

Extended abstract:

Identification of genomic regions related to litter size involving divergent selection between Iranian indigenous and Romanov high reproductive sheep breeds

Introduction:

Around 12,000 BP, sheep (*Ovis aries*) were among the first animals domesticated by humans during the Neolithic Revolution. Iran has a good genetic diversity with more than 30 breeds of sheep and this livestock plays a significant role in providing animal protein. These breeds are bred for meat and to a limited extent milk with thick wool, but are hardy and resilient in harsh environments. With the development of molecular genetics, the identification of selection signatures reflecting natural or artificial selection has become possible, and numerous methods have been developed. Using selection signature methods, we aimed to uncover adaptive selection signals, profile production types, and elucidate gene functions within selection patterns related to reproduction and litter size in sheep.

Materials and Methods

In order to identify genes related to reproductive performance with divergent selection between Iranian indigenous sheep breeds and Romanov high reproductive performance sheep breed, the genomic data of 233 sheep were used. The genomic data of Romanov sheep were obtained from the iSheep database and the genome of Iranian sheep was retrieved from the database at https://disk.yandex.ru/d/3N2wEv0-9_NL0w. Data filtering and quality control, genetic differentiation index analysis (F_{ST}) and principal component analysis (PCA) were performed to determine genetic groups using PLINK 1.9 software. . Following the final filtering, the genomic information of 488,752 common SNPs from autosomal chromosomes of 79 Romanov heads compared to 120 heads related to nine Iranian indigenous sheep breeds was used to screen signature of selection. The unbiased F_{ST} (0) estimator and XPEHH statistic were used to explore the signs of selection. The genes related to the selected genomic regions were extracted using the BIOMART online database corresponding to areas in the sheep genome assembly (Oar 3.1).

Results and discussion

A total of 489 genes associated with the selected genomic regions (consisting of 0.1% of studied markers) were identified. Investigation of the genomic regions under selection showed that out of all identified genes related to the difference between the two studied groups, 7 genes were involved in biological pathways related to steroid synthesis and ovarian steroidogenesis that may be associated with litter size.

Conclusion

Identifying this pathway and other complementary studies about genes involved in reproduction could be effective in designing breeding programs to improve reproductive performance.

Keywords: *Selective Sweep, Genomic array, Litter Size, Iranian native sheep, Romanov*

Identification of genomic regions related to litter size involving divergent selection between Iranian indigenous and Romanov high reproductive sheep breeds

Abstract

In order to identify genes related to reproductive performance with divergent selection between Iranian indigenous sheep breeds and Romanov high reproductive performance sheep breed, the genomic data of 233 sheep was used. The genomeic data of Romanov sheep were obtained from the iSheep database and the genome of Iranian sheep was achieved from the database at https://disk.yandex.ru/d/3N2wEv0-9_NL0w. Data filtering and quality control, genetic differentiation index analysis (F_{ST}) and principal component analysis (PCA) were performed to determine genetic groups using PLINK 1.9 software. Following the final filtering, the genomic information of 488,752 common SNPs from autosomal chromosomes of 79 Romanov heads compared to 120 heads related to nine Iranian indigenous sheep breeds was used to scrining signature of selection. The ubiased F_{ST} (θ) estimator and XPEHH statistic were used to explore the signs of selection. The genes related to selected genomic regions were extracted using the BIOMART online database corresponding to areas in the sheep genome assembly (Oar 3.1). A total of 489 genes associated with the selected genomic regions (consisting of 0.1% of the studied markers) were identified. Investigation of the genomic regions under selection showed that out of all the identified genes related to the difference between the two studied groups, 7 genes were involved in biological pathways related to steroid synthesis and ovarian steroidogenesis that may be associated with litter size. Identifying this pathway and other complementary studies about genes involved in reproduction could be effective in designing breeding programs to improve reproductive performance.

Keywords: Selective Sweep, Genomic array, Litter Size, Iranian native sheep, Romanov.

شناسایی جایگاه‌های ژنومی مرتبط با چندقلوزایی تحت انتخاب بین نژادهای گوسفندان

بومی ایران و گوسفند نژاد رومانوف با عملکرد تولیدمثلی بالا

چکیده

به منظور شناسایی ژن‌های مرتبط با عملکرد تولیدمثلی تحت انتخاب بین نژادهای گوسفندان بومی ایران و نژاد رومانوف روسی از اطلاعات ژنومی ۲۳۳ رأس گوسفند استفاده شد. داده‌های مربوط به گوسفندان نژاد رومانوف از پایگاه اطلاعاتی iSheep و اطلاعات ژنومی گوسفندان ایرانی از پایگاه اطلاعاتی به آدرس https://disk.yandex.ru/d/3N2wEv0-9_NL0w تهیه شدند. کنترل کیفی و غربالگری داده‌ها، آنالیز شاخص

تمایز ژنتیکی (FST) و آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA) جهت تعیین گروه‌های ژنتیکی با استفاده از نرم افزار PLINK1.9، صورت گرفت. متعاقب غربالگری نهایی صورت گرفته، اطلاعات ژنومی تعداد ۴۸۸۷۵۲ نشانگر SNP مشترک مربوط به کروموزوم‌های بدنی تعداد ۷۹ رأس از نژاد رومانوف در مقابل تعداد ۱۲۰ رأس مربوط به ۹ نژاد از جمعیت‌های دامی ایرانی برای جستجوی نشانه‌های انتخاب، مورد استفاده قرار گرفت. از برآوردگر ناریب $F_{ST}(\theta)$ و آماره‌ی XPEHH جهت کاوش نشانه‌های انتخاب مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج ژن‌های مرتبط با مناطق ژنومی تحت انتخاب توسط پایگاه اطلاعاتی آنالیز BIOMART با انطباق روی ژنوم گوسفند (Oar_v3.1) انجام شد. تعداد ۴۸۹ ژن مرتبط با مناطق ژنومی تحت انتخاب (معادل ۰/۱ درصد کل نشانگرهای مورد مطالعه) شناسایی شدند. بررسی مناطق ژنومی تحت انتخاب نشان داد، از میان ۴۸۹ ژن شناسایی شده مرتبط با تفاوت‌های موجود بین دو گروه مورد مطالعه، تعداد ۷ ژن درگیر در مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با سنتز استروئید و استروئیدوزن تخمدان بودند که به‌عنوان موارد تحت انتخاب مرتبط با صفت چندقلوژایی، شناسایی شدند. شناسایی این مسیرهای بیولوژیکی و تلفیق آن با سایر اطلاعات مرتبط با صفت چندقلوژایی می‌تواند در طراحی برنامه‌های اصلاح نژادی جهت بهبود عملکرد تولیدمثلی، موثر باشد.

کلمات کلیدی: جاربوب انتخاب، آرایه‌های ژنومیک، چندقلوژایی، گوسفندان بومی، نژاد رومانوف،

مقدمه

میانگین تعداد بره‌ی متولد شده به ازای هر زایش، یک صفت کلیدی در تعیین بهره‌وری یا کارایی تولیدمثل است (Gootwine, 2020). میش‌های با کارایی پایین عملکرد تولیدمثلی، در اغلب موارد تنها یک بره در هر زایش خود به دنیا می‌آورند (Garel et al., 2005). در مقابل، نژادهایی با کارایی بالای عملکرد تولیدمثلی (چندقلوژاها)، از قبیل فین شیپ (Finnisheep) و رومانوف (Romanov)، زایش سه قلو و چهار قلو متداول بوده و حتی گزارشاتی از تولدهای شش و حتی هفت قلو نیز وجود دارد (Gootwine, 2020).

افزایش کارایی تولیدمثل یک استراتژی و مسیر نسبتاً جدید در تاریخچه‌ی اصلاح نژاد گوسفند به‌شمار می‌رود. به‌طوری که تمرکز اکثر مطالعات بررسی پیوستگی کل ژنوم (GWAS) روی گوسفند در گذشته، بیشتر روی صفاتی از قبیل تطابق‌پذیری به شرایط اقلیمی (Lv et al., 2014) و صفات تولیدی از قبیل گوشت، شیر و الیاف بوده است (Kijas et al., 2012; Fariello et al., 2014).

با توجه به اینکه پرورش گوسفند در دامنه وسیعی از شرایط آب و هوایی از محیط‌های خشن در سیستم‌های باز (که در آن شرایط محیطی مانند در دسترس بودن خوراک و آب و هوا عوامل محدود کننده برای تولید بره هستند) تا سیستم‌های کاملاً بسته (که در آن مدیریت برای بهره‌برداری کامل از پتانسیل تولیدمثلی میش‌ها امکان پذیر بوده و مورد هدف است)، صورت می‌گیرد. امکان بهره‌برداری کامل از پتانسیل ژنتیکی و فیزیولوژیکی دام‌ها در سیستم‌های کاملاً بسته با وجود فراهمی مواد

غذایی، مراقبت‌های دامپزشکی، و امکان پرورش بره‌های چندقلو، امکان‌پذیر است. به‌دلیل همین دامنه‌ی وسیع سیستم‌های پرورش گوسفند، تعریف تعداد بهینه‌ی بره در هر زایش در بین سیستم‌های تولیدی متفاوت است. باروری بالا (در اینجا، منظور میانگین تعداد ۲ یا بیشتر بره در هر زایش است) یک صفت مطلوب تحت شرایط مدیریت سیستم‌های پرورشی باز نیست، زیرا اغلب اوقات شرایط مناسب مدیریتی و پرورشی از قبیل تأمین غذای مورد نیاز دام چندقلوزا در دوران آبستنی و متعاقباً پرورش بره‌های به دنیا آمده از این آبستنی در این سیستم ممکن نیست. این امر می‌تواند تبعات منفی روی جنین‌ها و نیز بره‌های از شیر گرفته شده داشته باشد (Menéndez Buxadera *et al.*, 2004). نکته جالب توجه دیگر اینکه، بهبود عملکرد باروری (چندقلوزایی) در نژادهای گوشتی گوسفند که البته تحت سیستم‌های پرورشی نیمه متمرکز تا باز توجیه اقتصادی دارد، ولی این امر همیشه در مورد تولید گوسفندان شیری صدق نمی‌کند، زیرا فروش شیر در نقطه مقابل تغذیه‌ی بره‌های اضافی قرار دارد (Wolfová *et al.*, 2009). با این وجود، در سیستم‌های پرورشی نیمه بسته و بسته (متمرکز) افزایش تولید (تعداد بره به ازای هر زایش) به‌دلیل فراهمی شرایط ممکن بوده و در افزایش درآمد حاصل از فروش بره‌ها، از نظر اقتصادی سودمند می‌باشد (Byrne *et al.*, 2012). بنابراین کشورهای مختلف طی دهه‌های اخیر با لحاظ سیستم‌های تولیدی خودشان برنامه‌های اصلاحی‌شان را از طریق اعمال انتخاب درون نژادی، ورود نژادهای جدید و انجام پروژه‌های تلاقی‌گری هدفمند طراحی و اجرا می‌کنند.

پیشینه پژوهش

برخلاف تئوری خنثی ارائه شده توسط کیمورا (Kimura *et al.*, 1985) که مدعی بود بخش قابل توجهی از تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها در اثر رانش تصادفی آلل‌های چندشکلی که از نظر انتخابی خنثی هستند، به‌وجود می‌آید، اگر جهش به‌وجود آمده در سطح ژنوم باعث افزایش شایستگی افراد در جامعه شود، انتخاب باعث می‌شود تا افراد با شایستگی بالاتر هدف انتخاب مثبت قرار گرفته و سهم بالاتری در تشکیل نسل بعد داشته باشند (Sabeti *et al.*, 2006). انتخاب‌های مثبت انجام شده روی یک آلل سودمند در طول ژنوم، باعث ایجاد نشانه‌هایی در سطح ژنوم می‌گردد (Biswas & Akey, 2006). این نشانه‌ها عبارتند از ایجاد ساختارهای هاپلوتایپی، افزایش عدم تعادل لینکاژی، کاهش جایگاه‌های دارای تنوع ژنتیکی بالا و انحراف از توزیع فراوانی آلی (Qanbari *et al.*, 2014).

متناسب با انواع نشانه‌های بجا مانده از انتخاب مثبت روی ژنوم، ابزارها و روش‌های مختلفی برای شناسایی این نشانه‌ها ارائه شده است (Li *et al.*, 2014). این روش‌ها اولین بار در جهت واکاوی ناشناخته‌های ژنوم انسان توسعه داده شده و سپس روی ژنوم سایر موجودات، مورد استفاده قرار گرفته است (Sabeti *et al.*, 2006). البته با توجه به انتخاب‌های مصنوعی صورت

گرفته بر روی ژنوم دام‌های اهلی در کنار انتخاب طبیعی (Biswas & Akey, 2006) و نیز عوامل مؤثری از قبیل اندازه‌ی مؤثر کوچک‌تر دام‌های اهلی و عدم تعادل لینکاژی بالاتر این گونه‌ها در مقایسه با انسان (Rahimadad *et al.*, 2021)، این گونه‌ها نمونه مناسب‌تری برای شناسایی سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم هستند (Biswas & Akey, 2006).

با توجه به اهمیت نشانه‌های انتخاب در کشف زوایای پنهان ژنوم و مسیرهای انتخاب‌های صورت گرفته در گذشته، مطالعات متعددی در جهت شناسایی نشانه‌های انتخاب در انسان (Sabeti *et al.*, 2002 & 2007; Hider *et al.*, 2013) و دام‌های اهلی از قبیل، گاو و گاو میش (Pérez *et al.*, 2014; Mokhber *et al.*, 2018; Strillacci *et al.*, 2021; Biabani *et al.*, 2022 &) (Zandi *et al.*, 2023; Salehi *et al.*, 2021)، گوسفند و بز (Kijas *et al.*, 2012; Moradi *et al.*, 2012; Manzari *et al.*, 2016)، اسب (Bovo *et al.*, 2020; Diao *et al.*,)، الاغ (Wang *et al.*, 2022)، شتر (Khalkhali-Evrigh *et al.*, 2022)، خوک (Asadollahpour *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2023)، و حیوانات خانگی از قبیل سگ و گربه (Crepaldi *et al.*, 2023 Barnett *et al.*, 2020) انجام شده است.

در بررسی انجام شده توسط Mohammadi *et al.* (۲۰۱۸)، از اطلاعات ژنومی ۹۶ رأس گوسفند نژاد زندگی به منظور شناسایی مناطقی از ژنوم که تحت انتخاب‌های طبیعی و مصنوعی قرار گرفته‌اند، استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های بیوانفورماتیکی نشان داد، که نشانه‌های انتخاب پوشاننده چندین ژن که به طور مستقیم و غیرمستقیم با ژن‌های موثر بر آدپتاسیون به آب و هوای گرم و خشک (MSRB3, HSPA4L, DNAJB4)، رشد و اندازه بدن (LAP3, STAC3)، رشد اسکلتی و ساختار بدن (IBSP, MEPE, SPP1)، پاسخ ایمنی (LY96, STAT6, IL23A) و متابولیسم انرژی (CS, GLS2, ATP5B) مرتبط هستند. Manzari *et al.* (۲۰۱۶) نشانه‌های انتخاب رخ داده بین دو نژاد دنبه‌دار بلوچی و بدون دنبه‌ی زل را مورد بررسی قرار دادند. تجزیه و تحلیل اطلاعات زیستی این پژوهش نشان داد که برخی از این مناطق ژنگانی با ژن‌های مؤثر بر صفات اسکلتی، دم، ایمنی، متابولیسم و تولیدمثل همپوشانی دارند و در این راستا ژن‌های AAAS, ESPL1, HOXB9, KA6RPS3 و A3FNDC را به‌عنوان ژن‌های مؤثر معرفی کردند. Zhao *et al.* (۲۰۱۶) نشانه‌های انتخاب را در سه جمعیت گوسفندان دورپر، موتان آلمانی و سونت با استفاده از آزمون‌های REHH و XP-EHH، شناسایی کردند. در ۴۳۸ ناحیه انتخاب شده شناسایی نمودند. در این بررسی ۴۲ ژن شناسایی شدند که عمدتاً با متابولیسم چربی و توسعه و تکامل عضلانی مرتبط بودند. Demars *et al.* (۲۰۱۳) از تراشه‌های SNP برای شناسایی مناطقی ژنومی موثر بر باروری در گوسفند استفاده نمودند. در این مطالعه از ۱۰۴ نمونه گوسفند از دو نژاد متفاوت استفاده کردند و میش‌های با باروری نرمال به‌عنوان نمونه‌های کنترل و میش‌های با باروری

بالا به عنوان نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفتند. در هر دو جمعیت یک ناحیه‌ی روی کروموزوم X و نزدیک به ژن BMP15 یافت شد که شامل مجموعه‌ای از نشانگرهای با ارتباط معنی‌دار با صفت مورد نظر بود.

هدف از مطالعه‌ی حاضر استفاده از اطلاعات آرایه‌های ژنومیکی با تراکم بالای گوسفند (Illumina Ovine SNP 600K) (BeadChip) جهت شناسایی جایگاه‌های ژنومی موثر بر عملکرد تولیدمثلی گوسفند می‌باشد. در این راستا از اطلاعات ژنومی دو گروه متمایز ژنتیکی شامل نژادهای گوسفندان بومی ایران، به عنوان نژادهای با عملکرد تولیدمثلی با بازدهی پایین، در مقایسه با نژاد رومانوف روسی، به عنوان یکی از شاخص ترین نژادهای گوسفند با کارایی تولیدمثلی بالای دنیا، استفاده شد. برخی از موارد ژنومی شناسایی شده در مطالعه حاضر می‌تواند بیانگر و عامل تفاوت در عملکرد تولیدمثلی دو گروه مورد مطالعه باشد.

روش شناسی پژوهش

تهیه داده‌های ژنومی

در مطالعه حاضر از اطلاعات ژنومی ۲۳۳ رأس گوسفند از ۱۲ نژاد، شامل ۷۹ رأس گوسفند از نژاد رومانوف مربوط به کشور روسیه و ۱۱ نژاد مربوط به نژادهای بومی ایران استفاده شد، که اطلاعات مربوطه به تفکیک نژاد در جدول ۱ آورده شده است. داده‌های مربوط به گوسفندان نژاد رومانوف از پایگاه اطلاعاتی Isheep (<https://ngdc.cnbc.ac.cn/isheep/download>) تهیه شدند (Wang *et al.*, 2021). اطلاعات ژنومی نژادهای ایرانی از طریق منبع اطلاعاتی به آدرس https://disk.yandex.ru/d/3N2wEv0-9_NL0w به دست آمد. ژنوم حیوانات منابع مختلف با استفاده از آرایه‌های ژنومی اختصاصی گوسفند با تراکم نشانگری بالا (Illumina Ovine SNP 600 BeadChip (Illumina Inc., CA, USA)) توالی‌یابی شده بودند. آدرس دهی اطلاعات آرایه‌ی مورد استفاده مطابق اطلاعات ژنوم رفرنس Oar3.1 بود (Jiang *et al.*, 2014). با توجه به اینکه منبع انتشار دو سری داده متفاوت از هم بودند، قبل از ادغام داده‌ها، ابتدا شناسه‌های منحصر بفرد و موقعیت کروموزومی یکسان برای دو سری داده‌ی مورد استفاده با استفاده از نرم افزار SNPchiMp v.3 تعیین شدند. (Nicolazzi *et al.*, 2015). سپس داده‌ها با اطلاعات ژنومی مشترک و با کمک دستور merge- نرم افزار PLINK1.9 باهم ادغام شدند.

جدول ۱ - اطلاعات مربوط به نژادهای گوسفند ایرانی و نژاد رومانوف مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Information of Iranian sheep breeds/ecotypes and Romanov breed used in this study

علامت معرف	تعداد	نژاد	علامت معرف	تعداد	نژاد
IRAN_KER	۱۵	Kermani	IRAN_AFS	۱۴	Afshari

Baluchi	۱۲	IRAN_BAL	Lori Bakhtiari	۱۵	IRAN_LRB
Chios	۱۵	IRAN_CHS	Sanjabi	۱۴	IRAN_SAN
Ghezel	۱۵	IRAN_GHE	Shal	۱۵	IRAN_SHA
Grey Shiraz	۹	IRAN_GRS	Zandi (Siah Kabod)	۱۵	IRAN_SKD
karakul	۱۵	IRAN_KAR	Romanov	۷۹	ISH_ROM

کنترل کیفیت و فیلتراسیون داده‌ها

جهت اطمینان از کیفیت داده‌های ژنومی، کنترل کیفیت بر روی داده‌های اولیه اعمال و داده‌های با کیفیت پایین از ادامه آنالیزها کنار گذاشته شد. کنترل کیفی و فیلتراسیون داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار PLINK-1.9 انجام شد (Purcell *et al.*, 2007). آستانه‌های کنترل کیفی از این قرار بود؛ حیوانات و نشانگرهایی که ژنوتیپ از دست رفته آنها بیش از ۵ درصد بود، حذف شدند. سپس داده‌های مربوط به هر گروه ژنتیکی به‌طور مجزا برای حداقل فراوانی آلی (MAF) کمتر از ۱ درصد و عدم تعادل هاردی واینبرگ (HWE) به‌عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ (Teo *et al.*, 2007) از ادامه محاسبات حذف شدند. سطح معنی‌داری در این تحقیق با استفاده از تصحیح بنفرونی ($\beta = \alpha/n$)، $9/04 \times 10^{-8}$ تعیین شد. در این رابطه، n تعداد آزمون است که در این‌جا برابر تعداد SNP ($n = 552847$) و α خطای آزمایش است که در این بررسی $0/05$ در نظر گرفته شده بود. کنترل‌های کیفی داده‌های ژنوتیپی به MAF و تعادل هاردی- واینبرگ روی کل داده‌های مورد مطالعه انجام شد.

تنوع ژنتیکی و تعیین مولفه‌های اصلی واریانس (PCA)

آنالیز شاخص تمایز ژنتیکی (F_{ST}) و آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA) جهت تعیین گروه‌های ژنتیکی با استفاده از نرم افزار PLINK1.9 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>)، صورت گرفت.

ردیابی مناطق ژنومی تحت انتخاب و تحلیل موارد مرتبط با عملکرد تولیدمثلی

جهت بررسی الگوی ژنومیکی انتخاب مثبت در دو گروه ژنتیکی با عملکرد تولیدمثلی بالا و پایین، نشانه‌های انتخاب تنها روی کروموزوم‌های بدنی و با استفاده از دو آماره‌ی برآوردگر ناریب F_{ST} (θ) و XPEHH برآورد شدند. ارزش‌های F_{ST} برای هر SNP به روش ناریب تتا و در محیط R محاسبه گردید (Weir & Cockerham, 1984). در این روش در مقایسه با روش پایه‌ای F_{ST}

ارائه شده توسط رایت، اندازه‌ی نمونه‌ها در فرمول آورده شده و در واقع خطای نمونه‌گیری در فرمول لحاظ شده است (Weir & Cockerham, 1984). جهت شناسایی بهتر نشانه‌های انتخاب، ارزش‌های عددی SNP ها به روش Creeping Window (CW) تا حداکثر طول ۱۰۰ کیلو جفت باز با SNP های مجاور از میانگین‌گیری شد (Qanbari et al., 2012) و تنها ۰/۱٪ مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرهای مجاور دارای ارزش بالایی بودند، به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند. آستانه‌ی تعیین شده سختگیرانه بوده و فقط مناطقی از ژنوم که بیشترین تمایز جمعیتی را در بین دو نژاد نشان می‌دهند، انتخاب شدند. این آستانه در مطالعات مختلف از ۰/۰۱ درصد (Moradi et al., 2012) تا ۲/۵ درصد (Qanbari et al., 2012) متغیر بوده است. جستجوی نشانه‌های انتخاب با استفاده از آماره‌های XP-EHH با استفاده از نرم‌افزار ReHH انجام گرفت (Gautier and Vitalis, 2012). بدین منظور بعد از اعمال فیلتراسیون، داده‌های مربوط به هر کدام از گروه‌های ژنتیکی به فرمت ورودی Beagle تبدیل شده و به‌طور مجزا توسط نرم‌افزار Beagle 5.4 (Browning et al., 2021)، برای نشانگرهای SNP گمشده ایمپیوت و به حالت Phase تبدیل شدند. گراف منهن پلات برای هر کدام از روش‌ها با استفاده از بسته نرم‌افزاری QQman در محیط R رسم گردید (Turner, 2014).

شناسایی و تحلیل ژن‌های مرتبط مناطق ژنومی تحت انتخاب

در این مرحله اطلاعات مربوط به نواحی ژنومی تحت انتخاب (شامل کروموزوم و موقعیت SNP های انتخابی بر روی کروموزوم)، جهت شناسایی ژن‌هایی که احتمالاً با نواحی انتخابی مرتبط هستند، تعیین شدند. موقعیت کروموزومی این جایگاه‌ها با موقعیت ژن‌های لیست شده برای ژنوم گوسفند (Oar_v3.1) (Sheep (texel) genes) در Ensemble Biomart Tool (<https://www.ensembl.org/biomart/martview>) شناسایی شدند. سپس ژن‌های شناسایی شده جهت تعیین مسیرهای بیولوژیکی و وجود شبکه‌های احتمالی ژنی در سامانه‌های آنلاین DAVID و STRING (<https://string-db.org>) مورد واکاوی بیشتر قرار گرفتند.

یافته‌های پژوهش

کنترل کیفیت و فیلتراسیون داده‌ها

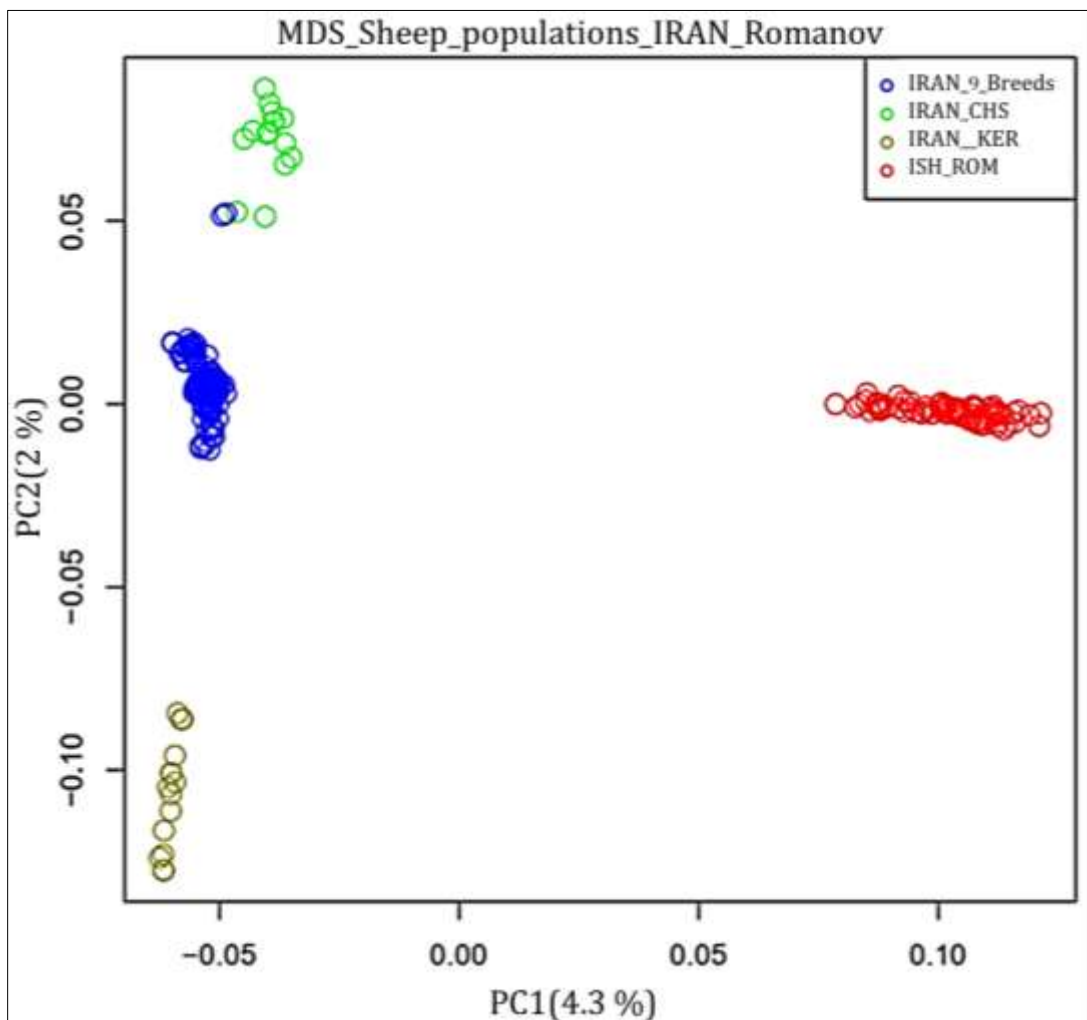
از کل داده‌های اولیه‌ی که در یک فایل ادغام شده‌ی اولیه وجود داشت (شامل ۵۷۷۳۷۷ نشانگر SNP مربوط به کروموزوم‌های بدنی با جایگاه شناخته شده)، تعداد ۲۴۵۳۰ نشانگر SNP بخاطر ژنوتیپ از دست رفته بیش از ۵ درصد، حذف شدند. هیچ حیوانی به دلیل ژنوتیپ از دست رفته بیش از ۵ درصد حذف نشد. داده‌های به دست آمده در این بخش شامل اطلاعات مربوط به ۵۵۲۸۴۷ نشانگر SNP با نرخ ژنوتایپینگ ۰/۹۹۹۴۱۶ از ۲۳۳ حیوان بودند که برای آنالیزهای تمایز جمعیتی و آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA) مورد استفاده قرار گرفتند. مطابق نتایج آنالیز PCA، گروه‌های ژنتیکی متمایز از هم تفکیک و در ادامه مراحل کنترل کیفی به‌طور مجرا روی هر کدام از گروه‌های ژنتیکی اعمال شد.

برای نژادهای ایرانی شامل ۱۵۴ حیوان، تعداد ۲۴۰۱۳ نشانگر SNP بخاطر حداقل فراوانی آلی زیر ۱ درصد حذف و در نهایت ۵۲۸۸۳۴ نشانگر SNP با نرخ ژنوتایپینگ ۰/۹۹۹۵۳۶ باقی ماند. برای جمعیت نژاد رومانوف شامل ۷۹ حیوان، تعداد ۵۸۴۲۲ نشانگر SNP بخاطر حداقل فراوانی آلی زیر ۱ درصد حذف و در نهایت ۴۹۴۴۲۵ نشانگر SNP با نرخ ژنوتایپینگ ۰/۹۹۹۱۸۳ باقی ماند. همچنین تعداد ۷۷ نشانگر، به دلیل خارج بودن از تعادل هاردی واینبرگ (شامل ۱۱ واریانت برای جمعیت رومانوف و ۶۶ مورد برای جمعیت‌های ایرانی)، از ادامه آنالیزها کنار گذاشته شدند. این سری داده‌ی مشترک (شامل ۲۳۳ حیوان) برای آنالیزهای تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها و آنالیز شاخص تمایز F_{ST} استفاده شد. سپس با استفاده از اطلاعات آنالیزهای تمایز جمعیتی، اطلاعات ژنومی مربوط به نژادهای کیوسی و کرمانی از ادامه آنالیزها حذف شدند. متعاقب غربالگری نهایی صورت گرفته، اطلاعات ژنومی تعداد ۴۸۸۷۵۲ نشانگر SNP مشترک مربوط به کروموزوم‌های بدنی تعداد ۷۹ رأس از نژاد رومانوف در مقابل تعداد ۱۲۰ رأس مربوط به ۹ نژاد از جمعیت‌های دامی ایران (جدول ۱) برای جستجوی نشانه‌های انتخاب با روش F_{ST} مورد استفاده قرار گرفت. برای آنالیز XP-EHH گروه‌های ژنتیکی دوباره تفکیک شده و هر کدام بعد از تبدیل به فرمت VCF توسط نرم‌افزار Beagle5.4 ایمپوت شده و نهایت برای شناسایی تمایز جمعیتی توسط آماره‌ی XPEHH مورد استفاده قرار گرفتند.

تنوع ژنتیکی و تعیین مولفه‌های اصلی واریانس (PCA)

گراف‌های مربوط به نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) بر اساس اطلاعات مولفه‌ی اول با مولفه‌های دوم تا ششم رسم شد و گراف‌های مربوط به اطلاعات مولفه‌های اول و دوم در شکل ۱ آورده شده است. در حالت کلی ۲۰ مولفه اول در مطالعه‌ی

حاضر ۱۶/۸ درصد واریانس ژنتیکی بین نمونه‌های مورد مطالعه را توجیه می‌کنند. از این میان واریانس ژنتیکی مولفه‌های اول تا ششم به ترتیب ۴/۳، ۲، ۱/۴، ۱/۲، ۱ و ۰/۸ درصد از کل واریانس ژنتیکی را توجیه می‌کند.



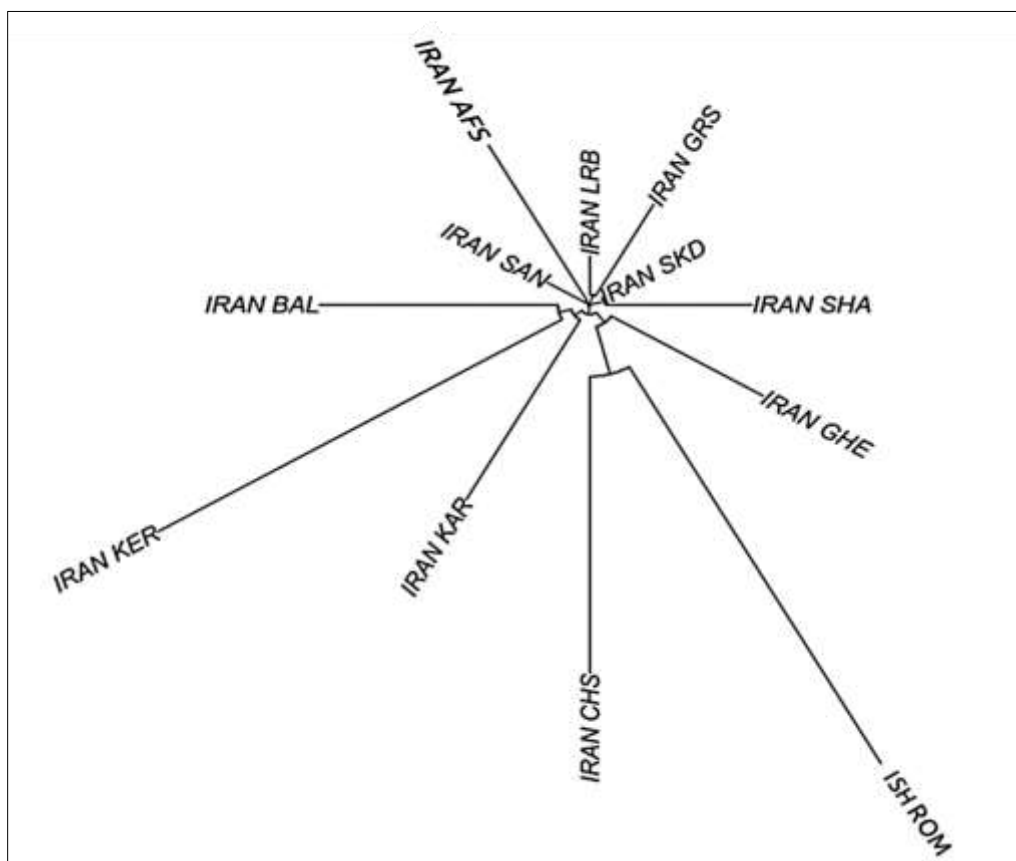
شکل ۱- گراف مولفه‌های واریانس مربوط به نژادهای گوسفندان ایرانی مورد مطالعه و نژاد رومانوف روسیه.

Figure 1 Principal components graph related to Iranian indigenous sheep breeds/ecotypes and Russian Romanov

در اغلب مطالعات صورت گرفته روی جوامع انسانی و گونه‌های اهلی دام، استفاده از اطلاعات ویژه بردارهای یک و دو آنالیز مولفه‌های اصلی، برای دسته‌بندی‌شان بر اساس نژاد و منطقه جغرافیایی متداول است (Yang et al., 2014; Kijas et al., 2012; Mokhber et al., 2019). با وجود اینکه پایین بودن میزان واریانس توجیهی نشان دهنده ساختارهای جمعیتی کمتر تمایز یافته است ولی این جمعیت‌ها همان‌طور که گراف (شکل ۱) نشان می‌دهد کاملاً از هم تفکیک شده‌اند. بخشی از واریانس پایین

می‌تواند به‌خاطر تنوع بالای نمونه‌گیری در میان نمونه‌ی گوسفندان ایران (به دلیل وجود تعداد بالای نژاد در جمعیت‌های دامی) است. در مطالعه‌ی *Kijas et al* (2012) روی گوسفندان دنیا، ۲۰ مولفه‌ی اول حدود ۱۶ درصد از واریانس ژنتیکی بین نمونه‌های مورد مطالعه را توجیه کردند. مولفه‌ی اول در این مطالعه‌ی مذکور تنها ۲/۹۸ درصد بود. میزان واریانس توجیهی در مطالعه‌ی *et Barendse al* (2009) برای مولفه‌های اول و دوم به ترتیب برابر ۶/۱ و ۳/۷ درصد بود. در هر حال با توجه به وجود تمایز بالای گروه‌های مورد مطالعه‌ی می‌توان امیدوار به یافتن نقاطی از ژنوم باشیم که به‌طور معنی‌داری مورد انتخاب قرار گرفته‌اند، و به‌نظر می‌رسد با توجه به تفکیک کامل نژاد با عملکرد تولیدمثلی بالا با نژادهای دیگر با عملکرد تولیدمثلی پایین، برخی از ژن‌های مرتبط با چندقلوزایی نیز در این مقایسه قابل استخراج باشد.

مطابق نتایج به‌دست آمده گروه با عملکرد تولیدمثلی بالا (رومانوف) به‌طور کامل از گروه ژنتیکی با عملکرد تولیدمثلی پایین (نژادهای ایرانی) مجزا هستند. تمایز کامل بین دو گروه با عملکرد تولیدمثلی پایین و بالا، می‌تواند مربوط به جدایش منطقه‌ای این دو گروه باشد. مولفه دوم توجیه تمایز بین برخی از نژادهای ایرانی از همدیگر است. به‌طوری که دو نژاد کرمانی و کیوسی (نگهداری شده در مرکز پرورشی کیوسی در استان کرمان) با مولفه‌ی دوم از گروه ژنتیکی اصلی مربوط به سایر نژادهای ایرانی شده است. نتایج این بخش (آنالیز PCA) با واکاوی‌های بیشتر ساختار جمعیتی و ارتباط ژنتیکی بین دام‌های مورد مطالعه، با آنالیز F_{ST} و رسم درخت فیلوژنی مستخرج از اطلاعات تعیین فواصل ژنتیکی، تایید شد (شکل ۲ و جدول ۲). همان‌طور که در گراف ۲ و نیز جدول ۲ مشخص است نژاد رومانوف بیشترین فاصله‌ی ژنتیکی را با سایر نژادهای مورد مطالعه را دارد. نزدیک‌ترین نژاد از لحاظ ژنتیکی به رومانوف مربوط به نژاد سیاه کبود شیراز (SDK) و دورترین مربوط به نژاد کرمانی است.



شکل ۲- گراف تمایز ژنتیکی مربوط به نژادهای گوسفندان ایرانی مورد مطالعه و نژاد رومانوف روسیه.

Figure 1 Genetic diversity graph related to Iranian indigenous sheep breeds/ecotypes and Russian Romanov sheep breed.

با بررسی های بیشتر متوجه می شویم که نژاد سیاه کبود شیراز به طور میانگین کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۴۲) را با نژادهای ایرانی مورد مطالعه دارد. این در حالی است که این تفاوت برای نژاد کرمانی بالاتر (۰/۱۱۹) است. این میزان می تواند به دلیل پرورش در شرایط ایزوله ی مربوط به جمعیت های دامی نمونه گیری شده مربوط به جمعیت کرمانی باشد.

جدول ۲- اطلاعات تمایز ژنتیکی جمعیت های مورد مطالعه با استفاده از آماره شاخص تمایز ویر و کوکرهام

Table 2. Genetic differentiation information of the studied populations using Weir and Cockerham differentiation index statistics

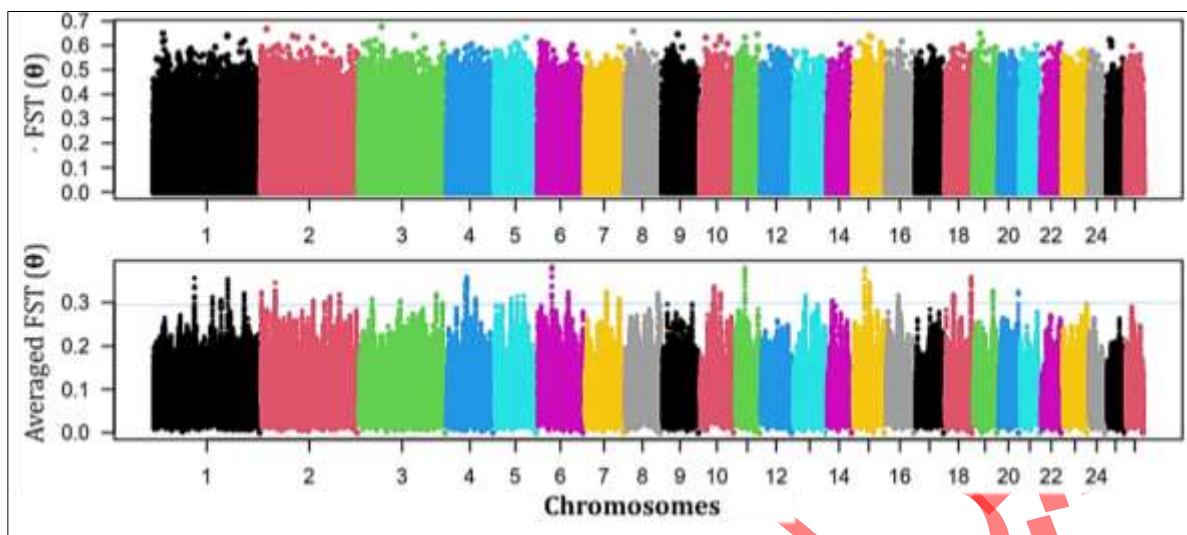
نژاد	IRAN_AFS	IRAN_BAL	IRAN_CHS	IRAN_GHE	IRAN_GRS	IRAN_KAR	IRAN_KER	IRAN_LRB	IRAN_SAN	IRAN_SHA	IRAN_SKD	ISHP_ROM
------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

0.153	0.049	0.076	0.054	0.055	0.136	0.091	0.071	0.079	0.117	0.096	NA	IRAN_AFS
0.147	0.048	0.077	0.056	0.057	0.126	0.085	0.069	0.084	0.118	NA	NA	IRAN_BAL
0.152	0.075	0.102	0.081	0.083	0.158	0.113	0.096	0.094	NA	NA	NA	IRAN_CHS
0.140	0.038	0.064	0.042	0.045	0.124	0.080	0.060	NA	NA	NA	NA	IRAN_GHE
0.132	0.025	0.052	0.031	0.028	0.111	0.065	NA	NA	NA	NA	NA	IRAN_GRS
0.143	0.046	0.074	0.052	0.054	0.127	NA	NA	NA	NA	NA	NA	IRAN_KAR
0.181	0.091	0.117	0.100	0.097	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	IRAN_KER
0.123	0.013	0.038	0.018	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	IRAN_LRB
0.120	0.011	0.038	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	IRAN_SAN
0.136	0.026	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	IRAN_SHA
0.114	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	IRAN_SKD
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	ISHP_ROM

میانگین تمایز نژاد کیوسی با نژادهای ایران برابر ۰/۱۰۴ بود که بالاتر از میانگین FST تخمینی (۰/۰۸۶) و در حد میانگین وزنی FST تخمینی (۰/۱۰۲) بود. همچنین بایستی اشاره کرد که میانگین تمایز ژنتیکی برای نژاد رومانوف با نژادهای ایرانی مورد مطالعه برابر ۰/۱۴ بود. که بیانگر بیشترین تمایز ژنتیکی بین دامهای مورد مطالعه است. تمایز مربوط به نژاد رومانوف و نیز فواصل ژنتیکی بیشتر مربوط به نژادهای کرمانی و کیوسی نسبت به سایر نژادهای ایرانی مورد مطالعه به نوعی تاییدی بر نتایج آنالیز مولفه‌های اصلی است. نتایج بررسی تنوع و فواصل ژنتیکی نژادهای ایرانی با نتایج (Deniskova et al., 2022) مطابقت دارد.

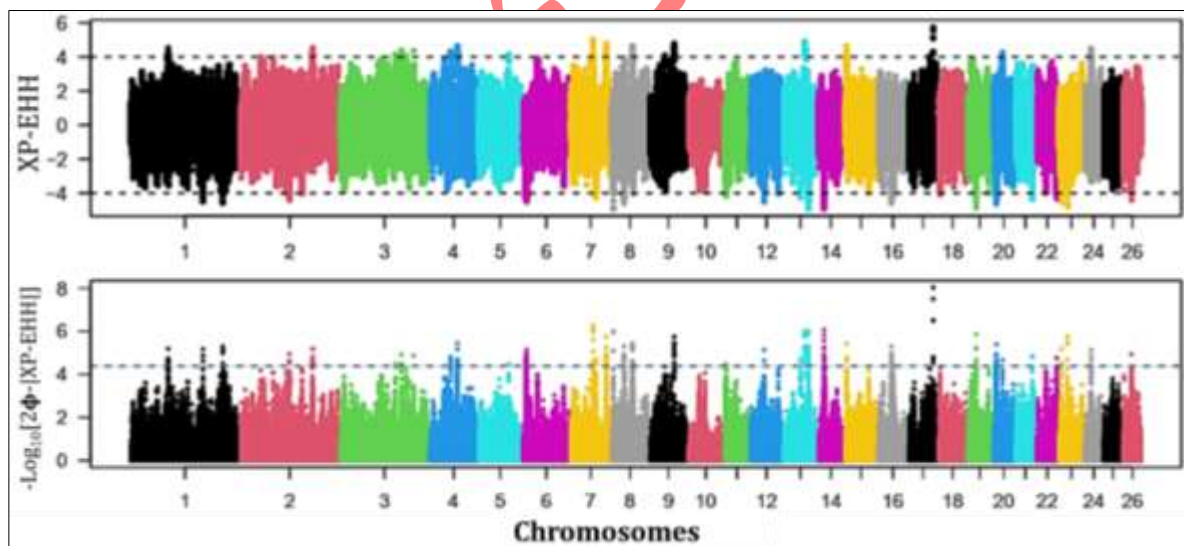
ردیابی مناطق ژنومی تحت انتخاب و تحلیل موارد مرتبط با عملکرد تولیدمثلی

نتایج مربوط به نقاط تحت انتخاب در اشکال ۳ و ۴ آورده شده است. همانطور که در تصویر مشخص است مطابق آستانه تعیین شده برای آمارهای FST تعداد ۳۷ منطقه ژنومی و برای روش XPEHH تعداد ۳۹ منطقه‌ی ژنومی به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی شدند. هر دو روش جزو روش‌های متداول برای شناسایی نشانه‌های انتخاب هستند. بخصوص اینکه کارایی هر دو روش در شناسایی نشانه‌های انتخاب در تراکم‌های بالا قابل قبول است (Simianer and Qanbari, 2014).



شکل ۳ - گراف منهنن پلات مربوط به ارزش‌های عددی F_{ST} (بالا) و میانگین‌گیری شده‌ی F_{ST} (پایین) با طول پنجره‌ی ۱۰۰ کیلوگفت بازی مقایسه‌ی بین دو گروه ژنتیکی (نژادهای ایرانی در مقابل نژاد رومانوف روسیه)

Figure 2. Manhattan plot graph of F_{ST} values (up) averaged pairwise unbiased F_{ST} (Theta) values (down), with a window length of 100 kb, between two genetic groups (Iranian indigenous sheep breeds/ecotypes and Russian Romanov sheep breed).



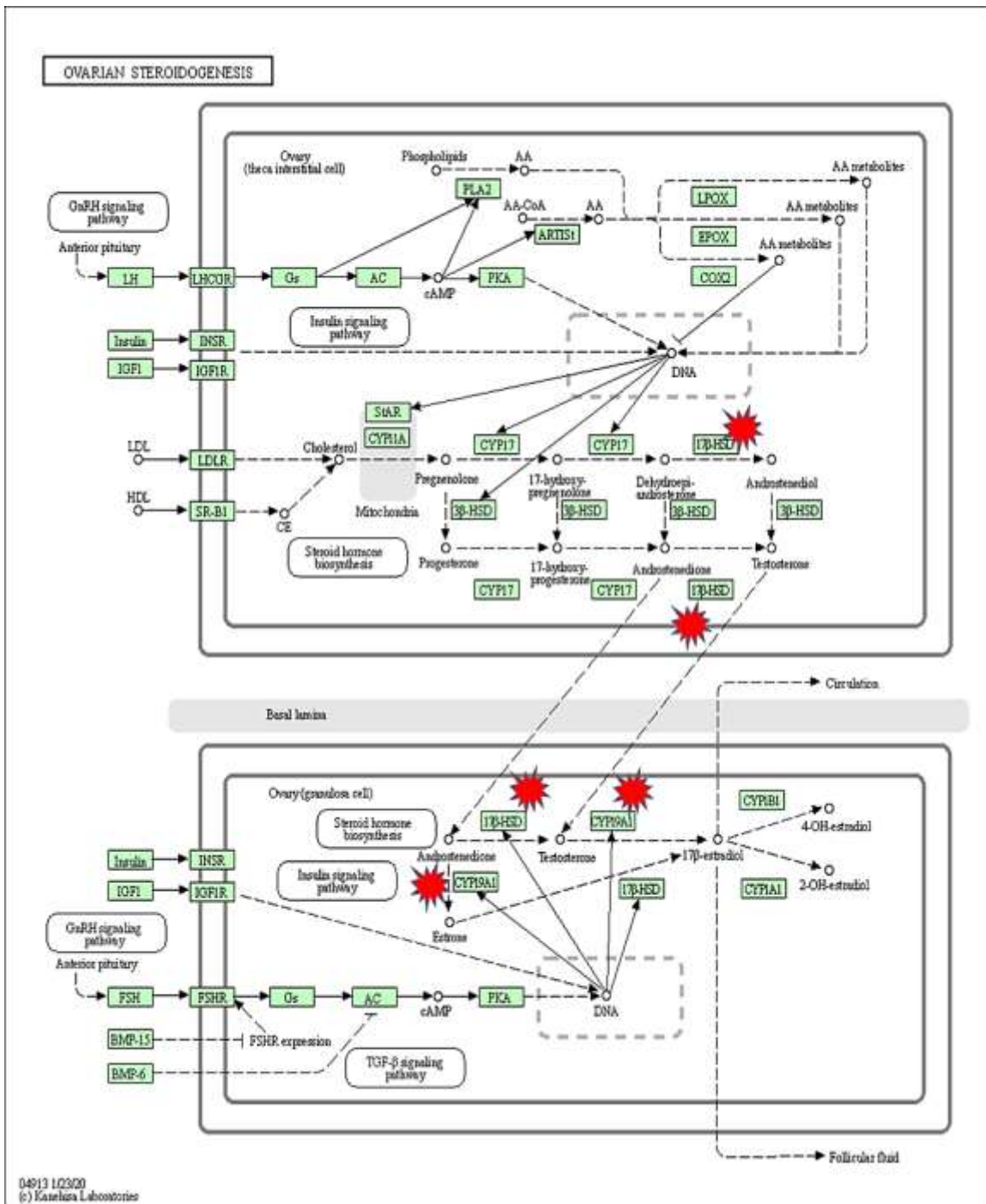
شکل ۴ - گراف منهنن پلات مربوط به آماره‌ی XPEHH بین دو گروه ژنتیکی (نژادهای ایرانی در مقابل نژاد رومانوف روسیه)

Figure 2. Manhattan plot graph of XPEHH statistics between two genetic groups (Iranian indigenous sheep breeds/ecotypes and Russian Romanov sheep breed).

شناسایی و تحلیل ژن‌های شناسایی شده مرتبط با تولیدمثل

جهت شناسایی ژن‌های مرتبط با بخش‌های انتخابی ژنوم، مناطق ارتولوگوس با نشانگر SNP که بیشترین ارزش عددی تتا را در هر پیک انتخابی دارد. بعلاوه ۲۵۰ کیلو جفت باز ناحیه اطراف این نشانگرهای SNP به‌وسیله Biomart (www.ensembl.org/biomart/martview)، مورد بررسی قرار گرفت. از کل مناطق ژنومی مورد بررسی از دو روش مورد استفاده جهت شناسایی نشانه‌های انتخاب تعداد ۴۸۹ ژن مرتبط با مناطق ژنومی تحت انتخاب شناسایی شد.

از ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه، با توجه به محوریت موارد مرتبط با تولیدمثل است، تمرکز عمده روی ژن‌های مرتبط با تولیدمثل است. همچنین برخی از ژن‌های شناسایی شده در مطالعه حاضر، در چندین مسیر بیولوژیکی مهم که بین دو گروه مورد مقایسه هدف انتخاب بوده‌اند، مشارکت دارند. این مسیرهای بیولوژیکی در ایمینیت در مقابل عوامل بیماری‌زای باکتریایی ($P\text{-value} = 5/8 \times 10^{-16}$)، گلیکوپروتئین سرم متصل به لیپید، انتهای N- Lipid-binding serum glycoprotein, N- (terminal) ($P\text{-value} = 5/0 \times 10^{-17}$) و Enrichment Score: 8.27 C-type lectin ($P\text{-value} = 7/1 \times 10^{-6}$) و hemoglobin complex ($P\text{-value} = 8/9 \times 10^{-4}$) Enrichment Score: 4.44 (که عمدتاً با ژن‌های مربوط به بویایی مشترک هستند) مشارکت دارند. گیرنده‌های بویایی در تحقیقات پیشین جزو ژن‌های تحت انتخاب در فرایند اهلی‌سازی شناسایی و گزارش شده است (Mokhber *et al.*, 2015). بررسی عمیق‌تر این مسیرهای بیولوژیکی هدف اصلی تحقیق حاضر نبود و در اینجا مورد واکاوی‌های بیشتر قرار نخواهد گرفت. از ژن‌های شاخص دیگری که در این بررسی به‌عنوان نشانه انتخاب شناسایی شد، ژن MC1R بود. این ژن مرتبط با رنگ پوشش سیاه در گوسفند نقش دارد و در بررسی‌های متعدد به‌عنوان یکی از جایگاه‌های تحت انتخاب در بین نژادهای گوسفند معرفی شده است (Mohammadi *et al.*, 2022).



04913 1/23/00
 © Kazuhisa Laboratories

شکل ۵: مسیر بیولوژیکی استروئیدوزن تخمدان. ژن‌های مستخرج از مطالعه‌ی حاضر با علامت قرمز رنگ مشخص شده‌اند.

Figure 5: biological pathway of ovarian steroidogenesis. The genes extracted from the present study are marked with a red color.

از ژن‌های شناسایی شده مرتبط با عملکرد تولیدمثلی می‌توان به میسرهای سنتز استروئید (Steroid hormone biosynthesis) با مشارکت ۷ ژن با P-Value برابر ۰/۰۰۳۲، اشاره کرد. مسیر دوم در این راستا مربوط به استروئیدوژنز تخمدان (Ovarian steroidogenesis) با مشارکت ۴ ژن با P-Value برابر ۰/۰۴۳، می‌شود (شکل ۵).

مسیر بیولوژیکی استروئیدوژنز تخمدان

ژن‌های CYP19 (cytochrome P450, family 19) در موقعیت ۵۶/۱۲ - ۵۶/۱۵ مگاجفت بازی کروموزوم ۷، W5PJ49_SHEEP - Aldo_ket_red domain-containing یا (dihydrodiol dehydrogenase 3-like) LOC101106610 و W5PKI7_SHEEP - Aldo_ket_red domain- (dihydrodiol dehydrogenase 3-like) LOC101107119 protein containing protein و LOC101107541 (dihydrodiol dehydrogenase 3-like) چهار ژنی هستند که در مطالعه‌ی حاضر در مناطق ژنومی تحت انتخاب قرار دارند. این چهار بعلاوه ۳ ژن دیگر (DHR11, CYP2E1 و LOC101107541)، در مسیر بیولوژیکی Steroid hormone biosynthesis به‌نظر می‌رسد جزو مناطق ژنومی متمایز بین جمعیت‌های گوسفند ایران و رومانوف (به‌عنوان یکی از خاص‌ترین نژاد با عملکرد تولیدمثلی بالا) باشد. همانطور که در مطالعات پیشین اشاره شده چندقلوایی در رومانوف تحت تاثیر ژن‌های بزرگ‌اثر مثل برولا قرار ندارد و دانشمندان اتفاق نظر دارند که عملکرد تولیدمثلی رومانوف احتمالاً تحت تاثیر مجموعه‌ای از ژن‌های عملکردی باشد.

در پستانداران، غدد جنسی و آدرنال اندام‌های اصلی هستند که هورمون‌های استروئیدی را از پیش‌سازشان یعنی کسترول تولید می‌کنند. هورمون‌های استروئیدی نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی دارند. به‌عنوان مثال حفظ هموستاز گلوکوکورتیکوئید آدرنال و مینرالوکورتیکوئیدها برای متابولیسم گلوکز، پاسخ به استرس، ایمنی و تعادل مایع/الکترولیت ضروری هستند (Yazawa *et al.*, 2019). تخمدان یک عضو مهم در سیستم تولیدمثل پستانداران ماده است. وظایف اصلی تخمدان تولید و آزادسازی دوره ای تخمک و ترشح استروئید است (Li *et al.*, 2021). آندروژن و استروژن گنادال برای تمایز جنسی و تولیدمثل مهم هستند. این هورمون‌های استروئیدی از طریق یک سری واکنش‌های کاتالیز شده توسط استروئید سیتوکروم (CYP) P450، هیدروکسی لازها و هیدروکسی استروئید دهیدروژنازها تولید می‌شوند (Yazawa *et al.*, 2019). هورمون‌های استروئیدی و گیرنده‌های آنها نقش اساسی در توسعه‌ی فولیکول دارند (Li *et al.*, 2021).

ناحیه‌ی شناسایی شده با استفاده از آماره‌های FST و XPEHH، در موقعیت ۱۸/۷۶ جفت بازی روی کروموزوم ۱۷ با نشانگر شناسایی شده مطالعه‌ی Gholizadeh و Esmaili-Fard (۲۰۲۲) در همین موقعیت مکانی (با کد نشانگری

OAR3_OAR17_18770871) یکسان است. همچنین ژن SLC7A11 شناسایی شده نیز مربوط به همین موقعیت مکانی روی ژنوم (۱۹ مگاجفت بازی) است.

برخی از ژن‌های با اثر بالا برای صفت تعداد بزه در هر زایش در گوسفند گزارش شده است. نکته قابل توجه شناسایی شدن خاص و متفاوت در نژادهای مختلف است. از این میان می‌تواند به تاثیر ژن پرولاکتین در نژاد Herdwick، ژن GDF9 در نژاد Hanrahan *et al.*, 2004; Chu) و ژن‌های BMP15 و BMP1B در نژاد Han و Lacaune اشاره کرد (Belclare و Cambridge *et al.*, 2007; Bowles *et al.*, 2014) و شاید یکی از شاخص ترین مطالعات در ارتباط با تعیین مکانیسم‌های درگیر با چندقلوزایی توسط (Xu *et al.* ۲۰۱۸). در این مطالعه مکانیسم‌های و ژن‌های عمده اثر موثر بر عملکرد چندقلوزایی ژن‌های BMP1B، FBN1 و MMP2 در نژاد Wadi چین، ژن‌های GRIA2، SAMD1 و CTNNB1 در نژاد Hu، ژن NCOA1 در نژاد Icelandic، ژن‌های JNHBB، NF1، PTGS2 و PLCB3 در نژاد Finnsheep، ژن ESR2 در نژاد Romanov، و نیز ژن‌های ESR1، GHR، MMP15، FLI1 و SPP1 در نژاد Texel، شناسایی و گزارش شدند (Xu *et al.*, 2018). حاشیه نویسی بیشتر ژن‌ها و تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک نشان داد که مسیرهای بیولوژیکی مختلف می‌تواند در تعداد بزه‌ی متولد شده در یک زایش دخیل باشد: ترشح هورمون‌های (LH و FSH) در نژاد Wadi و Hu، جفت و مرگ و میر جنین در نژاد Icelandic، فولیکولوژن و سیگنالینگ LH در Finnsheep، تخمک گذاری و بلوغ فولیکول قبل از تخمک گذاری در Romanov و افزایش استروژن و رشد فولیکول در Texcel. این موارد می‌تواند بینش و رویکرد جدیدی را در زمینه‌ی شناخت معماری ژنتیکی صفت باروری در گوسفند و پستاندارن دیگر را پیش روی محققان این حوزه قرار بدهد و در نهایت کمک میکند تا مسیر درستی را در راستای طراحی و اجرای پروژه‌های اصلاح نژادی مرتبط با افزایش عملکرد تولیدمثلی، انتخاب کنیم (Xu *et al.*, 2018).

همچنین در مطالعه‌ی Edmaeili-Fard *et al.* (۲۰۲۱) یکسری جایگاه‌های مرتبط با صفات تولید مثلی در درون و یا نزدیکی ژن‌های RDX، FDX1، ARHGAP20، ZX2H12C، THBS1 و EPG5 شناسایی شدند. ژن‌های شناسایی شده در مسیرهای عملکردی مرتبط با آبستی از قبیل اتوفازی در جفت، تولید پروژسترون توسط جفت، تشکیل جفت، انتقال یون کلسیم و پاسخ ایمنی مادر مشارکت داشتند. هر چند هیچکدام از ژن‌های معرفی شده در مطالعه حاضر با این ژن‌ها مطابقت نداشتند، ولی بخش عمده‌ای از ژن‌های شناسایی شده مرتبط با ایمنیت مادری و موارد از ژن‌های مرتبط با انتقال یون که در مطالعه‌ی Edmaeili-Fard *et al.* (۲۰۲۱) به‌عنوان عوامل دخیل در عملکرد تولیدمثلی عنوان شده است، در مطالعه حاضر جزو ژن‌های شناسایی

شده بودند.

در هر صورت مشابهت اندکی بین ژن‌های شناسایی شده در مطالعه‌ی حاضر با تحقیقات پیشین در زمینه صفت دوقلوژی وجود دارد. یکی از دلایل اساسی می‌تواند مربوط به مسیرهای بیولوژیکی و ژن‌های درگیر در این مسیر در بین نژادها متفاوت بوده و بخصوص اینکه این مسیر در رومانوف حتی در مقایسه با نژادهای چندقلوژی دنیا، متفاوت است. حتی در مطالعات پیشین نیز ارتباط و همپوشانی کمتری بین ژن‌های مرتبط با چندقلوژی رومانوف با سایر نژادهای چندقلوژی دنیا وجود دارد (Xu *et al.*, 2018). مورد اساسی دیگر که شاید در تطبیق نتایج مطالعه‌ی حاضر با تحقیقات پیشین دخیل باشد، به تفاوت‌های عمده‌ی دیگر غیر از تولیدمثل، مربوط است.

نتیجه گیری

در مطالعه‌ی حاضر در کنار موارد و مسیرهای بیولوژیکی شناسایی شده از مقایسه‌ی جمعیت‌های گوسفندان ایران با نژاد رومانوف که جزو شاخص‌ترین نژادهای چندقلوژی دنیا به شمار می‌رود. هم‌ردیف با تفاوت‌های شناسایی شده به‌عنوان نشانه‌های انتخاب واگرا بین دو گروه مطالعه از قبیل ایمنیت و بویایی، مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با سنتز استروئید و استروئیدوزنر تخمدان به‌عنوان موارد تحت انتخاب مرتبط با صفت چندقلوژی شناسایی شد. شناسایی این مسیر و مطالعات تکمیلی دیگر در زمینه‌ی شناسایی ژن‌های درگیر در تولیدمثل می‌تواند در طراحی بهتر پروژه‌های بهبود عملکرد تولیدمثلی موثر باشد.

سپاسگزاری

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

- Asadollahpour Nanaei, H., Kharrati-Koopae, H., & Esmailizadeh, A. (2022). Genetic diversity and signatures of selection for heat tolerance and immune response in Iranian native chickens. *BMC genomics*, 23(1), 224.
- Barnett, R., Westbury, M. V., Sandoval-Velasco, M., Vieira, F. G., Jeon, S., Zazula, G., ... & Gilbert, M. T. P. (2020). Genomic adaptations and evolutionary history of the extinct scimitar-toothed cat, *Homotherium latidens*. *Current Biology*, 30(24), 5018-5025.
- Biabani, P., Mehrbani Yeganeh, H., & Mokhber, M. (2022). Detection of Genetic Differences between Holstein and Iranian North-West Indigenous Hybrid Cattles using Genomic Data. *Research On Animal Production*, 13(37), 175-186. (In Persian)
- Biswas, S. & Akey, J. M. (2006). Genomic insights into positive Selection. *Trends in Genetics*, 22(8), 437-436.

Bovo, S., Ribani, A., Muñoz, M., Alves, E., Araujo, J. P., Bozzi, R., ... & Fontanesi, L. (2020). Whole-genome sequencing of European autochthonous and commercial pig breeds allows the detection of signatures of selection for adaptation of genetic resources to different breeding and production systems. *Genetics Selection Evolution*, 52(1), 1-19.

Bowles, D., Carson, A., & Isaac, P. (2014). Genetic distinctiveness of the Herdwick sheep breed and two other locally adapted hill breeds of the UK. *PLoS One*, 9(1), e87823.

Browning, B. L., Tian, X., Zhou, Y., & Browning, S. R. (2021). Fast two-stage phasing of large-scale sequence data. *The American Journal of Human Genetics*, 108(10), 1880-1890.

Browning, S.R. and B.L. Browning. 2007. Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. *The American Journal of Human Genetics*, 81(5): 1084-1097.

Buxadera, A. M., Alexandre, G., & Mandonnet, N. (2004). Discussion on the importance, definition and genetic components of the number of animals born in the litter with particular emphasis on small ruminants in tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 54(1-2), 1-11.

Byrne, T. J., Ludemann, C. I., Amer, P. R., & Young, M. J. (2012). Broadening breeding objectives for maternal and terminal sheep. *Livestock Science*, 144(1-2), 20-36.

Chu, M. X., Liu, Z. H., Jiao, C. L., He, Y. Q., Fang, L., Ye, S. C., ... & Wang, J. Y. (2007). Mutations in BMPR-IB and BMP-15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han sheep (*Ovis aries*). *Journal of Animal Science*, 85(3), 598-603.

Crepaldi, P., Bionda, A., Cortellari, M., Lopreiato, V., & Liotta, L. (2023). Selection signatures in Italian hunting dogs. *Italian Journal of Animal Science*, 22(s1), 91-92.

Demars, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., Persani, L., ... & Bodin, L. (2013). Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genetics*, 9(4), e1003482.

Deniskova, T., Esmailizadeh, A., Dotsev, A., Koshkina, O., Farahvashi, M. A., Mokhtari, M., ... & Zinovieva, N. (2022). A Search for Eurasian Sheep Relationships: Genomic Assessment of the Autochthonous Sheep Breeds in Russia and the Persian Plateau. *Diversity*, 14(6), 445.

Diao, S., Huang, S., Chen, Z., Teng, J., Ma, Y., Yuan, X., ... & Zhang, Z. (2019). Genome-wide signatures of selection detection in three South China indigenous pigs. *Genes*, 10(5), 346.

Ensembl BioMart: Ensembl online genome database BioMart Tool.
<http://www.ensembl.org/biomart/martview/>.

EntrezGene: NCBI Resources EntrezGene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

- Esmaeili-Fard, S. M., Gholizadeh, M., Hafezian, S. H., & Abdollahi-Arpanahi, R. (2021). Genes and pathways affecting sheep productivity traits: Genetic parameters, genome-wide association mapping, and pathway enrichment analysis. *Frontiers in genetics*, 12, 710613.
- Fariello, M. I., Servin, B., Tosser-Klopp, G., Rupp, R., Moreno, C., International Sheep Genomics Consortium, ... & Boitard, S. (2014). Selection signatures in worldwide sheep populations. *PloS one*, 9(8), e103813.
- Garel, M., Cugnasse, J. M., Gaillard, J. M., Loison, A., Gibert, P., Douvre, P., & Dubray, D. (2005). Reproductive output of female mouflon (*Ovis gmelini musimon* × *Ovis sp.*): a comparative analysis. *Journal of Zoology*, 266(1), 65-71.
- Gautier, M. and R. Vitalis. 2012. rehh: an R package to detect footprints of selection in genome-wide SNP data from haplotype structure. *Bioinformatics*, 28(8): 1176-1177.
- Gholizadeh, M., & Esmaeili-Fard, S. M. (2022). Multi-population joint genome-wide association study to detect genomic regions associated with litter size in sheep. *Animal Production Research*, 11(3), 15-26.
- Gootwine, E. (2020). Invited review: Opportunities for genetic improvement toward higher prolificacy in sheep. *Small Ruminant Research*, 186, 106090.
- Gootwine, E. (2020). Invited review: Opportunities for genetic improvement toward higher prolificacy in sheep. *Small Ruminant Research*, 186, 106090.
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., & Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of reproduction*, 70(4), 900-909.
- Hider, J. L., Gittelman, R. M., Shah, T., Edwards, M., Rosenbloom, A., Akey, J. M. & Parra, E. J. (2013). Exploring signatures of positive selection in pigmentation candidate genes in populations of East Asian ancestry. *BMC Evolutionary Biology*, 13, 150-160.
- Jiang, Y., Xie, M., Chen, W., Talbot, R., Maddox, J. F., Faraut, T., ... & Dalrymple, B. P. (2014). The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science*, 344(6188), 1168-1173.
- Khalkhali-Evrigh, R., Hedayat, N., Ming, L., & JIRANmutu. (2022). Identification of selection signatures in Iranian dromedary and Bactrian camels using whole genome sequencing data. *Scientific reports*, 12(1), 9653.
- Kijas, J. W., Lenstra, J. A., Hayes, B., Boitard, S., Porto Neto, L. R. & *et al.* (2012). Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. *PLoS Biology*, 10(2), e1001258. doi:10.1371/journal.pbio.1001258.
- Kimura, M. (1985). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, New York.
- Li, L., Shi, X., Shi, Y., & Wang, Z. (2021). The signaling pathways involved in ovarian follicle development. *Frontiers in Physiology*, 12, 730196.

- Lv, F. H., Agha, S., Kantanen, J., Colli, L., Stucki, S., Kijas, J. W., ... & Ajmone Marsan, P. (2014). Adaptations to climate-mediated selective pressures in sheep. *Molecular biology and evolution*, 31(12), 3324-3343.
- Manzari, Z., Mehrabani Yeghaneh, H., Najati-Javaremi, A., Moradi, M. H., & Gholizadeh, M. (2016). Detection of loci under positive selection in Iranian Baluchi and Zel sheep breeds. *Iranian Journal of animal Science*, 47(3), 389-398.
- Mohammadi, H., Moradi, M. H., & Khaltabadi Farahani, A. H. (2022). Genome-wide association study and pathway analysis for identifying the genes associated with coat color in Lori-Bakhtiari sheep breed. *Iranian Journal of animal Science*, 53(3), 153-160. (In Persian)
- Mohammadi, H., Rafat, S. A., Moradi Shahrababak, H., Shoja, J., & Moradi, M. H. (2018). Genome-wide analysis for detection of loci under positive selection in Zandi sheep breed. *Iranian Journal of animal Science*, 48(4), 533-548. (In Persian)
- Mokhber, M., Moradi, M., Sadegi, M., Moradi, H. & Williams, J. (2015). Genome-Wide Survey of signature of positive selection in Khuzestani and Mazandrani buffalo breeds. *Iranian Journal of Animal Science*, 46(2), 119-131. (In Persian)
- Mokhber, M., Moradi-Shahrababak, M., Sadeghi, M., Moradi-Shahrababak, H., Stella, A., Nicolzzi, E., ... & Williams, J. L. (2018). A genome-wide scan for signatures of selection in Azeri and Khuzestani buffalo breeds. *BMC genomics*, 19(1), 1-9.
- Mokhber, M., Moradi Shahre Babak, M., Sadeghi, M., Moradi Shahrababak, H., & Rahmani-Nia, J. (2019). Estimation of effective population size of Iranian water buffalo by genomic data. *Iranian Journal of animal Science*, 50(3), 197-205. (In Persian)
- Moradi Shahrababak, H., Biabani, P., Mehrbani Yeganeh, H., & Mokhber, M. (2023). Investigating the genetic diversity of Iranian native and Holstein cattle breeds using genomic data. *Animal Sciences Journal*, 36(138), 87-98. (In Persian)
- Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrababak, 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, 10.
- Nicolazzi EL, Caprera A, Nazzicari N, Cozzi P, Strozzi F, Lawley C, et al. SNPchiMp v. 3: integrating and standardizing single nucleotide polymorphism data for livestock species. *BMC Genomics*. 2015;16:283.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J. & Sham, P. C. (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., Jansen, S., Somel, M., Strom, T. M. & et al. (2014). Classic Selective Sweeps Revealed by Massive Sequencing in Cattle. *PLoS Genetics*, 10(2), e1004148. doi:10.1371/journal.pgen.1004148

Qanbari, S., Strom, T. M., Haberer, G., Weigend, S., Gheyas, A. A. & *et al.* (2012) A High Resolution Genome-Wide Scan for Significant Selective Sweeps: An Application to Pooled Sequence Data in Laying Chickens. *PLoS ONE*, 7(11), e49525. doi:10.1371/journal.pone.0049525.

R version 4.1.3 [computer software]. (2013). [http:// www.r-project.org/](http://www.r-project.org/).

Rahimadad, S., Ghaffari, M., Mokhber, M., & Williams, J. L. (2021). Linkage disequilibrium and effective population size of buffalo populations of Iran, Turkey, Pakistan, and Egypt using a medium density SNP array. *Frontiers in Genetics*, 12, 608186.

Sabeti, P. C., Reich, D. E., Higgins, J. M., Levine, H. Z. P., Richter, D. J., Schaffner, S. F., Gabriel, S. B., Platko, J. V., Patterson, N. J., McDonald, G. J. & *et al.* (2002). Detecting recent positive selection in the human genome from Haplotype structure. *Nature*, 419, 832-837.

Salehi, R., Javanmard, A., Mokhber, M., & Alijani, S. (2023). Genomic Selection Signatures in Two French and Swedish Holstein Cattle Breeds Provide Evidence for Several Potential Candidate Genes Linked to Economic Traits. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 13(4), 677-684.

Shi, S., Shao, D., Yang, L., Liang, Q., Han, W., Xue, Q., ... & Tong, H. (2023). Whole genome analyses reveal novel genes associated with chicken adaptation to tropical and frigid environments. *Journal of Advanced Research*, 47, 13-25.

Simianer, H., Ma, Y. & Qanbari, S. (2014). Statistical problems in livestock population genomics. *Proceedings 10th Congress of Genetics Applied to Livestock Production*, 17-22 August., Vancouver, BC, Canada.

Strillacci, M. G., Moradi-Shahrbabak, H., Davoudi, P., Ghoreishifar, S. M., Mokhber, M., Masroue, A. J., & Bagnato, A. (2021). A genome-wide scan of copy number variants in three Iranian indigenous river buffaloes. *BMC genomics*, 22(1), 1-14.

Teo, Y. Y., Fry, A. E., Clark, T. G., Tai, E. S. & Seielstad, M. (2007). On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Human Genetics*, 71, 701-703.

Turner, S.D. 2014. QQman: An R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *bioRxiv*, 5165.

Wang, G., Wang, F., Pei, H., Li, M., Bai, F., Lei, C., & Dang, R. (2022). Genome-wide analysis reveals selection signatures for body size and drought adaptation in Liangzhou donkey. *Genomics*, 114(6), 110476.

Wang, Z. H., Zhu, Q. H., Li, X., Zhu, J. W., Tian, D. M., Zhang, S. S., ... & Li, M. H. (2021). iSheep: an integrated resource for sheep genome, variant and phenotype. *Frontiers in Genetics*, 12, 714852.

Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *International Journal of Evolution*, 38: 1358-1370.

Wolfová, M., Wolf, J., Krupová, Z., & Margetín, M. (2009). Estimation of economic values for traits of dairy sheep: II. Model application to a production system with one lambing per year. *Journal of dairy science*, 92(5), 2195-2203.

Xu, S. S., Gao, L., Xie, X. L., Ren, Y. L., Shen, Z. Q., Wang, F., ... & Li, M. H. (2018). Genome-wide association analyses highlight the potential for different genetic mechanisms for litter size among sheep breeds. *Frontiers in genetics*, 9, 118.

Yang, S., Li, X., Li, K., Fan, B. & Tang, Z. (2014). A genome-wide scan for signatures of selection in Chinese indigenous and commercial pig breeds. *BMC Genetics*, 15(7), 9. from <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/15/7>.

Yazawa, T., Imamichi, Y., Sekiguchi, T., Miyamoto, K., Uwada, J., Khan, M. R. I., ... & Taniguchi, T. (2019). Transcriptional regulation of ovarian steroidogenic genes: recent findings obtained from stem cell-derived steroidogenic cells. *BioMed Research International*, 2019.

Zandi, M. B., Salek Ardestani, S., Vahedi, S. M., Mahboudi, H., Mahboudi, F., & Meskoob, A. (2022). Detection of Common Copy Number of Variants Underlying Selection Pressure in Middle Eastern Horse Breeds Using Whole-Genome Sequence Data. *Journal of Heredity*, 113(4), 421-430.

Zhao, F.P., Wei, C.H., Zhang, L., Liu, J.S., Wang, G.K., Tao, Z.E.N.G. and Du, L.X. (2016). A genome scan of recent positive selection signatures in three sheep populations. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(1): 162-174.