}{\binom{N}{2}}$$

که در این معادله، G بیانگر تعداد گروه‌های حامل یک هاپلوتیپ مرکزی بسط داده شده منحصر به فرد،  $n_i$  بیانگر تعداد افراد داخل هر زیرگروه و n نیز تعداد کل نمونه‌های حامل هاپلوتیپ مرکزی خاص است. و آماره XP-EHH:

$$XP-EHH_{score} = \ln\left(\frac{IA}{IB}\right)$$

که،  $IA$  = انتگرال ارزش EHH در جمعیت A و  $IB$  = انتگرال ارزش EHH در جمعیت B است.

برای محاسبه آماره XP-EHH و تعیین جایگاه‌های مورد انتخاب از بسته نرم‌افزاری rehh (نسخه 1.2.3) در محیط R استفاده شد (Gautier *et al.*, 2012). تنها ۰/۱ درصد از مناطقی از ژنگان که در همه نشانگرهای مجاور، ارزش بالایی داشتند به عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند. پس از شناسایی مناطق دارای نشانه‌های انتخاب (شامل کروموزوم و موقعیت SNP‌های انتخابی روی کروموزوم)، برای بررسی ژن‌های گزارش شده در این مناطق و بازه ۵۰۰ کیلو جفت باز اطراف آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) و از نسخه OAR4 استفاده شد. برای بررسی عملکرد زیستی ژن‌ها از پایگاه‌های Genecard (<https://www.genecards.org>)، UniProtKB (<https://www.uniprot.org>) و برای تعیین مسیرهای زیستی و درک بهتر عملکردهای مولکولی در پایگاه اطلاعاتی DAVID مورد تجزیه Gene Ontology قرار گرفت (<http://www.david.ncifcrf.gov>). از آنجا که حاشیه‌نویسی (Annotation) ژنوم گوسفند کامل نشده است، برای بررسی ژن‌های گزارش شده از مناطق ژنگانی متناظر (اورتولوگوس) در گونه گاو (*Bos Taurus*) نیز در

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_S}$$

که،  $H_T$  نشان‌دهنده هتروزیگوسیتی مورد انتظار در کل جمعیت است که از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$H_T = 1 - \sum (\bar{p}^2) - (\bar{q}^2)$$

که،  $\bar{p}$  و  $\bar{q}$  به ترتیب فراوانی آللی  $A_1$  و  $A_2$  در کل جمعیت هستند.  $H_S$  نیز هتروزیگوسیتی داخل زیر جمعیت‌ها است که با رابطه زیر محاسبه شد:

$$H_S = \frac{\sum_{i=1}^n H_{expi} - n_i}{N_{Total}}$$

که،  $H_{expi}$  و  $n_i$  به ترتیب بیانگر هتروزیگوسیتی مورد انتظار و اندازه جمعیت در زیر جمعیت  $i$  ام هستند. یکی از مشکلات اصلی روش رایت در نظر نگرفتن خطای نمونه‌گیری است که این مشکل با ارائه روش برآورد کننده ناریب تتا تصحیح شد که مستقل از شمار گروه‌های نمونه‌گیری شده و شمار افراد داخل هر گروه است (Weir and Cookerham, 1984).

ارزش‌های  $F_{ST}$  و برآورد ناریب آن (تتا) برای هر SNP در محیط R محاسبه شد. با توجه به این که انتخاب، فزون بر جهش مفید، جایگاه‌های مجاور آن را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد، پس از محاسبه ارزش  $F_{ST}$  برای هر نشانگر SNP، برای نمایش بهتر مناطق مورد انتخاب به جای ارزش هر SNP، میانگین ارزش عددی  $F_{ST}$  هر پنج SNP مجاور به عنوان ارزش Win5 هر نشانگر محاسبه شد. در نهایت، نگاره منتهن ارزش تمایز جمعیتی آماره  $F_{ST}$  در سطح ژنگان ترسیم شد. تنها ۰/۱ درصد از مناطقی از ژنگان که در همه نشان‌گرهای مجاور ارزش بالایی داشتند به عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند (Moradi *et al.*, 2012).

آزمون  $XP-EHH$ : این آماره که یک آماره مبتنی بر عدم تعادل پیوستگی و طول هاپلوتیپ است، مناطق ژنومی مورد انتخاب به وسیله آلل‌های با هموزیگوسیتی هاپلوتایپی بسط داده شده یا EHH (Extended Haplotype Homozygosity) و فراوانی بالا را تشخیص می‌دهد (Manzari *et al.*, 2019). برای شناسایی علائمی از انتخاب که طی آن‌ها، آلل‌های سودمند در یکی از جمعیت‌ها تثبیت شده‌اند، یا به مرحله تثبیت نزدیک شده‌اند درحالی که در کل جمعیت‌ها هنوز به صورت چندشکل باقی‌مانده‌اند از آماره XP-EHH استفاده می‌شود. آماره XP-EHH، انتگرال‌های EHH را بین دو جمعیت با تعداد SNP‌های یکسان بر پایه عدم تعادل پیوستگی و طول هاپلوتایپی و

۰/۰۳۱ و ۰/۰۱۹ بود. بیشترین ارزش  $F_{ST}$  محاسبه شده برابر با ۰/۲۰۲ و کمترین ارزش محاسبه شده برابر با ۰/۰۰۱ بود. حد آستانه سخت گیرانه با مقدار ۰/۱۲ برای شناسایی SNPهای با ارزش  $F_{ST}$  بالا تعیین شد. تعداد ۳۸ ناحیه ژنومی که  $F_{ST}$  ارزش عددی بالاتر از ۰/۱۲ را داشتند روی کروموزومهای ۳ و ۲۳ (یک ناحیه)، ۱، ۷، ۱۰، ۱۴ و ۱۸ (دو ناحیه برای هر کدام)، ۲، ۶، ۱۷ و ۲۲ (چهار ناحیه برای هر کدام) و کروموزوم ۹ و X (پنج ناحیه برای هر کدام) به عنوان نواحی کاندید شناسایی شدند. با ادغام مناطق مورد انتخاب که با هم هم پوشانی داشتند در مجموع، ۱۴ ناحیه ژنومی روی کروموزومهای ۱ و ۲ (دو ناحیه برای هر کدام)، ۳، ۷، ۹، ۱۴، ۱۸، ۲۲ و ۲۳ (یک ناحیه برای هر کدام) و کروموزوم X (سه ناحیه) شناسایی شدند. برای شناسایی ژنهای مرتبط در مناطق ژنومی شناسایی شده، ۵۰۰ کیلو جفت باز قبل و بعد از نقاط شروع و پایان مناطق انتخابی بررسی شد. از ۱۴ ناحیه مورد بررسی، همه نواحی حاوی ژنهای کد کننده ژنها بودند و در مجموع، ۱۲۱ ژن شناسایی شدند (جدول ۲).

جستجوی پایگاه ([http:// genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway)) استفاده شد (Wang et al., 2020).

## نتایج

پس از اجرای مراحل مختلف کنترل کیفیت داده‌های اولیه، ۴۹ نمونه گروه تک‌قلوزا با ۴۱۴۰۰ نشانگر SNP و ۳۷ نمونه گروه دوقلوزا با ۴۳۳۶۶ نشانگر SNP برای تجزیه‌های بعدی انتخاب شدند (جدول ۱).

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی همبستگی بین ارزش‌های شاخص تمایز جمعیتی رایت ( $F_{ST}$ ) و روش ناریب تتا بیانگر همبستگی بالای ۹۹ درصد بین آنها بود. به همین علت در این تحقیق، فقط نتایج به‌دست‌آمده از روش تمایز جمعیتی رایت ( $F_{ST}$ ) گزارش شد.

آماره  $F_{ST}$  برای بررسی الگوی ژنومی نشانه‌های انتخاب مثبت در نژاد بلوچی برای تعداد بره در هر زایش برآورد شد. ارزش تمایز جمعیتی  $F_{ST}$  بر اساس Win5 در سطح ژنوم در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین کل و انحراف معیار  $F_{ST}$  برای جمعیت مورد و کنترل به ترتیب برابر با

جدول ۱- توصیف مراحل کنترل کیفیت در گروه مورد و کنترل گوسفند نژاد بلوچی

Table 1. Description of quality control steps in case (one lamb per litter) and control (two lambs per litter) groups of Baluchi sheep

| Item                    | Control | Case  |
|-------------------------|---------|-------|
| Number of animals       | 56      | 40    |
| Sample call rate <95%   | 7       | 3     |
| Raw number of SNPs      | 50750   | 50750 |
| MAF < 0.05              | 6815    | 6709  |
| Marker call rate < 0.95 | 2535    | 675   |
| Qualified SNPs          | 41400   | 43366 |

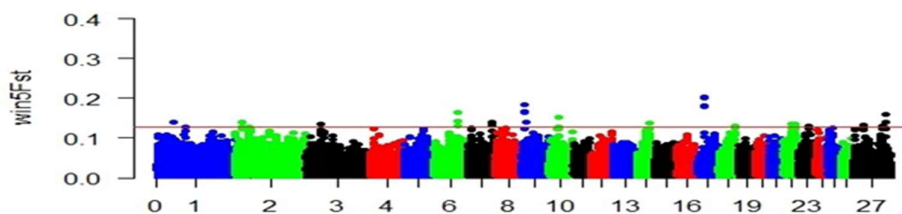


Fig. 1. Distribution of win5  $F_{ST}$  values in Baluchi sheep genome. The genomic position of the SNPs is on the horizontal axis and the numeric values of win5  $F_{ST}$  are on the vertical axis. The red line shows the threshold (99.99 percentile).

شکل ۱- توزیع ارزش‌های win5  $F_{ST}$  در سطح ژنوم گوسفند نژاد بلوچی. موقعیت ژنومی SNPها روی محور افقی و ارزش عددی win5  $F_{ST}$  روی محور عمودی قرار دارند. خطوط قرمز افقی نشان‌دهنده حد آستانه (صدک ۹۹/۹۹) مناطق مورد انتخاب است.

جدول ۲- ژن‌های کاندید در مناطق ژنومی مورد انتخاب نژاد بلوچی بر اساس آماره  $F_{ST}$ 

| Table 2. The candidate genes in genomic regions under selection in Baluchi breed estimated from $F_{ST}$ statistic |                     |                           |                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chromosome                                                                                                         | Physical map (bp)   | Marker distance from gene | Gene                                                                                                                                                                                                                                                |
| 1                                                                                                                  | 59254771-60501827   | Within                    | TTL7                                                                                                                                                                                                                                                |
| 1                                                                                                                  | 102112281-103606224 | Within                    | SNAPIN, NPR1, INTS3, GATAD2B, CRTC2, SHE, PMVK, SLC39A1, JTB, RPS27, TPM3, MIR190B, HAX1, ATP8B2, CHRN2, PMVK, S100A7, CHTOP, RAB13, C3H1orf43                                                                                                      |
| 2                                                                                                                  | 20898912-22405837   | Within                    | GRIN3A, PPP3R2, MIR2284Z-5, PGAP4, ALDOB, PLPPR1, MRPL50, RNF20, ZNF189                                                                                                                                                                             |
| 2                                                                                                                  | 45043978-46405335   | Within                    | SLC18A1, LZTS1, ATP6V1B2, LPL                                                                                                                                                                                                                       |
| 3                                                                                                                  | 49899934-51116201   | Within                    | RNFT1                                                                                                                                                                                                                                               |
| 7                                                                                                                  | 85018812-86241267   | Within                    | TMEM63C, POMT2, NGB, AHSA1, ADCK1, CIPC, ZDHHC22, TMED8, VIPAS39, AHSA1, SPTLC2, SNW1, GSTZ1, ALKBH1, SLIRP                                                                                                                                         |
| 9                                                                                                                  | 11919854-13713975   | Within                    | SLC39A4, RECQL4, VPS28, OPLAH, EXOSC4, SHARPIN, DGAT1, SLC52A2, ADCK5, CPSF1, TONSL, CYHR1, LRRC24, MFS3, C14H8orf82, RPL8, ZNF34, C14H8orf33, PTP4A1, PHF3, EXOSC4, COMMD5, HSF1, SCRT1, MROH1, FOXH1, KIFC2, RECQL4, MAF1, GRINA, GPAA1, ARHGAP39 |
| 14                                                                                                                 | 42980150-44278762   | Within                    | WTIP, KCTD15, LSM14A, COX7A2, LSM14A, PDCD2L, UBA2, CHST8, GARRE1                                                                                                                                                                                   |
| 18                                                                                                                 | 56432894-57806940   | Within                    | UBR7, PRIMA1, ASB2, IFI27, SERPINA10, TMEM251, GON7, OTUB2, DDX24, ISG12(B), CCTDC197                                                                                                                                                               |
| 22                                                                                                                 | 38366864-39753249   | Within                    | GRK5, RGS10, TIAL1, SEC23IP, MCMBP, BAG3, PPAPDC1A, BAG3, MCMBP, WDR1                                                                                                                                                                               |
| 23                                                                                                                 | 37337139-38612389   | Within                    | MYOM1, MYL12A, MYL12B, TGIF1, DLGAP1                                                                                                                                                                                                                |
| x                                                                                                                  | 115990433-117314073 | Within                    | MAF1, TRPC5, NDUFA1, SERTM2, DCX, CAPN6, PAK3CIPC, TMEM63C, POMT2, VIP, TRPC5, SERTM2, CAPN6TENM1                                                                                                                                                   |
| x                                                                                                                  | 35021641-36362696   | Within                    | CIPC, TMEM63C, POMT2, VIPAS39, AHSA1, SNW1, SLIRP, ZDHHC22, TMED8, NGB, SPTLC2, AHSA1, VIPAS39, ALKBH1, SNW1                                                                                                                                        |
| x                                                                                                                  | 102128756-103850118 | Within                    | SH2D1A                                                                                                                                                                                                                                              |

با هم همپوشانی داشتند، با آغام این مناطق، در مجموع نه منطقه روی کروموزوم‌های ۲، ۱۲، ۱۳ و ۲۲ (یک ناحیه برای هر کدام)، ۷ (سه ناحیه) و X (دو ناحیه) شناسایی شد که در مجموع، در برگیرنده ۵۵ ژن بودند (جدول ۳). ژن‌های شناسایی شده برای تعیین مسیرهای زیستی و درک بهتر عملکردهای مولکولی در پایگاه داده DAVID مورد تجزیه هستی‌شناسی قرار گرفتند. در این تحقیق، مسیرها و ژن‌آنتالوژی (GO) ژن‌هایی که با آستانه  $P < 0.05$  معنی‌دار شدند، انتخاب شدند. تعداد ۱۱ دسته عملکردی در هستی‌شناسی فرآیندهای زیستی با آماره  $F_{ST}$  و نه دسته با آماره XP-EHH با آستانه  $P < 0.05$  معنی‌دار شدند. چهار

آماره XP-EHH برای بررسی الگوی ژنومی نشانه‌های انتخاب مثبت برآورد شد (شکل ۲). کمترین ارزش محاسبه شده در جمعیت مورد (دوقلوزا) برابر با ۴/۲۴۲- و بیشترین ارزش محاسبه شده برابر با ۰/۰۰۱۶- بود. حد آستانه سخت‌گیرانه آماره XP-EHH برای گروه مورد (دوقلوزا) برابر با ۳/۴۳۱- تعیین شد. ارزش‌های ۳/۴۳۱- XP-EHH به عنوان شناسایی مناطق مورد انتخاب در گروه مورد (دوقلوزا) در نظر گرفته شد. مناطق ژنومی مورد انتخاب در گوسفند بلوچی روی کروموزوم‌های ۲، ۱۳ و ۲۲ (هر کدام یک ناحیه)، ۷ (۲۹ ناحیه)، ۱۲ (چهار ناحیه) و X (دو ناحیه) شناسایی شد. از آنجا که برخی مناطق مورد انتخاب

(EHH) استفاده شد. روش‌های آماره  $F_{ST}$  و XP-EHH از یکدیگر متفاوت هستند و مناطق انتخابی با استفاده از روش  $F_{ST}$  لزوماً مشابه روش‌های مبتنی بر LD نخواهد بود ولی در صورت تأیید و شناسایی با استفاده از آماره XP-EHH، نتایج مورد اطمینان‌تر خواهد بود. نتایج بررسی همبستگی بین ارزش‌های شاخص تمایز جمعیتی رایت ( $F_{ST}$ ) و روش ناریب تتا بیانگر همبستگی بالای ۹۹ درصد بین آن‌ها بود. همبستگی بالای مشاهده شده بین آماره  $F_{ST}$  رایت و  $F_{ST}$  تتا زمانی که شمار نمونه‌ها در دو جمعیت مورد مقایسه، همسان یا تقریباً همسان باشد قابل انتظار است.

فرآیند شامل: فرآیندهای پاسخ دفاعی، ماکروتوفاژی، متیلاسیون هیستون‌ها و پلیمریزاسیون اکتین‌ها با آماره  $F_{ST}$  و فرآیند تحرک سلولی با آماره XP-EHH با فرآیندهای تولیدمثلی و دوقلو زایی دارای ارتباط معنی‌دار بودند (جدول ۴).

### بحث

در این مطالعه برای شناسایی جایگاه‌های مورد انتخاب مرتبط با تعداد بچه در هر زایش از روش‌های مبتنی بر سطح تمایز زیر جمعیتی ( $F_{ST}$ ) و عدم تعادل پیوستگی ژنی (XP-)

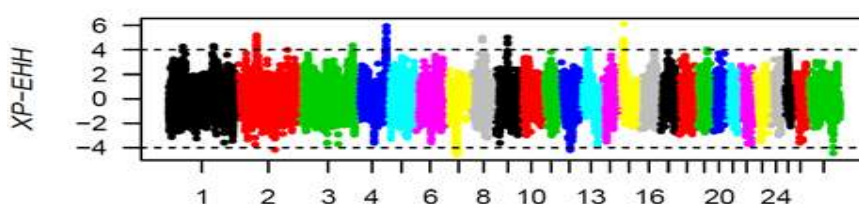


Fig. 2. Distribution of XP-EHH values in Baluchi sheep genome. The genomic position of the SNPs is on the horizontal axis and the numerical values of XP-EHH are on the vertical axis. Horizontal lines indicate the threshold (99.99th percentile). Negative values indicate the selection in case group (twin bearers) and positive values indicate the selection in control group (single bearers).

شکل ۲- توزیع ارزش‌های XP-EHH در سطح ژنوم گوسفند بلوچی. موقعیت ژنومی SNPs روی محور افقی و ارزش عددی XP-EHH روی محور عمودی قرار دارند. خطوط افقی نشان‌دهنده حد آستانه (صدک ۹۹/۹۹) مناطق مورد انتخاب است. ارزش‌های منفی بیانگر انتخاب در گروه مورد (دوقلوزا) و ارزش‌های مثبت بیانگر انتخاب در گروه شاهد (تک‌قلوزا) هستند.

جدول ۳- ژن‌های کاندید در مناطق ژنومی مورد انتخاب نژاد بلوچی در گروه مورد (دوقلوزا) بر اساس آماره XP-EHH  
Table 3. The candidate genes in genomic regions under selection in case group (twins) of Baluchi breed estimated from XP-EHH statistics

| Chromosome | Physical map (bp)   | Marker distance from gene | Gene                                                                                                      |
|------------|---------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2          | 150448610-151448610 | Within                    | ACVR1, ACVR1C, ERMN, CYTIP, GALNT5                                                                        |
| 7          | 43527589-45664257   | Within                    | C2CD4B, MIR2285Y, TPM1, MIR190A, APH1B, RAB8B, RPS27L, LACTB                                              |
| 7          | 39013097-40577499   | Within                    | RPS29, RPL36AL, POLE2, KLHDC1, KLHDC2, VCPKMT, L2HGDH, LRR1, NEMF, DNAAF2, MIR6517, CDKL1, DMAC2L, MAP4K5 |
| 7          | 40288484-41847236   | Within                    | FRMD6, TMX1, ATL1, PYGL, TRIM9, SAV1, GNG2                                                                |
| 12         | 41107017-42499843   | Within                    | UBE4B, NMNAT1, CTNNBIP1, TMEM201, PIK3CD, SPSB1, MIR34A, SLC2A5                                           |
| 13         | 68315186-69315186   | Within                    | TOP1, PLCG1                                                                                               |
| 22         | 43016551-44016551   | Within                    | ABRAXAS2, ZRANB1                                                                                          |
| X          | 103851418-105043760 | Within                    | PRR32, MIR2285X                                                                                           |
| X          | 103883398-105054446 | Within                    | MIR190A, RPS27L, APH1B, RAB8B, LACTB, TPM1                                                                |

جدول ۴- مهم‌ترین مسیرهای معنی‌دار بیوشیمیایی مرتبط با دوقلو زایی در مناطق مورد انتخاب در نژاد بلوچی با استفاده از آماره  $F_{ST}$  و XP-EHH

Table 4. The most important biochemical pathways associated with twinning in genomic regions of Baluchi breed estimated from  $F_{ST}$  and XP-EHH statistics

| Category      | Go term    | Term                                     | P-value | Number of genes | Reported Gene                                         | Statistics |
|---------------|------------|------------------------------------------|---------|-----------------|-------------------------------------------------------|------------|
| GOTERM_BP_ALL | GO:0031062 | Histone methylation                      | 0.01    | 3               | RNF20, CHTOP, SNW1                                    | $F_{ST}$   |
| GOTERM_BP_ALL | GO:0016236 | Macroautophagy                           | 0.01    | 6               | MYOM1, SNAPIN, SPTLC2, ASB2, ZNF189, PAK3             | $F_{ST}$   |
| GOTERM_BP_ALL | GO:0051607 | Defense response                         | 0.02    | 4               | TENM1, HAX1, WDR1, TGIF1                              | $F_{ST}$   |
| GOTERM_BP_ALL | GO:0097305 | Actin polymerization or depolymerization | 0.02    | 3               | CHRNA2, GRIN3A, PMVK                                  | $F_{ST}$   |
| GOTERM_BP_ALL | GO:0048870 | Cell motility                            | 0.02    | 7               | ACVR1, ZRANB1, TMEM201, ACVR1C, DNAAF2, PIK3CD, PLCG1 | XP-EHH     |

(Knight *et al.*, 2006). در واقع، مهار یا جهش در خانواده اصلی سیگنالینگ TGF- $\beta$ / SMAD باعث مشکلات تولیدمثلی از جمله ناباروری می‌شود (La *et al.*, 2019). عامل هوموباکسی حاصل از TGIF1 عضوی از یک خانواده اسیدهای آمینه حلقوی است که به میزان بالا در تخمدان گوسفند بیان می‌شود. TGIF1 در سلول گرانولوزا و تیکا شناسایی شده است که نقش مهمی در فولیکول‌ها دارد (Knight *et al.*, 2006). مطالعات پیشین نشان می‌دهد TGIF1 نقش اساسی در تولیدمثل پستانداران دارد. ارتباط ژن TGIF1 با تعداد بچه در هر زایش در نژاد هان گزارش شده است که این فرضیه را تأیید می‌کند که ژن TGIF1 روی صفت تعداد بچه در هر زایش در گوسفند نقش دارند (Yan *et al.*, 2019).

ژن DDX24 (DEAD-Box Helicase 24) روی کروموزوم ۱۸ گوسفند شناسایی شد که یک پروتئین جعبه‌ای DEAD با اندازه ۹۶/۳ کیلو دالتون را کد می‌کند. پروتئین‌های جعبه DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) گروه بزرگی از ۳۸ هلیکاز RNA تشکیل و در رونویسی، اتصال قبل از mRNA، پردازش rRNA، در انتقال RNA، شروع ترجمه، بیوژن ریبوزومی و از بین رفتن RNA نقش دارند (Wang *et al.*, 2020). اعضای این خانواده پروتئینی در بیشتر موجودات از پروکاریوت گرفته تا انسان یافت می‌شوند. این پروتئین جعبه‌ای DEAD شباهت اندکی با سایر پروتئین‌های جعبه DEAD شناخته شده در انسان

در بررسی‌های پیشین نیز همبستگی بیش از ۹۹ درصد این دو آزمون در مقایسه بین گاوهای مبتلا به ورم پستان و سالم (Abasi *et al.*, 2017)، گوسفندان دنبه‌دار و بدون دنبه (Moradi *et al.*, 2012) و مقایسه نژادهای گوسفند ایرانی (Manzari *et al.*, 2019) گزارش شده است. به همین علت در این تحقیق، فقط نتایج به‌دست آمده از روش تمایز جمعیتی رایت ( $F_{ST}$ ) گزارش شد. نتایج بررسی در مناطق ژنومی مورد انتخاب، ژن‌های متعددی را مورد شناسایی قرار داد که بنا بر گزارش‌های پیشین، تعدادی از این ژن‌ها به‌طور مستقیم و غیرمستقیم با صفات تولیدمثلی و تعداد بچه در هر زایش در ارتباط هستند. ژن‌های DDX24، TGIF1 و FOXH1 به ترتیب روی کروموزوم‌های ۲۳، ۱۸ و ۹ با آماره  $F_{ST}$  و ژن ACVR1 روی کروموزوم ۲ با استفاده از آماره XP-EHH شناسایی شدند.

ژن TGIF1 روی کروموزوم ۲۳ گوسفند قرار دارد. پروتئینی که به وسیله ژن TGIF1 کد می‌شود در تمایز سلولی نقش دارد. این پروتئین با اتصال به برخی مناطق خاص DNA یا با تعامل با سایر پروتئین‌های متصل به DNA، ژن‌ها را تنظیم می‌کند. میزان تخم‌ریزی و تعداد نتاج در هر زایش عمدتاً تحت تأثیر اعضای خانواده TGF- $\beta$ ، عامل تمایز رشد ۹ (GDF9) و پروتئین مورفونیک استخوان ۱۵ (BMP15) است. سیگنالینگ TGF- $\beta$ / SMAD در فرآیندهای تولیدمثلی مهم شامل فعال و آزادسازی فولیکول، رشد فولیکول‌های تخمدان و بالغ شدن اووسیت‌ها نقش دارند

(Hu *et al.*, 2018) و با باروری بالا در گوسفند نژاد Hu گزارش شده است (Yuan *et al.*, 2019). ژن ACVR1 روی کروموزوم ۲ شناسایی شد. ژن گیرنده اکتیوین نوع یک (ACVR1) به عنوان ALK2 شناخته شده و پروتئین اسید آمینه ۵۰۹ را کد می‌کند. ACVR1 گیرنده‌ای است که در تنظیم بیان ID2 و مسیر پاسخ BMP نقش دارد که به نوبه خود به دلیل اهمیت آن در طول رشد فولیکولی شناخته شده است. محصول پروتئین ACVR1 در ابتدا به عنوان یک گیرنده اکتیوین نوع یک توصیف می‌شد و مشخص شد که در چندین بافت بیان می‌شود (Mela *et al.*, 2015). با استفاده از توالی‌یابی (RNA (RNaseq مشخص شد که ژن ACVR1 در همه بافت‌ها بیان می‌شود. ACVR1 اولین بار به صورت متصل به اکتیوین A، عضوی از خانواده BMP/TGF، شناسایی شد (Yadin *et al.*, 2016). ACVR1 چندین BMP را به گیرنده‌های نوع دو متصل می‌کند که باعث راه‌اندازی سیگنال SMAD1/5/8 می‌شود. ACVR1 از اعضا و گیرنده‌های ابر خانواده TGF به عنوان تنظیم کننده‌های مهم توسعه سیستم تولیدمثل و هموستاز گزارش شده‌اند (Zhang *et al.*, 2017). در طول رشد فولیکول گوسفند، FSH و استرادیول، ACVR1 را تنظیم می‌کنند و سیگنال‌دهی BMP7 از مسیر ACVR2A/ACVR1 در سلول‌های گرانولوزا نقشی در رشد فولیکول دارند. علاوه بر این، سطح ACVR1 در سلول‌های گرانولوزا با اندازه فولیکول افزایش می‌یابد (Shimizu *et al.*, 2006). ACVR1 چندین فرآیند تولیدمثل (مانند رشد فولیکولی و تخمک‌گذاری) را تنظیم می‌کند که با احتمال بالا با باروری از مسیر سیگنال‌دهی BMP و AMH مرتبط است (Rafati *et al.*, 2016). ارتباط ژن ACVR1 با تعداد بره در هر زایش در نژاد گوسفند بومی چین گزارش شده است (McBride *et al.*, 2012). نتایج تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن‌ها نشان داد که شرح‌نویسی ژن‌های کاندیدای مورد مطالعه در مسیر متیلاسیون هیستون‌ها به‌طور معنی‌داری با صفات تولیدمثل در ارتباط است. متیلاسیون هیستون‌ها یک فرآیند بیوشیمیایی ضروری و حیاتی است که در تنظیم گامتوژنز، رشد جنین و جفت نقش دارند (Menezo *et al.*, 2016). ترمیم DNA، عملکرد پروتئین و بیان ژن زیر کنترل متیلاسیون هیستون‌ها است. متیلاسیون هیستون‌ها در دو ساز و کار اصلی تنظیمی *pigenesis* و *imprinting*

دارد، اما شباهت زیادی به DDX24 در سطح اسید آمینه در موش نشان می‌دهد. این خانواده پروتئین ابتدا به عنوان گروهی از NTPase‌ها که دارای عناصر توالی مشترک هستند تعریف شدند (Ma *et al.*, 2019). این ژن در تخمدان، سرویکس، رحم و بیضه به میزان زیاد بیان می‌شود. برخی از اعضای این خانواده در رشد جنین، اسپرماتوژنیز، رشد و تقسیم سلولی نقش دارند. بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد ژن DDX24 در رشد تخمدان و فولیکول گوسفند دخیل است (Wang *et al.*, 2020). این ژن به عنوان یک ژن کاندید برای باروری در خوک‌های سفید آلمانی گزارش شده است. افزون بر این، گزارش شده است بیشترین بیان این ژن در رحم صورت می‌گیرد. ظرفیت رحم یکی از مؤلفه‌های مهم در بقای جنین قبل از تولد است (Knight *et al.*, 2006). ژن FOXH1 (Forkhead Box H1) روی کروموزوم ۹ قرار دارد. این ژن در اپی بلاست و آندودرم خارج جنینی بیان می‌شود. تنوع فعالیت زیستی اعضای خانواده TGF- $\beta$  که با فعالیت‌های تولیدمثل در ارتباط هستند تا حد زیادی از راه فعل و انفعالات کمپلکس DNA/Smads صورت می‌گیرد. اعضای خانواده TGF $\beta$  از مسیر گیرنده‌های سرین/ترئونین کیناز با فسفوریلاسیون کمپلکس DNA/Smads کنترل می‌شوند (Sabeti *et al.*, 2007). نتایج پیشین نشان می‌دهد آغاز بیان ژن NODAL مستلزم پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -Catenin است در حالی که حفظ بیان آن به وسیله خودتنظیمی وابسته به Foxh1/Smad2 انجام می‌شود. این خودتنظیمی در تشکیل آندودرم ضروری است چرا که حذف بخش اتصالی Foxh1 از تقویت کننده اینترونی باعث کاهش بیان ژن NODAL شده و تخصصی شدن آندودرم حقیقی را سبب می‌شود. از دست دادن عملکرد کورسپتور NODAL و Foxh1، سبب ایجاد جنین‌هایی با نقص گاسترولاسیون و نقص در تخصصی شدن آندودرم می‌شود (Kijas *et al.*, 2012). ارتباط بین ژن FOXJ1 با عملکرد اسپرم و باروری در گوسفندان آفریقایی گزارش شده است (Dolebo *et al.*, 2019). ژن FOXA به عنوان یک عامل رونویسی پیشگام در عناصر قابل جابجایی برای فعال کردن تمایز سلول‌های بنیادی جنینی و به عنوان هدف تنظیم کروماتین‌های GF1 است. در توالی‌یابی کل ژنوم، ارتباط معنی‌داری بین SMAD2 با صفت تعداد بزغاله متولد شده در بزهای شیری با باروری بالا (سه بزغاله در هر زایش)

اؤزینوفیل‌ها، نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها در مراحل مختلف تکامل فولیکول در تخمدان تشکیل شده است. نوتروفیل‌ها نیز در مدولا و جسم زرد وجود دارند (Yuan *et al.*, 2019).

مسیر تحرک سلولی یک فرآیند ضروری است که در بسیاری از پدیده‌های زیستی دخیل است. مولکول‌ها و مسیرهای مختلفی با مهاجرت سلولی مرتبط شده‌اند، اما اطلاعات اندکی در مورد نحوه ادغام آن‌ها در زمان و مکان برای تنظیم فرآیند تحرک وجود دارد (Yadin *et al.*, 2016). تحرک سلولی برای بقا، حفظ و تمایز گامت‌ها ضرورت دارد. نقص در تحرک سلول‌های زایشی می‌تواند منجر به ناباروری شود (Knight *et al.*, 2006). تحرک سلولی برای موفقیت در لقاح و لانه‌گزینی ضروری است. تخمک‌ها نمی‌توانند به‌طور فعال حرکت کنند، زیرا به وسیله یک ساختار سخت متشکل از یک گلیکوپروتئین به نام زونا پلوسیدا پوشیده شده‌اند. تخمک رها شده به‌طور غیرفعال به وسیله جریان مجرای لوله‌ای تخمک‌گذاری با حرکات مژگانی اپیتلیوم، منتقل می‌شوند (Zhang *et al.*, 2017). شاید بتوان مسیرهای پاسخ دفاعی و تحرک سلولی را از مهم‌ترین مسیرهای مؤثر بر فرآیندهای تخمدان معرفی کرد. این مسیرها شامل اجزای سلولی هستند که یک ناحیه خاص اتصال را بین دو یا چند سلول یا بین سلول و ماتریکس خارج سلولی ایجاد می‌کند. در این مسیرها، پروتئین‌های واسطه جهت ارتباط دادن اسکلت سلولی یک سلول به اسکلت سلولی مجاور یا یک پروتئین در ماتریکس خارج سلولی، از سطح غشای پلاسمایی گسترش می‌یابند. اجزای سلولی میتوکندری، دستگاه گلژی و شبکه آندوپلاسمی، ارتباط تنگاتنگی با فرآیندهای تولیدمثلی دارند. برای بلوغ موفق و توسعه اووسیت، اندامک‌های سلولی در سیتوپلاسم اووسیت‌ها در طول بلوغ تحت تأثیر تغییرات فیزیولوژیکی قرار می‌گیرند و دستگاه گلژی و شبکه آندوپلاسمیک، ارتباط نزدیکی با بلوغ هسته و سیتوپلاسمی دارند (Yan *et al.*, 2019).

### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، داده‌های ژنومی یکی از نژادهای ارزشمند بومی ایران از نظر دوقلوژیایی بررسی شد. این مطالعه، پایه ژنتیکی مفیدی را فراهم می‌کند که به شناخت بهتر ژن‌ها و فرآیندهای درگیر در تولیدمثل گوسفندان بلوچی منجر

نقش دارد که خاموش کردن رونویسی و تنظیم ژن‌ها طی فرآیندهای تولیدمثلی (زمان لقاح) را کنترل می‌کنند. به همین دلیل نمی‌تواند در پارتنوز کامل (شکاف اووسیت تا برای تشکیل جنین بدون باروری با اسپرم) یا آندروژنز (رشد و توسعه جنین‌ها بدون مشارکت ژنتیکی از یک تخمک) منجر به رشد جنین زنده شود. فرآیندهای متیلاسیون هیستون‌ها، ویژگی‌های فرآیندهای تنظیمی را تعیین می‌کنند که بین ژنوم نر و ماده متفاوت است (Bonde *et al.*, 2016). همچنین نتایج تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن نشان داد که ژن‌های کاندیدا به‌طور معنی‌داری در مسیر macroautophagy (GO:0016236) غنی‌سازی می‌شوند. وزیکول درون‌سلولی دو غشایی در جداسازی و انتقال مواد به لیزوزوم نقش دارد (Feng *et al.*, 2014). در محیط تخمدان، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ماکرواتوفاژی برای ارتقای بقای تخمک ضرورت دارد. در طول مدت رشد جنین پستانداران، زمانی که تخمک‌ها وارد تقسیم میوز شده و در پروفاز I متوقف می‌شوند، این مرحله طولانی توقف چرخه سلولی، مسیر ماکرواتوفاژی، تخمک را در برابر آسیب‌های ناشی از عوامل مانند تنش اکسیداتیو، هیپوکسی، نوسانات حرارتی و محرومیت از مواد مغذی که آسیب‌پذیر هستند محافظت می‌کند. به عنوان مثال، Becn1 در تخمک خوک منجر به کاهش BECN1 و LC3B می‌شود که این منجر به افزایش آسیب DNA و اختلال در عملکرد میتوکندری می‌شود که در نهایت، ظرفیت رشد تخمک را به خطر می‌اندازد (Shen *et al.*, 2018). مسیر ماکرواتوفاژی می‌تواند نقش‌های دوگانه‌ای را در تخمدان ایفا کند که به موجب آن، نه تنها مسئول بقای تخمک است، اما می‌تواند باعث مرگ سلولی شود (Aldawood *et al.*, 2020).

از مسیرهای زیستی مهم مرتبط با تولیدمثل، پاسخ دفاعی بود که نشان‌دهنده نقش سیستم ایمنی در فرآیندهای تخمدان است. عمده ژن‌های این مسیر، انواع اینترفرون‌ها (آلفا، بتا، گاما و امگا) و اینترلوکین‌ها هستند. نقش اینترلوکین‌ها در عملکرد تخمدان و فرآیندهای تخمک‌ریزی در چندین بررسی گزارش شده است (Yadin *et al.*, 2016). تخمک‌گذاری فرآیند پیچیده‌ای است که طی آن، تخمک بالغ و سلول‌های سوماتیک با هم از فولیکول جدا شده و به داخل اویدوکت رها می‌شوند. تخمدان یک اندام ایمنی منحصر نیست و از مجموعه متنوعی از لوکوسیت‌ها شامل

پدیده‌های زیستی دخیل است. با توجه به عملکرد زیستی مسیرهای شناسایی شده در این پژوهش، به نظر می‌رسد دو ژن TGIF1 و ACVR1 شناسایی شده را می‌توان به عنوان ژن کاندید مرتبط با تعداد بره در هر زایش در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند بلوچی استفاده و مورد مطالعه نمود. این موضوع یافته‌های قبلی مرتبط با این صفت را بیش‌تر تأیید می‌کند و زمینه مطالعات بیشتر در رابطه با تعداد بره در هر زایش را فراهم می‌کند.

می‌شود. تعدادی ژن و مسیرهای زیستی که با تعداد بره در هر زایش و باروری به‌طور مستقیم و غیرمستقیم ارتباط داشتند شناسایی شدند. مسیر پاسخ دفاعی دارای نقش مهمی در نرخ تخمک‌گذاری و تعداد بره در هر زایش بود. پروتئین‌های ایجاد شده در این مسیر با ایجاد فرآیند التهابی سبب آزادسازی تخمک می‌شود. مسیر دیگری که در این پژوهش به‌طور معنی‌داری با بقا، حفظ، تمایز گامت‌ها، لقاح و لانه‌گزینی مرتبط بود مسیر تحرک سلولی بود. مسیر تحرک سلولی یک فرآیند ضروری است که در بسیاری از

### فهرست منابع

- Abasi-Mashei B., Rahimi-Mianji G. H., Nejati-Jawarami A., Moradi M. H. and Son K. 2017. Genomic scan for selection signature associated with mastitis in German Holstein cow. *Iranian Journal Animal Science*, 48: 453-461. (In Persian).
- Abdoli R., Zamani P., Mirhosseini S. Z., Ghavi Hossein-Zadeh N. and Almasi M. 2019. Genetic parameters and trends for litter size in Markhoz goats. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 32(1): 58-63.
- Aldawood N., Alrezaki A., Alanazi S., Amor N., Alwasel S. and Sirotkin A. 2020. Acrylamide impairs ovarian function by promoting apoptosis and affecting reproductive hormone release, steroidogenesis and autophagy-related genes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197: 110595-110599.
- Al-Lawama M., Albaramki J., Altamimi M. and El-Shanti H. 2019. Congenital glucose-galactose malabsorption: A case report with a novel SLC5A1 mutation. *Clinical Case Reports*, 7: 51-53.
- Akey J. M., Zhang G., Zhang K., Jin L. and Shriver M. D. 2002. Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genetics Research*, 12: 1805-1814.
- Bonde J. P., Flachs E. M., Rimborg S., Glazer C. H., Giwercman A., Ramlau-Hansen C. H. and Bräuner E. V. 2016. The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 23: 104-125.
- Dolebo A. T., Khayatizadeh N., Melesse A., Wragg D., Rekik M., Haile A., Rischkowsky B., Rothschild M. and Mwacharo J. M. 2019. Genome-wide scans identify known and novel regions associated with prolificacy and reproduction traits in a sub-Saharan African indigenous sheep (*Ovis Aries*). *Mammalian Genome*, 11: 339-352.
- Esmaili fard S. M., Hafezian S. H., Gholizadeh M. and Abdolahi Arpanahi R. 2019. Gene set enrichment analysis using genome-wide association study to identify genes and biological pathways associated with twinning in Baluchi sheep. *Animal Production Research*, 8(2): 63-80. (In Persian).
- Farhangfar H., Molaei M., Naeimipour H. 2007. Using the logistic regression model in estimating the phenotypic trend of twinning trait in Baluchi ewes of Abbas Abad Station, Mashhad. *Modern Genetics*, 3: 31-34. (In Persian).
- Fariello M. I., Servin B., Tosser-Klopp G., Rupp F. and Moreno C. 2014. Selection signatures in worldwide sheep populations. *International Sheep Genomics Consortium*, 8: 103813-103817.
- Gautier M. and Vitalis R. 2012. rehh: an R package to detect footprints of selection in genome-wide SNP data from haplotype structure. *Bioinformatics*, 8: 1176-1177.
- Gholizadeh M., Rahimi-Mianji G. H. and Nejati-Javaremi A. 2015. Genomewide association study of body weight traits in Baluchi sheep. *Journal of Genetics*, 94: 143-146.
- Jafaroghli M., Safari A., Shadparvar A. A. and N. Ghavi Hossein-Zadeh. 2019. Genetic analysis of ewe productivity traits in Baluchi sheep. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 9(4): 651-657.
- Kijas J. W., Lenstra J. A., Hayes B., Boitard S., Porto Neto L. R., San Cristobal M., Servin B., McCulloch R., Whan V. and Gietzen K. 2012. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS Biology*, 2: 100-118.
- Knight P. G. and Glister C. 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 14: 191-206.
- Kosgey L. S., Baker R. L., Udo H. M. J. and van Arendonk J. A. M. 2006. Success and failures of small ruminant breeding programmes in the tropics: A review. *Small Ruminant Research*, 61: 13-28.

- La Y., Liu Q., Zhang L. and Chu M. 2019. Single nucleotide polymorphisms in SLC5A1, CCNA1, and ABCC1 and the association with litter size in small-tail Han sheep. *Animals*, 7: 432-439.
- Ma H., Fang C., Liu L., Wang Q., Aniwashi J., Sulaiman Y. and Abudilaheman K. 2019. Identification of novel genes associated with litter size of indigenous sheep population in Xinjiang, China using specific-locus amplified fragment sequencing. *Peer Journal*, 26: 80-79.
- Manzari Z., Mehrabani-Yeganeh., Nejati-Javaremi H., Moradi M. H. and Gholizadeh M. 2019. Detecting selection signatures in three Iranian sheep breeds. *Animal Genetics*, 50: 298-302.
- McBride D., Carré W., Sontakke S. D., Hogg C. O. and Law A. 2012. Identification of miRNAs associated with the follicular-luteal transition in the ruminant ovary. *Reproduction*, 144: 221-233.
- Menezo Y. J., Silvestris E., Dale B. and Elder K. 2016. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: Two sides of the same coin in reproduction. *Reproduction*, 33: 668-683.
- Melé M., Ferreira P. G., Reverter F., DeLuca D. S., Monlong J., Sammeth M., Young T. R., Goldmann J. M., Pervouchine D. D. and Sullivan T. J. 2015. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science*, 348: 660-665.
- Moradi M. H., Nejati-Javaremi A., Moradi-Shahrbabak M., Dodds K. G. and 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*, 71: 1-19.
- Nosrati M., Asadollahpour-Naini H., Amiri Z. and Esmailzadeh A. 2018. Whole genome sequence analysis to detect signatures of positive selection for high fecundity in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 52: 358-364.
- Pasandideh M., Rahimi-Mianji G., Gholizadeh M. and Fontanesi L. 2017. Detection of genomic regions affecting reproductive traits in Baluchi sheep using high density markers. *Animal Production Research*, 6(3): 29-41. (In Persian).
- Pourtahmasebian Ahrabi M., Eskandarinasab M. P. and Zandi Baghcheh Maryam M. B. 2020. Estimation of genetic parameters and genetic trend of litter size in under selection flock of Afshari sheep. *Animal Production Research*, 9(2): 23-35.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M. A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P. I., Daly M. J. and Sham P. C. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81: 559-575.
- Rafati M., Mohamadhesh F., Hoseini A., Hoseininasab F. and Ghari S. R. 2016. A novel ACVR1 mutation detected by whole exome sequencing in a family with an unusual skeletal dysplasia. *European Journal of Medical Genetics*, 59: 330-336.
- Sabeti P. C., Schaffner S. F., Fry B., Lohmueller J., Varilly P., Shamovsky O., Palma A., Mikkelsen T. S., Altshuler D. and Lander E. S. 2007. Positive natural selection in the human lineage. *Science*, 312: 1614-1620.
- Shimizu T., Jayawardana B. C., Nishimoto H., Kaneko E., Tetsuka M. and Miyamoto A. 2006. A: Involvement of the bone morphogenetic protein/receptor system during follicle development in the bovine ovary: hormonal regulation of the expression of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) and its receptors (ActRII and ALK-2). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 249: 78-83.
- Taghizadeh K., Gholizadeh M., Moradi M. H. and Rahimi Mianji G. 2020. Investigation of copy number variation in Baluchi sheep genome using comparative analysis of PennCNV and QuantiSNP algorithms. *Animal Production Research*, 9(1): 29-44. (In Persian).
- Wang Y., Niu Zh., Zeng Zh., Jiang Y., Jiang Y., Ding Y., Tang S., Shi H. and Ding X. 2020. Using high-density SNP array to reveal selection signatures related to prolificacy in Chinese and Kazakhstan sheep breeds. *Animals*, 151: 16-33.
- Weir B. S. and Clark-Cockerham C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 36: 1358-1370.
- Xu S. S., Gao L., Xie X. L., Ren Y. L., Shen Z. Q., Wang F., Shen M., Eyþórsdóttir E., Hallsson J. H., Kiseleva T., Kantanen J. and Li M. H. 2018. Genome-Wide association analyses highlight the potential for different genetic mechanisms for litter size among sheep breeds. *Frontiers in Genetics*, 118: 452-459.
- Yadin D., Knaus P. and Mueller T. D. 2016. Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 27: 13-34.
- Yuan Z., Zhang J., Li W., Wang W., Li F. and Yue X. 2019. Association of Polymorphisms in Candidate Genes with the Litter Size in Two Sheep Breeds. *Animals*, 11: 263-271.
- Zhang Y. E. 2017. Non-Smad signaling pathways of the TGF- family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9: 56-71.
- Zhou M., Pan Z. Y., Cao X. H., Guo X. F., He X. Y., Sun Q. and Chu M. X. 2018. Single nucleotide polymorphisms in the HIRA gene affect litter size in Small Tail HanSheep. *Animal Science*, 71: 544-552.