

شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی کنترل کننده شدت فعالیت آنزیم لیزوژیم در مرغ، یک مطالعه همراهی در سطح ژنوم

Identification of single nucleotide polymorphisms underlying the strength of lysozyme activity in chicken, a genome-wide association study

وحید رئیسی^۱، علیرضا احسانی^{*۱}، رسول واعظ ترشیزی^۱

۱- بهتریپ کارشناس ارشد، استادیار، دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

Raeesi V¹, Ehsani A^{*1}, Vaez Torshizi R¹

1- Master of Science, Assistant Professor, Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Tarbiat Modares University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alireza.ehsani@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

در پژوهش حاضر، یک مطالعه همراهی در سطح ژنوم با هدف شناسایی نواحی ژنومیک کنترل کننده میزان فعالیت آنزیم لیزوژیم در مرغ انجام شد. پرندگان تحت آزمایش از یک جمعیت F₂ حاصل از تلاقی ضربه‌ری لاین گوشتی آرین و سویه بومی مرغ آذربایجان غربی بهدست آمد و آنالیزهای مربوطه با استفاده از پانل ۶۰ هزار تابی چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی شرکت ایلومینا انجام گرفت. در این مطالعه، میزان فعالیت آنزیم لیزوژیم علیه باکتری میکروکوکوس لوئوس به عنوان شاخصی برای فعالیت اینمی ذاتی مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیز آماری بر اساس مدل رگرسیونی مختلط و ثابت شده با تصحیح اثرات ناشی از اریب‌های سیستماتیک و اثرات ثابت جنس و هج بود. اثرات چند آزمونی با اعمال سطح ۱۰ درصد نفرخ کشف کاذب در سطح ژنوم به عنوان سطح معنی دار تصحیح شدند. نتایج این پژوهش ضمن تطابق با مطالعات پیشین، نشان داد که در هر دو مدل آماری سه نشانگر rs16479594, GGaluGA206187 و rs15204127 که به ترتیب بر روی کروموزوم‌های ۳، ۵ و ۱ واقع شده‌اند؛ همراهی معنی‌داری با فعالیت آنزیم لیزوژیم در مرغ دارند ($P < 0.01$). آنالیزهای بعدی غناء ژن در پایگاه داده DAVID نشان داد که ژن‌های کاندید واقع در این نواحی از ژنوم، در نه مسیر بیوشیمیایی مؤثر بر عملکرد سیستم اینمی نقش قابل توجهی دارند ($P < 0.01$). تنوع جایگاه‌های ژنتیکی مؤثر بر صفت یاد شده نشان می‌دهد که توارث این صفت به صورت پلی ژنیک بوده و اصلاح نژاد برای این صفت می‌تواند در دراز مدت به بهبود ژنتیکی حیوانات تحت انتخاب برای این صفت منجر شود.

واژه‌های کلیدی

- انتخاب ژنومیک
- جوچه‌های گوشتی
- سیستم اینمی
- مارکر ژنتیکی
- مطالعه پویش ژنوم

مقدمه

اخیراً پانل‌های بزرگی از نشانگرهای تک‌نوکلئوتیدی برای مرغ ساخته شده‌اند (Am Groenen et al. 2011). مطالعات همراهی در سطح ژنوم از این پانل‌ها برای شناسایی نواحی ژنومیک Goddard and Hayes (2009) کنترل کننده صفات پیچیده استفاده می‌کنند (Goddard and Hayes 2009). در مطالعات GWAS پیشین، تعدادی از مارکرهای ژنتیکی مرتبط با اینمی هومورال اکتسابی گزارش شده‌است (Zhang et al. 2015)، ولی تاکنون برای اینمی هومورال ذاتی هیچ مطالعه‌ای برای شناسایی نواحی ژنومیک مرتبط با فعالیت آنزیم لیزوزیم گزارش نشده‌است. بنابراین به دلیل عدم شناخت کافی از اساس ژنومیک سیستم اینمی، در پژوهش حاضر سعی شده‌است تا با انجام یک مطالعه GWAS با استفاده از پانل ۶۰ هزارتایی نشانگر SNP، دانش بهتری از اساس مولکولی پاسخ‌های اینمی فراهم شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۲۷۸ پرنده از جمعیت F_2 حاصل از تلاقی ضربدری (reciprocal crosses) لاین تجاری گوشتی آرین و سویه بومی آذربایجان غربی مورد بررسی قرار گرفتند. همه پرنده‌ها در قفس‌های انفرادی و در شرایط کاملاً یکسان نگهداری شدند. جمعیت مورد مطالعه از شش خروس ایجاد شد و بنابراین از شش خانواده ناتنی تشکیل می‌شد. جزئیات این طرح آزمایشی توسط کمیته حمایت از حیوانات دانشگاه تربیت مدرس مورد تایید قرار گرفت.

سنجه میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم با روش کدورت‌سنجه به شرح ذیل انجام شد. میکروارگانیسم مورد استفاده در این آزمایش *micrococcus luteus* بود که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. مقداری از ارگانیسم با بافر فسفات (۶۷ میلی‌مولار، اسیدیته $\text{pH} = ۶/۴$) مخلوط شد تا میزان جذب سوسپانسیون حاصل در طول موج 450 nm نانومتر بین $۰/۷$ تا $۰/۶$ به دست آید. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون درون کووت^۲ ریخته شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه به آن اضافه شد و بعد از تکان

² Cuvette

امروزه بیماری‌ها و عفونت‌های مرغ به دلیل خسارات اقتصادی و مشترک بودن برخی از این بیماری‌ها با انسان از چالش‌های جدی جوامع انسانی هستند. توسعه‌ی روش‌های متنوع درمان و پیشگیری، کارایی قابل قبولی در رفع این چالش نداشته است. این استراتژی‌ها علاوه بر ایجاد زیان‌های اقتصادی قابل توجه، از عوامل تهدیدکننده سلامت غذایی نیز هستند (Siwek et al. 2003b; Teillant et al. 2015).

بعد از توالی‌یابی ژنوم و پیدایش ژنومیک کاربردی، مرغ بیش از پیش مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. ژنومیک کاربردی بر شناسایی عملکرد و تنظیمات ژن‌ها و محصولات ژنی در مقیاسی در سطح ژنوم تمرکز کرده است (Cogburn et al. 2007). بهبود ژنتیکی عملکرد سیستم اینمی مرغ می‌تواند راه حلی پایدار برای پیشگیری از بروز بیماری‌ها و جایگزینی مناسب برای مصرف داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (Mallard et al. 2015). قابلیت توارث شاخص‌های ایمونولوژیک، شناسایی جایگاه‌ها یا ژن‌های کنترل کننده صفات مرتبط با سیستم اینمی را امکان‌پذیر ساخته است (Yonash et al. 2001; Kaiser et al. 2002). بنابراین مطالعه سیستم اینمی مرغ علاوه بر افزایش آگاهی نسبت به فرایندهای پیچیده سیستم اینمی، جهت تدوین برنامه‌های صحیح با هدف توسعه راهکارهای موثر در برابر بیماری‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است.

سیستم اینمی مجموعه‌ای از پاسخ‌ها علیه عوامل بیماری‌زا است که می‌تواند هومورال و سلولی باشد. لیزوزیم یک شاخص مهم برای سیستم اینمی علیه حملات میکروبی و یک شاخص مهم برای سنجش فعالیت اینمی ذاتی است. تخریب دیواره سلول‌های مهاجم و تحریک فرایند فاگوسیتوز از نقش‌های اصلی لیزوزیم در ایجاد خط دفاعی علیه عوامل بیماری‌زا است (Saurabh and Sahoo 2008). مطالعات گذشته به کمک نشانگرهای ریزماهواره نواحی متعددی از ژنوم مرغ که با سیستم اینمی ارتباط داشتند را شناسایی کردند ولی به دلیل پایین بودن وضوح نقشه‌های ژنتیکی حاصل از این نشانگرها تعداد بسیار محدودی ژن‌های سببی^۱ شناسایی شدند (Luo et al. 2013).

¹ Causative

آزمون تک صفتی^۳ پویش ژنومی با استفاده از مدل‌های رگرسیونی مختلط^۴ و ثابت‌شده^۵ انجام شد. مدل مختلط دربرگیرنده‌ی Matris مرتبط ژنومیک^۶ به عنوان اثر تصادفی بود (VanRaden et al. 2008) و در نرم‌افزار GCTA انجام شد (Yang et al. 2011a).

مدل آماری شامل اثرات ثابت جنس، هج^۷ و اثر افزایشی نشانگر و اثر پلی‌ژنیک تصادفی حاصل از Matris مرتبط ژنومیک بود. مدل رگرسیون خطی مختلط تک‌صفته برای هر نشانگر SNP به صورت زیر قابل نمایش است:

$$\mathbf{y} = \mathbf{W}\boldsymbol{\alpha} + \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{G}\mathbf{u} + \boldsymbol{\epsilon}$$

در این مدل، \mathbf{y} یک بردار $n \times 1$ از ارزش‌های فنتیپی برای n پرنده، \mathbf{W} یک Matris $c \times n$ از اثرات ثابت جنس و هج و میانگین جمعیت، $\boldsymbol{\alpha}$ یک بردار $1 \times c$ از ضرایب اثرات ثابت، \mathbf{x} یک بردار $1 \times n$ از ژنوتیپ‌های نشانگر تحت آزمون، $\boldsymbol{\beta}$ اثر مربوط به نشانگر که برای هر نشانگر برای آل مینور گزارش شده است، \mathbf{G} Matris مرتبط ژنومیک و \mathbf{u} بردار $1 \times n$ اثرات پلی‌ژنیک تصادفی با یک ساختار کوواریانسی به صورت $(\mathbf{Vg}, \mathbf{Ve}) \sim N(0, \mathbf{V})$ که $\mathbf{Vg} \sim \mathbf{I}_n$ واریانس پلی‌ژنیک افزایشی و $\mathbf{Ve} \sim N(0, \mathbf{V})$ واریانس باقی‌مانده تصادفی به‌طوری که $\mathbf{V} = \mathbf{Vg} + \mathbf{Ve}$ است.

در مدل رگرسیون خطی ثابت‌شده تک‌صفته، تصحیح اثرات اریب‌های سیستماتیک با قرار گرفتن جزء اول آنالیز مقیاس‌گذاری چند بعدی در مدل میسر شد. سایر اجراء مدل مشابه مدل مختلط بود. آنالیز مقیاس‌گذاری چند بعدی^۸ در نرم‌افزار PLINK نسخه ۱/۹ انجام شد (Chang et al. 2014). برای این آنالیز نیاز است که نشانگرهای کاملاً مستقل از هم مورد استفاده قرار بگیرند. لذا نشانگرهای به صورت پنجره‌های شامل ۵ نشانگر دارای عدم تعادل پیوستگی^۹ کمتر از ۰/۲ استخراج شدند. به‌طورکلی ۲۵۲۴ نشانگر مستقل استخراج شد. شباهت ژنوتیپی کل^{۱۰} بین نمونه‌ها با استفاده از این نشانگرهای مستقل محاسبه شد که از آن‌ها برای محاسبه

دادن بسیار آهسته، کووت سریعاً در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرار داده شد. میزان جذب به مدت ۵ دقیقه و هر ۳۰ ثانیه یکبار در طول موج ۴۵۰ نانومتر یادداشت شد و میانگین جذب‌های قرائت شده در ۵ دقیقه بر $100/0$ تقسیم شد تا میزان فعالیت آنزیم برای ۲۰ میکرولیتر نمونه معین شود. سپس میزان فعالیت آنزیم برای یک میلی‌لیتر نمونه محاسبه شد. در روش کدورت‌سنجدی، یک واحد فعالیت آنزیم برابر با $100/0$ کاهش کدورت سوسپانسیون در هر دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر است (Shugar 1952).

نمونه‌های خون از سیاهرگ بالی ۲۷۸ پرنده گرفته شد و جهت ژنوتایپینگ به دانشگاه آرهوس دانمارک فرستاده شدند. ژنوتایپینگ این نمونه‌ها با پانل ۶۰ هزارتایی SNP شرکت ایلومینا^۱ انجام شد. کنترل کیفیت داده‌های ژنومیک در نرم‌افزار PLINK نسخه ۱/۹ انجام شد (Chang et al. 2014). نمونه‌های خون با نرخ ژنوتیپ بالاتر از ۹۰ درصد و نشانگرهای با فراوانی آل مینور بیشتر از ۱ درصد و نرخ ژنوتیپ گمشده در افراد، کمتر از ۱۰ درصد در آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. هم‌چنین جهت آزمون تعادل هاردی-واینبرگ، نشانگرهایی که اختلاف هتروزیگوستی مشاهده شده و پیش‌بینی شده بیش‌تر از $15/0$ داشتند حذف شدند. هم‌چنین نشانگرهای با جایگاه نامشخص بر روی ژنوم و نشانگرهای واقع بر روی کروموزوم‌های جنسی حذف شدند. کدگذاری ژنوتیپ‌ها به صورت افزایشی^۲ انجام شد. قبل از آنالیز همراهی نشانگرها و فنتیپ تحت مطالعه، برای بررسی اثرات جنس، هج و والد نر، آنالیز اولیه‌ای با مدل رگرسیونی که شامل اثرات ثابت هج، جنس و هج اثرات معنی‌دار ($P < 0.05$) و پدر اثر غیر معنی‌داری ($P > 0.05$) بر فعالیت آنزیم لیزوزیم دارند. بنابراین مدل آماری که برای آزمون همراهی نشانگرها و صفت مورد مطالعه انتخاب شد شامل اثرات جنس و هج بود. علی‌رغم عدم معنی‌داری اثر والد نر برای حصول اطمینان از کنترل اثرات اریب‌های سیستماتیک از جمله روابط ژنتیکی ناشناخته و پنهان و خطاهای ژنوتایپینگ، روابط ژنومیک بین افراد در مدل آماری قرار داده شد (Kraft and Cox 2008).

¹ Illumina

² Additive

³ Univariate

⁴ Mixed linear regression

⁵ Fixed linear regression

⁶ Genomic Relationship Matrix (GRM)

⁷ Hatch

⁸ Multidimensional Scaling (MDS) analysis

⁹ Linkage Disequilibrium (LD or r^2)

¹⁰ Total genotype similarity or identity by state (IBS)

ثبت شدند. پایگاه داده KEGG به عنوان مرجع مورد استفاده قرار گرفت (Kanehisa et al. 2017).

نتایج و بحث

بعد از کنترل کیفیت داده‌ها تعداد 46702 نشانگر SNP و ۲۷۸ پرنده توانستند معیارهای مورد نظر را کسب کنند و برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار بگیرند. ساختار جمعیتی حاصل از آنالیز MDS در شکل ۱ به صورت سه بعدی نمایش داده شده است. جمعیت مورد استفاده در این پژوهش از ۶ خانواده ناتنی بودند (۶ خروس) و همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود ساختار جمعیتی حاصل از داده‌های ژنومیک نشان می‌دهد که زیر‌جمعیت‌های این مطالعه تمایز چندانی نسبت به هم نداشته‌اند. لذا، ساختار جمعیتی مشخصی وجود نداشته است. نرخ تورم ژنومیک (لامبدا) برای مدل رگرسیونی مختلط ۱/۰۱ و برای مدل رگرسیونی ثابت شده ۰/۸۸ بود. تورم ژنومیک ۱/۰۱ و ۰/۸۸ شاهدی بر این مدعی است که خطاهای سیستماتیک اثر قابل توجهی بر نتایج آزمون آماری نداشته‌اند (شکل ۲). در مطالعاتی که لامبدا کوچک‌تر یا مساوی ۱ است نیازی به تصحیح اثرات ساختار جمعیتی نیست (Hinrichs et al. 2009). هر چقدر لامبدا بزرگ‌تر از یک باشد اثر خطاهای سیستماتیک نیز بیش‌تر بوده است. البته نرخ تورم ژنومیک برای صفات پلی‌ژنیک همیشه بالاتر از ۱ خواهد بود. با توجه به لامبدا ۰/۸۸ مدل ثابت شده احتمالاً این مدل آماری اثرات نشانگرها را کم‌برآورده^۴ کرده است. (Yang et al. 2011b). عملکرد بهتر مدل مختلط دور از ذهن نبود، چرا که مطالعات گذشته نشان داده بودند که بطور کلی مدل‌های مختلط عملکرد بهتری نسبت به مدل‌های رگرسیون با اثرات ثابت دارند (Li and Zhu 2013). به نظر می‌رسد مدل‌های مختلط تعادل مناسبی بین خطای نوع اول و نوع دوم را دارند. نتایج اولیه نشان داد که در هر دو مدل آماری تقریباً ۲۰۰۰ نشانگر ارتباط معنی‌داری با فعالیت آنزیم لیزوزیم علیه باکتری میکروکوکوس لوتوس دارند ($P < 0.05$). نمای کلی نشانگرها بر اساس جایگاه آن‌ها بر روی ژنوم و میزان اثر آن‌ها برای هر دو مدل آماری در نمودارهای منتهن شکل ۳ نمایش داده شده است.

اجزاء MDS استفاده شد. با استفاده از این اجزاء، ساختار جمعیتی موجود در جمعیت مورد مطالعه به صورت شماتیک قابل نمایش است.

به منظور تصحیح اثرات ناشی از چند آزمونی، نرخ کشف کاذب ۱۰ درصد در سطح ژنوم به عنوان سطح معنی‌داری اعمال شد (Benjamini and Hochberg 1995). بنابراین برای آزمون معنی‌داری نشانگر، ارزش FDR مربوط به نشانگر محاسبه شد و نشانگرهایی که ارزش P آن‌ها از ارزش FDR آن‌ها کوچک‌تر باشد معنی‌دار محسوب می‌شوند. ارزش FDR به صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{راتب } P \text{ نشانگر} \times \frac{\text{سطح FDR}}{\text{تعداد کل نشانگرها}} = \text{ارزش FDR نشانگر}$$

هم‌چنین نرخ تورم ژنومیک^۱ برای سنجش میزان اثر خطاهای سیستماتیک بر آماره تحت آزمون (مربع کای)^۲ بر اساس معادله زیر محاسبه شد:

$$(3)$$

میانه مربع کای مشاهده شده

= نرخ تورم ژنومیک

میانه مربع کای پیش‌بینی شده

نمایش گرافیکی نرخ تورم ژنومیک و در واقع انحراف آماره تحت آزمون از توزیع نرمال پیش‌بینی شده به کمک نمودار Q-Q انجام شد.

هم‌چنین به منظور شناسایی عملکرد بیولوژیک نواحی معنی‌دار از ژنوم که با فعالیت آنزیم لیزوزیم ارتباط دارند؛ آنالیز غنا ژن^۳ در پایگاه داده DAVID انجام شد (Dennis Jr et al. 2003). بدین منظور، ژنهایی که در ناحیه ۱ مگاباژ پیرامون نشانگرها معنی‌دار بودند با استفاده از بسته نرم‌افزاری BioMart زبان برنامه‌نویسی R بودند با استفاده از بسته نرم‌افزاری DAVID (Durinck et al. 2005) استخراج و جهت آنالیز غنا ژن در پایگاه داده Ensembl

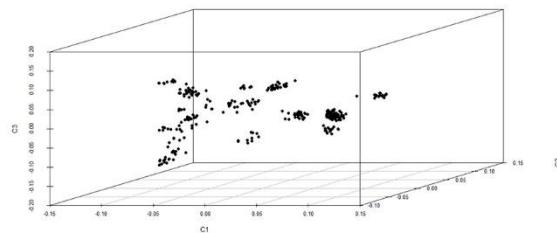
¹ Genomic inflation rate (lambda)

² Chi-square

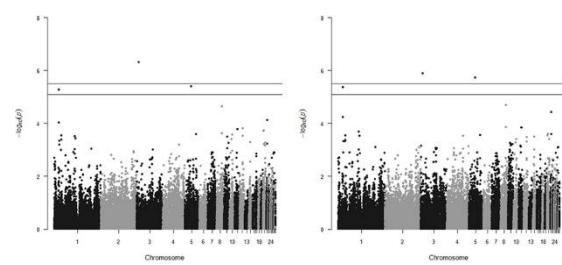
³ Gene Enrichment Analysis

نقش دارد (Mishima et al. 2014) و مانع از فعال شدن NF- κ B و سرکوب TNF آلفا و ایترلوکین ۶ می‌شود (Wei et al. 2011). نشانگر rs312924314 درون ناحیه ایترونی ژن WDR43 بر روی کروموزوم ۳ واقع شده است. ارتباط این ناحیه از کروموزوم ۳ و نواحی پیرامون آن در سیستم ایمنی شناخته شده است (Yunis et al. 2002; Siwek et al. 2003a; Siwek et al. 2003b; Zhou et al. 2003). ژن WDR43 بیوژن ریبوزوم سلول را کنترل می‌کند (Zhao et al. 2014). نشانگر rs16479594 در موقعیت 25218537 جفت‌باز بر روی کروموزوم ۵ درون ناحیه ایترونی QTL ژن SPTBN5 واقع شده است. در مطالعات پیشین چندین QTL در این ناحیه از کروموزوم ۵ برای پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی گزارش شده است به طوری که برخی از این QTL‌ها با جایگاه نشانگر rs16479594 همپوشانی دارند (Siwek et al. 2003b; Slawinska et al. 2011). در انسان موتاسیون درون ژن SPTBN5 با بیماری التهابی چشم (Wang et al. 2015) و تومورهای التهابی ناشی از هرپس ویروس ۸ ارتباط دارد (Aavikko et al. 2014). آنالیز غنا ژن در پایگاه داده DAVID نشان داد که چهار ژن که بر روی کروموزوم ۵ واقع شده‌اند با نه مسیر بیوشیمیایی ارتباط معنی‌داری دارند ($FDR < 0.01$). این مسیرهای بیولوژیک غالباً در متابولیسم لیپیدها و اسیدهای چرب نقش دارند و همگی ارتباطات شناخته شده‌ای با سیستم دفاعی بدن موجودات زنده دارند (جدول ۲). اسیدهای چرب به دلیل موقعیت قرارگیری و سازماندهی آنها درون لیپیدهای سلولی؛ به عنوان نگهبانان^۱ تنظیم سلول‌های ایمنی شناخته می‌شوند (Yaqoob 2003). لیپیدهای اتری که پلاسمالوژن نیز نامیده می‌شوند به عنوان ترکیبات احیاء‌کننده (آنتی‌اکسیدان) نقش برجسته‌ای در عملکرد ایمنی ذاتی و حفاظت از پروتئین‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو دارند (Bottelbergs et al. 2012; Watschinger and Werner 2013).

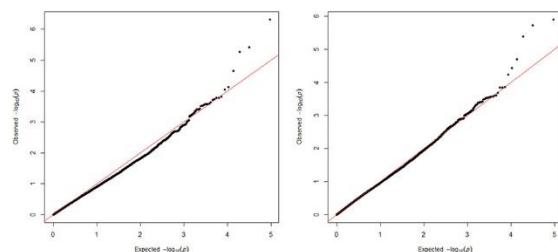
لینولینیک اسید پیش‌ساز آراشیدونیک اسید است و با تنظیم تولید ایکوزانوئید و سرکوب تولید لکوتین B4 موجب بهبود برخی از ناهنجاری‌های التهابی می‌شود (Kaku et al. 2001). مصرف لینولئیک زیاد اگر با کاهش مصرف سایر اسیدهای چرب غیراشباع



شکل ۱- ساختار جمعیتی حاصل از آنالیز مقیاس‌گذاری چندبعدی (MDS). C1، C2 و C3 به ترتیب جز اول، دوم و سوم حاصل از آنالیز MDS هستند.



شکل ۲- نمودار منتهی مدل‌های مختلط (سمت راست) و ثابت شده (سمت چپ) برای فعالیت آنزیم لیزوژیم در مرغ. محور x موقعیت هر نشانگر بر روی کروموزوم‌های (به ترتیب از چپ به راست) ۲۸-۱، ۲۸-۲، ۳۳ و گروه لینکازی LGE64 و محور y لگاریتم مبنای ۱۰ ارزش‌های P است. خطوط افقی به ترتیب از بالا به پایین سطوح ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ FDR هستند.



شکل ۳- نمودارهای Q-Q مدل‌های مختلط (سمت راست) با لامبدا ۱/۱۰۱ و ثابت شده (سمت چپ) با لامبدا ۱/۸۸. محور X آماره‌های مبتنی بر توزیع نرمال و محور y آماره‌های حاصل از نتایج آنالیز در پژوهش حاضر است.

تصحیح اثرات چندآزمونی در سطح ژنوم نشان داد که در هر دو مدل آماری ۳ نشانگر ارتباط معنی‌داری با فعالیت آنزیم لیزوژیم دارند ($FDR < 0.01$). جزئیات این نشانگرها در جدول ۱ گزارش شده است. مطالعات پیشین جایگاه‌های متعددی که با موقعیت نشانگر rs15204127 بر روی کروموزوم ۱ همپوشانی دارند و با عملکرد سیستم ایمنی در ارتباط هستند را شناسایی کرده‌اند (Siwek et al. 2003b). ژن BRDI در توسعه لنفوцит‌های T

^۱ Gatekeepers

اثرات سرکوبگر لینولئیک اسید می‌تواند راهکار درمانی مناسبی برای بیماری‌های خودایمنی از جمله بیماری کرون، پسوریازیس، آرتربیت روماتوئید و دیابت وابسته به انسولین باشد (Sammon et al., 1999; Namazi et al., 2004).

و ریوفلاوین همراه شود، منجر به تولید مقادیر زیادی از پروستوگلاندین E2 در بافت‌ها می‌شود. پروستوگلاندین E2 از تکثیر و تفرق سلول‌های Th1 و هم‌چنین تولید IL-1، IL-2، گاما و TNF آلفا که از عوامل کلیدی ایمنی سلولی هستند جلوگیری می‌کند و منجر به سرکوب ایمنی سلولی می‌شود. این

جدول ۱- جزئیات سه نشانگر با ارتباط معنی دار با فعالیت آنزیم لیزوژیم (FDR < 0/۰۵).

نشانگر	کروموزوم	P مدل ثابت شده	P مدل مختلط	نردیکترین ژن/ موقعیت نسبت به ژن ^۱
rs312924314	۳	$4/۸۶ \times 10^{-۷}$	$1/۱۶ \times 10^{-۶}$	WDR43 درون ایترون
rs16479594	۵	$۳/۹ \times 10^{-۶}$	$۱/۸ \times 10^{-۷}$	SPTBN5 درون ایترون
rs15204127	۱	$۵/۳ \times 10^{-۶}$	$۴/۱۴ \times 10^{-۶}$	BRD1 ۴۳۹ کیلوباز بالادست

^۱ جستجوی پایگاه داده بر اساس نسخه ۵ زنوم مرغ می‌باشد.

جدول ۲- مسیرهای بیوشیمیایی مرتبط با ژن‌های کاندید پیرامون نشانگرهای معنی دار (FDR < 0/۱).

مسیر بیوشیمیایی ^۱	P	FDR	ژن‌های کاندید
متابولیسم آلفا لینولئیک اسید	$۲/۲ \times 10^{-۵}$	$۴/۲ \times 10^{-۴}$	
متابولیسم لینولئیک اسید	$۳/۱ \times 10^{-۵}$	$۲/۹ \times 10^{-۴}$	cytosolic phospholipase A2 epsilon-like(LOC428870)
متابولیسم لیپیدهای اتری	۱×10^{-۴}	$۷/۴ \times 10^{-۴}$	phospholipase A2, group IVB (cytosolic)(PLA2G4B)
متابولیسم آراشیدونیک اسید	$۱/۶ \times 10^{-۴}$	$۷/۷ \times 10^{-۴}$	phospholipase A2, group IVE(PLA2G4E)
مسیر سیگنالینگ VEGF	$۲/۴ \times 10^{-۴}$	$۴/۴ \times 10^{-۴}$	phospholipase A2, group IVE-like(LOC771574)
GnRH	$۵/۸ \times 10^{-۴}$	$۱/۸ \times 10^{-۳}$	
متابولیسم گلیسرفسفولیپید	$۸/۹ \times 10^{-۴}$	$۲/۴ \times 10^{-۳}$	
انقضاض ماهیچه‌های صاف عروقی	$۱/۳ \times 10^{-۳}$	$۲/۱ \times 10^{-۳}$	
مسیر سیگنالینگ MAPK	$۱/۲ \times 10^{-۲}$	$۲/۳ \times 10^{-۲}$	

^۱ پایگاه داده KEGG جهت شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی استفاده شد.

مسیر سیگنالینگ kappaB تحت تاثیر قرار می‌دهد (Min et al., 2009). نقش GnRH و سایر هورمون‌های هیپوتالاموس در سیستم ایمنی به خوبی گزارش شده است (Quintanar and Guzmán-Soto 2013).

وراثت‌پذیری پایین صفات مرتبط با سیستم ایمنی (Wijga et al., 2009) و اثر قابل توجه عوامل محیطی بر این صفات و هم‌چنین مشکلات مرتبط با اندازه‌گیری فتوتیپ این صفات دلایل محکمی برای عدم کارایی مناسب برنامه‌های اصلاح‌نژادی ستی (بر اساس فتوتیپ) برای بهبود ژنتیکی سیستم ایمنی است. در این مطالعه،

در پستانداران، مسیر سیگنالینگ MAPK در تمامی جنبه‌های سیستم ایمنی؛ از فازهای آغازین ایمنی ذاتی تا فعال شدن ایمنی اکتسابی مشارکت دارد (Dong et al., 2002). مسیر سیگنالینگ VGEF فعالیت و توسعه سلول‌های دندانیتی، لنفوسيت‌های T و ماکروفازها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و موجب تحریک رشد تومورهای سرطانی می‌گردد (Ohm et al. 2003; Li et al. 2016). هورمون آزادکننده گونادوتropین^۱ عملکرد ماکروفازها را از طریق

^۱ Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)

سپاسگزاری

از پروفسور یوست یونسن از دانشگاه آرهوس دانمارک به جهت حمایت مالی برای زنوتاپینگ پرندگان و از کنسرسیوم GWMAS بهجهت در اختیار قرار دادن پانل ۶۰ هزارتایی نشانگر SNP سمیمانه قدردانی می‌کنیم. از کارکنان مرکز نگهداری و اصلاح نژاد لاین آرین و همچنین از مرکز پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی آذربایجان غربی به دلیل در اختیار گذاردن پرندگان برای انجام تحقیق سپاسگزاری می‌کنیم. از دکتر مهدی سرگلزاری از دانشگاه گوئلف کانادا به جهت تمامی حمایت‌های علمی ایشان عمیقاً سپاسگزاریم. از دانشگاه تربیت مدرس بهجهت حمایت‌های مالی و از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به جهت فراهم نمودن میکوارگانیسم مورد نیاز این پژوهش سپاسگزاریم.

نقش کروموزوم‌های ۳، ۵ و ۱ بویژه از طریق متabolism لبید و اسیدهای چرب در سیستم ایمنی نشان داده شد. انتخاب ژنومیک و مبتنی بر نشانگرهای ژنتیکی، جایگزینی مناسب برای انتخاب حیوانات برتر و ارتقاء پتانسیل سیستم ایمنی در جمعیت‌های حیوانات مزرعه‌ای به شمار می‌روند. نتایج نشان داد که امکان ایجاد تغییر ژنتیکی عملکرد سیستم ایمنی با استفاده از داده‌های ژنومیک وجود دارد که با مطالعات پیشین تطابق دارد. همچنین این پژوهش نشان داد که مدل‌های مختلط توان و صحت بالاتری نسبت به مدل‌های مبتنی بر اثرات ثابت دارند.

منابع

- Aavikko M, Kaasinen E, Nieminen JK, Byun M, Donner I, Mancuso R, Ferrante P, Clerici M, Brambilla L, Tourlaki A (2014) Whole-genome sequencing identifies STAT4 as a putative susceptibility gene in classic kaposi sarcoma. *The Journal of Infectious Diseases* 211:1842-1851.
- Am Groenen M, Megens H-J, Zare Y, Warren WC, Hillier LW, Crooijmans RP, Vereijken A, Okimoto R, Muir WM, Cheng HH (2011) The development and characterization of a 60K SNP chip for chicken. *BMC Genomics* 1: 1-9.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 57:289-300.
- Bottelbergs A, Verheijden S, Van Veldhoven PP, Just W, Devos R, Baes M (2012) Peroxisome deficiency but not the defect in ether lipid synthesis causes activation of the innate immune system and axonal loss in the central nervous system. *Journal of Neuroinflammation* 9: 61.
- Burt DW (2007) Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poultry Science* 86: 1460-1471.
- Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ (2014) Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScienc* 4:7-22.
- Cogburn LA, Porter TE, Duclos MJ, Simon J, Burgess SC, Zhu JJ, Cheng HH, Dodgson JB, Burnside J (2007) Functional genomics of the chicken--a model organism. *Poultry Science* 86: 2059-2094.
- Dennis Jr G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA (2003) DAVID: database for

annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biology* 4:3-13.

Dong C, Davis RJ, Flavell RA (2002) MAP kinases in the immune response. *Annual Review of Immunology* 20: 55-72.

Durinck S, Moreau Y, Kasprzyk A, Davis S, De Moor B, Brazma A, Huber W (2005) BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics* 21: 3439-3440.

Goddard ME, Hayes BJ (2009) Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Reviews Genetics* 10: 381-391.

Hinrichs AL, Larkin EK, Suarez BK (2009) Population Stratification and Patterns of Linkage Disequilibrium. *Genetic Epidemiology* 33: 88-92.

Kaiser M, Deeb N, Lamont S (2002) Microsatellite markers linked to *Salmonella enterica* serovar enteritidis vaccine response in young F1 broiler-cross chicks. *Poultry Science* 81: 193-201.

Kaku S, Ohkura K, Yunoki S, Nonaka M, Tachibana H, Sugano M, Yamada K (2001) Dietary gamma-linolenic acid dose-dependently modifies fatty acid composition and immune parameters in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65: 205-10.

Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K (2017) KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research* 45: 353-361.

Kraft P, Cox DG (2008) Study designs for genome-wide association studies. *Advances in Genetics* 60: 465-504.

- Li G, Zhu H (2013) Genetic studies: the linear mixed models in genome-wide association studies. *The Open Bioinformatics Journal* 7:27-33.
- Li Y-L, Zhao H, Ren X-B (2016) Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biology and Medicine* 13: 206-214.
- Luo C, Qu H, Ma J, Wang J, Li C, Yang C, Hu X, Li N, Shu D (2013) Genome-wide association study of antibody response to Newcastle disease virus in chicken. *BMC Genetics* 14: 42-51.
- Mallard BA, Emam M, Paibomesai M, Thompson-Crispi K, Wagter-Lesperance L (2015) Genetic selection of cattle for improved immunity and health. *Japanese Journal of Veterinary Research* 63: 37-44.
- Min JY, Park MH, Lee JK, Kim HJ, Park YK (2009) Gonadotropin-releasing hormone modulates immune system function via the nuclear factor-kappaB pathway in murine Raw264.7 macrophages. *Neuroimmunomodulation* 16: 177-84.
- Mishima Y, Wang C, Miyagi S, Saraya A, Hosokawa H, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Koide S, Negishi M, Sashida G, Naito T, Ishikura T, Onodera A, Nakayama T, Tenen DG, Yamaguchi N, Koseki H, Taniuchi I, Iwama A (2014) Histone acetylation mediated by Brd1 is crucial for Cd8 gene activation during early thymocyte development. *Nature Communications* 5: 5872-5872.
- Namazi MR (2004) The beneficial and detrimental effects of linoleic acid on autoimmune disorders. *Autoimmunity* 37: 73-5.
- Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisileva E, Parman KS, Nadaf S, Carbone DP (2003) VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 101: 4878-4886.
- Quintanar JL, Guzmán-Soto I (2013) Hypothalamic neurohormones and immune responses. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 7: 56.
- Sammon AM (1999) Dietary linoleic acid, immune inhibition and disease. *Postgraduate Medical Journal* 75: 129.
- Saurabh S, Sahoo P (2008) Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39: 223-239.
- Shugar D (1952) The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 8: 302-309.
- Siwek M, Buitenhuis AJ, Cornelissen SJ, Nieuwland MG, Bovenhuis H, Crooijmans RP, Groenen MA, de Vries-Reilingh G, Parmentier HK, van der Poel JJ (2003a) Detection of different quantitative trait loci for antibody responses to keyhole limpet hemocyanin and *Mycobacterium butyricum* in two unrelated populations of laying hens. *Poultry Science* 82: 1845-1852.
- Siwek M, Cornelissen SJ, Nieuwland MG, Buitenhuis AJ, Bovenhuis H, Crooijmans RP, Groenen MA, de Vries-Reilingh G, Parmentier HK, van der Poel JJ (2003b) Detection of QTL for immune response to sheep red blood cells in laying hens. *Animal Genetics* 34: 422-428.
- Slawinska A, Witkowski A, Nieuwland M, Minozzi G, Bednarczyk M, Siwek M (2011) Quantitative trait loci associated with the humoral innate immune response in chickens were confirmed in a cross between Green-Legged Partridgelike and White Leghorn. *Poultry Science* 90: 1909-1915.
- Teillant A, Brower CH, Laxminarayan R (2015) Economics of antibiotic growth promoters in livestock. *Annual Review of Resource Economics* 7: 349-374.
- VanRaden P (2008) Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of Dairy Science* 91: 4414-4423.
- Wang H, Zhang L, Cao J, Wu M, Ma X, Liu Z, Liu R, Zhao F, Wei C, Du L (2015) Genome-Wide Specific Selection in Three Domestic Sheep Breeds. *PLoS ONE* 10: e0128688.
- Watschinger K, Werner ER (2013) Orphan enzymes in ether lipid metabolism. *Biochimie* 95:59-65.
- Wei W-C, Lin S-Y, Chen Y-J, Wen C-C, Huang C-Y, Palanisamy A, Yang N-S, Sheu J-H (2011) Topical application of marine briarane-type diterpenes effectively inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and dermatitis in murine skin. *Journal of Biomedical Sciences* 18: 94.
- Wijga S, Parmentier H, Nieuwland M, Bovenhuis H (2009) Genetic parameters for levels of natural antibodies in chicken lines divergently selected for specific antibody response. *Poultry Science* 88: 1805-1810.
- Yang J, Lee SH, Goddard ME, Visscher PM (2011a) GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *The American Journal of Human Genetics* 88: 76-82.
- Yang J, Weedon MN, Purcell S, Lettre G, Estrada K, Willer CJ, Smith AV, Ingelsson E, O'Connell JR, Mangino M (2011b) Genomic inflation factors under polygenic inheritance. *European Journal of Human Genetics* 19: 807.
- Yaqoob P (2003) Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends in Immunology* 24: 639-645.
- Yonash N, Cheng H, Hillel J, Heller D, Cahaner A (2001) DNA microsatellites linked to quantitative trait loci affecting antibody response and survival rate in meat-type chickens. *Poultry Science* 80: 22-28.
- Yunis R, Heller ED, Hillel J, Cahaner A (2002) Microsatellite markers associated with quantitative trait loci controlling antibody response to *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* in young broilers. *Animal Genetics* 33: 407-414.
- Zhang L, Li P, Liu R, Zheng M, Sun Y, Wu D, Hu Y, Wen J, Zhao G (2015) The identification of loci for immune traits in chickens using a genome-wide association study. *PLoS ONE* 10: e0117269.
- Zhao C, Andreeva V, Gibert Y, LaBonté M, Lattanzi V, Prabhudesai S, Zhou Y, Zou L, McCann KL, Baserga S (2014) Tissue specific roles for the ribosome biogenesis factor Wdr43 in zebrafish development. *PLoS Genetics* 10: e1004074.
- Zhou H, Li H, Lamont SJ (2003) Genetic markers associated with antibody response kinetics in adult chickens. *Poultry Science* 82: 699-708.