

## شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی کنترل‌کننده شدت فعالیت آنزیم لیزوزیم 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<sup>۱</sup>، علی‌رضا احسانی<sup>۱\*</sup>، رسول واعظ ترشیزی<sup>۱</sup>

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

Raeesi V<sup>1</sup>, Ehsani A<sup>\*1</sup>, Vaez Torshizi R<sup>1</sup>

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: ۹۶/۴/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

#### چکیده

در پژوهش حاضر، یک مطالعه همراهی در سطح ژنوم با هدف شناسایی نواحی ژنومیک کنترل‌کننده میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در مرغ انجام شد. پرندگان تحت آزمایش از یک جمعیت  $F_2$  حاصل از تلاقی ضربدری لاین گوشتی آرین و سویه بومی مرغ آذربایجان غربی به‌دست آمد و آنالیزهای مربوطه با استفاده از پانل ۶۰ هزارتایی چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی شرکت ایلومینا انجام گرفت. در این مطالعه، میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم علیه باکتری میکروکوکوس لوتئوس به‌عنوان شاخصی برای فعالیت ایمنی ذاتی مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیز آماری بر اساس مدل رگرسیونی مختلط و ثابت شده با تصحیح اثرات ناشی از اربب‌های سیستماتیک و اثرات ثابت جنس و هج بود. اثرات چند آزمونی با اعمال سطح ۱۰ درصد نرخ کشف کاذب در سطح ژنوم به‌عنوان سطح معنی‌دار تصحیح شدند. نتایج این پژوهش ضمن تطابق با مطالعات پیشین، نشان داد که در هر دو مدل آماری سه نشانگر rs16479594، G.GaluGA206187 و rs15204127 که به‌ترتیب بر روی کروموزوم‌های ۳، ۵ و ۱ واقع شده‌اند؛ همراهی معنی‌داری با فعالیت آنزیم لیزوزیم در مرغ دارند ( $FDR < 0.1$ ). 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 ایمنی نقش قابل توجهی دارند ( $FDR < 0.1$ ). تنوع جایگاه‌های ژنتیکی مؤثر بر صفت یاد شده نشان می‌دهد که توارث این صفت به‌صورت 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  
جوجه‌های گوشتی  
سیستم ایمنی  
مارکر ژنتیکی  
مطالعه پویش ژنوم

## مقدمه

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 تهدیدکننده‌ی 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 ایمنی مرغ می‌تواند راه‌حلی 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 کنترل‌کننده‌ی صفات مرتبط با سیستم ایمنی را امکان‌پذیر ساخته است (Yonash et al. 2001; Kaiser et al. 2002). بنابراین مطالعه سیستم ایمنی مرغ علاوه بر افزایش آگاهی نسبت به فرایندهای پیچیده سیستم ایمنی، جهت تدوین برنامه‌های صحیح با هدف توسعه‌ی راهکارهای موثر در برابر بیماری‌ها امری اجتناب‌ناپذیر است.

سیستم ایمنی مجموعه‌ای از پاسخ‌ها علیه عوامل بیماری‌زا است که می‌تواند هومورال و سلولی باشد. لیزوزیم یک پاسخ هومورال سیستم ایمنی علیه حملات میکروبی و یک شاخص مهم برای سنجش فعالیت ایمنی 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 ایمنی ارتباط داشتند را شناسایی کردند ولی به دلیل پایین بودن وضوح نقشه‌های ژنتیکی حاصل از این نشانگرها تعداد بسیار محدودی ژن‌های سببی<sup>۱</sup> شناسایی شدند (Luo et al. 2013).

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 کنترل‌کننده صفات پیچیده استفاده می‌کنند (Goddard and Hayes 2009). در مطالعات GWAS پیشین، تعدادی از مارکرهای ژنتیکی مرتبط با ایمنی هومورال اکتسابی گزارش شده‌است (Zhang et al. 2015)، ولی تاکنون برای ایمنی 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 ایمنی، در پژوهش حاضر سعی شده‌است تا با انجام یک مطالعه GWAS با استفاده از پانل ۶۰ هزار تایی نشانگر SNP، دانش بهتری از اساس مولکولی پاسخ‌های ایمنی فراهم شود.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۲۷۸ پرنده از جمعیت F<sub>2</sub> 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.

سنجش میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم با روش کدورت‌سنجی به شرح ذیل انجام شد. میکروارگانیزم مورد استفاده در این آزمایش *micrococcus luteus* بود که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. مقداری از ارگانیزم با بافر فسفات (۶۷ میلی‌مولار، اسیدیته ۶/۴) مخلوط شد تا میزان جذب سوسپانسیون حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر بین ۰/۶ تا ۰/۷ به‌دست آید. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون درون کووت<sup>۲</sup> ریخته شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه به آن اضافه شد و بعد از تکان

<sup>2</sup> Cuvette<sup>1</sup> Causative

آزمون تک صفتی<sup>۳</sup> پویش ژنومی با استفاده از مدل های رگرسیونی مختلط<sup>۴</sup> و ثابت شده<sup>۵</sup> انجام شد. مدل مختلط دربرگیرنده ی ماتریس روابط ژنومیک<sup>۶</sup> به عنوان اثر تصادفی بود (VanRaden 2008) و در نرم افزار GCTA انجام شد (Yang et al. 2011a). مدل آماری شامل اثرات ثابت جنس، هج<sup>۷</sup> و اثر افزایشی نشانگر و اثر پلی ژنیک تصادفی حاصل از ماتریس روابط ژنومیک بود. مدل رگرسیون خطی مختلط تک صفتی برای هر نشانگر SNP به صورت زیر قابل نمایش است:

$$y = Wa + X\beta + Gu + \varepsilon$$

در این مدل،  $y$  یک بردار  $n \times 1$  از ارزش های فنوتیپی برای  $n$  پرنده،  $W$  یک ماتریس  $n \times c$  از اثرات ثابت جنس و هج و میانگین جمعیت،  $a$  یک بردار  $c \times 1$  از ضرایب اثرات ثابت،  $x$  یک بردار  $n \times 1$  از ژنوتیپ های نشانگر تحت آزمون،  $\beta$  اثر مربوط به نشانگر که برای هر نشانگر برای آلل مینور گزارش شده است،  $G$  ماتریس روابط ژنومیک و  $u$  بردار  $n \times 1$  اثرات پلی ژنیک تصادفی با یک ساختار کوواریانسی به صورت  $u \sim N(0, Vg)$  که  $Vg$ ، واریانس پلی ژنیک افزایشی و  $\varepsilon$  یک بردار  $n \times 1$  باقی مانده های تصادفی به طوری که  $\varepsilon \sim N(0, Ve)$  واریانس باقی مانده است.

در مدل رگرسیون خطی ثابت شده تک صفتی، تصحیح اثرات ارب های سیستماتیک با قرار گرفتن جزء اول آنالیز مقیاس گذاری چند بعدی در مدل میسر شد. سایر اجزاء مدل مشابه مدل مختلط بود. آنالیز مقیاس گذاری چند بعدی<sup>۸</sup> در نرم افزار 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 نشانگرها به صورت پنجره های شامل ۵ نشانگر دارای عدم تعادل پیوستگی<sup>۹</sup> کمتر از ۰/۲ استخراج شدند. به طور کلی ۲۵۲۴ نشانگر مستقل استخراج شد. شباهت ژنوتیپی کل<sup>۱۰</sup> بین نمونه ها با استفاده از این نشانگرهای مستقل محاسبه شد که از آن ها برای محاسبه

دادن بسیار آهسته، کووت سریعاً در دستگاه اسپکتوفوتومتر قرار داده شد. میزان جذب به مدت ۵ دقیقه و هر ۳۰ ثانیه یکبار در طول موج ۴۵۰ نانومتر یادداشت شد و میانگین جذب های قرائت شده در ۵ دقیقه بر ۰/۰۰۱ تقسیم شد تا میزان فعالیت آنزیم برای ۲۰ میکرولیتر نمونه معین شود. سپس میزان فعالیت آنزیم برای یک میلی لیتر نمونه محاسبه شد. در روش کدورت سنجی، یک واحد فعالیت آنزیم برابر با ۰/۰۰۱ کاهش کدورت سوسپانسیون در هر دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر است (Shugar 1952).

نمونه های خون از سیاهرگ بالی ۲۷۸ پرنده گرفته شد و جهت ژنوتایپینگ به دانشگاه آرهوس دانمارک فرستاده شدند. ژنوتایپینگ این نمونه ها با پانل ۶۰ هزار تایی SNP شرکت ایلومینا<sup>۱</sup> انجام شد. کنترل کیفیت داده های ژنومیک در نرم افزار PLINK نسخه ۱/۹ انجام شد (Chang et al. 2014). نمونه های خون با نرخ ژنوتیپ بالاتر از ۹۰ درصد و نشانگرهای با فراوانی آلل 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 هتروزیگوسیتی مشاهده شده و پیش بینی شده بیش تر از ۰/۱۵ داشتند حذف شدند. همچنین نشانگرهای با جایگاه نامشخص بر روی ژنوم و نشانگرهای واقع بر روی کروموزوم های جنسی حذف شدند. کدگذاری ژنوتیپ ها به صورت افزایشی<sup>۲</sup> انجام شد. قبل از آنالیز همراهی نشانگرها و فنوتیپ تحت مطالعه، برای بررسی اثرات جنس، هج و والد نر، آنالیز اولیه ای با مدل رگرسیونی که شامل اثرات ثابت هج، جنس و والد نر بود انجام شد. نتایج این آنالیز نشان داد که جنس و هج اثرات معنی دار ( $P < 0.05$ ) و پدر اثر غیر معنی داری ( $P > 0.05$ ) 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. علی رغم عدم معنی داری اثر والد نر برای حصول اطمینان از کنترل اثرات ارب های 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).

<sup>1</sup> Illumina

<sup>2</sup> Additive

<sup>3</sup> Univariate

<sup>4</sup> Mixed linear regression

<sup>5</sup> Fixed linear regression

<sup>6</sup> Genomic Relationship Matrix (GRM)

<sup>7</sup> Hatch

<sup>8</sup> Multidimensional Scaling (MDS) analysis

<sup>9</sup> Linkage Disequilibrium (LD or  $r^2$ )

<sup>10</sup> Total genotype similarity or identity by state (IBS)

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

### نتایج و بحث

بعد از کنترل کیفیت داده‌ها تعداد 46702 نشانگر SNP و 278 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 به‌صورت سه بعدی نمایش داده شده‌است. 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 نداشته‌است. 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 شاهدهی 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 بوده‌است. 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 کم‌برآورد کرده‌است. (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). به‌نظر 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 منهن شکل ۳ نمایش داده شده‌است.

<sup>4</sup> Underestimate

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

به‌منظور تصحیح اثرات ناشی از چند آزمونی، نرخ کشف کاذب ۱۰ درصد در سطح ژنوم به‌عنوان 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:

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

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

(۳)

میانۀ مربع کای مشاهده شده

= نرخ تورم ژنومیک

میانۀ مربع کای پیش‌بینی شده

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

هم‌چنین به‌منظور شناسایی عملکرد بیولوژیک نواحی معنی‌دار از ژنوم که با فعالیت آنزیم لیزوزیم ارتباط دارند؛ آنالیز غنا ژن<sup>۳</sup> در پایگاه داده DAVID انجام شد (Dennis Jr et al. 2003). بدین منظور، ژن‌هایی که در ناحیه ۱ مگاباز پیرامون نشانگرهای معنی‌دار بودند با استفاده از بسته نرم‌افزاری BioMart زبان برنامه‌نویسی R (Durinck et al. 2005) از نسخه ۵ ژنوم مرغ در پایگاه داده Ensembl استخراج و جهت آنالیز غنا ژن در پایگاه داده DAVID

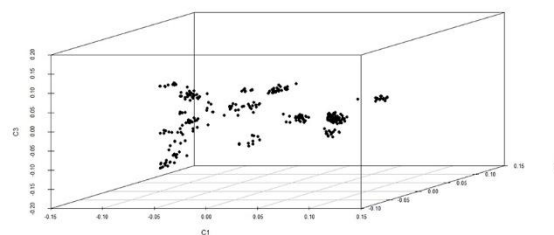
<sup>1</sup> Genomic inflation rate (lambda)

<sup>2</sup> Chi-square

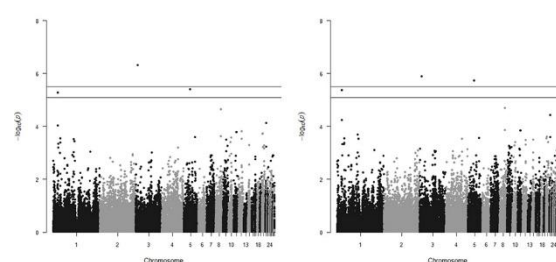
<sup>3</sup> Gene Enrichment Analysis

نقش دارد (Mishima et al. 2014) و مانع از فعال شدن NF- $\kappa$ B و سرکوب TNF  $\alpha$  و اینترلوکین ۶ می شود (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 بیورنز ریبوزوم سلول را کنترل می کند (Zhao et al. 2014). نشانگر rs16479594 در موقعیت 25218537 جفت باز بر روی کروموزوم ۵ درون ناحیه ایترونی ژن SPTBN5 واقع شده است. در مطالعات پیشین چندین QTL در این ناحیه از کروموزوم ۵ برای پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی گزارش شده است به طوری که برخی از این QTL ها با جایگاه نشانگر rs16479594 هم پوشانی 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 شده اند با نه مسیر بیوشیمیایی ارتباط معنی داری دارند ( $FDR < 0.1$ ). این مسیرهای بیولوژیک غالباً در متابولیسم لیپیدها و اسیدهای چرب نقش دارند و همگی ارتباطات شناخته شده ای با سیستم دفاعی بدن موجودات زنده دارند (جدول ۲). اسیدهای چرب به دلیل موقعیت قرارگیری و سازماندهی آنها درون لیپیدهای سلولی؛ به عنوان نگهبانان<sup>۱</sup> تنظیم سلول های ایمنی شناخته می شوند (Yaquob 2003). لیپیدهای اتری که پلاسمالوژن نیز نامیده می شوند به عنوان ترکیبات احیاء کننده (آنتی اکسیدان) نقش برجسته ای در عملکرد ایمنی ذاتی و حفاظت از پروتئین ها در برابر تنش های اکسیداتیو دارند (Bottelbergs et al. 2012; Watschinger and Werner 2013).

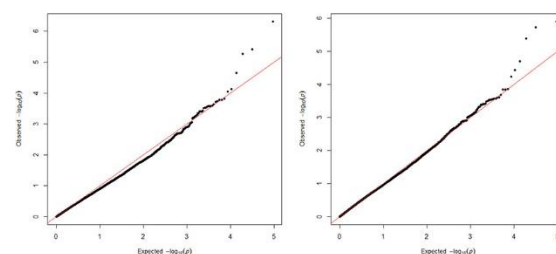
لینولنیک اسید پیش ساز آراشیدونیک اسید است و با تنظیم تولید ایکوزانوئید و سرکوب تولید لکوترین B4 موجب بهبود برخی از ناهنجاری های التهابی می شود (Kaku et al. 2001). مصرف لینولنیک زیاد اگر با کاهش مصرف سایر اسیدهای چرب غیراشباع



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



شکل ۲- نمودار منتهن مدل های مختلط (سمت راست) و ثابت شده (سمت چپ) برای فعالیت آنزیم لیزوزیم در مرغ. محور X موقعیت هر نشانگر بر روی کروموزوم های (به ترتیب از چپ به راست) ۱-۲۸، ۳۳ و گروه لینکازی LGE64 و محور Y لگاریتم مبنای ۱۰ ارزش های P است. خطوط افقی به ترتیب از بالا به پایین سطوح ۰/۰۵ و ۰/۱ FDR هستند.



شکل ۳- نمودارهای Q-Q مدل های مختلط (سمت راست) با لامبدا ۱/۰۱ و ثابت شده (سمت چپ) با لامبدا ۰/۸۸. محور X آماره های مبتنی بر توزیع نرمال و محور Y آماره های 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 معنی داری با فعالیت آنزیم لیزوزیم دارند ( $FDR < 0.1$ ). جزئیات این نشانگرها در جدول ۱ گزارش شده است. مطالعات پیشین جایگاه های متعددی که با موقعیت نشانگر rs15204127 بر روی کروموزوم ۱ هم پوشانی دارند و با عملکرد سیستم ایمنی در ارتباط هستند را شناسایی کرده اند (Siwek et al. 2003b). ژن *BRD1* در توسعه لنفوسیت های T

<sup>1</sup> Gatekeepers

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

و ریپوفلاوین همراه شود، منجر به تولید مقادیر زیادی از پروستوگلانندین E2 در بافت‌ها می‌شود. پروستوگلانندین E2 از تکثیر و تفرق سلول‌های Th1 و هم‌چنین تولید IL-1، IL-2، IFN 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 معنی‌دار با فعالیت آنزیم لیزوزیم (FDR ۰/۰۵).

| نشانگر      | کروموزوم | P مدل ثابت‌شده        | P مدل مختلط           | نردیکترین ژن/ موقعیت نسبت به ژن <sup>۱</sup> |
|-------------|----------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------------------|
| rs312924314 | ۳        | $4/86 \times 10^{-7}$ | $1/16 \times 10^{-6}$ | درون اینترون WDR43                           |
| rs16479594  | ۵        | $3/9 \times 10^{-6}$  | $1/8 \times 10^{-6}$  | درون اینترون SPTBN5                          |
| rs15204127  | ۱        | $5/3 \times 10^{-6}$  | $4/14 \times 10^{-6}$ | ۴۳۹ کیلوپاز بالادست BRD1                     |

<sup>۱</sup> جستجوی پایگاه داده بر اساس نسخه ۵ ژنوم مرغ می‌باشد.

جدول ۲- مسیرهای بیوشیمیایی مرتبط با ژن‌های کاندید پیرامون نشانگرهای معنی‌دار (FDR < ۰/۱).

| مسیر بیوشیمیایی <sup>۱</sup> | P                    | FDR                  | ژن‌های کاندید                                      |
|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------------------------|
| متابولیسم آلفا لینولئیک اسید | $2/2 \times 10^{-5}$ | $4/2 \times 10^{-4}$ |                                                    |
| متابولیسم لینولئیک اسید      | $3/1 \times 10^{-5}$ | $2/9 \times 10^{-4}$ | cytosolic phospholipase A2 epsilon-like(LOC428870) |
| متابولیسم لیپیدهای اتری      | $1 \times 10^{-4}$   | $6/4 \times 10^{-4}$ | phospholipase A2, group IVB (cytosolic)(PLA2G4B)   |
| متابولیسم آراشیدونیک اسید    | $1/6 \times 10^{-4}$ | $7/7 \times 10^{-4}$ | phospholipase A2, group IVE(PLA2G4E)               |
| مسیر سیگنالینگ VEGF          | $2/4 \times 10^{-4}$ | $9/4 \times 10^{-4}$ | phospholipase A2, group IVE-like(LOC771574)        |
| مسیر سیگنالینگ GnRH          | $5/8 \times 10^{-4}$ | $1/8 \times 10^{-3}$ |                                                    |
| متابولیسم گلیسر فسفولیپید    | $8/9 \times 10^{-4}$ | $2/4 \times 10^{-3}$ |                                                    |
| انقباض ماهیچه‌های صاف عروقی  | $1/3 \times 10^{-3}$ | $3/1 \times 10^{-3}$ |                                                    |
| مسیر سیگنالینگ MAPK          | $1/2 \times 10^{-2}$ | $2/3 \times 10^{-2}$ |                                                    |

<sup>۱</sup> 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 فنوتیپ این صفات دلایل محکمی برای عدم کارایی مناسب برنامه‌های اصلاح‌نژادی سنتی (بر اساس فنوتیپ) 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 فعال‌شدن ایمنی اکتسابی مشارکت دارد (Dong et al. 2002). مسیر سیگنالینگ VEGF فعالیت و توسعه سلول‌های دندریتی، لنفوسیت‌های T و ماکروفاژها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و موجب تحریک رشد تومورهای سرطانی می‌گردد (Ohm et al. 2003; Li et al. 2016). هورمون آزادکننده گونادوتروپین<sup>۱</sup> عملکرد ماکروفاژها را از طریق

<sup>۱</sup> Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)

## سپاسگزاری

از پروفسور یوست یونس از دانشگاه آرهوس دانمارک به جهت حمایت مالی برای ژنوتایپینگ پرندگان و از کنسرسیوم GWMAS به جهت در اختیار قرار دادن پانل ۶۰ هزارتایی نشانگر SNP صمیمانه 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 سرگلزایی از دانشگاه گونلف کانادا به جهت تمامی حمایت‌های علمی ایشان عمیقاً سپاسگزاریم. از دانشگاه تربیت مدرس به جهت حمایت‌های مالی و از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به جهت فراهم نمودن میکروارگانسیم مورد نیاز این پژوهش سپاسگزاریم.

## 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. *GigaSci* 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

نقش کروموزوم‌های ۳، ۵ و ۱ بویژه از طریق متابولیسم لیپید 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.

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, Kisseleva 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 Partridge-like 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 Science* 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, LaBonty M, Lattanzi V, Prabhudesai S, Zhou Y, Zon 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.