

فرا تحلیل پویش کل ژنوم برای شناسایی شبکه‌های ژنی مرتبط با ماربلینگ در گاوهای گوشتی

چکیده

ماربلینگ یا رگه‌های چربی درون ماهیچه‌ای، یکی از شاخص‌های کلیدی کیفیت گوشت گاو است که بر طعم، آبداری و نرمی آن اثر مستقیم دارد و نقش مهمی در ارزش اقتصادی و بازاریابی محصول ایفا می‌کند. این مطالعه فراتحلیلی (متاآنالیزی) با هدف شناسایی شبکه‌های ژنی و نواحی ژنومی مرتبط با ماربلینگ در گاوهای گوشتی انجام شد. با استفاده از داده‌های پویش کل ژنوم (GWAS) و تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن‌ها، نواحی ژنومی و ژن‌های کاندید مؤثر بر این صفت بررسی شدند. داده‌ها از پایگاه‌های علمی معتبر جمع‌آوری و استانداردسازی شدند و با روش‌های آماری فیشر و استوفر تحلیل شدند تا قدرت آماری افزایش یابد. نتایج نشان داد که کروموزوم ۱۵، با ژن *CADM1* و بالاترین سطح معنی‌داری ($-\log_{10}(p) = 29.24$)، نقش اصلی را در تنظیم ماربلینگ ایفا می‌کند. کروموزوم‌های ۱، ۲، ۱۲، ۱۷، ۱۹ و ۲۴ نیز به‌عنوان نواحی کلیدی شناسایی شدند که شامل ژن‌های مرتبط با متابولیسم لیپید و سیستم ایمنی هستند. تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن‌ها، دو ژن محوری *CLEC12A* و *CD69* را در کروموزوم ۵ شناسایی کرد که در تنظیم مسیرهای بیولوژیکی شامل متابولیسم چربی، تنظیم ایمنی، سیگنال‌دهی سلولی و کنترل رونویسی نقش دارند. این شبکه با ساختار بدون مقیاس، پایداری و انعطاف‌پذیری بیولوژیکی را نشان داد. یافته‌های این مطالعه امکان توسعه نشانگرهای مولکولی برای انتخاب ژنومی هدفمند را فراهم می‌آورند که می‌تواند کیفیت گوشت را بهبود بخشد و رقابت‌پذیری صنعت گوشت را در بازارهای جهانی افزایش دهد. مطالعات آینده با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم و تحلیل‌های چند-اومیکس می‌توانند این نتایج را تکمیل کنند.

واژگان کلیدی: شبکه‌های ژنی، گاو گوشتی، ماربلینگ، متاآنالیز، پویش کل ژنوم (GWAS)

Meta-analysis of genome-wide association studies for identification of gene networks related to marbling in beef cattle

ABSTRACT

Marbling, or intramuscular fat, is a critical quality trait in beef cattle, directly influencing flavor, juiciness, and tenderness, and significantly contributing to the economic value and marketability of beef. This Meta-analysis aimed to identify genomic regions and gene networks associated with marbling in beef cattle. By integrating data from genome-wide association studies (GWAS) and gene coexpression network analyses, we investigated genomic regions and candidate genes affecting this trait. Data were collected from reputable scientific databases, standardized, and analyzed using Fisher's and Stouffer's statistical methods to enhance statistical power. The Results revealed that chromosome 15, harboring the *CADM1* gene with the highest significance level ($-\log_{10}(p) = 29.24$), plays a pivotal role in regulating marbling. Additionally, chromosomes 1, 2, 12, 17, 19, and 24 were also identified as key regions containing genes involved in lipid metabolism and immune response. Gene coexpression network analysis identified two hub genes, *CLEC12A* and *CD69*, on chromosome 5, which regulate biological pathways including lipid metabolism, immune regulation, cellular signaling, and transcriptional control. The observed scale-free network structure demonstrated biological stability and flexibility. These findings provide opportunities for developing molecular markers for targeted genomic selection, enhancing beef quality and increasing the global competitiveness of the beef industry. Future studies leveraging whole-genome sequencing and multi-omics analyses may further refine these results.

Keywords: Beef cattle, Gene networks, Genome-wide association study (GWAS), Marbling, Meta-analysis

مقدمه

از زمان پیدایش بشر، غذا و تغذیه یکی از مسائل مهم انسان بوده است، چه زمانی که بشر به صورت وحشی در بیابان‌ها زندگی می‌کرد و چه در حال حاضر، به کمک فناوری، فضای نامحدود را تسخیر کرده است (Eghtedari et al., 2024). موضوع غذا و تغذیه یکی از اصلی‌ترین مسائلی بوده که اندیشه بشر را به خود مشغول کرده است و با وجود اینکه بشر در عصر جدید توانسته در مراحل مختلف زندگی خود پیشرفت چشمگیری داشته باشد، همچنان مسئله غذا و تغذیه در جوامع انسانی از نظر اقتصادی و اجتماعی اولویت ویژه‌ای دارد. امروزه اهمیت تغذیه به حدی است که یکی از معیارهای مهم سطح تمدن و پیشرفت هر جامعه تلقی می‌شود. در توسعه همه جانبه یک جامعه، سطح سلامت روحی و جسمی افراد آن جامعه عامل تعیین‌کننده پرورش دام است (Eghtedari et al., 2025). دامپروری در اقتصاد یک کشور یکی از مهم‌ترین شاخه‌های اقتصادی محسوب می‌شود و از

اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. دامپروری شغل بسیار سودآوری است و وسیله‌ای برای رونق بخشیدن به اقتصاد کشورها محسوب می‌شود. بیشتر مردم دنیا به دامداری اشتغال دارند و از محصولات آن استفاده می‌کنند. علاوه بر این، گاوداری نقش مهمی دارد (Eghtedari *et al.*, 2024).

ماربلینگ یا رگه‌های چربی درون‌بافتی یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های کیفی گوشت قرمز به‌شمار می‌رود که اثر بسزایی بر طعم، آبداری، نرمی و پذیرش کلی محصول توسط مصرف‌کنندگان دارد (Reis *et al.*, 2024; Magalhães *et al.*, 2016; Killinger *et al.*, 2004). این صفت، که به میزان چربی داخل ماهیچه‌ای (Intramuscular Fat; IMF) اشاره دارد، به‌صورت رگه‌های سفید قابل‌مشاهده در بافت عضلانی ظاهر می‌شود و نقش کلیدی در ارزش اقتصادی و بازاریابی گوشت ایفا می‌کند (Kombolo *et al.*, 2023). چربی درون‌ماهیچه‌ای با افزایش نرمی و طراوت گوشت، تجربه حسی مطلوبی برای مصرف‌کننده فراهم می‌کند. همچنین، ترکیبات غیرفرار، اسیدهای چرب آزاد، اسیدهای فرار و ترکیبات آروماتیک آزاد شده طی فرآیند پخت، به ایجاد طعم و عطر متمایز گوشت کمک می‌کنند (Reis *et al.*, 2024). ماربلینگ یک صفت کمی و پلی‌ژنیک است که تحت کنترل چندین ژن با اثرات کوچک قرار دارد و از ساختار ژنتیکی پیچیده‌ای تأثیر می‌پذیرد (Bhuiyan *et al.*, 2018; Glazier *et al.*, 2002). وراثت‌پذیری این صفت در گاوهای گوشتی نسبتاً بالا و در محدوده ۰/۳۸ تا ۰/۴۹ گزارش شده است، که نشان‌دهنده نقش قابل‌توجه عوامل ژنتیکی در بروز و تنوع آن است (Bhuiyan *et al.*, 2018; Srikanth *et al.*, 2020). نمره ماربلینگ، که معمولاً در مقیاس ۱ تا ۹ ارزیابی می‌شود، در گاوهای هانوو (نژاد کره‌ای) به‌طور میانگین ۶/۱ با انحراف معیار ۱/۹ گزارش شده است (Srikanth *et al.*, 2020). تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که عوامل ژنتیکی، به‌ویژه در نژادهای مختلف گاوهای گوشتی، نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان و الگوی توزیع چربی درون‌ماهیچه‌ای دارند (Sasazaki *et al.*, 2024; Akanno *et al.*, 2018). این تنوع ژنتیکی، امکان بهبود هدفمند کیفیت گوشت از طریق برنامه‌های اصلاح نژادی را فراهم می‌سازد.

پوش کل ژنوم (Genome-Wide Association Studies; GWAS) ابزاری قدرتمند برای شناسایی مناطق ژنومی و ژن‌های کاندید مرتبط با صفات اقتصادی مهم مانند ماربلینگ ارائه می‌دهند (Taye *et al.*, 2017; Srikanth *et al.*, 2020). این روش با بررسی همبستگی بین فراوانی آللی پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) و صفات فنوتیپی، اطلاعات ارزشمندی درباره ژن‌های دخیل در رشد عضلانی، متابولیسم لیپید و کیفیت گوشت فراهم می‌کند (Reis *et al.*, 2005; Hirschhorn & Daly, 2005). GWAS امکان شناسایی SNP‌های مرتبط با ژن‌های اثرگذار بر ماربلینگ را فراهم کرده و درک عمیق‌تری از مکانیسم‌های بیولوژیکی این صفت و فهرستی از ژن‌های کاندید برای نقشه‌برداری دقیق‌تر ارائه می‌دهد (Magalhães *et al.*, 2016). با توجه به ماهیت پلی‌ژنیک ماربلینگ و تأثیر چندین جایگاه ژنی با اثرات کوچک، استفاده از نمونه‌های بزرگ و قدرت آماری بالا در این مطالعات ضروری است (Glazier *et al.*, 2002). از سوی دیگر، اندازه‌گیری مستقیم ماربلینگ به‌دلیل هزینه‌بر بودن و نیاز به کشتار دام، چالش‌هایی را در اعمال روش‌های انتخاب سنتی ایجاد می‌کند (Magalhães *et al.*, 2016).

فراتحلیل GWAS رویکردی مؤثر برای ادغام نتایج چندین مطالعه مستقل است که به شناسایی جامع‌تر جایگاه‌های کنترل‌کننده صفات (Quantitative Trait Loci; QTL) مرتبط با ماربلینگ کمک می‌کند (McKenna *et al.*, 2010). این روش با افزایش قدرت آماری و کاهش احتمال خطای نوع اول، امکان تشخیص اثرات ژنتیکی کوچک‌تر را که در مطالعات منفرد ممکن است نادیده گرفته شوند، فراهم می‌سازد (Bhuiyan *et al.*, 2018; Wang & Xu, 2019). علاوه بر این، استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل‌ژنوم در مطالعات GWAS، بینش‌های نوینی درباره معماری ژنتیکی صفات کیفی گوشت ارائه داده است (Leal-Gutiérrez *et al.*, 2020). تاکنون، این مطالعات QTL‌های مهمی را برای ماربلینگ شناسایی کرده‌اند که ژن‌های کلیدی دخیل در متابولیسم لیپید و توسعه بافت عضلانی را مشخص می‌کنند (Taye *et al.*, 2017). این یافته‌ها نه‌تنها درک دقیق‌تری از مکانیسم‌های

زیستی تنظیم‌کننده رسوب چربی درون ماهیچه‌ای ارائه می‌دهند، بلکه در طراحی برنامه‌های اصلاح نژادی برای بهبود کیفیت گوشت نیز کاربرد دارند (Pickrell et al., 2009).

پروتئوگلیکان‌های موجود در اسکلت عضلانی نیز نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای میوزنز و توسعه بافت چربی بین ماهیچه‌ای ایفا می‌کنند (Brandan & Gutierrez, 2013; Velleman, 2012). بررسی دقیق‌تر مسیرهای بیولوژیکی و متابولیکی دخیل در تنظیم کیفیت گوشت می‌تواند به توسعه استراتژی‌های پیشرفته‌تر انتخاب ژنومی برای افزایش ماربلینگ کمک کند (Arikawa et al., 2024). این پیشرفت‌ها امکان طراحی روش‌های انتخاب مولکولی دقیق‌تر و کارآمدتر را فراهم می‌آورند که نه تنها کیفیت گوشت را بهبود می‌بخشند، بلکه به ثبات و گسترش بازارهای صادراتی گوشت نیز کمک می‌کنند (Magalhães et al., 2016; Lee et al., 2011). با توجه به این زمینه، هدف این مطالعه ادغام داده‌های ژنومی با استفاده از رویکردهای پیشرفته یادگیری ماشینی است تا شبکه‌های ژنی و نشانگرهای زیستی مرتبط با ماربلینگ در گاوهای گوشتی با دقت بیشتری شناسایی شوند. این رویکرد نه تنها قدرت آماری مطالعات را افزایش می‌دهد، بلکه راهبردهای انتخاب ژنومی را برای ارتقای کیفیت گوشت بهینه‌سازی می‌کند. انتظار می‌رود نتایج این مطالعه به بهبود برنامه‌های اصلاح نژادی و افزایش رقابت‌پذیری صنعت گوشت در بازارهای جهانی کمک کند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و انتخاب داده‌ها

در این پژوهش، برای شناسایی نواحی ژنومی مؤثر بر صفت ماربلینگ در گاوهای گوشتی، رویکرد فراتحلیلی با بهره‌گیری از داده‌های ژنومی حاصل از مطالعات پیشین به کار گرفته شد. ابتدا، جستجوی جامعی در پایگاه‌های داده علمی معتبر شامل Scopus, Web of Science, PubMed و Google Scholar با استفاده از کلیدواژه‌های مرتبط مانند ("marbling", "intramuscular fat", "GWAS", "cattle") انجام شد. معیارهای ورود به مطالعه شامل مقالات اصیل منتشرشده در بازه زمانی ۲۰۱۰ تا ۲۰۲۵؛ تمرکز بر نژادهای مختلف گاوهای گوشتی؛ گزارش ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) و صفات اقتصادی مرتبط با ماربلینگ، و ارائه داده‌های دقیق مانند حجم نمونه، موقعیت ژنومی و مقادیر p-value بود. در آخر ۱۴ مطالعه برای این صفت مورد بررسی قرار گرفت، همچنین کشورهایی که در مورد این نژادها تحقیقات انجام داده‌اند، در (جدول ۱) آمده‌اند.

جدول ۱. خلاصه کشور و نژادهای مورد بررسی در مطالعه ماربلینگ گوشت گاو

کشور	نژاد
Canada	multi-breed (Angus, Charolais, PG1, Kinsella Composite, Elora crossbred, Hereford, Simmental, Limousine, Piedmontese)
South Korea	Hanwoo
Australia	multi-breed (Taurine, Indicine)
China	Simmenta / Chinese Simmenta
United States	Brangus (Angus + Brahman)
Japan	Japanese Black
Russia	Angus

استخراج و استانداردسازی داده‌ها

پس از غربالگری و انتخاب مقالات واجد شرایط، داده‌های کلیدی شامل صفت مورد مطالعه، شناسه SNP، شماره کروموزوم، موقعیت ژنومی، حجم نمونه، ژن‌های کاندید و مقادیر p-value استخراج شدند. این داده‌ها در قالب فرم استاندارد در نرم‌افزار

Microsoft Excel ثبت گردیدند. نمودارهایی که داده‌های عددی مستقیم ارائه نداده بودند، از ابزار WebPlotDigitizer (نسخه ۴/۶) برای استخراج دقیق مقادیر استفاده شد. به‌منظور افزایش قابلیت مقایسه و دقت تحلیل‌ها، داده‌های استخراج‌شده استانداردسازی شدند. این فرآیند شامل موارد زیر بود:

تبدیل موقعیت‌های ژنومی به نسخه مرجع گاوی UMD3.1؛ یکسان‌سازی نام‌گذاری صفات برای جلوگیری از ناهماهنگی؛ و محاسبه مجدد مقادیر p-value در مواردی که به‌صورت $-\log_{10}(p\text{-value})$ گزارش شده بودند. داده‌های ناقص یا غیرقابل استانداردسازی (مانند مواردی با اطلاعات ناکافی درباره موقعیت ژنومی یا حجم نمونه) از تحلیل‌ها حذف شدند تا کیفیت داده‌های ورودی حفظ شود.

سازمان‌دهی و خوشه‌بندی داده‌ها

داده‌های استانداردشده ابتدا بر اساس شماره کروموزوم و سپس بر اساس موقعیت ژنومی مرتب شدند. برای شناسایی مناطق متراکم SNP های معنی‌دار، فواصل ژنومی (intervals) بر اساس نزدیکی فیزیکی SNP ها و شباهت مقادیر p-value تعریف شدند. SNP هایی که فاصله‌ای کمتر از ۵۰۰۰ کیلوباز از یکدیگر داشتند، در یک فاصله واحد قرار گرفتند. برای هر فاصله، اطلاعات زیر ثبت شد:

موقعیت شروع و پایان فاصله؛ تعداد SNP های موجود در فاصله؛ و میانگین p-value برای SNP های داخل فاصله.

فرا تحلیل و ترکیب نتایج

به‌منظور افزایش قدرت آماری، مقادیر p-value هر فاصله با استفاده از دو روش فراتحلیلی فیشر (Fisher's method) و استوفر (Stouffer's method) با استفاده از نرم‌افزار R (نسخه ۴.۴.۱) ترکیب شدند (Hong & Park et al., 2012).

روش فیشر : مسیرهای عملکردی که حاوی ژن‌های معنی‌دار بودند با استفاده از رابطه زیر تحلیل شدند.

$$p_value = 1 - \sum_{i=1}^{k-1} \frac{\binom{s}{i} - \binom{N-s}{m-i}}{\binom{N}{m}} \quad (\text{رابطه ۱})$$

در این رابطه، k برابر با تعداد ژن‌های معنی‌دار در طبقه عملکردی، S برابر با تعداد کل ژن‌های معنی‌دار مرتبط با صفت مورد بررسی، N برابر با کل تعداد ژن‌هایی که در این مطالعه آنالیز شدند و m برابر با تعداد کل ژن‌های موجود در مسیر عملکردی است. تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی با استفاده از بسته goseq (Young et al., 2010) در محیط R انجام شد.

روش استوفر : در این روش، مقادیر p-value ژن‌های موجود در هر مسیر عملکردی به مقادیر Z تبدیل شدند و Z کلی مسیر با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$Z_{combined} = \frac{\sum_{i=1}^k w_i Z_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^k w_i^2}} \quad (\text{رابطه ۲})$$

در این رابطه، Z_i معکوس نرمال مقدار p ژن i ام، w_i وزن مورد استفاده برای هر ژن (معمولاً برابر با ۱ فرض می‌شود)، و k تعداد ژن‌های موجود در مسیر عملکردی است. مقدار نهایی p -value هر مسیر عملکردی با توجه به Z کلی ترکیب‌شده بر اساس توزیع نرمال محاسبه می‌شود:

$$p_{\text{pathway}} = 1 - \Phi Z_{\text{combined}} \quad (\text{رابطه ۳})$$

که در آن Φ تابع توزیع تجمعی نرمال استاندارد است (Whitlock, 2005).

خروجی‌های این مرحله شامل p -value ترکیبی و مقدار $-\log_{10}(p\text{-value})$ برای هر روش بود. این رویکرد امکان شناسایی اثرات ژنتیکی کوچک‌تر را که در مطالعات منفرد قابل تشخیص نبودند، فراهم کرد.

تحلیل ژن‌های کاندید و تعاملات ژنی

ژن‌های کاندید واقع در فواصل ژنومی معنی‌دار شناسایی و فهرست شدند. این ژن‌ها با استفاده از پایگاه داده STRING (نسخه ۱۲/۰) و با تمرکز بر گونه *Bos taurus* تحلیل شدند. در این تحلیل، تعاملات ژنی با حداقل امتیاز تعامل متوسط (medium confidence) بررسی شدند (Szkarczyk et al., 2025). این اطلاعات به درک بهتر شبکه‌های ژنی مرتبط با ماربلینگ کمک کرد.

تجسم نتایج

برای تجسم توزیع مناطق ژنومی معنی‌دار، نمودارهای منتهن با استفاده از نرم‌افزار R (نسخه ۴.۴.۱) و بسته ggplot2 رسم شدند. این نمودارها مقادیر $-\log_{10}(p\text{-value})$ برای p -value های اصلی و ترکیبی به روش استوفر را در محور عمودی و موقعیت‌های ژنومی را در محور افقی نمایش دادند. خط آستانه معنی‌داری در مقدار $-\log_{10}(p\text{-value}) = 8$ تنظیم شد. مقایسه این نمودارها تأثیر فراتحلیل را در افزایش حساسیت و شناسایی مناطق ژنومی جدید نشان داد.

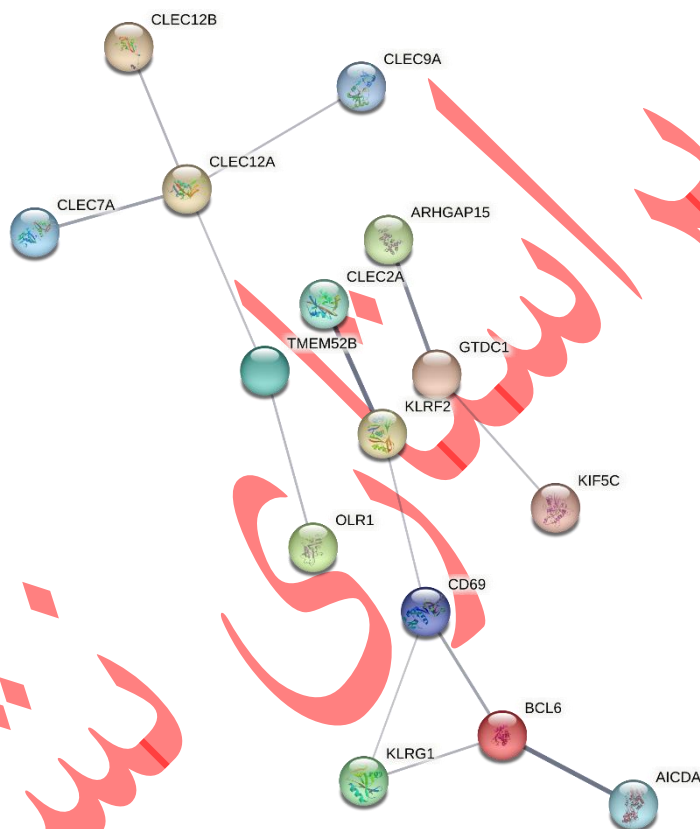
تحلیل حساسیت

برای ارزیابی پایداری نتایج، تحلیل حساسیت با تغییر آستانه‌های معنی‌داری مانند ۹ و ۷ $-\log_{10}(p\text{-value})$ و پارامترهای فاصله‌یابی، به منظور کاهش اثرات احتمالی linkage disequilibrium (LD) و تفکیک دقیق‌تر جایگاه‌های QTL، SNP‌هایی که فاصله آن‌ها کمتر از ۵۰۰۰ کیلوباز بوده و دارای الگوی معناداری مشابه در مقادیر p -value بودند، در فواصل ژنومی (intervals) گروه‌بندی شدند. این دسته‌بندی تا حد زیادی از اثرات تجمع SNP‌های همبسته جلوگیری کرده و استنباط‌های فراتحلیل را دقیق‌تر ساخت. هرچند حذف کامل SNP‌های در ارتباط بالا به دلیل پیچیدگی‌های ساختاری و محدودیت‌های داده‌ها امکان‌پذیر نبود، این رویکرد مهم باعث کنترل اثر LD محسوب می‌شود. تحقیقات آتی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم و روش‌های دقیق‌تر کنترل LD امکان پیشرفت بیشتر در این زمینه را فراهم خواهند کرد. همچنین، درصد افزایش قدرت آماری و میانگین افزایش $-\log_{10}(p\text{-value})$ در مقایسه با مطالعات منفرد محاسبه شد تا تأثیر فراتحلیل بر دقت نتایج ارزیابی شود.

نتایج و بحث

اهمیت ماربلینگ و تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن‌ها

ماربلینگ گوشت گاو، به عنوان یکی از شاخص‌های کلیدی کیفیت و ارزش اقتصادی گوشت، تحت کنترل شبکه‌ای پیچیده از ژن‌ها قرار دارد (Lim et al., 2014). برای درک مکانیسم‌های مولکولی این صفت کیفی، تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن‌ها (Gene Coexpression Network) به کار گرفته شد. این رویکرد سیستمی، برخلاف بررسی ژن‌های منفرد، امکان شناسایی تعاملات پیچیده ژنتیکی و ژن‌های محوری (Hub Genes) مرتبط با ماربلینگ را فراهم می‌کند. چنین تحلیلی برای توسعه استراتژی‌های اصلاح نژادی هدفمند، که به بهبود کیفیت گوشت منجر می‌شود، ضروری است. با استفاده از سایت STRING، شبکه برهم کنش پروتئین مرتبط با ماربلینگ رسم شد (شکل ۱).



شکل ۱. تحلیل ارتباطات پروتئینی و شبکه تعامل ژنی مرتبط با ماربلینگ گوشت گاو

ژن‌های محوری کلیدی

تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن‌ها منجر به شناسایی دو ژن محوری کلیدی با نقش تنظیمی برجسته در کنترل ماربلینگ شد. ژن *CLEC12A* به عنوان اصلی‌ترین ژن محوری شبکه شناسایی شد که با تعداد زیادی از ژن‌ها، از جمله *CLEC7A*، *CLEC12B*، *CLEC9A* و *TMEM52B*، تعامل مستقیم دارد. این ژن، که متعلق به خانواده لکترین‌های نوع C است، به عنوان تنظیم‌کننده مرکزی در چندین مسیر بیولوژیکی عمل می‌کند. ژن *CD69* نیز به عنوان ژن محوری ثانویه شناسایی شد که با ژن‌هایی نظیر *BCL6* و *KLRG1* تعامل دارد. این ژن، که یک گلیکوپروتئین غشایی است، در فعال‌سازی سلول‌های ایمنی و تنظیم پاسخ‌های التهابی نقش مهمی ایفا می‌کند (Wang et al., 2022).

خوشه‌های عملکردی ژن‌ها

تحلیل شبکه ژنی نشان داد که ژن‌های مرتبط با ماربلینگ در سه خوشه عملکردی اصلی سازمان‌یافته‌اند که هر کدام مسئولیت‌های متمایزی در تنظیم این صفت دارند. خوشه متابولیسم چربی شامل ژن‌هایی مانند *GTDC1*، *KLRF2* و *OLR1* است که مستقیماً در فرآیندهای متابولیسم لیپید دخیل هستند، به‌طوری که ژن *OLR1* به‌عنوان گیرنده لیپوپروتئین‌های کم‌چگالی اکسیدشده، نقش کلیدی در جذب و پردازش چربی‌ها ایفا می‌کند (Lim et al., 2014). در ارتباط با این خوشه، خوشه تنظیم سلولی شامل ژن‌های *ARHGAP15* و *CLEC2A* عمل می‌کند که در سیگنال‌دهی درون‌سلولی و تنظیم فعالیت‌های سلولی نقش دارند (Hudson et al., 2020)، در حالی که خوشه کنترل رونویسی شامل ژن‌های *BCL6* و *AICDA* در تنظیم بیان ژن و فرآیندهای رونویسی دخیل است (Tian et al., 2024)، این خوشه‌ها از طریق چهار مسیر بیولوژیکی کلیدی عمل می‌کنند: تنظیم سیستم ایمنی که توسط ژن‌های خانواده CLEC و گیرنده‌های سلول‌های کشنده نظیر *KLRG1* و *KLRF1* کنترل شده و در تنظیم پاسخ‌های ایمنی بافت عضلانی نقش دارد (Wang et al., 2025)، پردازش چربی که توسط *OLR1* و ژن‌های متابولیک مرتبط تنظیم می‌شود و مستقیماً در سنتز و ذخیره چربی درون‌ماهیچه‌ای دخیل است (Nguyen et al., 2021)، سیگنال‌دهی سلولی که شامل *ARHGAP15* و پروتئین‌های ترانس‌ممبرانی بوده و ارتباطات بین‌سلولی و درون‌سلولی را تنظیم می‌کند (Lim et al., 2014)، و در نهایت کنترل رونویسی که توسط *BCL6* و فاکتورهای تنظیمی مرتبط هدایت شده و بیان ژن‌های هدف را کنترل می‌کند (Tian et al., 2024).

توپولوژی شبکه

ساختار شبکه ژنی از الگوی بدون مقیاس (Scale-Free) تبعیت می‌کند که مشخصه شبکه‌های بیولوژیکی پیچیده است. در این ساختار، تعداد محدودی از ژن‌ها (مانند *CLEC12A* و *CD69*) دارای اتصالات متعدد هستند و به‌عنوان ژن‌های محوری عمل می‌کنند، در حالی که اکثر ژن‌ها اتصالات کمتری دارند. این الگو، سازمان‌دهی سلسله‌مراتبی شبکه را نشان می‌دهد که در آن سیگنال‌ها از ژن‌های محوری به ژن‌های هدف از طریق آبشارهای تنظیمی منتقل می‌شوند. این ساختار، پایداری و انعطاف‌پذیری شبکه را در پاسخ به تغییرات محیطی و فیزیولوژیکی تضمین می‌کند (Barabási & Oltvai, 2004).

مفاهیم بیولوژیکی برای ماربلینگ

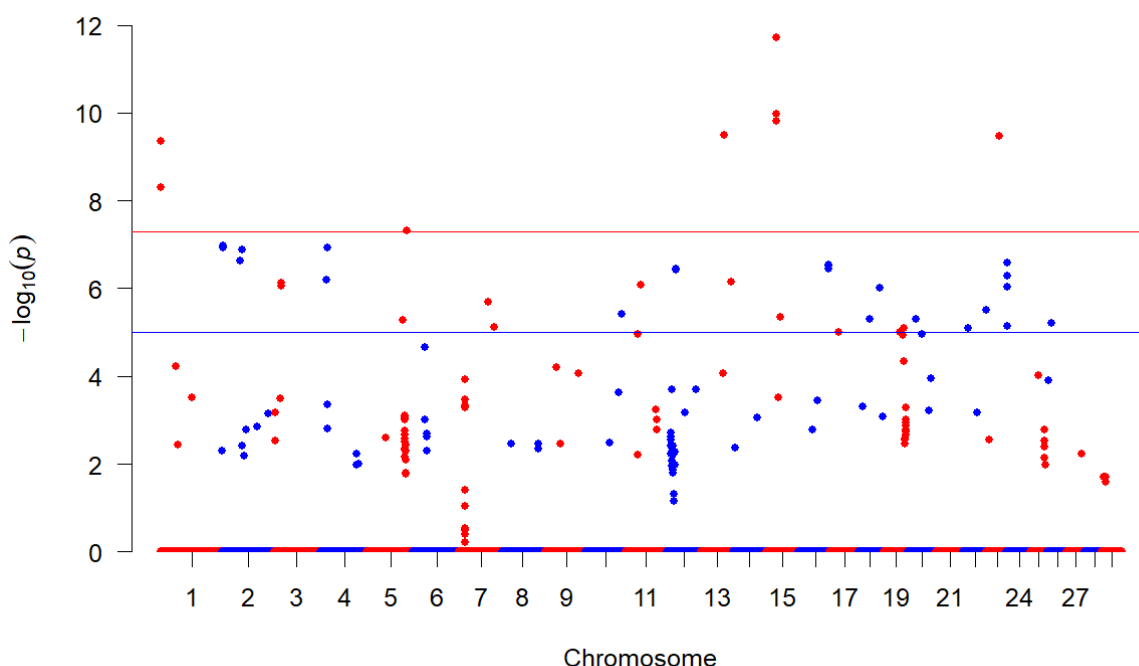
شبکه ژنی شناسایی‌شده، مکانیسم‌های مولکولی پیچیده‌ای را آشکار کرد که ماربلینگ گوشت گاو را تنظیم می‌کنند. مسیرهای آدیپوژنز، که توسط این شبکه کنترل می‌شوند، توسعه سلول‌های چربی درون‌ماهیچه‌ای را هدایت کرده و به تشکیل الگوهای ماربلینگ در بافت عضلانی منجر می‌شوند. تنظیم التهابی، که توسط ژن‌های ایمنی مانند *CLEC12A* و *CD69* کنترل می‌شود، تعادل بین التهاب و بازسازی بافت را حفظ می‌کند که برای رسوب مناسب چربی ضروری است. همچنین، هماهنگی متابولیک بین رسوب چربی و توسعه عضلانی توسط این شبکه تضمین می‌شود و به بهبود کیفیت گوشت کمک می‌کند (Zhang & Horvath, 2005).

خصوصیات آماری شبکه ژنی مورد مطالعه، ویژگی‌های ساختاری مهمی را نشان می‌دهد که عملکرد بیولوژیکی بهینه را تضمین می‌کند. تراکم متوسط شبکه، نشان‌دهنده تعاملات انتخابی و هدفمند بین ژن‌ها است که از تداخل غیرضروری جلوگیری می‌کند (Salleh et al., 2018)، و این ویژگی با ضریب خوشه‌بندی بالای شبکه تقویت می‌شود که وجود ماژول‌های عملکردی مشخص را تأیید کرده و تنظیم مستقل فرآیندهای بیولوژیکی را ممکن می‌سازد (Barabási & Oltvai, 2004). علاوه بر این، کوتاه بودن میانگین طول مسیرهای بین ژن‌ها، انتقال سریع و کارآمد سیگنال‌ها را در شبکه تضمین می‌کند که برای پاسخ‌دهی به موقع به

تغییرات فیزیولوژیکی ضروری است (Watts & Strogatz, 1998)، بنابراین این پارامترهای آماری در مجموع نشان‌دهنده ساختار شبکه‌ای هستند که قابلیت تنظیم دقیق و کارآمد فرآیندهای مرتبط با ماربلینگ را دارد.

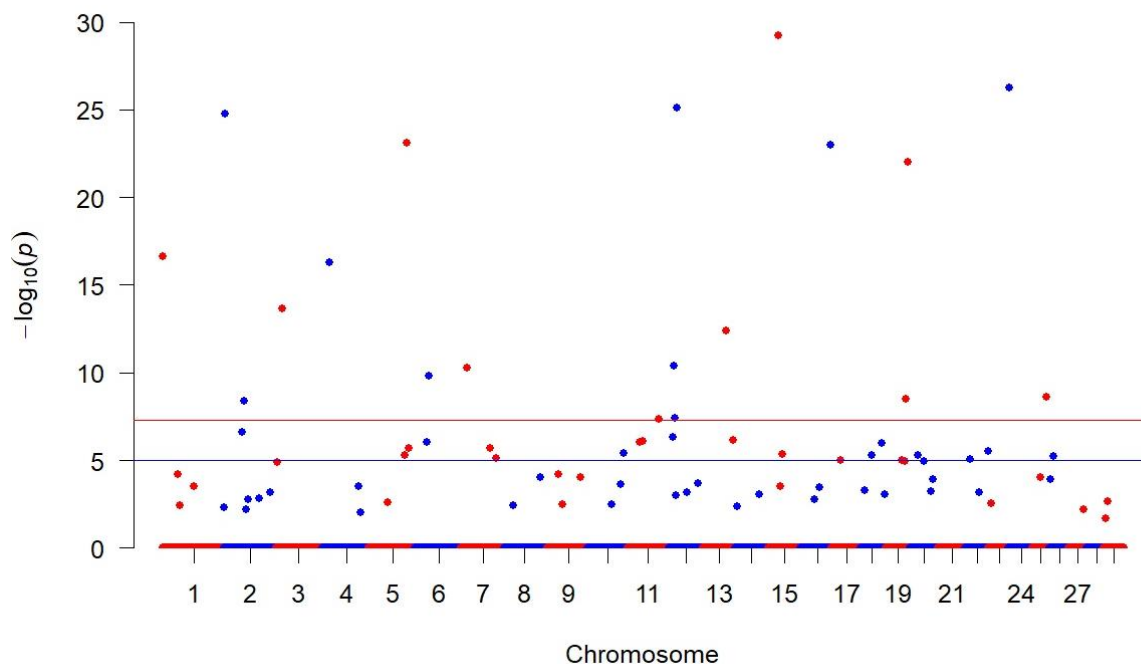
تحلیل نمودارهای منهتن

نمودارهای منهتن (Manhattan Plots) به عنوان ابزاری کلیدی در پویش کل ژنوم (GWAS) برای نمایش نتایج آماری ژنوتایپینگ استفاده شدند. این نمودارها مقادیر $-\log_{10}(p)$ را در برابر موقعیت‌های کروموزومی نشان می‌دهند، به طوری که نقاط بالاتر، نشان‌دهنده ارتباطات آماری قوی‌تر هستند. خط آستانه معنی‌داری در سطح $p < 10^{-8}$ معادل تعریف شد (شکل ۲).



شکل ۲. منهتن پلات نتایج $-\log_{10}(p)$ های گزارش شده از مطالعات قبلی

در شکل ۲، الگوی توزیع مشخصی از سیگنال‌های معنی‌دار مشاهده شد. بیشترین سیگنال‌های معنی‌دار در کروموزوم‌های ۱ و ۱۵ با مقادیر $-\log_{10}(p)$ در محدوده ۱۰ تا ۱۲ قرار داشتند. کروموزوم ۱۳ نیز پیک قابل توجهی با مقدار تقریبی $-\log_{10}(p)$ نشان داد. اکثر کروموزوم‌ها دارای نقاط پراکنده‌ای بودند که زیر آستانه معنی‌داری $-\log_{10}(p) = 5$ قرار داشتند، در حالی که کروموزوم‌های ۵ و ۷ سیگنال‌های متوسطی در محدوده $-\log_{10}(p) = 6-8$ نشان دادند. تحلیل ترکیبی (فراتحلیل) در شکل ۳ تفاوت‌های چشمگیری را نسبت به شکل ۲ نشان داد. در این تحلیل، پیک‌های قوی‌تری مشاهده شد که بالاترین آن‌ها در کروموزوم ۱۵ با مقدار $-\log_{10}(p) = 29/24$ ثبت شد. کروموزوم‌های ۲، ۱۲، ۱۷، ۱۹ و ۲۴ نیز پیک‌های معنی‌داری در محدوده $-\log_{10}(p) = 20-27$ ارائه دادند. این تحلیل منجر به شناسایی تعداد بیشتری از نواحی ژنومی معنی‌دار شد و با کاهش نویز، دقت تشخیص جایگاه‌های کنترل‌کننده صفات (QTL) واقعی را افزایش داد.



شکل ۳. نمودار منتهن نتایج تحلیل ترکیبی فراتحلیل

موقعیت‌های ژنومی کلیدی

جدول ۲، خلاصه‌ای از موقعیت‌های ژنومی معنی‌دار مرتبط با ماربلینگ را ارائه می‌دهد که از طریق تحلیل آماری روش استوفر (Stouffer's Method) شناسایی شدند.

جدول ۲. خلاصه موقعیت‌های ژنومی مهم به دست آمده، مرتبط با ماربلینگ گوشت گاو

ژن کاندید	لوکاریتیم‌های ترکیب شده به روش استوفر	پایان (کیلو باز)	شروع (کیلو باز)	کروموزم
<i>MRPS6</i>	۱۶/۶۱	۷۲۴	۶۱۹	۱
<i>SFT2D3, LIMS2</i>	۲۴/۷۶	۴۷۸۳	۴۷۵۸	۲
<i>ARHGAP15, GTDC1</i>	۸/۳۹	۵۴۷۷۳	۵۳۵۰۷	۲
<i>S100A10, PRCC</i>	۱۳/۶۶	۱۸۸۳۲	۱۵۴۸۱	۳
<i>NXPH1, ICA1</i>	۱۶/۳۹	۱۸۵۲۰	۱۷۲۳۱	۴
<i>GABARAPL1, TMEM52B, OLR1, CLEC7A, CLEC1A CLEC9A, CLEC1B, CLEC12B CLEC12A, CLEC2A, KLRF2 7SK, KLRF1, CD69, CLECL1P, KLRB1, OVOS2, A2ML1 RIMKLB, MFAP5, AICDA, A2M, KLRG1, M6PR, PHC1 APOBEC1, DPPA3, NANOG, SLC2A3, FOXJ2, C3AR1 NECAP1, CLEC4A CLEC6A, CLEC4E, CLEC4D, CD163 WC-7, WC1-12</i>	۲۳/۰۷	۱۰۱۶۸۷	۹۹۷۵۱	۵
<i>PPM1K, ABCG2, PKD2</i>	۹/۸۲	۳۷۴۳۹	۳۷۲۸۸	۶
<i>RDH8, ANGPTL6, DNMT1, MRPL4, ICAM1 ICAM2, ICAM3, ICAM4, ICAM5, ICAM6 ICAM7</i>	۱۰/۲۵	۱۶۰۸۹	۱۵۸۲۱	۷
<i>ATP7B,ALG11,NEK5, FREM2, NEK3,CKAP2,VPS36,THSD1</i>	۲۵/۱۲	۲۳۲۷۸	۲۱۳۷۱	۱۲
<i>DGKH, AKAP11, TNFSF11, FAM216B, EPSTI1, LACC1, DNAJC15, ENOX1, CCDC122, SERP2, TSC22D1, NUFIP1, GPALPP1, GTF2F2, KCTD4</i>	۱۰/۳۹	۱۴۶۸۰	۱۲۳۳۶	۱۲
<i>CASS4, CSTF1, AURKA, FAM210B, MC3R SIRPD, NSFL1C, FKBP1A, SDCBP2, SNPH RAD21L1, TMEM74B, PSMF1, RSPO4 ANDPT4, DAM110A, SLC52A3, SRXN1, TCF15, LOC783163, C13H20orf8</i>	۱۲/۳۹	۶۰۵۴۵	۵۸۱۴۰	۱۳

۱۵	۲۶۹۳۹	۲۷۰۰۶	۲۹/۲۴	CADM1
۱۶	۷۸۵۵۸	۷۸۵۶۲	۲۲/۹۹	bta-mir-2284n
۱۹	۵۶۲۱۷	۵۸۸۳۸	۲۲/۰۰	SLC25A19, MIF4GD, MRPS7, GGA3, NUP85, SUMO2, JPT1 NT5C, ARMC7, SLC16A5, MRPL58, CDR2L, HID1, OTOP3, RPL38, 7SK, SLC39A11, SOX9 OTOP2, USH1G, FADS6, FDXR, GRIN2C, TMEM104, NAT9 NHERF1, U6, RAB37, CD300E, CD300LB, CD300A GPRC5C, GPR142, BTBD17, KIF19, DNAI2, TTYH2 SDK2, CDC42EP4, C19H17orf80, FAM104A, COG1, SSTR2
۱۹	۵۳۲۴۰	۵۳۸۳۲	۸/۵۱	RBOX3, ENGASE, CANT1, LGALS3BP, CYTH1, PGS1 THA1, TMC6, TMC8, BIRC5, TIMP2, C1QTNF1 CEP295NL USP36, DNAH17, SOCS3, AFMID, TK1 TMEM235, SYNGR2 CDC2, NRSN1, PRP1, PRP2 PRP3, PRP4, PRP6, PRP7, PRP14, PRL, CSH2 HDGFL1
۲۴	۱۹۸۴	۲۳۰۲	۲۶/۲۳	GALR1
۲۵	۳۶۴۸۸	۳۷۸۱۳	۸/۶۲	CYP3A28, SNORA70, CYP3A74, CYP3A76, CYP3A24 PTCD1, BUD31, PDAP1, ARPC1B, ARPC1A, KPNA7 SMURF1, LMTK2, CCZ1, TRIM4, OR2AE1

نتایج تحلیل ترکیبی نشان داد که ۱۷ منطقه ژنومی معنی دار در ۱۴ کروموزوم مختلف، با مقادیر $-\log_{10}(p)$ ترکیبی (روش استوفر) در محدوده ۸/۳۹ تا ۲۹/۲۴ شناسایی شدند. برجسته ترین یافته، ژن *CADM1* در کروموزوم ۱۵ با بالاترین سطح معنی داری $-\log_{10}(p) = ۲۹/۲۴$ بود. همچنین، خوشه بزرگی از ژن های مرتبط با سیستم ایمنی در کروموزوم های ۵ و ۱۹ شناسایی شد که نقش مهمی در تنظیم ماربلینگ ایفا می کنند. این نتایج، مجموعه ای از ژن های کاندید را برای استفاده در برنامه های اصلاح نژادی به منظور بهبود صفت ماربلینگ ارائه می دهند.

bta-miR-2284n همبستگی مثبتی با مازول p-D نشان می دهد، که به طور کلی در مورد miRNAهایی که مسیرهای مهم برای رشد عضلانی و متابولیسم چربی را هدف قرار می دهند، بحث می کند (MacPhillamy et al., 2023). فراتحلیل در مقایسه با مطالعات منفرد، مزایای قابل توجهی در شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با صفت ماربلینگ گوشت گاو ارائه می دهد. این روش با افزایش حجم نمونه مؤثر از طریق ادغام داده های مطالعات مختلف، قدرت آماری را به طور چشمگیری بهبود بخشیده است. ترکیب داده ها همچنین به کاهش خطاهای تصادفی و اثرات ناهمگونی بین مطالعات کمک کرده و امکان شناسایی نواحی ژنومی را فراهم آورده که در مطالعات منفرد به دلیل محدودیت های آماری معنی دار نبودند (Bhuiyan et al., 2018; Wang & Xu, 2019). این رویکرد، با تقویت سیگنال های ژنتیکی و کاهش نویز، دقت تشخیص جایگاه های کنترل کننده صفات (QTL) مرتبط با ماربلینگ را افزایش داده است.

نتایج تحلیل ترکیبی نشان داد که کروموزوم ۱۵ قوی ترین سیگنال را با مقدار $-\log_{10}(p) = ۲۹/۲۴$ ارائه می دهد، که به ویژه با حضور ژن *CADM1* مرتبط است. این ژن، که در تنظیم چسبندگی سلولی و فرآیندهای متابولیک دخیل است، احتمالاً نقش کلیدی در تنظیم رسوب چربی درون ماهیچه ای ایفا می کند (Sasazaki et al., 2024). شناسایی این ژن به عنوان یک کاندید اصلی، با توجه به سطح بالای معنی داری آماری، نشان دهنده پتانسیل آن برای استفاده در برنامه های اصلاح نژادی هدفمند است. علاوه بر کروموزوم ۱۵، کروموزوم های ۱، ۲، ۱۲، ۱۷، ۱۹ و ۲۴ نیز سیگنال های قوی ای با مقادیر $-\log_{10}(p)$ در محدوده ۲۰ تا ۲۷ نشان دادند. این نواحی شامل ژن هایی مانند *SFT2D3*، *LIMS2*، *OLR1* و مجموعه ای از ژن های مرتبط با سیستم ایمنی در کروموزوم های ۵ و ۱۹ هستند که در تنظیم متابولیسم لیپید، سیگنال دهی سلولی و پاسخ های ایمنی دخیل اند (Reis et al., 2024; Taye et al., 2017).

کروموزوم ۱۳، با سیگنال متوسط اما قابل توجه ($-\log_{10}(p) = ۱۲/۳۹$)، نیز شامل ژن های متعددی مانند *CASS4*، *AURKA* و *MC3R* است که در فرآیندهای متابولیک و تنظیم رشد سلولی نقش دارند. این یافته ها نشان دهنده تنوع ژنتیکی نواحی دخیل در ماربلینگ است و بر پیچیدگی پلی ژنیک این صفت تأکید می کند (Glazier et al., 2002). تفاوت های مشاهده شده بین نمودارهای منهن تحلیل منفرد (شکل ۲) و تحلیل ترکیبی (شکل ۳) نشان دهنده تأثیر قابل توجه فراتحلیل در تقویت سیگنال ها و کاهش

نویز است. به‌ویژه، پیک‌های قوی‌تر در کروموزوم‌های ۲، ۱۲، ۱۷، ۱۹ و ۲۴ در تحلیل ترکیبی، نشان‌دهنده شناسایی نواحی جدید و تأیید نواحی شناخته‌شده با دقت بالاتر است.

تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن‌ها، که در بخش نتایج شرح داده شد، درک عمیق‌تری از تعاملات ژنتیکی مرتبط با ماربلینگ ارائه داد. شناسایی ژن‌های محوری مانند *CLEC12A* و *CD69* و سازمان‌دهی آن‌ها در خوشه‌های عملکردی (متابولیسم چربی، تنظیم سلولی و کنترل رونویسی) نشان‌دهنده شبکه‌ای پیچیده و سلسله‌مراتبی است که فرآیندهای آدیپوژنز، تنظیم التهابی و هماهنگی متابولیک را هدایت می‌کند (Lim et al., 2014; Brandan & Gutierrez, 2013). به‌ویژه، ژن *OLR1* در خوشه متابولیسم چربی، با نقش کلیدی در جذب لیپوپروتئین‌های کم‌چگالی اکسیدشده، ارتباط مستقیمی با رسوب چربی درون‌ماهیچه‌ای دارد. این یافته با مطالعات قبلی که نقش ژن‌های متابولیک را در کیفیت گوشت تأیید کرده‌اند (Magalhães et al., 2016)، همخوانی دارد. به طور کلی، یافته‌های این مطالعه امکان توسعه نشانگرهای مولکولی برای انتخاب ژنومی هدفمند را فراهم می‌آورند که می‌تواند کیفیت گوشت را بهبود بخشد و رقابت‌پذیری صنعت گوشت را در بازارهای جهانی افزایش دهد. مطالعات آینده با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل‌ژنوم و تحلیل‌های چند-اومیکس می‌توانند این نتایج را تکمیل کنند.

محدودیت‌ها

در این مطالعه چالش‌های مهمی در فراتحلیل‌های ژنومی وجود داشت. یکی از مهم‌ترین این چالش‌ها، سوگیری انتشار (publication bias) بود که به دلیل انتشار بیشتر نتایج مثبت نسبت به منفی رخ می‌دهد. برای کاهش این سوگیری، معیارهای دقیق انتخاب و حذف تعریف شد و داده‌های ناقص یا غیرقابل استانداردسازی حذف گردیدند. همچنین تحلیل حساسیت تحت آستانه‌های مختلف انجام شد تا پایداری نتایج ارزیابی شود. با این وجود، به دلیل محدودیت‌های داده‌های موجود، امکان استفاده از تست‌های آماری مستقیم برای ارزیابی سوگیری انتشار فراهم نبود.

چالش دیگر، ناهمگونی میان مطالعات به دلیل تفاوت در صفات اندازه‌گیری شده، نژادها، استانداردهای آزمایشی، شرایط محیطی و مدل‌های آماری بود. به دلیل محدودیت داده‌های منبع، امکان اجرای تست‌های آماری مانند Cochran's Q یا استفاده از مدل‌های random effects برای کنترل ناهمگونی وجود نداشت. بنابراین، روش‌های ترکیب *p*-value (فیشر و استوفر) که رویکردهای متداول در فراتحلیل برای ادغام نتایج مطالعات با ناهمگونی محدود هستند، به کار گرفته شدند. تنوع ژنتیکی مربوط به نژادهای مختلف گاوهای گوشتی نیز تأثیر قابل توجهی بر بیان ژن‌ها و ساختار QTL‌ها داشت که در تحلیل جامع لحاظ شد، ولی تحلیل‌های تفصیلی‌تر برای هر نژاد به مطالعات آتی واگذار شد.

اثرات عوامل محیطی مهم نظیر تغذیه، سن، جنس و شرایط پرورش در داده‌های اولیه اغلب کنترل شده‌اند، اما به دلیل ماهیت داده‌های موجود، کنترل دقیق آن‌ها در فراتحلیل فعلی محدود بود. در این مطالعه، حجم نمونه هر مطالعه به عنوان وزن در روش استوفر به کار گرفته شد تا تأثیر مطالعات دارای نمونه بزرگ‌تر در نظر گرفته شود و دقت تحلیل افزایش یابد.

برای تحلیل شبکه ژنی مرتبط با ماربلینگ از پایگاه داده STRING استفاده شد که بر پایه تعاملات پروتئینی-پروتئینی استوار است و بیشتر تعاملات شناخته‌شده را نشان می‌دهد. این روش الزاماً منعکس‌کننده هم‌بیانی ژن‌ها نیست. در مقابل، شبکه‌های هم‌بیانی ژن مانند (WGCNA) مبتنی بر داده‌های بیان ژن واقعی هستند و می‌توانند ارتباطات تنظیمی و عملکردی ژن‌ها را بهتر نمایان کنند. با توجه به محدودیت دسترسی به داده‌های بیان ژن مرتبط با نمونه‌های این مطالعات GWAS، امکان اجرای تحلیل‌های WGCNA فراهم نبود.

رویکرد فراتحلیل در این مطالعه به طور ضمنی هم‌پوشانی و پایداری سیگنال‌های QTL و SNP‌ها را در مطالعات مختلف لحاظ کرده است، زیرا با ترکیب داده‌ها و افزایش قدرت آماری، قادر به شناسایی مناطقی است که در چندین مطالعه به آن‌ها اشاره شده است. با این حال، انجام تحلیل مستقیم و تفصیلی هم‌پوشانی SNP‌ها و QTL‌ها می‌تواند عمق بیشتری به بررسی پایداری سیگنال‌ها ببخشد که به عنوان پیشنهاد برای مطالعات آینده مطرح است.

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

منابع

- Akanno, E. C., Chen, L., Abo-Ismael, M. K., Crowley, J. J., Wang, Z., Li, C., Basarab, J. A., MacNeil, M. D., & Plastow, G. S. (2018). Genome-wide association scan for heterotic quantitative trait loci in multi-breed and crossbred beef cattle. *Genetics, selection, evolution : GSE*, 50(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12711-018-0405-y>
- Arikawa, L. M., Mota, L. F. M., Schmidt, P. I., Frezarim, G. B., Fonseca, L. F. S., Magalhães, A. F. B., Silva, D. A., Carvalheiro, R., Chardulo, L. A. L., & Albuquerque, L. G. (2024). Genome-wide scans identify biological and metabolic pathways regulating carcass and meat quality traits in beef cattle. *Meat science*, 209, 109402. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109402>
- Barabási, A. L., & Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews. Genetics*, 5(2), 101–113. <https://doi.org/10.1038/nrg1272>
- Bhuiyan, M. S. A., Lim, D., Park, M., Lee, S., Kim, Y., Gondro, C., Park, B., & Lee, S. (2018). Functional Partitioning of Genomic Variance and Genome-Wide Association Study for Carcass Traits in Korean Hanwoo Cattle Using Imputed Sequence Level SNP Data. *Frontiers in genetics*, 9, 217. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00217>
- Brandan, E., & Gutierrez, J. (2013). Role of skeletal muscle proteoglycans during myogenesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 32(6), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.03.007>
- Eghtedari, M., Khezri, A., Kazemi-Bonchenari, M., Mohammadabadi, M., Esmaeili Mahani, S., & Aschenbach, J. R. (2025). Phosphorus has a crucial role in growth performance of calves fed starters with incorporated forage. *Animal Nutrition*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2025.01.012>
- Eghtedari, M., Khezri, A., Kazemi-Bonchenari, M., Yazdanyar, M., Mohammadabadi, M., Esmaeili Mahani, S., & Ghaffari, M. H. (2024). Effects of corn grain processing and phosphorus content in calf starters on intake, growth performance, nutrient digestibility, blood metabolites, and urinary purine derivatives. *Journal of Dairy Science*, 107(11), 9334–9346. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25079>
- Glazier, A. M., Nadeau, J. H., & Aitman, T. J. (2002). Finding genes that underlie complex traits. *Science*, 298(5602), 2345–2349. <https://doi.org/10.1126/science.1076641>
- Hirschhorn, J. N., & Daly, M. J. (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 6(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrg1521>
- Hong, E. P., & Park, J. W. (2012). Sample size and statistical power calculation in genetic association studies. *Genomics & informatics*, 10(2), 117–122. <https://doi.org/10.5808/GI.2012.10.2.117>
- Hudson, N. J., Reverter, A., Griffiths, W. J., Yutuc, E., Wang, Y., Jeanes, A., McWilliam, S., Pethick, D. W., & Greenwood, P. L. (2020). Gene expression identifies metabolic and functional differences between intramuscular and subcutaneous adipocytes in cattle. *BMC genomics*, 21(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6505-4>
- Killinger, K. M., Calkins, C. R., Umberger, W. J., Feuz, D. M., & Eskridge, K. M. (2004). Consumer sensory acceptance and value for beef steaks of similar tenderness, but differing in marbling level. *Journal of Animal Science*, 82(11), 3294–3301. <https://doi.org/10.2527/2004.82113294x>
- Kombolo-Ngah, M., Goi, A., Santinello, M., Rampado, N., Atanassova, S., Liu, J., Faure, P., Thoumy, L., Neveu, A., Andueza, D., De Marchi, M., & Hocquette, J. F. (2023). Across countries implementation of handheld near-infrared spectrometer for the on-line prediction of beef marbling in slaughterhouse. *Meat science*, 200, 109169. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109169>
- Leal-Gutiérrez, J. D., Rezende, F. M., Reecy, J. M., Kramer, L. M., Peñagaricano, F., & Mateescu, R. G. (2020). Whole Genome Sequence Data Provides Novel Insights Into the Genetic Architecture of Meat Quality Traits in Beef. *Frontiers in genetics*, 11, 538640. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.538640>
- Lee, S. H., van der Werf, J. H. J., Kim, N. K., Lee, S. H., Gondro, C., Park, E. W., Oh, S. J., Gibson, J. P., & Thompson, J. M. (2011). QTL and gene expression analyses identify genes affecting carcass weight and

- marbling on BTA14 in Hanwoo (Korean cattle). *Mammalian Genome*, 22(9–10), 589–601. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9331-9>
- Lim, D., Kim, N. K., Lee, S. H., Park, H. S., Cho, Y. M., Chai, H. H., & Kim, H. (2014). Characterization of genes for beef marbling based on applying gene coexpression network. *International journal of genomics*, 2014, 708562. <https://doi.org/10.1155/2014/708562>
- MacPhillamy, C., Ren, Y., Chen, T., Hiendleder, S., & Low, W. Y. (2023). MicroRNA breed and parent-of-origin effects provide insights into biological pathways differentiating cattle subspecies in fetal liver. *Frontiers in genetics*, 14, 1329939. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1329939>
- Magalhães, A. F., de Camargo, G. M., Fernandes, G. A., Junior, Gordo, D. G., Tonussi, R. L., Costa, R. B., Espigolan, R., Silva, R. M., Bresolin, T., de Andrade, W. B., Takada, L., Feitosa, F. L., Baldi, F., Carnevalheiro, R., Chardulo, L. A., & de Albuquerque, L. G. (2016). Genome-Wide Association Study of Meat Quality Traits in Nellore Cattle. *PloS one*, 11(6), e0157845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157845>
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., & DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
- Nguyen, D. V., Nguyen, O. C., & Malau-Aduli, A. E. O. (2021). Main regulatory factors of marbling level in beef cattle. *Veterinary and animal science*, 14, 100219. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100219>
- Nikolitsa, E. K., Kontou, P. I., & Bagos, P. G. (2025). metacp: a versatile software package for combining dependent or independent p-values. *BMC Bioinformatics*, 26, 109. <https://doi.org/10.1186/s12859-025-06126-z>
- Pickrell, J. K., Coop, G., Novembre, J., Kudaravalli, S., Li, J. Z., Absher, D., Srinivasan, B. S., Barsh, G. S., Myers, R. M., Feldman, M. W., & Pritchard, J. K. (2009). Signals of recent positive selection in a worldwide sample of human populations. *Genome Research*, 19(5), 826–837. <https://doi.org/10.1101/gr.087577.108>
- Reis, H. B. D., Carvalho, M. E., Espigolan, R., Poleti, M. D., Ambrizi, D. R., Berton, M. P., Ferraz, J. B. S., de Mattos Oliveira, E. C., & Eler, J. P. (2024). Genome-Wide Association (GWAS) Applied to Carcass and Meat Traits of Nellore Cattle. *Metabolites*, 14(1), 6. <https://doi.org/10.3390/metabo14010006>
- Salleh, S. M., Mazzoni, G., Løvendahl, P., & Kadarmideen, H. N. (2018). Gene co-expression networks from RNA sequencing of dairy cattle identifies genes and pathways affecting feed efficiency. *BMC bioinformatics*, 19(1), 513. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2553-z>
- Sasazaki, S., Kondo, H., Moriishi, Y., Kawaguchi, F., Oyama, K., & Mannen, H. (2024). Comprehensive genotyping analysis of single nucleotide polymorphisms responsible for beef marbling in Japanese Black cattle. *BMC genomic data*, 25(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12863-024-01199-w>
- Srikanth, K., Lee, S. H., Chung, K. Y., Park, J. E., Jang, G. W., Park, M. R., Kim, N. Y., Kim, T. H., Chai, H. H., Park, W. C., & Lim, D. (2020). A Gene-Set Enrichment and Protein-Protein Interaction Network-Based GWAS with Regulatory SNPs Identifies Candidate Genes and Pathways Associated with Carcass Traits in Hanwoo Cattle. *Genes*, 11(3), 316. <https://doi.org/10.3390/genes11030316>
- Szklarczyk, D., Nastou, K., Koutrouli, M., Kirsch, R., Mehryary, F., Hachilif, R., Hu, D., Peluso, M. E., Huang, Q., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2025). The STRING database in 2025: Protein networks with directionality of regulation. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D730–D737. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1113>
- Taye, M., Lee, W., Jeon, S., Yoon, J., Dessie, T., Hanotte, O., Mwai, O. A., Kemp, S., Cho, S., Oh, S. J., Lee, H. K., & Kim, H. (2017). Exploring evidence of positive selection signatures in cattle breeds selected for different traits. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 28(11-12), 528–541. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9715-6>
- Tian, R., Mahmoodi, M., Tian, J., Esmailzadeh Koshkoiyeh, S., Zhao, M., Saminzadeh, M., Li, H., Wang, X., Li, Y., & Esmailzadeh, A. (2024). Leveraging Functional Genomics for Understanding Beef Quality Complexities and Breeding Beef Cattle for Improved Meat Quality. *Genes*, 15(8), 1104. <https://doi.org/10.3390/genes15081104>
- Velleman, S. G. (2012). Meat science and muscle biology symposium: Extracellular matrix regulation of skeletal muscle formation. *Journal of Animal Science*, 90(3), 936–941. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4575>
- Wang, M., & Xu, S. (2019). Statistical power in genome-wide association studies and quantitative trait locus mapping. *Heredity*, 123(3), 287–306. <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0202-3>
- Wang, Q., Gao, B., Yue, X., Cui, Y., Looor, J. J., Dai, X., Wei, X., & Xu, C. (2022). Weighted Gene Co-expression Network Analysis Identifies Specific Modules and Hub Genes Related to Subacute Ruminant Acidosis. *Frontiers in veterinary science*, 9, 897714. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.897714>
- Wang, S., Liu, T., Peng, P., Fu, Y., Shi, S., Liang, S., Chen, X., Wang, K., & Zhou, R. (2025). Integrated Transcriptomic Analysis of Liver and Muscle Tissues Reveals Candidate Genes and Pathways Regulating

- Intramuscular Fat Deposition in Beef Cattle. *Animals : an open access journal from MDPI*, 15(9), 1306. <https://doi.org/10.3390/ani15091306>
- Watts, D. J., & Strogatz, S. H. (1998). Collective dynamics of ‘small-world’ networks. *Nature*, 393(6684), 440–442. <https://doi.org/10.1038/30918>
- Whitlock, M. C. (2005). Combining probability from independent tests: The weighted Z-method is superior to Fisher’s approach. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(5), 1368–1373. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00917.x>
- Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., & Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome biology*, 11(2), R14. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r14>
- Zhang, B., & Horvath, S. (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 4, Article17. <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1128>

Meta-analysis of genome-wide association studies for identification of gene networks related to marbling in beef cattle

Introduction

Livestock production represents one of the most crucial economic sectors globally, with beef cattle farming holding particular importance for food security and rural development. Marbling, defined as the intramuscular fat distribution pattern in beef, has emerged as a critical quality indicator that determines both the economic value and consumer acceptance of beef products. This complex polygenic trait directly influences meat tenderness, juiciness, and flavor profile, making it a primary target for genetic improvement programs. Understanding the molecular mechanisms controlling marbling quality is essential for developing targeted breeding strategies that can enhance meat quality and improve the competitiveness of the beef industry.

Materials and Methods

Literature Search and Study Selection

The study employed a systematic meta-analytical approach to identify genomic regions significantly associated with marbling traits in beef cattle. A comprehensive literature search was conducted across major scientific databases including Web of Science, Scopus, and PubMed, focusing on publications from 2010 to 2025 that examined relationships between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and marbling-related traits. Inclusion criteria encompassed original research articles reporting associations between SNPs and marbling traits with precise statistical data.

Genomic Interval Analysis and Meta-Analysis

The methodological framework involved systematic data extraction and standardization procedures to ensure compatibility across different studies. Key parameters including trait descriptions, SNP identifiers, chromosome numbers, genomic positions, sample sizes, candidate genes, and p-values were systematically extracted and standardized using Microsoft Excel. For studies presenting graphical data without direct numerical values, WebPlotDigitizer software (version 4.6) was employed for precise data extraction. Genomic positions were standardized to the UMD3.1 bovine reference genome assembly, trait nomenclatures were harmonized to prevent inconsistencies, and p-values were recalculated where necessary when reported as $-\log_{10}(\text{p-value})$ formats. Incomplete or non-standardizable data (such as cases with insufficient information about genomic positions or sample sizes) were excluded from analyses to maintain input data quality.

Standardization of Genomic Coordinates and Meta-Analysis Procedures

Genomic positions were standardized to the UMD3.1 bovine reference genome assembly, and SNPs located within 5000 kilobase distances were grouped into unified intervals. Meta-analytical procedures employed both Fisher’s method and Stouffer’s method to combine p-values within each interval. Gene network analysis was performed using the STRING database (version 12.0) with a focus on *Bos taurus* species, examining gene interactions with medium confidence thresholds. Manhattan plots were generated using R software to visualize the distribution of significant genomic regions.

Results

The meta-analytical approach demonstrated substantial advantages over individual studies in identifying genomic regions associated with marbling traits. Through integration of multiple datasets, the effective sample size increased significantly, resulting in enhanced statistical power and improved precision in quantitative trait loci (QTL) detection. The combined analysis successfully identified 17 significant genomic regions across 14 different chromosomes, with combined- $\log_{10}(\text{p-value})$ values (Stouffer's method) ranging from 8.39 to 29.24.

The most prominent finding was the *CADM1* gene on chromosome 15 with the highest significance level ($-\log_{10}(\text{p}) = 29.24$). Additionally, large clusters of immune system-related genes were identified on chromosomes 5 and 19, playing important roles in marbling regulation. Manhattan plot analysis revealed that the combined analysis showed dramatic differences compared to individual studies, with stronger peaks observed, particularly on chromosome 15. Chromosomes 2, 12, 17, 19, and 24 also presented significant peaks in the range of $-\log_{10}(\text{p}) = 20-27$.

Gene co-expression network analysis revealed sophisticated molecular mechanisms underlying marbling control. *CLEC12A* emerged as the primary hub gene of the network, with extensive direct interactions with numerous other genes. This gene, belonging to the C-type lectin family, functions as a central regulator in multiple biological pathways. *CD69* was also identified as a secondary hub gene interacting with genes such as *BCL6* and *KLRG1*. The network analysis demonstrated that genes are organized into three main functional clusters: lipid metabolism, cellular regulation, and transcriptional control.

Discussion

The identification of key candidate genes, particularly *CADM1* on chromosome 15 with the highest significance level, represents a prime candidate for targeted breeding programs due to its role in cellular adhesion and metabolic processes. The identification of the CLEC gene family clusters provides concrete targets for genomic selection programs aimed at improving meat quality. The comprehensive gene network analysis provided fundamental insights into the biological pathways controlling intramuscular fat deposition, revealing mechanisms including adipogenesis pathways, inflammatory regulation, and metabolic coordination.

The practical implications of these findings extend to the development of molecular markers for targeted genomic selection, potentially enhancing meat quality while maintaining production efficiency. The identified genetic variants can be incorporated into breeding value estimation systems, enabling more accurate prediction of marbling potential in breeding animals. These results provide a set of candidate genes for use in breeding programs to improve marbling traits, offering possibilities for developing molecular markers that can improve meat quality and increase competitiveness of the meat industry.

Conclusions

This comprehensive meta-analysis successfully identified 17 significant genomic intervals associated with marbling traits in beef cattle, providing valuable insights into the genetic architecture underlying this economically important trait. The integration of multiple studies through meta-analytical approaches significantly enhanced the detection power for genomic regions that remained undetectable in individual studies due to statistical limitations.

The study's limitations include the focus on specific cattle breeds and the reliance on available published data, which may introduce publication bias. Future research directions should incorporate whole-genome sequencing data and multi-omics approaches to provide more comprehensive understanding of the molecular mechanisms underlying marbling traits. Validation studies in diverse cattle populations and environments will be essential to confirm the universal applicability of these findings across different production systems.

Author Contributions

Ehsan Moazami: Data collection, Writing original draft of the manuscript, Data curation and organization, Data analysis, Investigation, and Methodology.

Ali Esmailzadeh: Conceptualization, Project administration, Supervision of all phases of the scientific work, Validation, and Review and Editing the manuscript.

Mohammad Reza Mohammadabadi: Supervision, Review and Editing the manuscript, Validation, and Contributing to better presentation of the scientific work.

Iman Moazemi: Data analysis assistance, Data acquisition and collection, Investigation, and Methodology support.

Data Availability Statement

Not applicable. This study used data published online and published articles, all of which are publicly available.

Ethical considerations

Not applicable. The study used data published online and in printed articles and did not involve any living organisms.

پایان کار