



## مطالعه پویش ژنومی بر پایه آنالیز مسیر جهت شناسایی ژن‌های مرتبط با پارامترهای هماتولوژی در گوسفند

حسین محمدی<sup>۱</sup>، ابوذر نجفی<sup>۲</sup>، محمد شمس‌اللهی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، مرکزی، ایران

<sup>۲</sup> گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

<sup>۳</sup> گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۲۱ فروردین ماه ۱۴۰۱، تاریخ پذیرش: ۲۲ خرداد ماه ۱۴۰۱



10.22059/jvr.2022.341417.3255



20.1001.1.20082525.1401.77.2.6.3

### چکیده

**زمینه مطالعه:** گلبول‌های قرمز خون نقش اساسی در انتقال اکسیژن و سیستم ایمنی دارند. علاوه بر این، پارامترهای هماتولوژی به عنوان یک شاخص کلینیکی مهم برای بیماری‌های مختلف، از جمله کم‌خونی و سندرم متابولیکی می‌باشند.

**هدف:** مطالعه پویش کل ژنوم بر اساس آنالیز مجموعه‌های ژنی برای شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر صفات هماتولوژی با استفاده از آرایه‌های ژنومی 630K بوده است.

**روش کار:** بدین منظور از اطلاعات رکوردهای فنوتیپی و ژنوتیپی مرتبط با شمارش گلبول‌های قرمز (RBC)، هموگلوبین (HGB)، هماتوکریت (HCT)، حجم متوسط گلبول قرمز (MCH)، میانگین غلظت هموگلوبین (MCHC) و توزیع دامنه حجم گلبول‌های قرمز (RWD\_CV) ۴۹۸ نمونه از گوسفندان آلپاین مرینو استفاده شد. ابتدا آنالیز پویش کل ژنومی برای صفات هماتولوژی در برنامه TASSEL انجام شد. سپس با استفاده از بسته نرم افزاری *biomaR2* برنامه R ژن‌های معنی‌دار شناسایی گردید. در نهایت تفسیر مجموعه ژنی با بسته نرم افزاری *goseq* برنامه R از طریق پایگاه‌های GO، KEGG، DAVID و PANTHER انجام شد.

**نتایج:** در مطالعه حاضر تعداد ۱۱ نشانگر تک نوکلئوتیدی واقع روی کروموزوم‌های ۱، ۲، ۳، ۶، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۴ و ۲۰ شناسایی شدند که با ژن‌های *TRPC4*، *SPTA1*، *TMCC2* (RBC)، *EPAS1* (HGB)، *GPLD1*، *KRT26*، *PDGFRA* (HCT) و *BBS1*، *HAG1*، *PIK3R3*، *STXBP5*، *FCER1G* (MCH، MCHC، RWD\_CV) مرتبط بودند. در تفسیر مجموعه ژنی تعداد ۱۷ مسیر هستی‌شناسی ژنی و بیوشیمیایی با صفات هماتولوژی شناسایی شد ( $P < 0.05$ ). مسیرهای شناسایی شده عملکردهای مهمی را در ارتباط با رشد و تفرق گلبول‌های قرمز، میزان دسترسی به اکسیژن، فرآیند آداپتاسیون، استرس محیطی، تنظیم سیستم ایمنی و فعال‌سازی پلاکت‌ها بر عهده داشتند.

**نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به تأیید نتایج حاصل از مطالعه قبلی در زمینه پویش ژنومی صفات هماتولوژی و شناسایی مناطق ژنومی جدید استفاده از یافته‌های مطالعه حاضر می‌تواند در انتخاب ژنتیکی برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند مفید باشد.

**کلمات کلیدی:** آنالیز مسیر، صفات اریتروسایت، پویش ژنومی، گوسفند، ژن کاندیدا

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

**نویسنده مسئول:** حسین محمدی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، مرکزی، ایران

پست الکترونیکی: H-mohammadi64@araku.ac.ir

### مقدمه

پارامترهای خونی حیوانات به تأیید کلینیکی دامپزشکان در دام و آبیان کمک می‌کند (۳-۱). پارامترهای خونی اندازه‌گیری

تغییر پارامترهای خونی در تشخیص بیماری‌های مختلف باکتریایی و انگلی بسیار با اهمیت می‌باشد، به طوری که ارزیابی

قرار گرفتند که در آن مطالعه از مدل‌های خطی مختلط تک نشانگری و از تصحیح بنفرونی برای تعیین آستانه معنی‌داری و جلوگیری از خطای نوع اول استفاده شده است (۴). برای اولین بار Peñagaricano و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که تجزیه و تحلیل پویش ژنومی بر مبنای مسیر دقت شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر صفت نرخ باروری گاوهای نر را بالا برده است، زیرا با استفاده از این روش تمام نشانگرهای معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ آنالیز می‌شوند و در نتیجه میزان خطای نوع اول و بیش برآوردها کاهش پیدا می‌کند.

اخیراً مطالعه پویش ژنومی بر مبنای مسیر با استفاده از آنالیز غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی روی صفت تولید مثلی تعداد نتایج در نژادهای مختلف گوسفند انجام شده است. نتایج به‌دست آمده از آنالیز مسیر، منجر به شناسایی ۳۰ طبقه مختلف عملکردی هستی‌شناسی ژن و مسیرهای زیستی KEGG معنی‌دار مرتبط شامل TGF- $\beta$  signaling pathway, Oxytocin signaling pathway, Estrogen signaling pathway, Insulin signaling pathway و Prolactin signaling pathway و ژن‌های کاندیدای *ESR1*, *BMPR1B*, *DHCR24*, *BMP5* و *EGFR*, *BMP7*, *PTGS2*, *INSR*, *SMAD2*, *PLCB1*, *ESR2* و *KCNMA1* شده بود (۱۰).

هدف از انجام مطالعه حاضر، تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی و مسیرهای زیستی مرتبط با صفات هماتولوژی در گوسفند با استفاده از تراشه‌های 630K و براساس پویش کل ژنوم بر مبنای مسیر می‌باشد. شناسایی این جایگاه‌ها از دیدگاه علمی و اقتصادی می‌تواند دارای اهمیت زیادی باشد.

## مواد و روش کار

در مطالعه حاضر از ۴۹۸ نمونه خون گوسفندان نر نژاد آلپاین مرینو از گله تحت رکورد برداری مرکز اصلاح نژاد Huangcheng استفاده شد. صفات مورد مطالعه شامل شمارش گلبول‌های قرمز خون، میزان هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط گلبول قرمز، میانگین غلظت هموگلوبین و توزیع دامنه حجم گلبول‌های قرمز بودند، آمار توصیفی صفات مورد بررسی در جدول ۱ ارائه شده است.

پس از اطمینان از کمیت و کیفیت بالای DNA استخراج شده، نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های شرکت افی‌متریکس با آرایه‌های 630K تعیین ژنوتیپ شدند. جهت اطمینان از کیفیت

شده شامل شمارش گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط گلبول قرمز، میانگین غلظت هموگلوبین و توزیع دامنه حجم گلبول‌های قرمز می‌باشند (۴).

سنجش شمارش گلبول‌های قرمز خون پارامتر مهمی به عنوان یک صفت شاخص در تعیین کم‌خونی و سندرم متابولیکی است (۵-۶). صفت هماتوکریت، درصد گلبول‌های قرمز فشرده شده خون می‌باشد. کم‌خونی را می‌توان از نظر کارکردی به صورت کاهش ظرفیت حمل اکسیژن خون تعریف کرد. دقیق‌ترین و آسان‌ترین علامت آزمایشگاهی کم‌خونی، کاهش هماتوکریت تا میزان کمتر از دامنه نوسان طبیعی هماتوکریت در هر گونه دامی است. سنجش میزان هموگلوبین کاربردی‌ترین راه برای بیان ظرفیت جابجایی اکسیژن خون است. همچنین سنجش هموگلوبین برای تعیین حجم متوسط گلبول قرمز و میانگین غلظت هموگلوبین ضروری می‌باشد. افزایش حجم متوسط گلبول قرمز ممکن است نشانه افزایش رتیکولوسیت‌های خون باشد (۷).

هدف از مطالعات پویش ژنومی (GWAS) که با شناسایی ارتباط بین نشانگرهای SNP و صفت مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای با تراکم بالا در سطح ژنوم همراه است، پیدا کردن جهش‌های مؤثر یا مسببی می‌باشد که بر فنوتیپ صفت مورد نظر اثر می‌گذراند. این اطلاعات می‌تواند برای انتخاب به کمک نشانگر مفید بوده و به درک مکانیسم مولکولی صفات مورد مطالعه کمک نمایند (۸). یکی از عیوب مطالعات GWAS در نظر گرفتن آستانه معنی‌داری محافظه کارانه برای جلوگیری از اشتباه کاذب است، در حالی که پرهیز از اشتباه نوع اول باعث افزایش خطای نوع دوم می‌گردد. لذا برای حل این مشکل، یکی از راه‌حل‌ها استفاده از آنالیزهای غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی می‌باشد. در واقع در این روش به جای انجام تجزیه برای یک SNP یا یک ژن، ارتباط بین صفت مورد مطالعه و واریانت‌های ژنتیکی را در یک دسته یا گروه ژنی که به طور عملکردی با هم مرتبط هستند بررسی می‌کند. به عبارتی دیگر آنالیز پیوستگی بین یک مجموعه ژنی معنی‌دار زیستی با فنوتیپ مورد آزمون قرار می‌گیرد. در حقیقت در این روش به دنبال ژن‌هایی هستیم که به تنهایی اثر آن‌ها بر صفت مورد نظر معنی‌دار نشده، ولی اثر تجمعی آن‌ها روی صفت دارای اثر معنی‌دار است (۹).

داده‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر، در مطالعه قبلی برای صفات هماتولوژی در گوسفند نژاد آلپاین مرینو مورد آنالیز

پایین دست آن ژن قرار داشت، ارتباط داده شدند (۱۳). (۲) ارتباط ژن‌ها به طبقات عملکردی و مسیرهای بیوشیمیایی از پایگاه‌های اطلاعاتی شامل هستی‌شناسی ژن (<http://www.geneontology.org>), (GO), مسیرهای بیوشیمیایی (<http://www.genome.jp/kegg>), (KEGG), Panther (<http://www.pantherdb.org>), Metacyc (<http://www.metacyc.org>) و Reactome (<http://www.reactome.org>) (۱۴). (۳) پویش کل ژنومی بر پایه آنالیز مسیر با استفاده از توزیع فوق هندسی و آماره Fisher's exact test مورد آزمون قرار گرفت. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی با استفاده از بسته نرم افزاری *goseq* (۱۵) در محیط نرم افزار R انجام گردید. برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به دست آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی آنالین GeneCards (<http://www.genecards.org>) و UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) استفاده شد.

## نتایج

نتایج حاصل از پویش کل ژنومی برای شش صفت مورد مطالعه در تصویر ۱ نشان داده شده است. تعداد مجموعه‌های ژنی حاصل از پایگاه‌های داده‌ای مختلف شامل ۲۴۸ طبقات هستی‌شناسی (فرایند زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی) و ۳۶ مسیر بیوشیمیایی KEGG بود. همان‌طور که در جداول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، طبقات عملکردی در هستی‌شناسی فرایندهای زیستی، عملکرد مولکولی، اجزای سلولی و مسیرهای KEGG با صفات مرتبط با هماتولوژی دارای ارتباط هستند ( $P < 0.05$ ). مسیرهای بیوشیمیایی که شامل بیش از ۳ ژن و کمتر از ۵۰۰ ژن داشتند گزارش شده‌اند.

داده‌های تعیین ژنوتیپ مراحل مختلف کنترل کیفیت روی داده‌های اولیه تعیین ژنوتیپ شده انجام شد.

برای فیلتراسیون داده‌های تعیین ژنوتیپ شده، ابتدا نمونه‌هایی که فراوانی نرخ تعیین ژنوتیپ آن‌ها کمتر از ۹۵ درصد بود، شناسایی و حذف شد. در مرحله بعد نشانگرهایی که حداقل فراوانی آلی در آن‌ها کمتر از ۱ درصد بود حذف شدند. سپس نشانگرهایی که نرخ تعیین ژنوتیپ آن‌ها در نمونه‌ها کمتر از ۹۰ درصد بود شناسایی و حذف شدند. مراحل مختلف فیلتراسیون با استفاده از نرم افزار PLINK (نسخه ۱/۹) انجام شد (۱۱). در نهایت، ۴۳۹۳۹۸ نشانگر و ۴۹۸ نمونه توانستند مراحل مختلف کنترل کیفیت را بگذرانند.

جهت ارتباط فنوتیپ‌ها با ژنوتیپ‌ها از نرم افزار TASSEL استفاده شد. مدل مورد استفاده بر پایه مدل خطی مختلط تک صفتی به شکل زیر بود:

$$y = Xb + Zu + e$$

در مدل فوق  $y$  بردار مشاهدات فنوتیپی،  $X$  و  $Z$  ماتریس‌هایی هستند که مشاهدات را به ترتیب به اثر ثابت نشانگر SNP و اثر تصادفی ژنتیکی ربط می‌دهند. بردارهای  $b$ ،  $u$  و  $e$  به ترتیب در برگزیده اثر نشانگر SNP، اثر پلی‌ژنیک و اثر تصادفی باقیمانده هستند.

اساساً آنالیز پویش ژنومی بر پایه تجزیه و تحلیل مجموعه‌های ژنی در سه مرحله انجام گردید: (۱) تعیین مکان SNP‌های معنی‌دار که مقدار  $P$  آن‌ها کمتر از ۰/۰۵ بود با استفاده از بسته نرم افزاری *biomaR2* (۱۲) در محیط R و با استفاده از ژنوم مرجع گوسفند نسخه (*Oar\_3.1*) به ژن‌هایی که نشانگر SNP مورد نظر در داخل آن ژن و یا ۱۵ kb بالادست یا

جدول ۱. آمار توصیفی صفات هماتولوژی مورد بررسی.

صفات (واحد)	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب تنوع
شمارش گلبول‌های قرمز خون ( $10^{12}$ در لیتر)	۴۹۴	۷/۶۶	۱/۶۹	۲۲/۰۸
میزان هموگلوبین (گرم در لیتر)	۴۸۹	۹۸/۶۰	۱۱/۶۴	۱۱/۸۰
هماتوکریت (درصد)	۴۹۶	۰/۲۷	۰/۰۸	۲۹/۸۴
حجم متوسط گلبول قرمز (پیکوگرم)	۴۹۲	۱۳/۲۴	۲/۶۴	۱۹/۹۳
میانگین غلظت هموگلوبین (گرم در لیتر)	۴۸۸	۳۷۷/۴۷	۱۰۳/۷۷	۲۷/۴۹
توزیع دامنه حجم گلبول‌های قرمز	۴۹۸	۰/۳۹	۰/۰۷	۱۹/۲۳

جدول ۲. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) مرتبط با صفات شمارش گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت.

P-adjust	ژن‌های کاندیدای مرتبط	ژن‌های معنی‌دار	کل ژن‌های موجود در Term	نام مسیر
				فرایند زیستی
				مسیرهای غنی‌شده با شمارش گلبول‌های قرمز خون
۰/۰۳۱	<i>IFT27; PVALB; NCF4; CSF2RB; TRPC4; TEX33; TST</i>	۷	۴۶	regulation of reactive oxygen species metabolic process (GO:2000377)
۰/۰۴۳	<i>TMEM30A; SPTA1; SENP6; IMPG1; PHIP; LCA5</i>	۶	۸۲	regulation of blood circulation (GO:1903522)
۰/۰۰۲	<i>TMCC2; CAMKMT; PREPL; PPM1B</i>	۴	۳۷	positive regulation of cell development (GO:0010720)
۰/۰۰۲	<i>RNF135; ADAP2; TEFM; ATAD5; CRLF3</i>	۵	۳۴	macromolecule metabolic process (GO:0043170)
				مسیرهای غنی‌شده با میزان هموگلوبین
۰/۰۴۷	<i>IFT27; PVALB; NCF4; CSF2RB; TEX33; TST; MPST; TMPRSS6; IL2RB</i>	۹	۳۷	regulation of blood coagulation (GO:0030193)
۰/۰۲۸	<i>KCTD17; GPLD1; HMG3; LRPPRC; KRT26</i>	۵	۲۸	response to oxygen-containing compound (GO:1901700)
۰/۰۱۲	<i>TNFRSF19; SACS; SGCG; FGF9; EPAS1; MICU2; ZDHC20; MRPL57; SKA3; SAP18; LAT52;</i>	۱۱	۵۰	blood vessel development (GO:0001568)
				مسیرهای غنی‌شده با درصد هماتوکریت
۰/۰۱۵	<i>PKIB; TBC1D32; RAC2; HSPD1</i>	۴	۲۹	regulation of response to stimulus (GO:0048583)
۰/۰۲۶۰	<i>PHIP; BCKDHB; UBE3D; ME1; SNAP91; NCOA7; NF217; NKAIN2; TRDN; PKIB; TBC1D32; FAM184A; FIG4; PDGFRA</i>	۱۴	۹۲	regulation of blood pressure (GO:0008217)

جدول ۳. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) مرتبط با صفات حجم متوسط گلبول قرمز، میانگین غلظت هموگلوبین و توزیع دامنه حجم گلبول‌های قرمز.

P-adjust	ژن‌های کاندیدای مرتبط	ژن‌های معنی‌دار	کل ژن‌های موجود در Term	نام مسیر
				فرایند زیستی
				مسیرهای غنی‌شده با حجم متوسط گلبول قرمز
۰/۰۲۵۵	<i>YARS2; DNML1; TMPRSS6; BBS1; STXBP5</i>	۵	۳۲	blood vessel endothelial cell migration (GO:0043534)
۰/۰۱۵۰	<i>CSF2RB; TEX33; TST; MPST; KCTD17; HAG1; IL2RB</i>	۷	۲۶	positive regulation of lymphocyte activation (GO:0051251)
۰/۰۳۳۷	<i>IL12RB2; PTGFR; CYM; OVGPI; ADORA3; ATP1A1</i>	۶	۲۳	positive regulation of lymphocyte differentiation (GO:0045621)
				مسیرهای غنی‌شده با میانگین غلظت هموگلوبین
۰/۰۰۱۰	<i>APOLD1; CDKN1B; GPR19; CREBL2; DUSP16; SENP6; BORCS5; TRNAC-GCA</i>	۸	۳۶	Cellular response to estradiol stimulus (GO:0071392)
۰/۰۲۲	<i>TMEM30A; IMPG1; PIK3R3; PHIP; HMG3; LCA5; SH3BGL2; ELOVL4; TTK; BCKDHB; IBTK; UBE3D; DOPEY1; ME1; SNAP91; KIAA0408; ECHDC1; TRDN;</i>	۱۸	۵۹	Positive regulation of apoptotic process (GO:0043065)
				مسیرهای غنی‌شده با توزیع دامنه حجم گلبول‌های قرمز
۰/۰۱۷	<i>PRDM5; FABP2; SEC24D; PRSS12; NDST3; THADA; HAAO; OXER1; MTA3; KCNG3</i>	۱۰	۵۸	regulation of lymphocyte proliferation (GO:0050670)
۰/۰۱۴	<i>P2B1; SLFN14; SLFN11; FNDC8; RAD51D; RFFL; LIG3; CCT6B</i>	۸	۴۱	adaptive immune response (GO:0002250)
	<i>SESNI; STXBP5; HACE1</i>	۳	۱۶	regulation of leukocyte apoptotic process (GO:2000106)
				مسیرهای KEGG
۰/۰۲۸	<i>FCER1G; ROCK1; ADCY2; ADCY3; PLCB2</i>	۵	۷۵	Platelet activation (oar04611)

کاندیدای در جدول ۲ ارائه شده است. همچنین مسیرهای زیستی مرتبط با صفات هماتولوژی با استفاده از پایگاه داده KEGG مورد بررسی قرار گرفته شد که با نتایج برخی از مطالعات قبلی مرتبط با صفات هماتولوژی مطابقت داشت (۱۷).

بر اساس تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO)، فرآیندهای زیستی مختلفی برای ژن‌های مؤثر بر صفات هماتولوژی مشاهده شد که مطابق با نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین بود (۳، ۱۶). جزئیات کامل ترم‌های هستی‌شناسی معنی‌دار به همراه اسامی ژن‌های

با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب در شش نژاد گاوهای آفریقای جنوبی، ژن کاندیدای *KRT26* در ارتباط با آدپتاسیون به شرایط آب و هوایی گرم و خشک گزارش شده است (۲۰).

مطالعه پویش ژنومی در گونه گاو در ارتباط با شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با آدپتاسیون در ارتفاع بالا، ژن کاندیدای *EPAS1* گزارش شده است. ژن *EPAS1* همچنین به نام ژنی *HIF2a* شناخته می‌شود که جزئی از خانواده HIF بوده که مسئول دسترسی به اکسیژن در پاسخ سلولی به شرایط محیطی در ارتفاع بالا می‌باشد (۲۱).

فرایندهای زیستی معنی‌دار مشاهده شده مرتبط با صفت درصد هماتوکریت، شامل ژن‌های *RAC2* و *HSPD1* با سطح معنی‌داری ۰/۰۱۵ با فرایند regulation of response to stimulus و ژن *PDGFRA* با سطح معنی‌داری ۰/۰۲۸ با فرایند regulation of blood pressure مشاهده شدند. *RAC2* و *HSPD1* دو ژن مهم در ارتباط با صفات هماتولوژی می‌باشند و می‌توانند بر صفت درصد هماتوکریت نیز تأثیر گذار باشند.

مطالعه پویش کل ژنومی با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با مقاومت به پارازیت‌های معده‌ای-روده‌ای در گوسفندان نژاد Santa Inês، ژن کاندیدای *RAC2* در ارتباط با صفات هماتولوژی درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین شناسایی گردید. ژن *RAC2* جزء ژن‌های پاسخ ایمنی مقاومت به پارازیت‌ها می‌باشد (۲۲). همچنین در مطالعه پویش کل ژنومی با هدف شناسایی ژن‌های کلیدی مرتبط با استرس دمایی در گاوهای شیری هلشتاین، ژن کاندیدای *HSPD1* شناسایی گردید که نقش مهمی در ایمنی ذاتی داشت (۲۳). اخیراً مطالعه پویش ژنومی با ۱۵ نژاد بومی کشور روسیه با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با تطابق پذیری انجام شده است، ژن کاندیدای *PDGFRA* مرتبط با استرس دمایی در شرایط سرما گزارش شده است (۲۴).

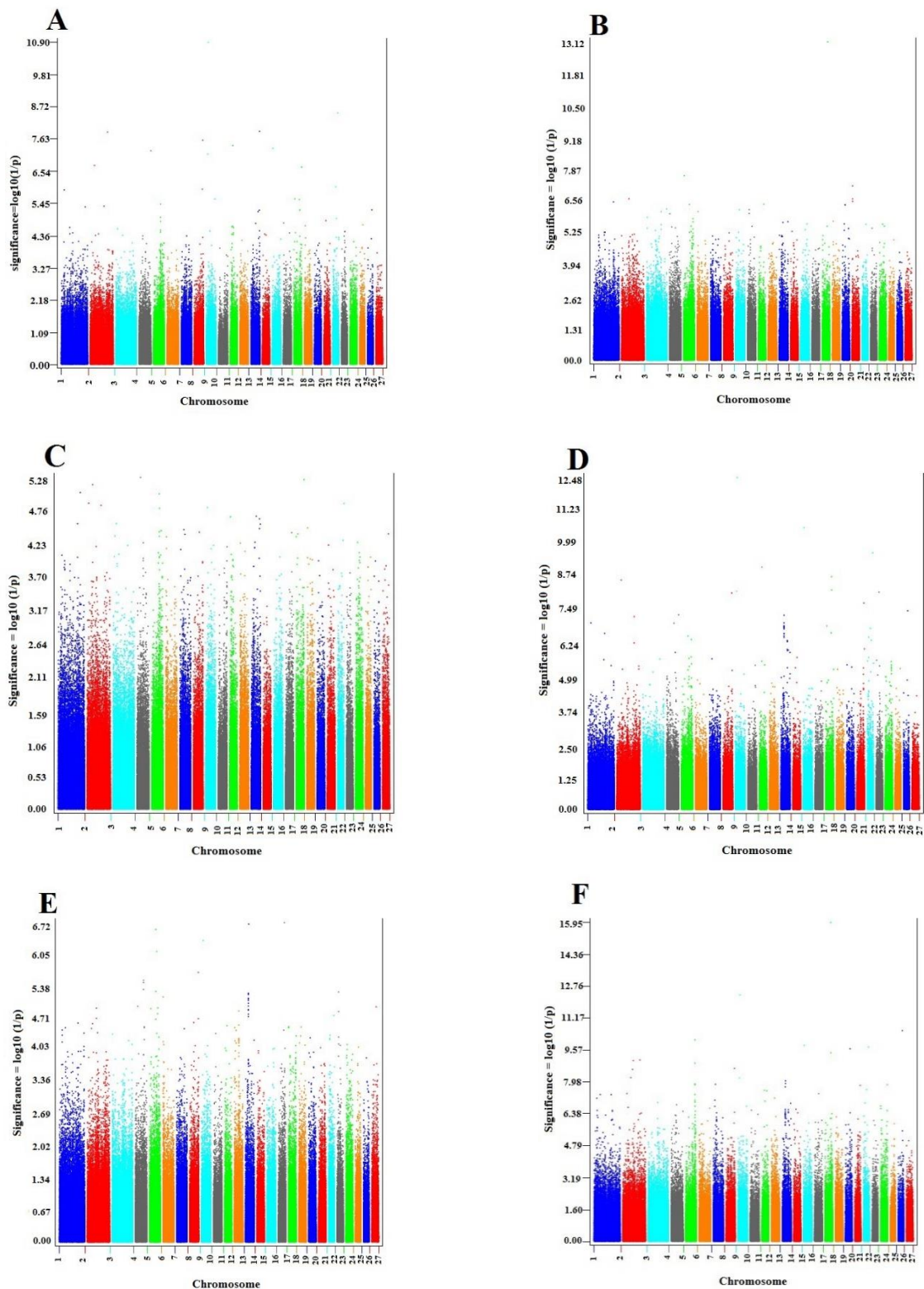
فرایندهای زیستی مشاهده شده با صفات حجم متوسط گلبول قرمز خون و میانگین غلظت هموگلوبین، ژن‌های *BBS1* و *STXBP5* با سطح معنی‌داری ۰/۰۲۵ با فرایند blood vessel endothelial cell migration و ژن *HAG1* با سطح معنی‌داری ۰/۰۱۵ با فرایند positive regulation of lymphocyte activation و ژن *PIK3R3* با سطح معنی‌داری ۰/۰۲۲ با فرایند Positive regulation of apoptotic process بود.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که ژن *TRPC4* با سطح معنی‌داری ۰/۰۳۱ با فرایند regulation of reactive oxygen species metabolic process و ژن *SPTA1* با سطح معنی‌داری ۰/۰۴۳ با فرایند regulation of blood circulation و ژن *TMCC2* در فرایند زیستی positive regulation of cell development که مرتبط با شمارش گلبول‌های قرمز خون بودند، شناسایی شدند. برخی از ژن‌های این فرایند زیستی در مطالعات مختلف بررسی ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات هماتولوژی به خصوص شمارش گلبول‌های قرمز خون در ارتباط می‌باشند.

مطالعه پویش کل ژنومی با هدف بررسی معماری ژنتیکی مقاومت به بیماری براساس صفات هماتولوژی گونه خوک، ژن *SPTA1* در ارتباط با صفت شمارش گلبول‌های قرمز خون گزارش شد. ژن *SPTA1* نقش کلیدی در تولید پروتئین‌های مرتبط با غشای گلبول‌های قرمز خون داشت (۱۸). همچنین در مطالعه پویش کل ژنومی جمعیت خوک‌های نژاد Duroc×Erhualian، مرتبط با شمارش گلبول‌های قرمز، ژن کاندیدای *TMCC2* شناسایی شد. ژن *TMCC2* نقش کلیدی در حجم گلبول‌های قرمز خون و اندازه‌گیری آنمی داشت (۶). مطالعه اخیر پویش ژنومی در گوسفندان بومی مدیترانه‌ای نشان داد، ژن کاندیدای *TRPC4* نقش کلیدی در ارتباط با آدپتاسیون دارد. ژن *TRPC4* نقش مهمی در تنظیم سیستم عصبی شامل فرایندهای مرتبط با دوپامین دارد (۱۹).

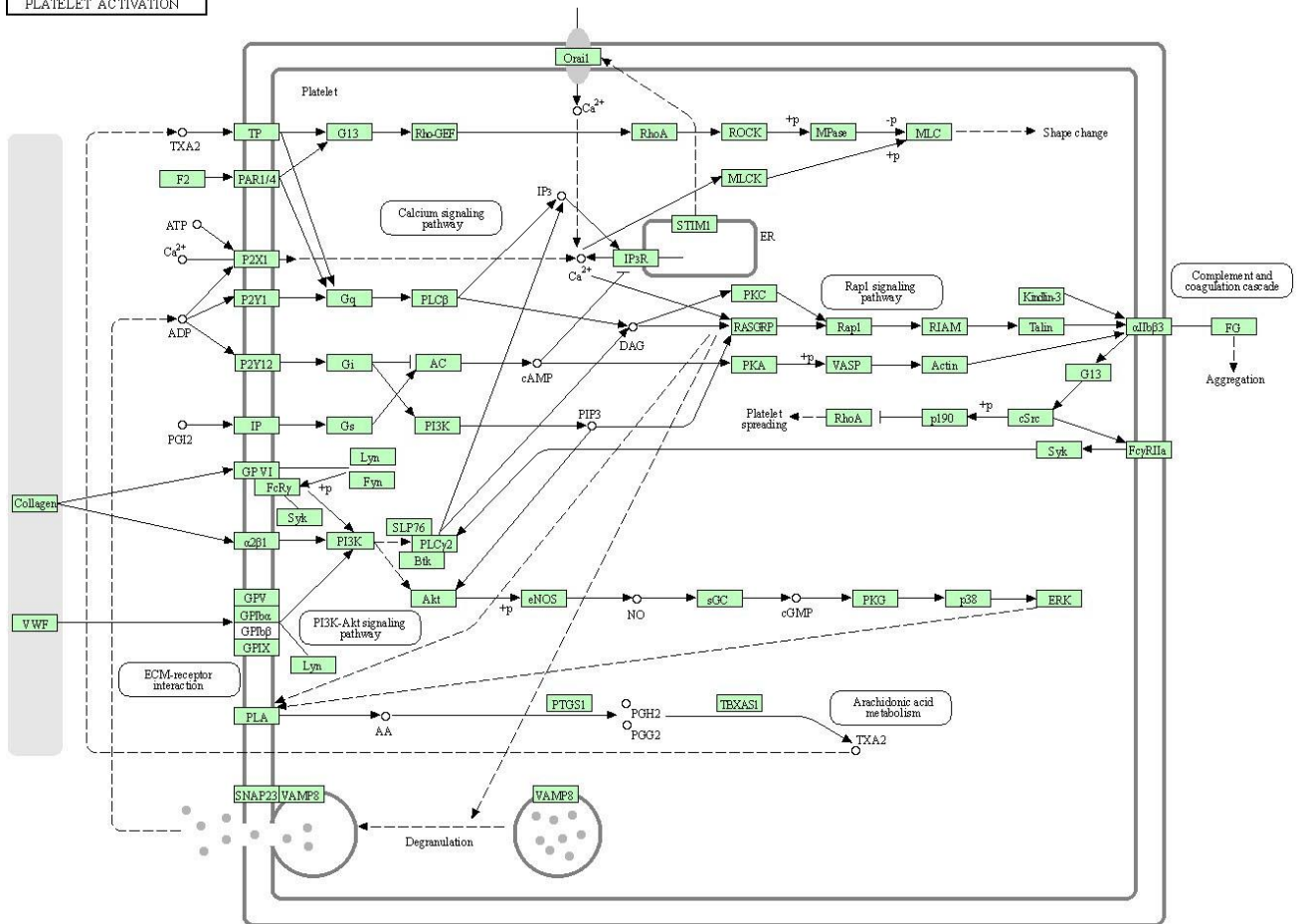
ژن‌های *KRT26* و *GPLD1* با سطح معنی‌داری ۰/۰۲۸ با فرایند response to oxygen-containing compound و ژن *EPAS1* با سطح معنی‌داری ۰/۰۱۲ با فرایند blood vessel development مرتبط با صفت میزان هموگلوبین مشاهده شد. *EPAS1* و *GPLD1* دو ژن مهم دیگر مرتبط با صفات هماتولوژی می‌باشند که تأثیر این دو ژن در صفت هموگلوبین در مطالعات اخیر مشاهده شد.

مطالعه پویش کل ژنومی در گونه یاک (yak) با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با صفات هماتولوژی، ژن *GPLD1* با صفات هموگلوبین و شمارش گلبول‌های قرمز گزارش شده است (۳). ژن *GPLD1* در ارتباط با عملکرد ایمنی در سلول‌های خونی مرتبط می‌باشد. علاوه بر این مطالعه ژنومی



تصویر ۱. پلات منهن برای صفات هماتولوژی. (A) شمارش گلبول‌های قرمز خون، (B) میزان هموگلوبین، (C) هماتوکریت، (D) حجم متوسط گلبول قرمز، (E) میانگین غلظت هموگلوبین، (F) توزیع دامنه حجم گلبول‌های قرمز.

PLATELET ACTIVATION



تصویر ۲. مسیر سیگنالی Platelet activation و ژن‌های کاندیدی مرتبط (پایگاه داده KEGG).

در ارتباط با صفات میزان هموگلوبین، درصد هماتوکریت و میانگین غلظت هموگلوبین خون مرتبط بود (تصویر ۲).

در مطالعه ژنومی بر پایه آنالیز مقایسه‌ای فایل ترانسکریپتوم بافت طحال گوسفندان نژاد سافوک و قزاق با هدف شناسایی تفرق معنی‌دار بیان ژن‌های صفات مرتبط با آداپتاسیون، ژن *FCER1G* گزارش شد که با سیستم ایمنی ارتباط داشت (۱۷). همچنین ژن کاندیدی در مطالعه‌ای در گاوهای شیری، با بررسی پروفایل RNA-Seq در غدد پستانی آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس آئروس*، تفرق معنی‌دار بیان ژن *PLCB2* گزارش شده است (۲۷). ژن *PLCB2* از خانواده ژنی *PLCB* بوده و نقش کلیدی در تفرق و تولید گلبول‌های قرمز خون و تنظیم عملکرد ماکروفاژها دارند. در مطالعه قبلی آنالیز پویا ژنومی نژاد آلپاین مریوس، ژن *PLCB1* به عنوان ژن کاندیدی مرتبط با صفت میانگین غلظت هموگلوبین خون شناسایی شده بود (۴).

در مطالعه ژنومی با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب در گوسفندان نژاد تبتی، مناطق ژنومی مرتبط با آداپتاسیون در ارتفاع بالا گزارش شده است که شامل ژن کاندیدی *HAG1* در ارتباط با صفات هماتولوژی شامل حجم متوسط گلبول قرمز خون و میانگین غلظت هموگلوبین می‌باشد (۲۵). همچنین مطالعه پویا کل ژنومی در جمعیت نژادهای خوک در ارتباط با صفات هماتولوژی، ژن کاندیدی *BBS1* در ارتباط با صفت حجم متوسط گلبول قرمز خون گزارش شده است (۱۶). اخیراً در مطالعه پویا کل ژنومی گونه خوک، با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با صفات سلامتی، ژن کاندیدی *PIK3R3* در ارتباط با صفات هماتولوژی حجم متوسط گلبول قرمز خون و میانگین غلظت هموگلوبین گزارش شده است (۲۶).

جزئیات کامل مسیر زیستی KEGG به همراه اسامی ژن‌های کاندیدا در جدول ۳ ارائه شده است. با بررسی نتایج حاصل شده مشاهده شد که ژن‌های *FCER1G* و *PLCB2* با سطح معنی‌داری ۰/۰۲۸ با مسیر زیستی Platelet activation

گوسفندان بومی و نتایج به دست آمده را برای مطالعات اصلاحی به کار برد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دکتر یانگ و همکاران در گروه علوم دامی آکادمی علوم کشاورزی چین به خاطر فراهم نمودن اطلاعات مورد نیاز مطالعه حاضر صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

بررسی مناطق ژنومی به دست آمده با استفاده از پایگاه داده BioMart، GeneCards و UniProtKB نشان داد که بیشتر این مناطق شناسایی شده روی کروموزوم‌های مختلف با صفات هماتولوژی در گونه‌های مختلف مرتبط می‌باشند. با توجه به عملکرد بیولوژیکی مسیرهای شناسایی شده در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد این ژن‌ها در بروز فنوتیپی صفات مرتبط با هماتولوژی نقش ایفا می‌کنند، در نتیجه می‌توان کارآیی روش تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی برای پویش ژنومی صفات مهم اقتصادی را نیز مورد تأیید قرار داد. همچنین با بررسی چند شکلی موجود در ژن‌های کاندیدای شناسایی شده از تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی مرتبط با پارامترهای هماتولوژی از طریق مطالعات آزمایشگاهی در نژادهای

## References

- Hasanpour Fattahi A, Jafaryan H, Khosravi, AR. The combined effects of the yeast *saccharomyces cerevisiae* and *aspergillus niger* on the hematological and biochemical parameters of cultured juvenile beluga (*Huso huso*). *J Vet Res.* 2015; 70(4): 463-473 (In Persian) doi: [10.22059/JVR.2016.56468](https://doi.org/10.22059/JVR.2016.56468)
- Jamshidi R, Arab HA, Rassouli A, Javaheri AL, Shams GR. Biochemical, hematological and pathological alterations associated with ascites in broilers and the role of oxygen-derived free radicals. *J Vet Res.* 2008; 62(6): 333-339 (In Persian).
- Ma X, Jia C, Fu D, Chu M, Ding X, Wu X, Guo X, Pei J, Bao P, Liang C, Yan P. Analysis of Hematological Traits in Polled Yak by Genome-Wide Association Studies Using Individual SNPs and Haplotypes. *Genes (Basel).* 2019; 10(6): 463. doi: [10.3390/genes10060463](https://doi.org/10.3390/genes10060463) PMID: [31212963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31212963/)
- Zhu S, Guo T, Zhao H, Qiao G, Han M, Liu J, Yuan C, Wang T, Li F, Yue Y, Yang B. Genome-Wide Association Study Using Individual Single-Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes for Erythrocyte Traits in Alpine Merino Sheep. *Front Genet.* 2020; 11: 848 doi: [10.3389/fgene.2020.00848](https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00848) PMID: [32849829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32849829/)
- Jamshidi R, Arab HA, Rassouli A, Javaheri AL, Shams GR. Biochemical, hematological and pathological alterations associated with ascites in broilers and the role of oxygen-derived free radicals. *J Vet Res.* 2008; 62(6): 333-339 (In Persian)
- Jiu-hong N, Li-lin Y, Zhen-shuang T, Jian-hai C, Jie Z, Hai-yan W, Xiao-yong D, Xiang-dong L. Genetic parameter estimation and genome-wide association study (GWAS) of red blood cell count at three stages in a Duroc×Erhualian pig population. *J Integr Agric.* 2020; 19(3): 793–799 doi: [10.1016/S2095-3119\(19\)62773-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62773-5)
- von tempelhoff GF, Schelkunov O, Demirhan A, Tsikouras P, Rath W, Velten E. Correlation between blood rheological properties and red blood cell indices (MCH, MCV, MCHC) in healthy women. *Clin Hemorheol Microcircul.* 2015; 62: 45–54 doi: [10.3233/CH-151944](https://doi.org/10.3233/CH-151944) PMID: [26410854](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26410854/)
- El-Halawany N, Zhou X, Al-Tohamy AF, El-Sayd YA, Shawky AA, Michal JJ, Jiang Z. Genome-wide screening of candidate genes for improving fertility in Egyptian native Rahmani sheep. *Anim Genet.* 2016; 47(4): 513. doi: [10.1111/age.12437](https://doi.org/10.1111/age.12437) PMID: [27062642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27062642/)
- Marques DBD, Bastiaansen JWM, Broekhuijse MLWJ, Lopes MS, Knol EF, Harlizius B, Guimarães SEF, Silva FF, Lopes PS. Weighted single-step GWAS and gene network analysis reveal new candidate genes for semen traits in pigs. *Genet Sel Evol.* 2018; 50(1): 40. doi: [10.1186/s12711-018-0412-z](https://doi.org/10.1186/s12711-018-0412-z) PMID: [30081822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30081822/)
- Khaltabadi Farahani AH, Mohammadi H, Moradi MH. Gene set enrichment analysis using genome-wide association study to identify genes and pathways associated with litter size in various sheep breeds. *Anim Prod.* 2020; 22(3): 325-335 (In Persian) doi: [10.22059/JAP.2020.292715.623468](https://doi.org/10.22059/JAP.2020.292715.623468)
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 559-575. doi: [10.1086/519795](https://doi.org/10.1086/519795) PMID: [17701901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17701901/)
- Durink S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols.* 2009; 4: 1184-1191. doi: [10.1038/nprot.2009.97](https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97) PMID: [19617889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19617889/)
- Pegolo S, Cecchinato A, Savoia S, Di Stasio L, Pauciuolo A, Brugiapaglia A, Bittante G, Albera A. Genome-wide association and pathway analysis of carcass and meat quality traits in Piemontese young bulls. *Animal.* 2020; (2): 243-252. doi: [10.1017/S1751731119001812](https://doi.org/10.1017/S1751731119001812) PMID: [31414654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31414654/)
- Neupane M, Kiser JN. Bovine Respiratory Disease Complex Coordinated Agricultural Project Research Team, Neiberghs HL. Gene set enrichment analysis of SNP data in dairy and beef cattle with bovine respiratory disease. *Anim Genet.* 2018; (6): 527-538. doi: [10.1111/age.12718](https://doi.org/10.1111/age.12718) PMID: [30229962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30229962/)
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Method gene ontology analysis for RNA-seq: Accounting for selection bias. *Genome Biology.* 2010; 11: 14-23. doi: [10.1186/gb-2010-11-2-r14](https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r14) PMID: [20132535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20132535/)



16. Zhang J, Chen JH, Liu XD, Wang HY, Liu XL, Li XY, Wu ZF, Zhu MJ, Zhao SH. Genome wide association studies for hematological traits and T lymphocyte subpopulations in a Duroc × Erhualian F resource population. *J Anim Sci*. 2016; 94(12): 5028-5041. doi: [10.2527/jas.2016-0924](https://doi.org/10.2527/jas.2016-0924) PMID: [28046140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28046140/)
17. Yang H, Yang YL, Li GQ, Yu Q, Yang J. Identifications of immune-responsive genes for adaptative traits by comparative transcriptome analysis of spleen tissue from Kazakh and Suffolk sheep. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 3157. doi: [10.1038/s41598-021-82878-x](https://doi.org/10.1038/s41598-021-82878-x) PMID: [33542475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33542475/)
18. Bai X, Yang T, Putz AM, Wang Z, Li C, Fortin F, Harding JCS, Dyck MK; PigGen Canada, Dekkers JCM, Field CJ, Plastow GS. Investigating the genetic architecture of disease resilience in pigs by genome-wide association studies of complete blood count traits collected from a natural disease challenge model. *BMC Genomics*. 2021; 22(1): 535. doi: [10.1186/s12864-021-07835-4](https://doi.org/10.1186/s12864-021-07835-4) PMID: [34256695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34256695/)
19. Kolosov A, Getmantseva L, Kolosova M, Romanets T, Bakoev N, Romanets E, Bakoeva I, Kostyunina O, Prytkov Y, Tretiakova O, Bakoev S. Investigation of the Genetic Architecture of Pigs Subjected to Breeding Intensification. *Genes (Basel)*. 2022; 13(2): 197. doi: [10.3390/genes13020197](https://doi.org/10.3390/genes13020197) PMID: [35205240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35205240/)
20. Makina SO, Muchadeyi FC, van Marle-Köster E, Taylor JF, Makgahlela ML, Maiwashe A. Genome-wide scan for selection signatures in six cattle breeds in South Africa. *Genet Sel Evol*. 2015; 47: 92. doi: [10.1186/s12711-015-0173-x](https://doi.org/10.1186/s12711-015-0173-x) PMID: [26612660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26612660/)
21. Newman JH, Holt TN, Cogan JD, Womack B, Phillips JA, Li C, Kendall Z, Stenmark KR, Thomas MG, Brown RD, Riddle SR, West JD, Hamid R. Increased prevalence of EPAS1 variant in cattle with high-altitude pulmonary hypertension. *Nat Commun*. 2015; 6: 6863. doi: [10.1038/ncomms7863](https://doi.org/10.1038/ncomms7863) PMID: [25873470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25873470/)
22. Berton MP, de Oliveira Silva RM, Peripolli E, Stafuzza NB, Martin JF, Álvarez MS, Gavinã BV, Toro MA, Banchemo G, Oliveira PS, Eler JP, Baldi F, Ferraz JBS. Genomic regions and pathways associated with gastrointestinal parasites resistance in Santa Inês breed adapted to tropical climate. *J Anim Sci Biotechnol*. 2017; 8: 73. doi: [10.1186/s40104-017-0190-4](https://doi.org/10.1186/s40104-017-0190-4) PMID: [28878894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28878894/)
23. Fang H, Kang L, Abbas Z, Hu L, Chen Y, Tan X, Wang Y, Xu Q. Identification of key Genes and Pathways Associated With Thermal Stress in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Holstein Dairy Cattle. *Front Genet*. 2021; 12: 662080. doi: [10.3389/fgene.2021.662080](https://doi.org/10.3389/fgene.2021.662080) PMID: [34178029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34178029/)
24. Yurchenko AA, Deniskova TE, Yudin NS, Dotsev AV, Khamiruev TN, Selionova MI, Egorov SV, Reyer H, Wimmers K, Brem G, Zinovieva NA, Larkin DM. High-density genotyping reveals signatures of selection related to acclimation and economically important traits in 15 local sheep breeds from Russia. *BMC Genomics*. 2019; 20(Suppl 3): 294. doi: [10.1186/s12864-019-5537-0](https://doi.org/10.1186/s12864-019-5537-0) PMID: [32039702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32039702/)
25. Liu J, Yuan C, Guo T, Wang F, Zeng Y, Ding X, Lu Z, Renqing D, Zhang H, Xu X, Yue Y, Sun X, Niu C, Zhuoga D, Yang B. Genetic signatures of high-altitude adaptation and geographic distribution in Tibetan sheep. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 18332. doi: [10.1038/s41598-020-75428-4](https://doi.org/10.1038/s41598-020-75428-4) PMID: [33110149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33110149/)
26. Ballester M, Ramayo-Caldas Y, González-Rodríguez O, Pascual M, Reixach J, Díaz M, Blanc F, López-Serrano S, Tibau J, Quintanilla R. Genetic parameters and associated genomic regions for global immunocompetence and other health-related traits in pigs. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 18462. doi: [10.1038/s41598-020-75417-7](https://doi.org/10.1038/s41598-020-75417-7) PMID: [33116177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33116177/)
27. Heimes A, Brodhagen J, Weikard R, Becker D, Meyerholz MM, Petzl W, Zerbe H, Schuberth HJ, Hoedemaker M, Schmicke M, Engelmann S, Kühn C. Cows selected for divergent mastitis susceptibility display a differential liver transcriptome profile after experimental *Staphylococcus aureus* mammary gland inoculation. *J Dairy Sci*. 2020; 103(7): 6364-6373. doi: [10.3168/jds.2019-17612](https://doi.org/10.3168/jds.2019-17612) PMID: [32307160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32307160/)



## Genome-Wide Association Study Based on Pathways Analysis for Detection Candidate Genes Related to Hematological Traits in Sheep

Hosesin Mohammadi<sup>1</sup>, Abouzar Najafi<sup>2</sup>, Mohammad Shamsollahi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Environmental Sciences, University of Arak, Markazi, Iran

<sup>2</sup> Department of Animal and Poultry Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Ilam, Ilam, Iran

doi [10.22059/jvr.2022.341417.3255](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.341417.3255)

Received: 10 April 2022, Accepted: 12 June 2022

### Abstract

**BACKGROUND:** Red blood cells play an essential role in the oxygen transport and the immune system. Moreover, hematologic parameters are an important clinical indicator of various diseases including anemia and metabolic syndrome.

**OBJECTIVES:** The present study aimed to conduct genome-wide association studies (GWAS) based on gene-set enrichment analysis to identify the loci associated with hematological traits using 630K arrays.

**METHODS:** For this purpose, the phenotype records included 498 genotyped Alpine Merino sheep were used for red blood cell count (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and RBC volume distribution width coefficient of variation (RWD\_CV). Genome-wide association study was performed with hematological traits using TASSEL software. Using biomaR2 R package R, SNP was assigned to genes. GO, KEGG, DAVID, and PANTHER databases were used to assign the genes to functional categories.

**RESULTS:** 11 SNP markers on chromosomes 1, 2, 3, 6, 8, 10, 11, 14, and 20 located in *TRPC4*, *SPATI*, *TMCC2* (RBC), *KRT26*, *GPLD1*, *EPAS1* (HGB), *RAC2*, *HSPD1*, *PDGFRA* (HCT) and *BBS1*, *HAG1*, *PIK3R3*, *STXBP5*, *FCER1G* (MCH, MHCH, RWD\_CV) genes were identified. Based on the pathway analysis, 17 pathways from gene ontology and biological pathways were associated with hematological traits ( $P < 0.05$ ). The pathways have important functions in the development and differential of red blood cells, hypoxia, adaptation process, environmental stress, and platelet activation.

**CONCLUSIONS:** In total, this study supported previous results from the GWAS of hematological traits, and also revealed additional regions in the sheep genome associated with important traits, using these findings could be potentially useful for genetic selection in the breeding programs.

**Keywords:** Erythrocytes traits, Pathway analysis, Genome scan, Sheep, Candidate gene

Copyright © 2022. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: H-mohammadi64@araku.ac.ir Tel/Fax: 086-32623000/086-32623020

### How to cite this article:

Mohammadi H, Najafi A, Shamsollahi M. Genome-Wide Association Study Based on Pathways Analysis for Detection Candidate Genes Related to Hematological Traits in Sheep. J Vet Res, 2022; 77(2): 117-126. doi: 10.22059/jvr.2022.341417.3255

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Descriptive statistics of hematological traits.

**Table 2.** Gene set enrichment analysis significantly ( $P < 0.05$ ) associated with the red blood cell count, hemoglobin and hematocrit traits.

**Table 3.** Gene set enrichment analysis significantly ( $P < 0.05$ ) associated with the mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration and RBC volume distribution width coefficient of variation traits.

**Figure 1.** Manhattan plots for hematological traits. (a), red blood cell count (b), hemoglobin (c), hematocrit (d), mean corpuscular hemoglobin (e), mean corpuscular hemoglobin concentration (f), RBC volume distribution width coefficient of variation.

**Figure 2.** Platelet activation pathway and candidate genes related (KEGG database).