



Detection of genomic regions under positive selection in adapting to high altitude in Iranian sheep

Zahra Patiabadi¹ , Mohammad Razmkabir² , Ali Esmailzadeh Koshkoiyeh³ ,
Mohammad Hossein Moradi⁴ , Amir Rashidi⁵ 

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. Email: zahra.patiabadi@uok.ac.ir

2. Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. Email: m.razmkabir@uok.ac.ir

3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: aliesmaili@uk.ac.ir

4. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Arak, Arak, Iran. Email: hoseinmoradi@ut.ac.ir

5. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. Email: arashidi@uok.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	Selective signatures provide information about the stages of evolution of different species, including sheep, which lead to changes in their genome over many years. The aim of this study was to detect signatures of selection in the genome of Iranian sheep in the highlands. A total of 58 sheep from 4 breeds, two breeds scattered in the highlands and two breeds scattered in the lowlands, were genotyped using Illumina ovine SNP600K BeadChip genomic arrays. Two statistical tests of unbiased FST (Theta) and hapFLK were used to identify the selection signatures. The results of Theta revealed 22 genomic regions and the results of hapFLK revealed 15 genomic regions. Bioinformatics analysis demonstrated that many of genes had important effects on adaptation to hypoxia conditions e.g. rheumatoid arthritis (TXNDC5), hematopoiesis (FANCA), immunity and fighting infection (LEF1, NMUR1, PTMA and COPS7B), regulating blood pressure and responding to pain and inflammation (NMUR1) and suppressing cancer (CD82, GAS8, PRMT1, B3GNT7). For example, TXNDC5 and FANCA functional genes, which are located on chromosome 13 and 14, were related to reacts to hypoxic conditions and hematopoiesis. Also, genes such as LEF1, NMUR1, PTMA and COPS7B are effective in immunogenicity and fighting infection. Study of the reported QTL in these regions of the sheep genome showed that they overlapped with QTL of economically important traits such as corpuscular hemoglobin concentration, hematocrit, traits related to meat, carcass, milk, body weight, bone density, and the total number of lambs born. Due to the fact that little research has been done regarding adaptation to altitude in sheep, the results of this research may facilitate the identification of genes affecting adaptation to altitude. However, it will be necessary to carry out more association and functional studies to demonstrate the implication of these genes.
Article history: Received: 27 July 2022 Received in revised form: 17 November 2022 Accepted: 28 November 2022 Published online: 20 March 2024	
Keywords: <i>Selection Signature,</i> <i>altitude,</i> <i>Genomic scanning,</i> <i>FST test,</i> <i>hapFLK test.</i>	

Cite this article: Patiabadi, Z., Razmkabir, M., Esmailzadeh Koshkoiyeh, A., Moradi, M. H. & Rashidi, A. (2024). Detection of genomic regions under positive selection in adapting to high altitude in Iranian sheep. *Iranian Journal of Animal Science*, 55 (1), 143-162. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2023.353223.653925>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2023.353223.653925>

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Iran has many breeds of sheep that are distributed in the highlands and lowlands, many of which have evolved over a long period of time. Environmental heterogeneity and differences in climatic factors (temperature, precipitation, altitude, etc.) affect the distribution of phenotypic and genetic diversity of all kinds of organisms. Changes in climate and altitude have many effects on organisms, including sheep. Therefore, understanding the factors affecting the adaptation of sheep breeds to different environments is necessary for the development of breeding programs in future environmental changes. Selective signatures in whole genome can help us to understand the mechanisms of selection and to identify the genomic regions that have been under

natural or artificial selection for long years. Since Selective signatures are usually associated with major effect genes and important economic traits, they can provide suitable information sources to improve the performance of selection programs in the future. The objective of this study was to identify the genomic regions that have been under selection in skin and wool sheep breeds. In general, it can be said that selective signatures provide information about the stages of evolution of different species, including sheep, which lead to changes in their genomes over many years. The aim of this study was to identify the signs of selection in the Iranian sheep genome in the highlands.

Materials and methods

In the present study, Illumina ovine SNP600K BeadChip genomic arrays of 58 sheep from 4 breeds were used, two breeds scattered in the highlands (Lori Bakhtiari and Afshari) and two breeds scattered in the lowlands (Karkul and Siah Kabud). Unbiased method of Weir and Cockerham's F_{ST} (Theta) and hapFLK were used to detect the selection signatures. Also, to check the genes and QTLs in the selected regions, the Biomart database, OAR 3.1 version of the sheep genome, was used, and the function of the identified genes was analyzed through a wide search in different databases such as Genecards and OMIM. And finally, the list of genes related to the selected regions was reported. For this purpose, the chromosomal position of SNPs with high numerical value of theta and hapFLK, as well as the 250 kbp region around these markers, were further investigated. Then, DAVID database online search was used to investigate the biological and functional processes of genes and to study the ontology. Finally, Cytoscape software was also used to determine gene networks.

Results

The results of Theta revealed 22 genomic regions and the results of hapFLK revealed 15 genomic regions. Bioinformatics analysis demonstrated that many of genes had important effects on adaptation to hypoxia conditions e.g. rheumatoid arthritis (*TXNDC5*), hematopoiesis (*FANCA*), immunity and fighting infection (*LEF1*, *NMUR1*, *PTMA* and *COPS7B*), regulating blood pressure and responding to pain and inflammation (*NMUR1*) and suppressing cancer (*CD82*, *GAS8*, *PRMT1*, *B3GNT7*). For example, *TXNDC5* and *FANCA* functional genes, which are located on chromosome 13 and 14, were related to reacts to hypoxic conditions and hematopoiesis. Also, genes such as *LEF1*, *NMUR1*, *PTMA* and *COPS7B* are effective in immunogenicity and fighting infection. Study of the reported QTL in these regions of the sheep genome showed that they overlapped with QTL of economically important traits such as corpuscular hemoglobin concentration, hematocrit, traits related to meat, carcass, milk, body weight, bone density, and the total number of lambs born.

Conclusion

Due to the fact that little research has been done regarding adaptation to altitude in sheep, the results of this research may facilitate the identification of genes affecting adaptation to altitude. However, it will be necessary to carry out more association and functional studies to demonstrate the implication of these genes.



شناسایی نواحی ژنومی تحت انتخاب مثبت برای سازگاری با ارتفاع بالا در گوسفندان ایرانی

زهرا پتی‌آبادی^۱ | محمد رزم‌کبیر^۲ | علی اسماعیلی‌زاده کشکوئیه^۳ | محمدحسین مرادی^۴ | امیر رشیدی^۵

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: zahra.patiabadi@uok.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: m.razmkabir@uok.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: aliesmaili@uk.ac.ir

۴. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک، ایران. رایانامه: hoseinmoradi@ut.ac.ir

۵. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: arashidi@uok.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>نوع مقاله:</p> <p>مقاله پژوهشی</p>	<p>شناسایی نشانه‌های انتخاب، اطلاعاتی در مورد مراحل تکامل گونه‌های مختلف از جمله گوسفند، که منجر به تغییراتی در سطح ژنوم آنها در طی سالیان متمادی می‌شود، را فراهم می‌کند. هدف از این پژوهش شناسایی نشانه‌های ژنومی انتخاب در گوسفندان مناطق مرتفع کشور ایران بود. بدین منظور ۵۸ رأس گوسفند از ۴ نژاد که دو نژاد در مناطق مرتفع و دو نژاد در مناطق پست پراکنده‌اند، با استفاده از آرایه‌های گوسفند ۶۰۰k تعیین ژنوتیپ شدند. جهت شناسایی نواحی ژنومی تحت انتخاب از دو آزمون آماری برآوردگر ناریب Fst (تتا) و hapFLK استفاده شد. با استفاده از آزمون تتا، ۲۲ منطقه ژنومی به عنوان مناطق تحت انتخاب شناسایی شدند. در آزمون hapFLK نیز ۱۵ منطقه ژنومی شناسایی شد. تجزیه و تحلیل اطلاعات زیستی (بیوانفورماتیک) نشان داد که برخی از این مناطق ژنومی با ژن‌های موثر بر سازگاری با شرایط کم اکسیژنی (<i>TXNDC5</i>)، خون‌سازی (<i>FANCA</i>)، ایمنی‌زایی و مقابله با عفونت (<i>PTMA</i>، <i>NMURI</i>، <i>LEF1</i>، <i>COPS7B</i>)، تنظیم فشار خون و پاسخ به درد و التهاب (<i>NMURI</i>) و سرکوب سرطان (<i>B3GNT7</i>، <i>PRMT1</i>، <i>GAS8</i>، <i>CD82</i> و ...) همپوشانی دارند. بررسی QTL‌های گزارش شده نیز نشان داد که این مناطق با QTL‌های صفات مهم اقتصادی از جمله صفات مرتبط با میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، مشخصات گوشت، لاشه، شیر، وزن بدن، تراکم استخوان و تعداد کل بره‌های متولد شده در ارتباط می‌باشند. با توجه به اینکه تحقیقات کمی در رابطه با سازگاری با ارتفاع در گوسفندان انجام شده است، لذا نتایج این تحقیق می‌تواند اطلاعات سودمندی در رابطه با ژن‌هایی که به سازگاری با ارتفاع پاسخ می‌دهند، ارائه دهد. به هر حال، به منظور شناسایی و بررسی دقیق‌تر جهش‌های عامل در ژن‌ها و QTL‌های شناسایی شده ضروری است که پژوهش‌های تکمیلی بیشتری صورت گیرد.</p>
<p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۱</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۲/۲۳</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۸</p> <p>تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۱/۰۱</p>	
<p>کلیدواژه‌ها:</p> <p>آزمون <i>Fst</i>، آزمون <i>hapFLK</i>، ارتفاع از سطح دریا، پویس ژنومی، نشانه‌های انتخاب.</p>	

استناد: پتی‌آبادی، زهرا؛ رزم‌کبیر، محمد؛ اسماعیل‌زاده کشکوئیه، علی؛ مرادی، محمدحسین و رشیدی، امیر (۱۴۰۳). شناسایی نواحی ژنومی تحت انتخاب مثبت برای سازگاری

با ارتفاع بالا در گوسفندان ایرانی. نشریه علوم دامی ایران، ۵۵ (۱)، ۱۶۲-۱۴۳. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2023.353223.653925>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2023.353223.653925>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

کشور ایران از مناطق ناهموار و کوهستانی تشکیل شده است که حوضه‌های داخلی مرتفع را احاطه کرده‌اند. رشته کوه زاگرس، رشته کوه اصلی است که از شمال غرب به جنوب ایران کشیده شده است. ارتفاع بسیاری از قله‌های زاگرس از سطح دریا از ۳۰۰ متر بیشتر است. مرکز ایران نیز متشکل از حوضه‌های بسته متعددی می‌باشد که در مجموع از آنها به عنوان فلات مرکزی یاد می‌شود. بنابراین ایران فلاتی مرتفع با ارتفاع متوسط بیش از ۹۰۰ متر از سطح دریا است. گوسفند اولین گونه‌های دام اهلی شده می‌باشد که اجداد آن عمدتاً در مناطق حاصلخیز زندگی می‌کردند (Gorkhali *et al.*, 2016). ایران دارای نژادهای گوسفند زیادی است که در ارتفاعات و مناطق پست توزیع شده‌اند که بسیاری از آنها طی زمان طولانی تکامل یافته‌اند.

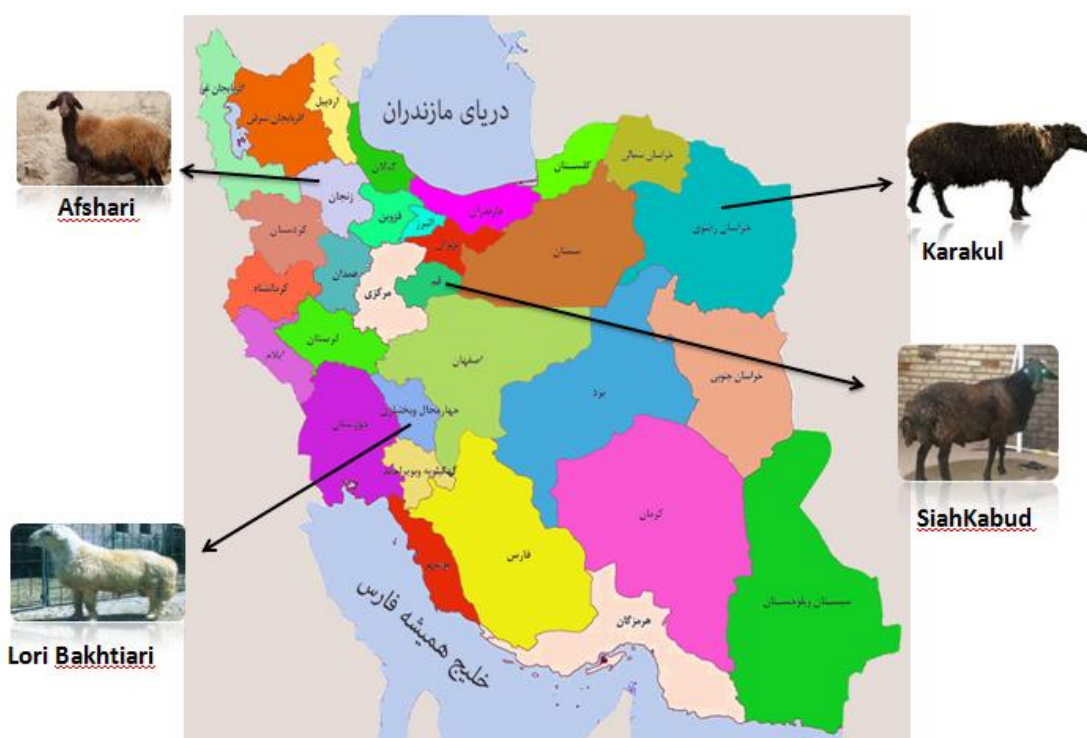
ناهمگونی محیطی و تفاوت در عوامل اقلیمی (دما، بارش، ارتفاع و ...) بر توزیع تنوع فنوتیپی و ژنتیکی انواع موجودات تاثیر می‌گذارد (Hancock *et al.*, 2011). تغییرات آب و هوایی و ارتفاع تاثیرات زیادی بر موجودات از جمله گوسفندان می‌گذارد (Hoffmann, 2010). بنابراین درک عوامل موثر بر سازگاری انواع نژاد گوسفند با محیط‌های مختلف برای توسعه برنامه‌های پرورش در تغییرات محیطی آینده لازم است (Lobell *et al.*, 2008).

چنانچه جهش جدیدی سبب افزایش درجه شایستگی فرد شود، انتخاب باعث می‌شود این افراد مشارکت بیشتری در تشکیل نسل آینده داشته باشند. بنابراین فراوانی آلل جهش یافته بسته به سهم آن در افزایش درجه شایستگی به سرعت افزایش می‌یابد، که در نتیجه انتخاب مثبت اتفاق می‌افتد، پس می‌توان گفت که به انتخاب جهش‌ها با اثرگذاری مطلوب در جمعیت‌های مختلف انتخاب مثبت گفته می‌شود که در طی سالیان متمادی منجر به تمایز نژادها از یکدیگر می‌شود (Nielsen, 2005). انتخاب در جهت افزایش فراوانی جهش‌های ایجاد شده که در برخی از جمعیت‌ها مفید بوده‌اند، باعث به‌جا گذاشتن نشانه‌هایی همچون کاهش تنوع ژنتیکی، افزایش فراوانی آلل جهش یافته، افزایش عدم تعادل پیوستگی و توسعه ساختار هاپلوتایپی در سطح ژنوم شده‌اند (Biswas *et al.*, 2006; Akey, 2009; Qanbari *et al.*, 2014). بطور کلی می‌توان گفت که انتخاب باعث ایجاد تغییراتی خاص در الگوهای تنوع میان جایگاه و جایگاه‌های خنثی مرتبط با آن‌ها در سطح ژنوم می‌شود. این نشانه‌های ژنومی که در اثر انتخاب بر روی ژنوم باقی می‌مانند، نشانه‌های انتخاب نامیده می‌شود (Kreitman *et al.*, 2000).

همانطور که گفته شد زمانی که جمعیت‌ها در موقعیت‌های جغرافیایی متفاوت تحت انتخاب قرار گیرند، سبب تغییر فراوانی آللی در آن و عدم تغییر آن آلل در جمعیت‌های دیگر می‌شود که این خود سبب تمایز بین جمعیت‌ها می‌شود. متداول‌ترین آماره‌ای که برای تمایز جمعیت‌ها استفاده می‌شود، آماره برآوردگر ناریب F_{ST} (تتا) (Weir & Cockerham, 1984) است، که واریانس فراوانی آللی را در داخل و بین جمعیت مقایسه می‌کند (Akey *et al.*, 2002). آزمون hapFLK همانند آزمون تتا تمایز میان جمعیت را مورد بررسی قرار می‌دهد، با این تفاوت که در این آزمون هاپلوتایپ به جای آلل در نظر گرفته می‌شود. hapFLK ساختار سلسله مراتبی جمعیت‌ها را برخلاف سایر آزمون‌ها محاسبه می‌کند که سبب می‌شود قدرت بیشتری در شناسایی نشانه‌های انتخاب را فراهم کند (Fariello *et al.*, 2013).

تشخیص نشانه‌های انتخاب به واسطه آب و هوا و ارتفاع یکی از موضوعات تحقیقات مرکزی در زیست‌شناسی تکاملی بر اساس ژنتیک سازگاری و گونه‌زایی در پاسخ به شرایط محیطی متغیر است (Joost *et al.*, 2007). مطالعات متعددی در زمینه نشانه‌های انتخاب محیط محور در گونه‌هایی مانند انسان و مگس سرکه انجام شده است (Oleksyk *et al.*, 2010) که در این مطالعات نمونه‌هایی از سازگاری اقلیمی در صفاتی مانند رنگدانه (Hancock *et al.*, 2011)، اندازه بدن (Gardner *et al.*, 2011) و پاسخ حرارتی (Karell *et al.*, 2011) مشاهده می‌شود. چنین مطالعاتی در خصوص دام‌های بومی کمتر صورت گرفته است، این درحالیست که بسیاری از گونه‌های دام بومی در محیط گسترده‌ای توزیع شده‌اند که تنوع فنوتیپی و سازگاری به محیط‌های متفاوت را نشان می‌دهند.

بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که سازگاری با محیط در ارتفاعات ناشی از جهش‌های ژنتیکی سودمند است. با توجه به اهمیت زیاد فهم مکانیسم‌های ژنتیکی مرتبط با سازگاری گوسفند در ارتفاعات در پژوهش حاضر از چهار نژاد گوسفند ایرانی که دو نژاد در مناطق مرتفع (لری بختیاری و افشاری) و دو نژاد در مناطق پست (قره‌گل و سیاه‌کبود) پراکنده شده‌اند، جهت بررسی ژنومی نشانه‌های انتخاب بر اساس شاخص ارتفاع از سطح دریا محل پراکنش و شناسایی مناطقی از ژنوم که طی سالیان متمادی چه به صورت طبیعی یا مصنوعی هدف انتخاب‌های مختلف قرار گرفته‌اند، استفاده گردید (شکل ۱). پژوهش‌های متعددی در کل جهان به منظور شناسایی نشانه‌های انتخاب صورت گرفته است اما بطور کلی تحقیقات اندکی در زمینه شناسایی نشانه‌های انتخاب در رابطه با سازگاری با ارتفاع انجام گرفته است، بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی نشانه‌های انتخاب با استفاده از تراشه نشانگری K600 بر روی ژنوم گوسفندان ایرانی بود.



شکل ۱. تصاویر و محل پراکنش گوسفندان در ارتفاعات مختلف

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و تعیین ژنوتیپ حیوانات

در این پژوهش داده‌های ژنومی از نمونه خون ۵۸ راس گوسفند ایرانی از ۴ نژاد لری بختیاری، افشاری، قره‌گل و سیاه‌کبود شامل به ترتیب ۱۵، ۱۳، ۱۵ و ۱۵ نمونه بدست آمد (جدول ۱). مدیریت استخراج DNA توسط آزمایشگاه ژنتیک مولکولی، گروه علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت بالای DNA استخراج شده (توسط اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد)، نمونه‌ها با استفاده از آرایه Illumine Ovine SNP600k حاوی ۶۰۶۰۰۶ چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) در موسسه AgrResearch در نیوزلند و از طریق یک شرکت چینی به نام Berry Genomics تعیین ژنوتیپ شدند. در این پژوهش سعی شد از نمونه‌گیری از حیوانات آمیخته اجتناب شود و همچنین از هر جنس ماده و نر

به طور تصادفی از گله‌های متعدد نمونه‌برداری انجام شد. در این پژوهش جهت شناسایی نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم گوسفندان پرورش یافته در مناطق مرتفع و پست، ابتدا ارتفاع از سطح دریا مناطق تحت پراکنش نژادهای مختلف توسط مرکز آمار ایران تهیه شدند و نژادها بر اساس ارتفاع از سطح دریا در دو گروه ارتفاع زیاد (شامل نژادهای لری بختیاری و افشاری) و ارتفاع کم (شامل قره‌گل و سیاه‌کبود) قرار گرفتند. گوسفندان لری بختیاری و افشاری که نژادی گوشتی می‌باشند، در شهرکرد و زنجان که جز مناطق سردسیر کشور محسوب می‌شود، پراکنش دارند و میانگین ارتفاع از سطح دریا در این استان‌ها ۱۸۵۴/۷۵ متر از سطح دریا می‌باشد. قره‌گل و سیاه‌کبود نیز در مناطق گرمسیر کشور (سرخس و قم) پراکنش دارند که میانگین ارتفاع از سطح دریا در آنجا به ۵۸۰/۰۵ متر می‌رسد، که جز مناطق کم ارتفاع محسوب می‌شوند. در جدول ۱ حیوانات بر اساس ارتفاع محل زندگی به تفکیک آورده شده است.

جدول ۱. خلاصه ویژگی‌های فنوتیپی و محیطی گوسفندان در ارتفاعات بالا و پایین							
نژاد	مکان نمونه-گیری	علائم اختصاری	تعداد	فنوتیپ‌ها و متغیرهای محیطی			میانگین ارتفاع هر گروه (متر)
				رنگ پوشش	اکولوژی	استفاده	
لری بختیاری	شهرکرد	LRB	۱۵	سفید	سردسیر	گوشتی	۲۰۵۰
				رنگی	سردسیر	گوشتی	۱۶۵۹/۵
قره‌گل	سرخس	KAR	۱۵	رنگی	گرمسیر	پوستی	۲۸۱
				رنگی	گرمسیر	پشمی	۸۷۹/۱
سیاه‌کبود	قم	SKD	۱۵	رنگی	گرمسیر	پشمی	۸۷۹/۱

کنترل کیفیت داده‌های اولیه

برای کنترل کیفیت داده‌های ژنومی، ابتدا نشانگرهایی که فراوانی آلل نادر^۱ در آنها کمتر از یک درصد بود، شناسایی و حذف شدند (Edea et al., 2017). در مرحله بعد براساس درصدی از نمونه‌ها که برای آن نشانگر تعیین ژنوتیپ شده‌اند^۲ فیلتراسیون انجام گرفت و SNPهایی که نرخ تعیین ژنوتیپ برای آنها کمتر از ۹۵ درصد بود نیز حذف شدند (Mastrangelo et al., 2019) و در نهایت همه SNPهای با موقعیت ژنومی ناشناخته از داده‌ها حذف شدند (Moradi et al., 2012). مراحل مختلف پالایش با استفاده از نرم‌افزار PLINK (Purcell et al., 2007) نسخه ۱,۹ انجام شد. سپس برای داشتن دیدگاهی کلی در زمینه ساختار جمعیتی نژادهای مورد بررسی و شناسایی حیواناتی که بیرون از گروه نژادی خود قرار گرفته‌اند، تجزیه مؤلفه‌های اصلی^۳ در محیط R نسخه ۳,۶,۱ با استفاده از دستور prcomp انجام گرفت.

آنالیزهای آماری

برای شناسایی نشانه‌های انتخاب از دو آزمون روش برآوردگر ناریب F_{ST} (تتا) (Weir & Cockerham, 1984) و hapFLK (Fariello et al., 2013) استفاده شد. آزمون F_{ST} مهمترین آزمون آماری مبتنی بر تمایز جمعیتی است که سبب شناسایی جایگاه‌های متمایز تحت انتخاب مثبت می‌شود که برای صفات اقتصادی اهمیت بالایی دارد (MacEachern et al., 2009). برای بررسی نشانه‌های انتخاب در دو گروه مورد نظر، آزمون F_{ST} در هر جایگاه با استفاده از روش ناریب تتا در محیط نرم افزار R نسخه ۳,۶,۱ به صورت کدنویسی محاسبه شد. در این روش ناهمگنی اندازه جمعیت لحاظ می‌شود (Bonhomme et al., 2010). همچنین آماره hapFLK (Fariello et al., 2013) توسط کدهای پایتون ارائه شده در صفحه وب hapFLK (<https://forge-dga.jouy.inra.fr/projects/hapflk>) محاسبه شد. استفاده از این روش تا حد زیادی قدرت تشخیص نشانه‌های

1 Minor Allele Frequency

2 Call Rate

3 PCA

انتخاب را با استفاده از داده‌های حاصل از تراشه‌های با چگالی بالا افزایش می‌دهد (Fariello *et al.*, 2013). برای شناسایی بهتر نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم و رسم گراف‌های منهن از میانگین ارزش‌های عددی، SNP‌های مجاور با طول ۱۰ SNP تحت عنوان Win10 به جای در نظر گرفتن ارزش عددی هر SNP استفاده شد (Moradi *et al.*, 2022). نمودار منهن برای شناسایی مناطق انتخاب با استفاده از نرم افزار Haploview (Barrett, 2005) رسم گردید. حد آستانه در نظر گرفته شده سختگیرانه بود و تنها ۰/۰۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرهای مجاور دارای ارزش بالایی بودند، به عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند. در نتیجه تنها مناطقی که بیشترین تمایز جمعیتی را در بین دو گروه نشان می‌دادند، انتخاب شدند.

شناسایی ژن‌های گزارشی شده در مناطق تحت انتخاب و مطالعه هستی‌شناسی

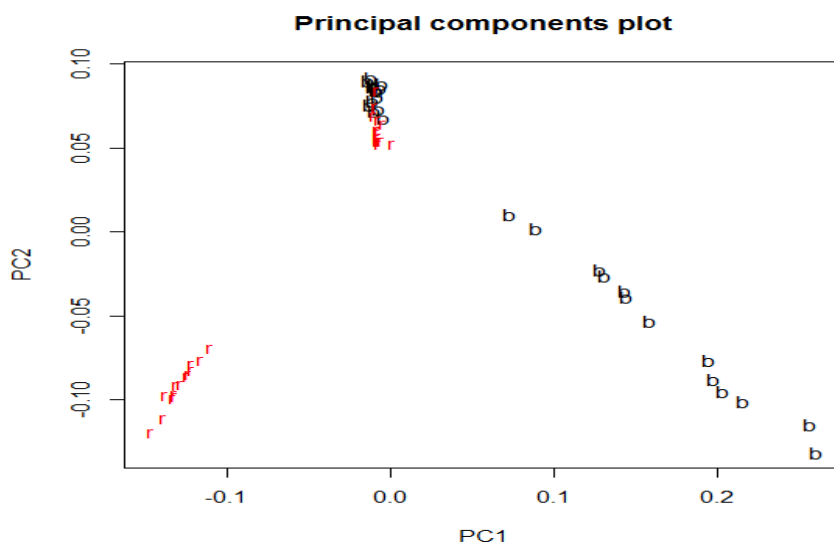
برای شناسایی ژن‌ها و QTL‌های موجود در مناطق ژنومی شناسایی شده که در مناطق تحت انتخاب بودند، موقعیت کروموزومی SNP‌هایی که ارزش عددی تا و hapFLK بالایی داشتند به علاوه ۲۵۰ کیلو جفت باز ناحیه اطراف این نشانگرها مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. به این منظور ابتدا ژن‌های شناسایی شده در این مناطق با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی برخط Biomart (<http://www.ensembl.org/biomart/>) برای نسخه ژنومی OAR 3.1 ژنوم گوسفند مورد بررسی قرار گرفت. همچنین عملکرد ژن‌های شناسایی شده به صورت جستجوی گسترده در پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف همچون Genecards (<https://www.genecards.org>) و OMIM (<https://www.omim.org>) مورد تجزیه و تحلیل بیشتر قرار گرفت. سپس برای بررسی فرایندهای بیولوژیکی و عملکردی ژن‌ها و مطالعه هستی‌شناسی از جستجوی برخط در پایگاه اطلاعاتی DAVID (<https://david.ncicrf.gov>) استفاده شد. در نهایت جهت تعیین شبکه‌های ژنی از نرم‌افزار Cytoscape نسخه ۳,۵,۱ نیز استفاده شد.

نتایج و بحث

همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، پس از مراحل مختلف ویرایش داده‌ها ۵۵۳۱۴۰ نشانگر SNP مربوط به ۵۸ حیوان (۲۸ حیوان در مناطق با ارتفاع زیاد و ۳۰ حیوان در مناطق با ارتفاع کم) برای تجزیه و تحلیل بعدی انتخاب شدند.

جدول ۲. شرح کنترل کیفیت در گوسفندان ارتفاع بالا و پایین	
تعداد حیوانات	۵۸ (۲۹ نر، ۲۹ ماده)
تعداد کل نشانگرها قبل از کنترل کیفیت	۶۰۶۰۰۶
تعداد نشانگرهایی با نرخ ژنوتیپ گم شده بیشتر از ۵ درصد	۰
تعداد نشانگرهایی با فراوانی آلل نادر کمتر از ۱ درصد	۳۳۹۵۷
تعداد نشانگرهایی با Call rate کمتر از ۹۵ درصد	۱۷۵۰۵
تعداد نشانگرهایی با موقعیت ناشناخته بر روی ژنوم	۴۰۴
تعداد کل نشانگرها بعد از کنترل کیفیت	۵۵۳۱۴۰

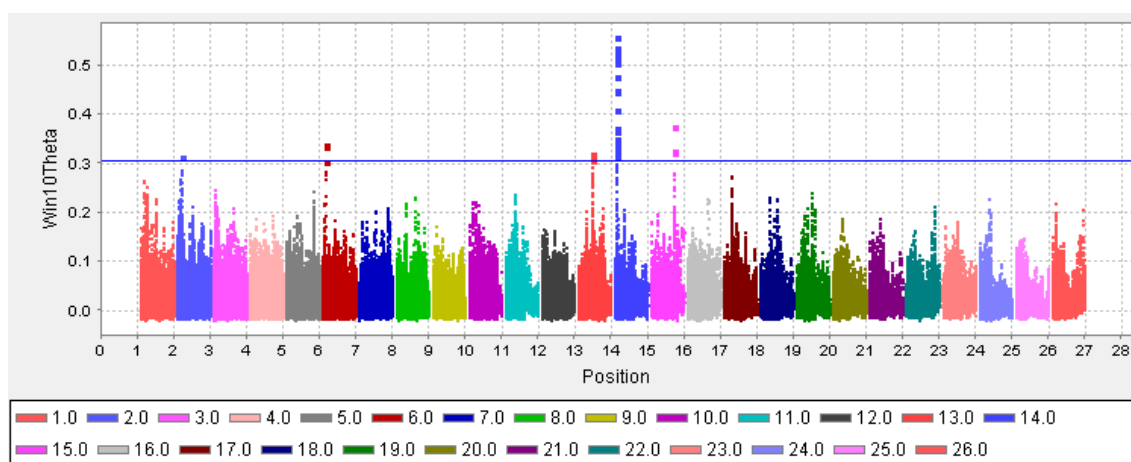
نتایج PCA به منظور بررسی نحوه کلاسه‌بندی حیوانات در دو جمعیت (حیوانات در مناطق در ارتفاع بالا با رنگ مشکی و حیوانات در ارتفاع کم با رنگ قرمز) در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که PC1 و PC2 به ترتیب ۳/۵۲ و ۲/۴۹ درصد از کل واریانس را به خود اختصاص می‌دهند.



شکل ۲. خوشه بندی حیوانات براساس آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA) با استفاده از داده‌های SNP کل ژنوم؛ گوسفندان در ارتفاع بالا و پایین به ترتیب با رنگ مشکی و قرمز نشان داده شده است.

نشانه‌های انتخاب شناسایی شده با استفاده از روش ناآریب F_{ST} (تا) و بررسی ییوانفورماتیکی این مناطق ژنومی

در شکل ۳ نمودار منتهن بر اساس آماره تا نشان داده شده است. در نتیجه ۲۲ جایگاه ژنی حد آستانه را رد کرده بودند و در صدک ۹۹/۹۹ کل ارزش‌های تا قرار گرفته بودند، که این مناطق بر روی کروموزوم‌های ۲، ۶، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ واقع شده بودند. همانطور که ملاحظه می‌شود، بالاترین فرسته انتخاب روی کروموزوم ۱۴ بود.



شکل ۳. توزیع ارزش‌های Win10 تا در سطح ژنوم گوسفندان در ارتفاع بالا و پایین؛ موقعیت ژنومی SNPها بر روی محور X و ارزش تتای آنها بر روی محور Y نشان داده شده است. مناطقی که بالای خط آستانه قرار دارند، مناطقی هستند که در صدک ۹۹/۹۹ کل ارزش‌های تا قرار دارند و در مقایسه گروه پوستی-پشمی به صورت متمایز (واگرا) هدف انتخاب قرار گرفته‌اند.

پس از شناسایی مناطق تحت انتخاب، ژن‌های گزارش شده در این مناطق مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳). ژن *TXNDC5* روی کروموزوم ۱۳ قرار دارد که تکثیر سلولی را در شرایط کم اکسیژنی تحریک می‌کند (Horna-Terrón *et al.*, 2014). کاهش فشار نسبی اکسیژن دمی سبب ایجاد تغییرات فیزیولوژیک در ارتفاع می‌شود که منجر به کم اکسیژنی می‌گردد. به این صورت که عامل اصلی ایجاد کننده آن کاهش فشار اکسیژن محیط و عدم توانایی اریتروسیت‌ها در به توازن رساندن

کامل و مناسب با گازهای دمی در گردش خون ریوی می‌باشد (Gale et al., 1985). پاسخ فیزیولوژیک به کم اکسیژنی حاد و مزمن متفاوت است. مواجهه ناگهانی با ارتفاع و کم اکسیژنی متعاقب آن باعث کاهش فشار نسبی اکسیژن تا ۴۰ میلی متر جیوه و اشباع اکسیژن شریانی تا ۷۵ درصد می‌شود. این ژن نقش مهمی در فیزیولوژی سلول ایفا می‌کند از جمله اختلال در بیان آن با تنش اکسیداتیو، پیری سلولی، آرتریت، سرطان، دیابت و عفونت‌های ویروسی مرتبط است (Crow & Kelman, 1973). همچنین این ژن در چنگارهای ریه، معده و دهانه رحم بیش از حد بیان می‌شود (Zhang et al., 2010). *FANCA* روی کروموزوم ۱۴ نقش مهمی در خون‌سازی ایفا می‌کند. جهش در این ژن نیز سبب کم‌خونی و انواع سرطان‌های مرتبط با خون می‌شود (Tischkowitz & Hodgson, 2003). ژن *CD82* روی کروموزوم ۱۵ واقع است و سرکوبگر متاستاز می‌باشد و بیان آن در پیشرفت چنگار و سرطان‌ها کاهش می‌یابد (*Entrez Gene*). همچنین ارزیابی بیان این ژن توسط چنگارها نیز اطلاعاتی درباره سرطان ریه ارائه می‌دهد (Adachi et al., 1996).

ژن *HADH* روی کروموزوم ۶ واقع است و ترشح انسولین را تنظیم می‌کند. کمبود این ژن سبب هیپوگلیسمی می‌شود. *HADH* ممکن است یک نشانگر مفید برای پیش‌بینی مقاومت به انواع خاصی از شیمی درمانی در بیماران مبتلا به سرطان ریه در انسان باشد (Kageyama et al., 2011; Senniappan et al., 2012). پراکسیداسیون لیپیدی حاصل از تنش اکسیداتیو دیابتی سبب همولیز گلبول‌های قرمز و کم‌خونی می‌شود که این خود سبب کاهش حجم این گلبول‌ها می‌گردد. گلیکولیزاسیون غیر طبیعی هموگلوبین به پروتئین‌های غشای گلبول‌های قرمز آسیب وارد می‌کند. در نتیجه اختلال در گلبول‌های قرمز و هماتوکریت موجب کاهش اکسیژن‌رسانی مناسب به اندام‌های مختلف بدن می‌شود که معمولاً این اتفاق در ارتفاعات بالا اتفاق می‌افتد (Faramoshi et al., 2016).

ژن‌هایی همچون *PTMA*، *NMUR1*، *LEF1* و *COPS7B* بر ایمنی‌زایی و مقابله با عفونت موثرند. ژن *PTMA*، *Tymosin* $\alpha 1$ را کدگذاری میکند که جز اصلی *Thymosin Fraction 5* است که مسئول بازگرداندن عملکرد ایمنی در حیوانات فاقد غده تیموس می‌باشد (Wara et al., 1975). این ژن ایمنی سلولی را در انسان و حیوانات تقویت می‌کند و در سندرم حاد تنفسی، عفونت، سل، عفونت‌های ریوی و هیپاتیت B موثر است. همچنین این ژن در درمان سرطان نیز می‌تواند موثر باشد (Goldstein, 2009; Wu et al., 2015). ژن *NMUR1* یک نوروپپتید در مغز انسان و سایر پستانداران می‌باشد که دارای عملکردهای متنوعی از جمله انقباض عضلات صاف، تنظیم فشار خون، درک درد، اشتها، رشد استخوان و ترشح هورمون است و عموماً در سامانه عصبی محیطی با بالاترین سطح در دستگاه گوارش بیان می‌شود (Brighton et al., 2004; Torres et al., 2007). فرسته‌های عصبی این ژن مکانیسم انتخابی فراهم می‌کند که از طریق سامانه عصبی روده و سامانه عصبی ذاتی می‌تواند پاسخ‌های ضد میکروبی و التهابی دهد (Klose et al., 2017). همچنین این ژن در پاسخ به درد و التهاب نقش دارد (Torres et al., 2007). ژن *COPS7B* در ایمنی به انگل نقش به‌سزایی ایفا می‌کند (Ready, 2013). *LEF1* نیز در ایمنی ذاتی نقش دارد. همچنین در نگهداری سلول‌های بنیادی و رشد اندام ضروری است و بیان نابجای آن در چنگارزایی و تکثیر سلول‌های سرطانی و مهاجرت و تهاجم نقش دارد (Steinke & Xue, 2014).

ARMC9 روی کروموزوم ۲ واقع است که در ناهنجاری‌های رشدی، عصبی و مغزی نقش دارد (Latour et al., 2019). *CHMP1A* نیز در رشد مخچه نقش داشته و تکثیر سلول‌های پیش‌ساز سامانه عصبی مرکزی را تنظیم می‌کند (Li et al., 2008) و همچنین در سرکوب چنگار (کلیه و مجرای پانکراس) نقش ایفا می‌کند (Mochida et al., 2012). *TUBB3* در تشکیل و نگهداری سامانه عصبی نقش دارد و برای نگهداری و هدایت آکسون در پستانداران مورد نیاز می‌باشد و جهش در این ژن سبب اختلالات سامانه عصبی می‌شود (Tischfield et al., 2010). ژن *CPEPI* در مغز و سراسر سامانه عصبی غدد درون ریز از جمله پانکراس، هیپوفیز و سلول‌های غدد فوق کلیوی یافت می‌شود که در چاقی و ناباروری نقش ایفا می‌کند. جهش در این ژن سبب ناتوانی ذهنی، هموستاز غیر طبیعی گلوکز و .. می‌شود (Naggert et al., 1995). *ALX4* نیز به عنوان یک فعال‌کننده رونویسی عمل می‌کند و عمدتاً در مزانشیم جوانه‌های اندام جنینی در حال رشد بیان می‌شود، همچنین در رشد جمجمه و رشد

فولیکول‌های پوست و مو نقش دارد. جهش در این ژن سبب اختلال در رشد جمجمه، صورت و اپیدرم نیز می‌شود (Panman *et al.*, 2004; Kayserili *et al.*, 2009).

ژن‌های *TCF25*، *BLOCLS5* و *MC1R* روی کروموزوم های ۱۳ و ۱۴ نقش اصلی در تنظیم رنگ حیوانات دارند. گیرنده ملانوکورتین ۱ بر تنوع رنگدانه‌های پوست و مو تاثیر می‌گذارد، این ژن نقش مهمی در تنظیم سنتز یومالانین (سیاه-قهوه‌ای) و فائومالانین (قرمز-زرد) در ملانوسیت پستانداران دارند. جهش‌های فعال منجر به افزایش سنتز اومالانین می‌شود (Gebreselassie *et al.*, 2020). رابطه *TCF25* و *MC1R* بر رنگ پوشش پستانداران تاثیر دارد. *TCF25* در نزدیکی *MC1R* قرار دارد که در رنگ پوشش گوسفند قهوه‌ای مایل به زرد نقش دارد (Xiaowei & Qing, 2020). *BLOCLS5* نیز در رنگدانه های پوست از جمله بیوژنز ملانوزومی دخیل می‌باشد (Rossberg *et al.*, 2016).

SNORA ها یا RNAهای کوچک هسته‌ای یکی از بزرگترین گروه های RNAهای کد کننده غیر پروتئینی هستند که در حال حاضر در سلول‌های یوکاریوتی شناخته شده‌اند. *SNORA75* عموماً در سرطان‌زایی نقش دارد (Wei *et al.*, 2021). *SNORD82* نیز یک مولکول RNA غیر کد کننده است که در اصلاح سایر RNAهای هسته‌ای کوچک عمل می‌کند. این نوع RNA اصلاح کننده معمولاً در هسته سلول یوکاریوتی قرار دارد و محل اصلی بیوژنز *SNRNA* است که به عنوان RNA راهنما نامیده می‌شود (Galardi *et al.*, 2002).

ژن‌های *B3GNTV* (Carroll *et al.*, 2022)، *PRMT1* (Mathioudaki *et al.*, 2008)، *GAS8* (Pan *et al.*, 2018)، *VPS9D1* (Tan *et al.*, 2018)، *CDK10* (Guen *et al.*, 2013) و *EXT2* (McCormick *et al.*, 2000) در انواع سرطان نقش دارند. ژن *SPG7* در کنترل کیفیت پروتئین میتوکندی نقش دارد (Pfeffer *et al.*, 2014). همچنین *U6* در سیتولوژی سلول نقش ایفا می‌کند (Gene Cards). ژن *PPP1CC* بر کروموزوم ۱۳ واقع است و در اسپرم‌زایی نقش دارد و کاهش یا فقدان آن سبب ناباروری جنس نر می‌شود (Sinha *et al.*, 2013). *PDE6D* روی کروموزوم ۲ بر شبکه چشم و گیرنده‌های نوری نقش دارد (Zhang *et al.*, 2007).

در جدول ۳ QTLهایی که در مناطق تحت انتخاب شناسایی شدند، آورده شده‌اند. این QTLها بیشتر با صفات مرتبط با مشخصات شیر، گوشت و لاشه، تغییر هماتوکریت، وزن بدن، مشخصات استخوان، مشخصات پا، رسوب چربی در دم، صفات مرتبط با رنگ و درصد پوشش، حساسیت به آگزمای صورت و تعداد تخم مدفوع در ارتباط بودند. وجود این QTLها و نیز ژن‌های مرتبط در این دو دسته نشانگر وجود تفاوت و تنوع در صفات بین دو گروه مورد بررسی است. میتوان نتیجه گرفت که ارتفاع محل زندگی بر روی عناصر موجود در خاک و پوشش گیاهی تاثیر می‌گذارد که همین امر بر رشد، بیماری‌ها، ایمنی و وظایف متعدد فیزیولوژیک می‌تواند تاثیرگذار باشد. مواد معدنی به شکل‌های مختلف و در محل‌های همچون خون، استخوان، شیر و ... در بدن ذخیره می‌شود (McDonald *et al.*, 2006) که این امر می‌تواند سبب تغییر در تراکم استخوان‌ها، تغییر در محتویات و میزان شیر تولیدی، ایمنی بدن، تغییر در مشخصات استخوان و وزن شود.

جدول ۳. ژن‌ها و QTL‌های شناسایی شده تحت انتخاب در گوسفندان در ارتفاع بالا و پایین			
کروموزوم	موقعیت سیگنال	نام ژن	QTL
۲	-۲۳۲۴۷۲۵۶۱ ۳۳۲۴۶۹۹۹۵	<i>ARMC9-NCL-PTMA-PDE6D- B3GNT7- COPS7B-NMURI- PRMT1- SNORA75- SNORA75B- SNORD20- SNORD82- SNORA62</i>	Milk fat percentage- Milk fat yield- Meat eicosapentaenoic acid content- Meat linolenic acid content- Meat docosapentaenoic acid content- Hot carcass weight- Worm count- Haemonchus contortus FEC- Change in hematocrit- Body weight- Fecal egg count- bone density
۶	-۱۷۱۵۰۷۴۴ ۱۷۱۴۱۴۴۴	<i>LEF1- HADH- CYP2U1</i>	fat weight in carcass- Total bone- Bone area- facial eczema susceptibility- Hot carcass weight- Body weight - Lean meat yield percentage
۱۳	-۴۹۱۳۴۸۳۰ ۴۸۹۶۹۷۷۵	<i>PPP1CC- BLOS1S5- BLOC1S5.TXNDC5</i>	Milk Yield- muscle weight in carcass- Tail fat deposition
۱۴	-۱۴۲۴۲۳۲۷ ۱۴۱۸۴۰۶۰	<i>SPG7- SNORD68- CPNE7- DPEP1- SPATA2L- ZNF276- VPS9D1- FANCA- SPIRE2- TCF25- MC1R- TUBB3 - DEF8- CENPBD1- DBNDD1- GAS8-W5PZX8- SHCBP1- CDK10-CHMP1A</i>	Coat color- Fecal egg count- Dressing percentage- Bone weight in carcass- fat weight in carcass- Total lambs born- Nematodirus FEC
۱۵	-۷۲۷۴۲۵۸۵ ۷۲۷۱۶۱۳۹	<i>EXT2- U6- ALX4- CD82</i>	Entropion- Hind leg length- Staple length

برای درک بهتر عملکردهای ژن‌های تحت انتخاب، آنالیز هستی شناسی انجام شد و نتایج در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که ژن‌ها در مسیرهای پاسخ سلولی به یون کلسیم، حمل و نقل با واسطه ویزیکول، گلیکوزیلاسیون پروتئین و انتقال فرسته درون سلولی دخیل هستند، هرچند که فقط مسیر پاسخ سلولی به یون کلسیم در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود. کلسیم پنجمین عنصر فراوان بدن است که در استخوان‌ها و دندان وجود دارد. حدود یک درصد از کلسیم بدن در فیزیولوژی نقش مهمی دارد. یون کلسیم به عنوان پیام رسان دوم در تحریک و انقباض نقش ایفا می‌کند. انواع تحریک سلول باعث ایجاد جریان کلسیم و پاسخ سلولی به محرک می‌شود. می‌توان گفت که این عنصر در فعال‌سازی سلول‌های یوکاریوتی نقش داشته و در برانگیختن پاسخ هر نوع سلول تمایز یافته توسط پیام رسان خارج سلولی مناسب خود، که ممکن است یک هورمون، متابولیت در گردش یا انتقال دهنده عصبی باشد، عمل می‌کند. این یون در انقباضات فیزیولوژیکی عضلات اسکلتی، قلبی و صاف نقش دارد (Rasmussen, 1985; Endo, 2006). انتقال اطلاعات ژنتیکی با واسطه ویزیکول خارج سلولی بین سامانه خون‌ساز و مغز در پاسخ به التهاب نقش داشته و همچنین انتقال با واسطه ویزیکول در چنگار و سرطان نیز نقش ایفا می‌کند (Ridder *et al.*, 2014).

گلیکوزیلاسیون پروتئین پیچیده‌ترین فرآیند اصلاح پس از ترجمه است. بیش از ۵۰ درصد پروتئین‌ها گلیکوزیله می‌شوند. بسیاری از محصولات طبیعی با مولکول کوچک نیز برای بیان عملکرد خود به گلیکوزیلاسیون نیاز دارند. توسعه ابزارهای مصنوعی مؤثر برای استفاده در درک تأثیر گلیکوزیلاسیون بر ساختار و عملکرد بیومولکول‌ها منجر به توسعه استراتژی‌های جدید برای مقابله با مشکلات عمده مرتبط با شناخت بیولوژیکی با واسطه کربوهیدرات خواهد شد. تغییرات در گلیکوزیلاسیون نه تنها مستقیماً بر رشد و بقای سلول تأثیر می‌گذارد بلکه باعث تسهیل سامانه ایمنی ناشی از چنگار و متاستاز نیز می‌شود. همچنین در سرطان و هیپرتروفی قلبی و رشد و بیماری‌ها مؤثر می‌باشد (Dennis *et al.*, 1999; Wong, 2005; Stowell *et al.*, 2015).

- 1 Cellular response to calcium ion
- 2 Vesicle-mediated transport
- 3 Protein glycosylation
- 4 Intracellular signal transduction

گلیکوزیلاسیون پروتئین پیچیده ترین فرآیند اصلاح پس از ترجمه است.... گلیکوزیلاسیون پروتئین پیچیده ترین فرآیند اصلاح بعد از ترجمه است....

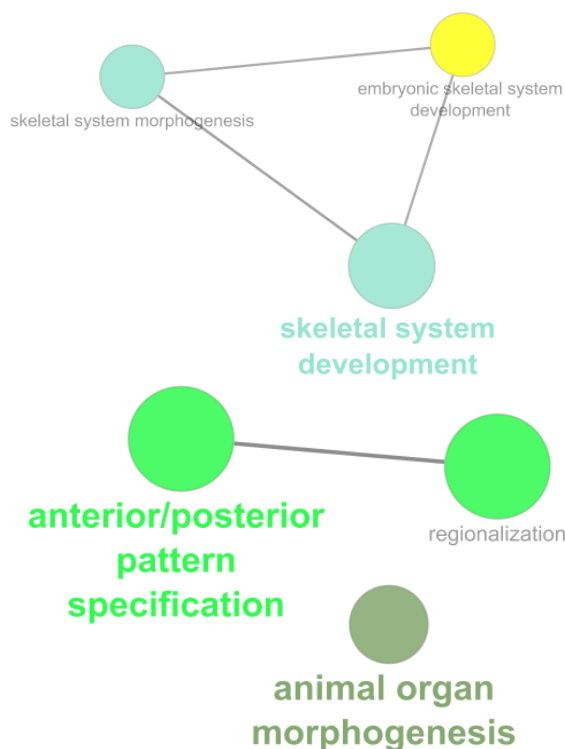
جدول ۴. آنالیز هستی شناسی و مسیرهای شناسایی شده در مناطق تحت انتخاب مثبت			
ژن‌ها	PValue	فرآیندهای بیولوژیکی	GO Term
CPNE7-DPEP1	۰/۰۵	پاسخ سلولی به یون کلسیم	GO:0071277
CHMP1A-SPIRE2	۰/۱۸	انتقال با واسطه ویزیکول	GO:0016192
B3GNT7-EXT2	۰/۱۹	گلیکوزیلاسیون پروتئین	GO:0006486
W5PZX8-DEF8	۰/۳۴	انتقال فرسته درون سلولی	GO:0035556

شبکه‌های ژنی با اطلاعات بدست آمده از آماره تتا در شکل ۴ نشان داده شده است که می‌توان به شبکه‌های توسعه سامانه اسکلتی حیوان و جنین اشاره کرد. استخوان‌ها اندام‌های سفت و سختی هستند که بخشی از اسکلت درونی مهره‌داران را تشکیل می‌دهند. آنها برای حرکت، حمایت و محافظت از اندام‌های مختلف بدن، تولید گلبول‌های قرمز و سفید خون و ذخیره مواد معدنی عمل می‌کنند. بافت استخوانی نوعی بافت همبند متراکم است. استخوان‌ها دارای اشکال مختلف با ساختار داخلی و خارجی پیچیده هستند و همچنین سبک وزن و در عین حال قوی و سخت هستند. یکی از انواع بافتی که بافت استخوانی را تشکیل می‌دهد، بافت معدنی است که به استخوان استحکام و ساختار داخلی سه بعدی شبیه لانه زنبوری می‌دهد. انواع دیگر بافت موجود در استخوان‌ها عبارتند از: مغز، اندوستئوم و پروستئوم، اعصاب، عروق خونی و غضروف (Nasoori, 2020). تشکیل سامانه اسکلتی مشخصه‌ای است که مهره‌داران را از بی‌مهرگان متمایز می‌کند. هویت موقعیتی هر عنصر اسکلتی در اوایل رشد جنینی، قبل از تراکم مزانشیمی، با تشکیل الگو به دست می‌آید. ارتباط سلول-سلول نقش مهمی در شکل‌گیری الگو ایفا می‌کند و توسط چندین مسیر پیام‌دهی اصلی انجام می‌شود. این مسیرها همچنین بعداً در رشد اسکلتی برای کنترل تعیین سرنوشت سلولی، تکثیر، بلوغ و قطبیت استفاده می‌شوند. تشکیل اسکلت فرآیندی است که در طول تکامل مهره‌داران کامل می‌شود. درک مکانیسم‌های مولکولی تنظیم‌کننده تشکیل غضروف و استخوان در طول رشد به ما امکان می‌دهد تا این مسیرها را برای ارتقای ترمیم بافت اسکلتی با استفاده از سلول‌های درون‌زا، سلول‌ها و بافت‌های اتولوگ بازگردانیم (Yang, 2013). به طور کلی می‌توان گفت که یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد رشد جنین مهره‌داران، تشکیل سامانه اسکلتی است که نه تنها نقش‌های مکانیکی، حمایتی و حفاظتی را ایفا می‌کند، بلکه چندین فرآیند مهم هموستاتیک را به صورت سامانه‌ای در حیوانات بالغ تنظیم می‌کند. سامانه اسکلتی یک اندام مشتق از مزودرم است و تشکیل آن از تراکم مزانشیمی شروع می‌شود، که در آن سلول‌های پیش‌ساز اسکلتی، که به عنوان پیش‌سازهای استخوانی نیز شناخته می‌شوند، یا غضروف‌ها را برای تشکیل غضروف یا استئوبلاست‌ها را برای تشکیل استخوان ایجاد می‌کنند. توسعه اسکلت‌ها توسط برنامه‌هایی همچون تکثیر سلولی، تمایز، بقا و سازماندهی کنترل می‌شود (Yang, 2009).

ریخت‌زایی همچنین توسعه اشکال حیات تک سلولی را توصیف می‌کند که مرحله جنینی در چرخه زندگی خود ندارند و برای تکامل اشکال جدید ضروری است. ریخت‌زایی یک فرآیند مکانیکی است که شامل نیروهایی است که تنش مکانیکی، فشار و حرکت سلول‌ها را ایجاد می‌کند و می‌تواند توسط برنامه‌های ژنتیکی با توجه به الگوی فضایی سلول‌ها در بافت القا شود. ریخت‌زایی همچنین شامل تغییراتی در ساختار سلولی یا نحوه تعامل سلول‌ها در بافت‌ها می‌شود. این تغییرات می‌تواند منجر به طویل شدن بافت، نازک شدن، چین خوردگی، تهاجم یا جدا شدن یک بافت به لایه‌های مجزا شود (Bidhendi et al., 2019; Duran-Nebreda et al., 2021).

یکی از انواع بافتی که بافت استخوانی را تشکیل می‌دهد، بافت معدنی است و این به آن استحکام و ساختار داخلی سه بعدی شبیه لانه زنبوری می‌دهد.

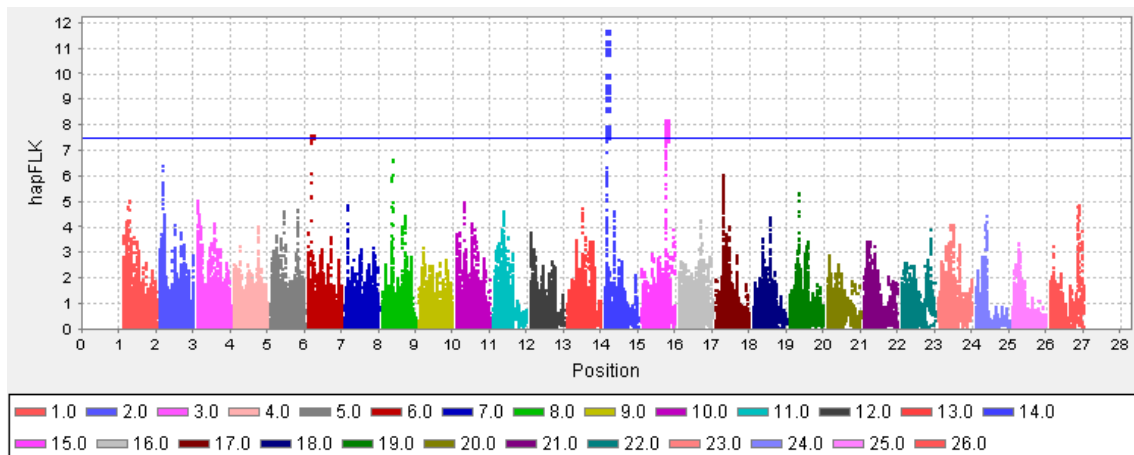
یکی دیگر از این شبکه ها مشخصات الگوی قدامی/خلفی است. ساختار بدنی، یک بافت با متابولیسم فعال بوده که در طول زندگی حیوان پیوسته در حال بازسازی است. فسیل های به جا مانده از گونه های جانوری، الگوهای دقیقی از تکامل و سازگاری با محیط زیست در جانوران منقرض شده را از راه بررسی روی سامانه ساختار بدنی آنها روشن می کند. استخوان بندی درون و بیرون بدن جاندار ، دو سامانه ساختار بدنی هستند که اهمیت بالایی در زیست شناسی تکامل دارد (Mohammadi *et al.*, 2018).



شکل ۴. نتایج شبکه ژنی آماره تتا: در این شکل نشان داده شده است که ژن های شناسایی شده به طور معنی دار در چه شبکه هایی فعالیت می کنند و تعاملات شبکه ها با یکدیگر نشان داده شده است.

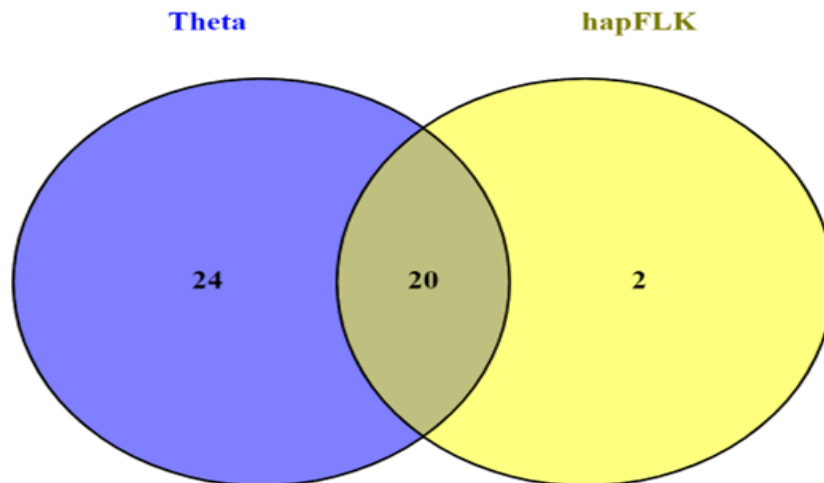
شناسایی نشانه های انتخاب با استفاده از روش hapFLK و بررسی بیوانفورماتیکی این مناطق ژنومی

در شکل ۵ نمودار منهدتن بر اساس ضرایب hapFLK در هر جایگاه نشانگری نشان داده شده است. نتایج نشان داد ۱۵ ناحیه ژنومی که در صدک ۹۹/۹۹ کل ارزش های hapFLK قرار گرفته بودند به عنوان نشانه های انتخاب شناسایی و تعیین شدند. این مناطق بر روی کروموزوم های ۶، ۱۴ و ۱۵ واقع شده اند که بالاترین فرسته انتخاب روی کروموزوم ۱۴ بود.



شکل ۵. توزیع ارزش‌های hapFLK در سطح ژنوم گوسفندان در ارتفاع بالا و پایین سطح دریا: موقعیت ژنومی SNPها بر روی محور X و ارزش تنای آنها بر روی محور Y نشان داده شده است. مناطقی که بالای خط آستانه قرار دارند، مناطقی هستند که در صدک ۹۹،۹۹ کل ارزش‌های تنای قرار دارند و در مقایسه گروه پوستی-پشمی به صورت متمایز (واگرا) هدف انتخاب قرار گرفته‌اند.

پس از شناسایی مناطق تحت انتخاب، ژن‌های گزارش شده در این مناطق مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۵). روش‌های آماری تنای و hapFLK پیش‌فرض‌های آماری متفاوتی دارند و ممکن است مناطق ژنومی متفاوتی را شناسایی کنند (Pavlidis & Alachiotis, 2017)، اما همانطور که ملاحظه می‌شود بیشتر ژن‌ها بین این دو روش مشترک بودند که سبب می‌شود مناطق ژنومی و ژن‌های کاندیدای قوی‌تری برای ارتباط با سازگاری به ارتفاع در گوسفندان ایرانی شناسایی شود (شکل ۶). تحقیقات گذشته حاکی از آن است که اگر توسط روش‌های مختلف آماری، مناطق ژنومی مشترکی شناسایی شود، آن مناطق کاندیدای معتبرتری برای صفات مورد پژوهش می‌باشند (Grossman *et al.*, 2010; Moradi *et al.*, 2022). در قسمت‌های قبل درباره عملکرد ژن‌های مشترک شناسایی شده با دو روش آماری تنای و hapFLK توضیح داده شد.



Test	n	Genes
Theta hapFLK	20	CHMP1A, DBNDD1, FANCA, EXT2, SPG7, SHCBP1, TCF25, SPIRE2, CDK10, CD82, GAS8, ZNF276, LEF1, DEF8, VPS9D1, CPNE7, W5PZX8, HADH, DPEP1, SPATA2L
Theta	24	PPP1CC, TUBB3, U6, B3GNT7, PRMT1, MC1R, NCL, SNORA62, PTMA, ARM39, SNORA75, SNORD68, BLOC1S5, NMUR1, CYP2U1, SNORD82, TXNDC5, SNORA75B, PDE5D, CENPBD1, COPS7B, ALX4, SNORD20, BLOS1S5
hapFLK	2	ACCS, ACCSL

شکل ۶. نمودار میزان همپوشانی دو آماره Theta و hapFLK از نظر استخراج نواحی مشابه ژنومی

نتایج بررسی QTL حاکی از آن است که QTLها بیشتر با صفات مرتبط با مشخصات لاشه، استخوان و گوشت، وزن بدن، حساسیت به آگزامی صورت، میزان غلظت هموگلوبین سلولی، رنگ و درصد پوشش بدن، تعداد تخم در مدفوع، کل بره‌های متولدشده و مشخصات پا در ارتباط بودند. وجود این QTLها و نیز ژن‌های مرتبط در این دو گروه، نشانگر وجود تفاوت و تنوع در صفات بین دو گروه مورد بررسی است. ارتفاع بالا سبب ایجاد تغییراتی در عملکرد دستگاه‌های مختلف بدن می‌شود. شایع‌ترین تغییر، افزایش هموگلوبین خون برای جذب بیشتر اکسیژن می‌باشد که واکنشی در برابر کم‌اکسیژنی نسبی ارتفاعات در اثر کاهش فشار نسبی اکسیژن است. به عبارتی با افزایش ارتفاع فشار هوا کاهش می‌یابد و این کاهش فشار باعث می‌شود عبور اکسیژن از ریه‌ها و عبور از سامانه عروقی و ورود به جریان خون به دشواری انجام شود (Moon, 2005).

کروموزوم	موقعیت سیگنال	نام ژن	QTL
۶	-۱۷۱۵۲۸۴۰ ۱۷۱۴۵۷۲۰	<i>LEF1-HADH</i>	fat weight in carcass- Bone area- Mean corpuscular hemoglobin concentration- Total bone- facial eczema susceptibility- Hot carcass weight- Body weight- Lean meat yield percentage
۱۴	-۱۴۲۳۴۱۸۴ ۱۴۱۷۳۳۱۶	<i>SPG7- CPNE7- DPEP1- SPATA2L- ZNF276- VPS9D1- FANCA- SPIRE2- TCF25- DEF8 - DBNDD1- GAS8- SHCBP1- CDK10- CHMP1A-W5PZX8</i>	Coat color- Fecal egg count- Bone weight in carcass- fat weight in carcass- Total lambs born- Dressing percentage- Nematodirus FEC
۱۵	-۷۲۷۵۰۹۱۷ ۷۲۵۰۸۶۴۴	<i>EXT2-CD82-ACCSL-ACCS</i>	Hind leg length- Staple length

مسیرهای زیستی برای درک بهتر عملکردهای ژن‌های تحت انتخاب بررسی شد و نتایج در جدول ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که ژن‌ها در مسیرهای فرآیند بیوسنتزی، پاسخ سلولی به یون کلسیم، حمل و نقل با واسطه ویزیکول و انتقال فرسته درون سلولی دخیل هستند. همانطور که در جدول ۶ ملاحظه می‌شود فقط برای مسیرهای فرآیند بیوسنتزی و پاسخ سلولی به یون کلسیم معنی‌داری در حد ۰/۰۵ تایید شد. اکثر مسیرها با نتایج تتا یکسان بودند. توضیحات در قسمت قبل داده شده است. مواد معدنی بر ایمنی سلولی نقش مهمی دارند (Mohammadpour & Ghandehari, 2022). یون کلسیم در سامانه ایمنی نقش به‌سزایی دارد و ممکن است مقادیر زیاد آن باعث ایمنی نامطلوب (خود ایمنی) و واکنش‌های سلولی شود (Budinger & Hertl, 2000). قرار گرفتن در معرض برخی از فلزات ممکن است باعث سرطان‌زایی و تنش اکسیداتیو در پاسخ‌های سلولی شود (Shi et al., 2004).

ژن‌ها	PValue	فرآیندهای بیولوژیکی	GO Term
<i>ACCSL-ACCS</i>	۰/۰۳	فرآیند بیوسنتزی	GO:0009058
<i>CPNE7-DPEP1</i>	۰/۰۴	پاسخ سلولی به یون کلسیم	GO:0071277
<i>CHMP1A-SPIRE2</i>	۰/۱۴	انتقال با واسطه ویزیکول	GO:0016192
<i>W5PZX8-DEF8</i>	۰/۲۸	انتقال فرسته درون سلولی	GO:0035556

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش پویش ژنومی در راستای شناسایی نشانه‌های انتخاب در گوسفندان ایرانی که در مناطق با ارتفاع زیاد از سطح دریا و ارتفاع کم می‌زیستند، انجام گرفت. ژن‌های شناسایی شده در مناطق مورد انتخاب در ارتباط با سازگاری با شرایط کم اکسیژنی، خون‌سازی، ایمنی‌زایی، مقابله با عفونت، تنظیم فشار خون، پاسخ به درد و التهاب و سرکوب سرطان نقش دارند. تثبیت آل‌های مفید گواهی بر انتخاب مثبت در دو جمعیت می‌باشد که در جهت ماندگاری دام‌های مورد پژوهش در محیط در حال رخ دادن می‌باشد. برخی از ژن‌ها نقش بیولوژیکی کامل شناخته شده‌ای ندارند و ممکن است بین این ژن‌ها تاثیرات متقابل وجود داشته باشد که شناخته شده نیست. همچنین QTL‌های شناسایی شده عمدتاً با صفات میزان غلظت هموگلوبین سلولی، مشخصات شیر، گوشت و لاشه، تغییر هماتوکریت، وزن بدن، مشخصات استخوان، رنگ و درصد پوشش بدن ارتباط داشتند. به طور خلاصه دو گروه حیوانات در این پژوهش به شرایط محیطی و جغرافیایی مختلف سازگار شده‌اند و از لحاظ عملکردی با یکدیگر متفاوتند که وجود تفاوت‌ها در بین این دو گروه منطقی است. به طور کل، از داده‌های این تحقیق می‌توان در تحقیقات مرتبط با انتخاب ژنومی، طراحی سامانه‌های آمیزشی و بررسی‌ها و ارزیابی‌های تکمیلی در جهت سازگاری بیشتر با ارتفاع استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته از طرح شماره ۹۸۰۲۸۸۱۴ انجام شده است، که بدینوسیله از مسئولین محترم این مؤسسه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Adachi, M., Taki, T., Ieki, Y., Huang, C., HigasMyama, M. & Miyake, M. (1996). Correlation of KAI1/CD82 Gene Expression with Good Prognosis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, 56(8), 1751-1755.
- Akey, J.M. (2009). Constructing genomic maps of positive selection in humans. Where do we go from here? *Genome Research*, 19, 711-722.
- Akey, J. M., Zhang, G., Zhang, K., Jin, L., & Shriver, M. D. (2002). Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Research*, 12(12), 1805-1814.
- Alberts, B. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed.). New York: Garland Science.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), 263-265.
- Bidhendi, A. J., Altartouri, B., Gosselin, F. P., & Geitmann, A. (2019). Mechanical stress initiates and sustains the morphogenesis of wavy leaf epidermal cells. *Cell Reports*, 28(5), 1237-1250.
- Biswas, S. & Akey, J. M. (2006). Genomic insights into positive selection. *Trends in Genetics*, 22, 437-436.
- Bonhomme, M., Chevalet, C., Servin, B., Boitard, S., Abdallah, J., Blott, S., & SanCristobal, M. (2010). Detecting selection in population trees: The Lewontin and Krakauer test extended. *Genetics*, 186(1), 241-262.
- Brighton, P. J., Szekeres, P. G. & Willars, G. B. (2004). Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles. *Pharmacol*, 56 (2), 231-48.
- Büdinger, L., Hertl, M., & Büdinger, L. (2000). Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy*, 55(2), 108-115.
- Carroll, D. J., Burns, M. W., Mottram, L., Propheter, D. C., Boucher, A., Lessen, G. M., ... & Kohler, J. J. (2022). Interleukin-22 regulates B3GNT7 expression to induce fucosylation of glycoproteins in intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 298(2).
- Crow, T. J., & Kelman, G. R. (1973). Psychological effects of mild acute hypoxia. *British Journal of Anaesthesia*, 45(4), 335-337.

- Dennis, J. W., Granovsky, M., & Warren, C. E. (1999). Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays*, 21(5), 412-421.
- Duran-Nebreda, S., Pla, J., Vidiella, B., Piñero, J., Conde-Pueyo, N., & Solé, R. (2021). Synthetic lateral inhibition in periodic pattern forming microbial colonies. *ACS Synthetic Biology*, 10(2), 277-285.
- Edea, Z., Dessie, T., Dadi, H., Do, K. T., & Kim, K. S. (2017). Genetic diversity and population structure of Ethiopian sheep populations revealed by high-density SNP markers. *Frontiers in Genetics*, 8, 218.
- Endo, M. (2006). Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-contraction coupling. *Journal of Pharmacological Sciences*, 100(5), 519-524.
- Faramoushi, M., Amir Sasan, R., Sari Sarraf, V., & Karimi, P. (2016). Effect of simulated intermittent altitude on the metabolic and hematologic parameters in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*, 16(1), 53-64.
- Fariello, M. I., Boitard, S., Naya, H., SanCristobal, M., & Servin, B. (2013). Detecting signatures of selection through haplotype differentiation among hierarchically structured populations. *Genetics*, 193(3), 929-941.
- Fededa, J. P., & Gerlich, D. W. (2012). Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nature Cell Biology*, 14(5), 440-447.
- Galardi, S., Fatica, A., Bachi, A., Scaloni, A., Presutti, C., & Bozzoni, I. (2002). Purified box C/D snoRNPs are able to reproduce site-specific 2'-O-methylation of target RNA in vitro. *Molecular and Cellular Biology*, 22(19), 6663-6668.
- Gale, G. E., Torre-Bueno, J. R., Moon, R. E., Saltzman, H. A., & Wagner, P. D. (1985). Ventilation-perfusion inequality in normal humans during exercise at sea level and simulated altitude. *Journal of Applied Physiology*, 58(3), 978-988.
- Gardner, J. L., Peters, A., Kearney, M., Joseph, L., & Heinsohn, R. (2011). Declining body size: a third universal response to warming? *Trends in Ecology & Evolution*, 26(6), 285-291.
- Gebreselassie, G., Liang, B., Berihulay, H., Islam, R., Abied, A., Jiang, L., ... & Ma, Y. (2020). Genomic mapping identifies two genetic variants in the MC1R gene for coat colour variation in Chinese Tan sheep. *PloS One*, 15(8), e0235426.
- Gene Cards. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STAT>.
- Goldstein, A. L., & Goldstein, A. L. (2009). From lab to bedside: emerging clinical applications of thymosin α 1. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(5), 593-608.
- Gorkhali, N. A., Dong, K., Yang, M., Song, S., Kader, A., Shrestha, B. S., ... & Ma, Y. (2016). Genomic analysis identified a potential novel molecular mechanism for high-altitude adaptation in sheep at the Himalayas. *Scientific Reports*, 6(1), 1-10.
- Grossman, S. R., Shylakhter, I., Karlsson, E. K., Byrne, E. H., Morales, S., Frieden, G., ... & Sabeti, P. C. (2010). A composite of multiple signals distinguishes causal variants in regions of positive selection. *Science*, 327(5967), 883-886.
- Guen, V. J., Gamble, C., Flajolet, M., Unger, S., Thollet, A., Ferandin, Y., ... & Colas, P. (2013). CDK10/cyclin M is a protein kinase that controls ETS2 degradation and is deficient in STAR syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48), 19525-19530.
- Hancock, A. M., Witonsky, D. B., Alkorta-Aranburu, G., Beall, C. M., Gebremedhin, A., Sukernik, R., ... & Di Rienzo, A. (2011). Adaptations to climate-mediated selective pressures in humans. *PLoS Genetics*, 7(4), e1001375.
- Hoffmann, I. (2010). Climate change in context: implications for livestock production and diversity. *Edited by NE Odongo, M. Garcia & GJ Viljoen*, 33.
- Horna-Terrón, E., Pradilla-Dieste, A., Sánchez-de-Diego, C., & Osada, J. (2014). TXNDC5, a newly discovered disulfide isomerase with a key role in cell physiology and pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 23501-23518.
- Joost, S., Bonin, A., Bruford, M. W., Després, L., Conord, C., Erhardt, G., & Taberlet, P. (2007). A spatial analysis method (SAM) to detect candidate loci for selection: towards a landscape

- genomics approach to adaptation. *Molecular Ecology*, 16(18), 3955-3969.
- Kageyama, T., Nagashio, R., Ryuge, S., Matsumoto, T., Iyoda, A., Satoh, Y., ... & Sato, Y. (2011). HADHA is a potential predictor of response to platinum-based chemotherapy for lung cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12(12), 3457-63.
- Karell, P., Ahola, K., Karstinen, T., Valkama, J., & Brommer, J. E. (2011). Climate change drives microevolution in a wild bird. *Nature Communications*, 2(1), 1-7.
- Kayserili, H., Uz, E., Niessen, C., Vargel, I., Alanay, Y., Tuncbilek, G., ... & Akarsu, N. A. (2009). ALX4 dysfunction disrupts craniofacial and epidermal development. *Human Molecular Genetics*, 18(22), 4357-4366.
- Klose, C. S., Mahlaköiv, T., Moeller, J. B., Rankin, L. C., Flamar, A. L., Kabata, H., ... & Artis, D. (2017). The neuropeptide neuromedin U stimulates innate lymphoid cells and type 2 inflammation. *Nature*, 549(7671), 282-286.
- Kreitman, M. (2000). Methods to detect selection in populations with applications. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1, 539-59.
- Latour, B. L., Van, De., Weghe, J. C., Rusterholz, T. D., Letteboer, S. J., Gomez, A., Shaheen, R., Gesemann, M., Grout, M. E., van Reeuwijk, J., Van Beersum, S. E. & Miller, C. V. (2019). ARMC9 and TOGARAM1 define a Joubert syndrome-associated protein module that regulates axonemal post-translational modifications and cilium stability. *BioRxiv*, 1, 817213.
- Li, J., Belogortseva, N., Porter, D., & Park, M. (2008). Chmp1A functions as a novel tumor suppressor gene in human embryonic kidney and ductal pancreatic tumor cells. *Cell Cycle*, 7(18), 2886-2893.
- Lobell, D. B., Burke, M. B., Tebaldi, C., Mastrandrea, M. D., Falcon, W. P., & Naylor, R. L. (2008). Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science*, 319(5863), 607-610.
- MacEachern, S., Hayes, B., McEwan, J., & Goddard, M. (2009). An examination of positive selection and changing effective population size in Angus and Holstein cattle populations (*Bos taurus*) using a high density SNP genotyping platform and the contribution of ancient polymorphism to genomic diversity in Domestic cattle. *BMC Genomics*, 10(1), 1-19.
- Mastrangelo, S., Bahbahani, H., Moioli, B., Ahbara, A., Al Abri, M., Almathen, F., ... & Ciani, E. (2019). Novel and known signals of selection for fat deposition in domestic sheep breeds from Africa and Eurasia. *PLoS One*, 14(6), e0209632.
- Mathioudaki, K., Papadokostopoulou, A., Scorilas, A., Xynopoulos, D., Agnanti, N., & Talieri, M. (2008). The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer. *British Journal of Cancer*, 99(12), 2094-2099.
- McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K. T., & Tufaro, F. (2000). The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 668-673.
- McDonald, P. R., Edwards, J. F., Greenhalgh, D. & Morgan, C. A. (2006). *Animal Nutrition. 1st Ed. minerals*. 760 p.
- Mochida, G. H., Ganesh, V. S., De Michelena, M. I., Dias, H., Atabay, K. D., Kathrein, K. L., ... & Walsh, C. A. (2012). CHMP1A encodes an essential regulator of BMI1-INK4A in cerebellar development. *Nature Genetics*, 44(11), 1260-1264.
- Mohammadi, H., Rafat, A., Moradi Shahre Babak, M. Shoja, J. & Moradi, M. H. (2018). Scanning the whole genus to determine positively selected sites in Zandi sheep. *Iranian Journal of Animal Science*, 48(4), 533-548.
- Mohammadpour R, Ghandehari H. (2022). Mechanisms of immune response to inorganic nanoparticles and their degradation products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1(180): 114022.
- Moon, R. E. (2005). Clinical care in altered environments: at high and low pressure and in space. *Miller's Anesthesia*, 2665-2701.
- Moradi, M. H., Khaltabadi-Farahani, A. H., Khodaei-Motlagh, M., Kazemi-Bonchenari, M., &

- McEwan, J. (2022). Genome-wide selection of discriminant SNP markers for breed assignment in indigenous sheep breeds. *Annals of Animal Science*, 21(3), 807-831.
- Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds, K. G., & McEwan, J. C. (2012). Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. *BMC Genetics*, 13(1), 1-15.
- Naggert, J. K., Fricker, L. D., Varlamov, O., Nishina, P. M., Rouille, Y., Steiner, D. F., ... & Leiter, E. H. (1995). Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nature Genetics*, 10(2), 135-142.
- Nasoori, A. (2020). Formation, structure, and function of extra-skeletal bones in mammals. *Biological Reviews*, 95(4), 986-1019.
- Nielsen, R. (2005). Molecular signature of natural selection. *Annual Review of Genetics*, 39, 197-218.
- Oleksyk, T. K., Smith, M. W., & O'Brien, S. J. (2010). Genome-wide scans for footprints of natural selection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537), 185-205.
- Pan, W., Zhang, N., Liu, W., Liu, J., Zhou, L., Liu, Y., & Yang, M. (2018). The long noncoding RNA GAS8-AS1 suppresses hepatocarcinogenesis by epigenetically activating the tumor suppressor GAS8. *Journal of Biological Chemistry*, 293(44), 17154-17165.
- Panman, L., Drenth, T., Tewelscher, P., Zuniga, A., & Zeller, R. (2004). Genetic interaction of Gli3 and Alx4 during limb development. *International Journal of Developmental Biology*, 49(4), 443-448.
- Pavlidis, P., & Alachiotis, N. (2017). A survey of methods and tools to detect recent and strong positive selection. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 24(1), 1-17.
- Pfeffer, G., Gorman, G. S., Griffin, H., Kurzawa-Akanbi, M., Blakely, E. L., Wilson, I., ... & Chinnery, P. F. (2014). Mutations in the SPG7 gene cause chronic progressive external ophthalmoplegia through disordered mitochondrial DNA maintenance. *Brain*, 137(5), 1323-1336.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D. & et al. (2007). PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *The American Journal of Human Genetics*, 81, 559-575.
- Qanbari, S., Pausch, H., Janse, S., Somel, M., Strom, T.M., Fries, R., Nielsen, R. & Simianer, H. (2014). Classic Selective Sweeps Revealed by Massive Sequencing in Cattle. *PLoS Genetics*, 10, 41-48.
- Rasmussen, H. (1985). Calcium Ion. *In Calcium in biological systems*, pp. 13-22.
- Ready, S. (2013). Abnormal Growth of the Parasite *Toxoplasma Gondii* in Human Cells.
- Ridder, K., Keller, S., Dams, M., Rupp, A. K., Schlaudraff, J., Del Turco, D., ... & Momma, S. (2014). Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS Biology*, 12(6), e1001874.
- Rossberg, W., Saturnus, R., Wagenpfeil, S., Kleber, M., März, W., Reichrath, S., ... & Reichrath, J. (2016). Human pigmentation, cutaneous vitamin D synthesis and evolution: variants of genes (SNPs) involved in skin pigmentation are associated with 25 (OH) D serum concentration. *Anticancer Research*, 36(3), 1429-1437.
- Samuel, S., & Gary, W. (2011). Polar bodies—more a lack of understanding than a lack of respect. *Molecular Reproduction and Development*, 78(1), 3-8.
- Senniappan, S., Shanti, B., James, C., & Hussain, K. (2012). Hyperinsulinaemic hypoglycaemia: genetic mechanisms, diagnosis and management. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(4), 589-601.
- Shi, H., Hudson, L. G., & Liu, K. J. (2004). Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(5), 582-593.
- Sinha, N., Puri, P., Nairn, A. C., & Vijayaraghavan, S. (2013). Selective ablation of Ppp1cc gene in

- testicular germ cells causes oligo-teratozoospermia and infertility in mice. *Biology of Reproduction*, 89(5), 128-1.
- Steinke, F. C., & Xue, H. H. (2014). From inception to output, Tcf1 and Lef1 safeguard development of T cells and innate immune cells. *Immunologic Research*, 59(1), 45-55.
- Stowell, S. R., Ju, T., & Cummings, R. D. (2015). Protein glycosylation in cancer. *Annual Review of Pathology*, 10, 473.
- Tan, J., & Yang, L. (2018). Long noncoding RNA VPS9D1-AS1 overexpression predicts a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1600-1606.
- Tischfield, M. A., Baris, H. N., Wu, C., Rudolph, G., Van Maldergem, L., He, W., ... & Engle, E. C. (2010). Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell*, 140(1), 74-87.
- Tischkowitz, M. D., and Hodgson, S. V. (2003). Fanconi anaemia. *Journal of Medical Genetics*, 40, 1-10.
- Torres, R., Croll, S. D., Vercollone, J., Reinhardt, J., Griffiths, J., Zabski, S., ... & Murphy, A. J. (2007). Mice genetically deficient in neuromedin U receptor 2, but not neuromedin U receptor 1, have impaired nociceptive responses. *Pain*, 130(3), 267-278.
- Wara, D. W., Goldstein, A. L., Doyle, N. E., & Ammann, A. J. (1975). Thymosin activity in patients with cellular immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, 292(2), 70-74.
- Wei, P., Wang, H., Li, Y., & Guo, R. (2021). Nucleolar small molecule RNA SNORA75 promotes endometrial receptivity by regulating the function of miR-146a-3p and ZNF23. *Aging (Albany NY)*, 13(11), 14924.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*, 1358-1370.
- Wong, C. H. (2005). Protein glycosylation: new challenges and opportunities. *The Journal of Organic Chemistry*, 70(11), 4219-4225.
- Wu, X., Jia, J., & You, H. (2015). Thymosin alpha-1 treatment in chronic hepatitis B. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(sup1), 129-132.
- Xiaowei, W. A., & Qing, M. A. (2020). Genome-wide association studies for coat color in Tan sheep. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 32(1), 28.
- Yang, Y. (2009). Skeletal morphogenesis during embryonic development. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 19(3).
- Yang, Y. (2013). Skeletal morphogenesis and embryonic development. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 1-14.
- Zhang, H., Li, S., Doan, T., Rieke, F., Detwiler, P. B., Frederick, J. M., & Baehr, W. (2007). Deletion of PrBP/ δ impedes transport of GRK1 and PDE6 catalytic subunits to photoreceptor outer segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(21), 8857-8862.
- Zhang, L., Hou, Y., Li, N., Wu, K., & Zhai, J. (2010). The influence of TXNDC5 gene on gastric cancer cell. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136(10), 1497-1505.