



تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۹

صفحه‌های ۱۹۹-۲۰۹

بررسی پروفایل ترنسکریپتوم بافت تخمدان در میش‌های نژاد شال با استفاده از داده‌های RNA-Seq

پروین شریعتی گزگزازه^۱، علی اکبر مسعودی^{۲*}، رسول واعظ ترشیزی^۲، علیرضا احسانی^۳، زینب موسویان^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴. استادیار، گروه علوم کامپیوتر، دانشکده ریاضی، آمار و علوم کامپیوتر، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۸/۰۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۲۳

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی پروفایل بیان ژن در بافت تخمدان گوسفندان شال با استفاده از داده‌های توالی‌یابی RNA بود. برای این منظور، تخمدان‌های پنج رأس گوسفند شال بعد از هم‌زمان‌سازی فحلی جداسازی و RNA آن‌ها با استفاده از فناوری Illumina Hiseq 4000 توالی‌یابی شد. به‌طور میانگین، داده‌های به‌دست‌آمده از توالی‌یابی شامل ۲۶۶۳۸۳۱۱ جفت خوانش با نرخ نقشه‌یابی منحصربه‌فرد ۸۱/۰۸ بود. نتایج حاصل از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، بیان ۲۱۰۸۵ ژن را در بافت تخمدان گوسفندان شال نشان داد که از این تعداد ۱۵۰۸۷ ژن دارای میانگین بیان بالاتر از ۱۰ بودند. تجزیه و تحلیل عملکردی ژن‌ها، معنی‌داری (P<۰/۰۵) عبارت GO شامل ۱۶۲ عبارت GO شامل ۴۱ فرآیند بیولوژیکی، ۴۶ عملکرد مولکولی و ۷۵ جزء سلولی را نشان داد. همچنین آنالیز مسیرهای KEGG، ۱۴۹ مسیر معنی‌دار (P<۰/۰۵) را شناسایی کرد که مهم‌ترین آن‌ها مسیر پیام‌رسانی استروژن، مسیر پیام‌رسانی TGF-beta و تقسیم میوز اووسیت بود. بررسی بیان ژن‌های عمده برای دوقلوژیایی و تولیدمثل، بیان بالایی برای ژن‌های INHA، INHBA و BMP1B را نشان داد و ژن INHA، یک فاکتور پاراکرین مهم در فولیکول‌های تخمدان، جزء ۱۰ ژن با بالاترین میانگین بیان بود. همچنین ژن‌های FSHR، ESR1 و ESR2 بیان متوسط و ژن‌های GDF9، BMP15 و PRLR بیان پایینی در نمونه‌ها نشان دادند. در این مطالعه برای اولین بار ترنسکریپتوم بافت تخمدان میش‌های شال با استفاده از فناوری RNA-Seq به‌طور جامع بررسی شد و این مطالعه می‌تواند پایه ژنتیکی مفیدی برای شناخت بهتر ژن‌ها و فرآیندهای درگیر در تولیدمثل گوسفندان شال فراهم کند.

کلیدواژه‌ها: آنالیز بیوانفورماتیکی، تولیدمثل، دوقلوژیایی، ژن‌های عمده، نرخ تخم‌کریزی.

Analysis of ovarian tissue transcriptome profile in Shal ewes using RNA-Seq data

Parvin Shariati Gazgazareh¹, Aliakbar Masoudi^{2*}, Rasoul Vaez Torshizi², Alireza Ehsani³, Zaynab Mousavian⁴

1. Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Computer Science, School of Mathematics, Statistics, and Computer Science, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

Received: October 28, 2019

Accepted: December 14, 2019

Abstract

The aim of this study was the investigation of gene expression profile in Shal sheep ovarian tissue using RNA sequencing data. For this purpose, the ovaries of five Shal sheep were isolated after estrous synchronization and their RNA was sequenced using Illumina Hiseq 4000 technology. On average, the data obtained from the sequencing consisted of 26638311 read pairs with 81.08 unique mapping rate. The results of bioinformatic analyzes revealed the expression of 21085 genes in Shal sheep ovarian tissue, of which 15078 genes had expression mean above 10. Gene ontology analysis revealed the significant enrichment of 162 GO terms including 41 biological processes, 46 molecular functions and 75 cellular components. KEGG pathway analysis also identified 149 significant pathways (P < 0.05), most important of which were estrogen signaling pathway, TGF-beta signaling pathway and oocyte meiosis. Investigating the expression of major genes for twinning and reproduction, showed a high expression for INHA, INHBA and BMP1B, so that INHA, an important paracrine factor in ovarian follicles, was one of the 10 genes with the highest expression. Also, FSHR, ESR1 and ESR2 showed medium expression and GDF9, BMP15 and PRLR showed low expression in the samples. For the first time, in this study the ovarian tissue transcriptome of Shal ewes was comprehensively studied using RNA-Seq technology and this study can provide a useful genetic basis for a better understanding of the genes and processes involved in the Shal sheep reproduction.

Keywords: Bioinformatics analysis, Major genes, Ovulation rate, Reproduction, Twinning.

مقدمه

معمول تا زمان بلوغ بیان نمی‌شوند، از طرف دیگر این صفات تنها در جنس ماده رکوردگیری می‌شوند. مطالعات ژنتیکی در گوسفند نشان داده‌اند که نرخ تخم‌ریزی و چندقلوزایی می‌تواند توسط فعالیت ژن‌های منفردی با اثرات بزرگ به نام ژن‌های باروری (Fec) تنظیم شوند. مهم‌ترین ژن‌های باروری شناسایی شده در گوسفند سه ژن BMP15 و GDF9، BMPR1B متعلق به مسیر TGF- β هستند. هم‌چنین اخیراً ژن B4GALNT2 به‌عنوان یک تنظیم‌کننده نرخ تخم‌ریزی در گوسفند شناسایی شده است [۱۱ و ۱۷].

مطالعات مولکولی زیادی بر روی ژن‌های مؤثر بر دوقلوزایی در گوسفندان شال انجام شده است. بیان ژن‌های NOBOX، OVOL1 و BMPR1B در گوسفندان شال چندقلوزا معنی‌دار گزارش شده است [۱۸]. بررسی بیش‌تر جهش‌های مؤثر بر چندقلوزایی که در نژادهای دیگر شناسایی شده‌اند، تنوعی را در گوسفندان شال، به‌جز یک مورد، نشان نداده‌اند [۳، ۴ و ۶]. بنابراین ژن‌های عمده تأثیرگذار بر صفت دوقلوزایی در گوسفندان شال نامشخص هستند و شناسایی این ژن‌ها نیازمند آنالیز جامع ژن‌های بیان‌شده در بافت تخمدان این نژاد است.

بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چند بعدی می‌باشد. تنها مجموعه نسبتاً کوچکی از کل ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. هم‌چنین مقدار محصولات ژن ساخته شده در همان بافت و نیز در سایر بافت‌های سازنده آن محصول، سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود [۱۵]. یکی از اقدام‌های اساسی در حیوانات اهلی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آن‌ها در سطح سلولی یا کروموزومی است [۸]. ظهور فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید با فراهم کردن آنالیز RNA از طریق

گوسفند یکی از گونه‌های دام‌های اهلی با تنوع بالاست که برای تولید گوشت، شیر، پوست و الیاف پرورش داده می‌شود [۱۳]. گوشت گوسفند منبع مهمی از پروتئین و عناصر مغذی مانند آهن، سلنیوم و ویتامین‌های A، B3، B12 و فولیک اسید می‌باشد، بنابراین نقش مهمی در تغذیه انسان دارد [۱]. بالغ بر ۲۶ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده‌اند. در حال حاضر، تولید گوشت مهم‌ترین دلیل پرورش گوسفند در ایران است و تولیدات دیگر مانند پشم، شیر و پوست در درجات بعدی اهمیت قرار دارند [۹، ۱۶ و ۲۵]. در بین نژادهای ایرانی گوسفند شال دارای بالاترین نرخ رشد است و افزایش وزن روزانه ۲۵۰ گرم برای این نژاد ثبت شده است. هم‌چنین نژاد شال بالاترین نرخ دوقلوزایی را در بین نژادهای گوسفند ایرانی داراست [۳].

بهبود صفات تولیدمثلی در گونه‌های دام‌های اهلی و به‌ویژه در گوسفند، بسیار مورد توجه است چون افزایش جزئی در چندقلوزایی افزایش قابل توجهی در سودآوری ایجاد می‌کند [۴]. از این‌رو، صفات نرخ تخم‌ریزی و چندقلوزایی دارای ارزش اقتصادی بالایی در صنعت پرورش گوسفند هستند و حفظ نرخ بالای تخم‌ریزی و سطوح مناسب باروری برای تولید گوسفند ضروری است [۲۰]. باروری صفتی پیچیده است و شناسایی ژن‌های نامزد مرتبط با این صفت با استفاده از روش‌های مولکولی معمول دشوار است چون این صفت تحت تأثیر ژن‌ها، سن، فصل و تغذیه می‌باشد و در این بین، ژنتیک مهم‌ترین عامل است [۱۲]. بهبود ژنتیکی صفات مرتبط با تولیدمثل از جمله نرخ تخم‌ریزی و چندقلوزایی در گوسفند چالش‌برانگیز است، چون این صفات دارای وراثت‌پذیری پایینی هستند (میانگین وراثت‌پذیری برآوردشده در مطالعات مختلف برای چندقلوزایی مشابه و حدود ۰/۱۱ است) و به‌طور

تولیدات دامی

بررسی پروفایل ترنسکرپتوم بافت تخمدان در میش‌های نژاد شال با استفاده از داده‌های RNA-Seq

Gonadotropin) تزریق شد [۵]. حدود ۲۷ ساعت بعد از تزریق هورمون PMSG، گوسفندان کشتار شدند و بافت تخمدان آن‌ها با استفاده از نیتروژن مایع جهت استخراج RNA به آزمایشگاه منتقل شد. استخراج RNA با استفاده از کیت GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد و NanoDrop انجام شد.

توالی‌یابی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از فناوری Illumina Hiseq 4000 و توسط شرکت BGI (چین، پکن) انجام گرفت. جهت جلوگیری از توالی‌یابی RNAهای ریبوزومی، mRNAها براساس دم پلی A انتخاب شدند. در این پژوهش توالی‌یابی به روش استاندارد و کتابخانه‌های paired-end با طول خوانش ۱۵۰ جفت باز مورد استفاده قرار گرفت.

کنترل کیفیت خوانش‌های خام توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار fastQC (نسخه 0.11.5) انجام شد. ژنوم مرجع و مدل‌های ژنی برای گوسفند از پایگاه Ensembl دانلود شد. نقشه‌یابی خوانش‌های توالی‌یابی با ژنوم مرجع گوسفند (نسخه Oar_v3.1) با استفاده از نرم‌افزار STAR (نسخه 2.5.4a) انجام شد. تنها خوانش‌های با نقشه‌یابی منحصربه‌فرد برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. تعیین کمیت خوانش‌ها با استفاده از ابزار feature counts (نسخه 1.6.0) انجام شد. روش نرم‌سازي مورد استفاده در این پژوهش، روش نسبت میانه مربوط به نرم‌افزار R (پکیج DESeq2) بود. برای شناسایی مقادیر بیان ژن‌ها از پکیج DESeq2 نرم‌افزار R (نسخه 1.18.1) استفاده شد. در نهایت، حاشیه‌نویسی عملکردی شامل حاشیه‌نویسی عملکردی GO (Gene Ontology) و حاشیه‌نویسی مسیر KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) انجام شد. غنی‌سازی معنی‌دار

توالی‌یابی cDNA در مقیاس وسیع، انقلابی در مطالعات ترنسکرپتوم ایجاد کرده است. ترنسکرپتوم مجموعه کامل رونوشت‌ها در یک سلول و مقدار آن‌ها برای یک مرحله خاص نمو یا شرایط فیزیولوژیکی خاص است. شناخت ترنسکرپتوم برای تفسیر عناصر عملکردی ژنوم و مشخص نمودن ترکیبات مولکولی سلول‌ها و بافت‌ها ضروری است [۲۳]. تعیین ساختار بیان ژن در تخمدان گوسفند، به‌عنوان یک اندام مهم در باروری این گونه، جهت شناسایی و استفاده از ژن‌های عمده تولیدمثل در گوسفند مفید خواهد بود. بنابراین، هدف این مطالعه بررسی ترنسکرپتوم بافت تخمدان گوسفندان شال با استفاده از داده‌های RNA-Seq به منظور آشکار نمودن وضعیت بیان ژن‌های مؤثر در چندقلوایی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل بافت تخمدان پنج رأس گوسفند شال دوقلوها بود. گوسفندان مورد استفاده در این مطالعه از ایستگاه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین براساس اطلاعات شجره‌ای تیپ تولد انتخاب و خریداری شدند. گوسفندانی که خود چندقلوها بوده و براساس اطلاعات شجره تا سه نسل قبل چندقلوها بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. همه گوسفندان تحت محیط یکسان با دسترسی آزاد به آب و غذا در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس پرورش داده شدند. ابتدا از آبستن نبودن گوسفندان اطمینان حاصل شد، سپس هم‌زمان‌سازی فعلی با روش سیدرگذاری انجام شد. روز اول سیدر در رحم گوسفندان جایگذاری و در روز سوم به هر کدام از آن‌ها دو سی‌سی پروستاگلندین (دی-کلوپروستونول) تزریق شد. در روز سیزدهم سیدرها از رحم گوسفندان برداشته شد و به هر یک از آن‌ها ۵۰۰ واحد هورمون PMSG (Pregnant Mare Serum)

تولیدات دامی

میانگین شامل ۲۶۶۳۸۳۱۱ جفت خوانش بود که به خوبی با ژنوم مرجع نقشه‌یابی شدند. نرخ نقشه‌یابی منحصر به فرد برای این داده‌ها بین ۷۸/۵۸-۸۷/۶۱ درصد و اندازه پوشش ژنوم بین ۲/۶۵-۳/۵۴ بود. در جدول (۲) خلاصه‌ای از داده‌های توالی‌یابی و نقشه‌یابی آن‌ها با ژنوم مرجع آورده شده است.

جدول ۱. غلظت و RIN نمونه‌های RNA مورد مطالعه

RIN	غلظت (نانوگرم بر میکرولیتر)	شماره میش
۸	۲۲۰	۱
۸/۴	۲۵۵	۲
۷/۸	۱۴۲	۳
۸/۶	۱۶۲	۴
۷/۹	۲۱۳	۵

نتایج حاصل از نقشه‌یابی با ژنوم مرجع با استفاده از مدل ژنی GTF خلاصه‌سازی شد و برای بررسی بیان ژن‌ها پکیج DESeq2 مورد استفاده قرار گرفت. ژنوم مرجع گوسفند شامل ۲۷۰۵۴ ژن حاشیه‌نویسی شده است و از این تعداد ۲۱۰۸۵ ژن (یعنی ۷۷/۹۴ درصد) در بافت تخمدان این گوسفندان شال بیان شده بودند. برای بررسی دقیق ساختار بیان ژن‌های بافت تخمدان گوسفندان شال محدودیت میانگین بیان بیش‌تر از ۱۰ در نظر گرفته شد که با اعمال این محدودیت ۱۵۰۸۷ ژن در این نمونه‌ها بیان شده بودند.

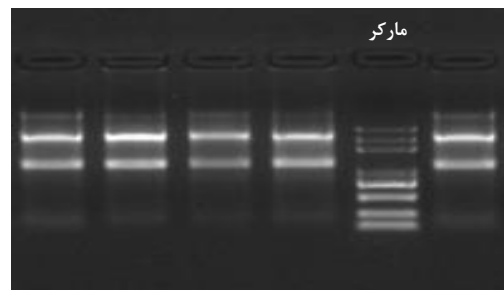
جدول ۲. خلاصه‌ای از داده‌های توالی‌یابی و نقشه‌یابی آن‌ها با ژنوم مرجع در نمونه‌های مورد مطالعه

شماره میش	۱	۲	۳	۴	۵
تعداد کل جفت خوانش‌های ورودی	۲۵۸۷۳۹۲۸	۲۴۴۴۲۳۵۷	۲۹۸۷۲۶۵۳	۲۴۲۲۶۲۶۵	۲۸۱۷۶۳۵۳
تعداد جفت خوانش‌های نقشه‌یابی شده با یک ناحیه ژنوم	۲۲۶۶۹۷۷۷	۱۹۳۵۱۷۶۹	۲۳۴۷۴۰۶۹	۱۹۰۹۸۷۴۷	۲۳۳۶۵۱۹۴
درصد جفت خوانش‌های نقشه‌یابی شده با یک ناحیه ژنوم	۸۷/۶۱	۷۹/۱۷	۷۸/۵۸	۷۸/۸۳	۸۱/۱۹
تعداد جفت خوانش‌های نقشه‌یابی شده با چند ناحیه ژنوم	۱۸۱۲۶۵۶	۱۱۱۷۲۲۳	۱۲۷۴۴۱۸	۹۹۲۶۲۹	۱۱۷۷۹۳۲
درصد جفت خوانش‌های نقشه‌یابی شده با چند ناحیه ژنوم	۷/۲۷	۴/۵۷	۴/۲۷	۴/۱۰	۴/۱۰

($P < 0.05$) عبارت GO (شامل فرآیندهای بیولوژیکی، عملکردهای مولکولی و اجزای سلولی) و مسیرهای KEGG با استفاده از پایگاه DAVID (نسخه 6.8) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از بررسی کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA، کیفیت مطلوب آن‌ها جهت استفاده در توالی‌یابی RNA را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱. کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد

همچنین، غلظت نمونه‌های RNA استخراج شده بین ۱۴۲ تا ۲۵۵ نانوگرم بر میکرولیتر و (RIN (RNA integrity number) آن‌ها بین ۷/۸ تا ۸/۶ بود (جدول ۱).

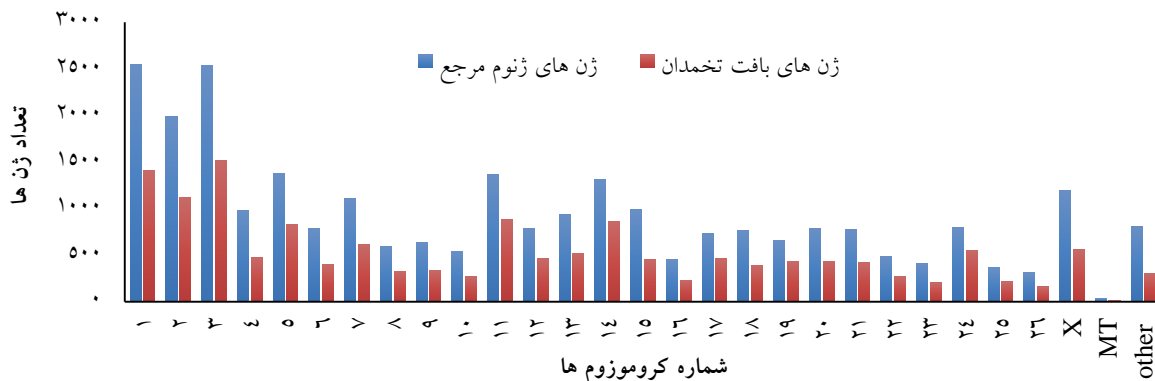
نتایج حاصل از کنترل کیفیت داده‌های خام توالی‌یابی کیفیت مطلوب همه نمونه‌ها را جهت انجام آنالیزهای بعدی نشان داد. داده‌های ورودی برای نقشه‌یابی به‌طور

بررسی پروفایل ترنسکرپتوم بافت تخمدان در میش‌های نژاد شال با استفاده از داده‌های RNA-Seq

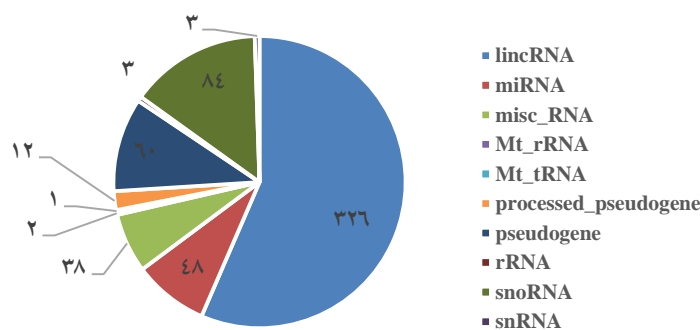
ژن‌های کدکننده ژنوم میتوکندریایی در این مطالعه مربوط به ژن CYTB بود.

انواع مختلفی از ژن‌ها در بافت تخمدان گوسفندان شال مشاهده شد، به‌صورتی‌که ۱۴۵۱۰ ژن بیان‌شده در این بافت کدکننده پروتئین و ۵۷۷ ژن RNAهای غیرکدکننده بودند. در بین RNAهای غیرکدکننده، RNAهای طویل غیرکدکننده بیش‌ترین فراوانی را نسبت به گروه‌های دیگر داشت، بنابراین بررسی این گروه از RNAهای غیرکدکننده می‌تواند به شناسایی ژن‌ها و مسیرهای درگیر در چندقلوزایی گوسفندان شال کمک کند. شکل (۳) مقایسه فراوانی تیپ‌های بیولوژیکی مختلف ژن‌های غیرکدکننده بافت تخمدان گوسفندان شال را نشان می‌دهد.

توزیع ژن‌های بیان‌شده در بافت تخمدان گوسفندان شال روی کروموزوم‌ها و مقایسه آن‌ها با ژن‌های حاشیه‌نویسی‌شده برای ژنوم مرجع در شکل (۲) نشان داده شده است. بیش‌ترین تعداد ژن‌های شناسایی‌شده در بافت تخمدان گوسفندان شال، به‌ترتیب روی کروموزوم‌های سه (۱۰/۰۲ درصد)، یک (۹/۳۴ درصد) و دو (۷/۳۹ درصد) قرار داشتند، درحالی‌که بیش‌ترین تعداد ژن‌های ژنوم مرجع گوسفند به‌ترتیب روی کروموزوم‌های یک (۹/۴۲ درصد)، سه (۹/۳۶ درصد) و دو (۷/۳۵ درصد) بودند. هم‌چنین داده‌های بیان ژن در گوسفندان شال، بیان ۱۶ ژن میتوکندریایی را نشان داد که به ۱۳ ژن کدکننده و سه ژن غیر کدکننده ژنوم میتوکندریایی تعلق داشتند. بیش‌ترین میانگین بیان



شکل ۲. توزیع کروموزومی ژن‌های بیان‌شده در بافت تخمدان گوسفندان شال



شکل ۳. تیپ بیولوژیکی ژن‌های غیرکدکننده بیان‌شده در بافت تخمدان گوسفندان شال

تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۹

۲۰۳

و اجزای سلولی با بیشترین تعداد ژن در جدول (۳) نشان داده شده است.

از فرآیندهای بیولوژیکی مهم مرتبط با تولیدمثل که در این مطالعه معنی‌دار بودند، می‌توان به proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic transforming growth factor beta receptor process، signaling pathway و negative regulation of TOR اشاره کرد. کمپلکس یوبی کویتین- پروتازوم نقش مهمی در از سرگیری تقسیم میوز اووسیت، تکمیل تقسیم میوز اول و هم‌چنین نفوذ اسپرم در طول لقاح ایفا می‌کند [۲۲]. هم‌چنین اعضای خانواده $TGF-\beta$ نقش مهمی در رشد و توسعه فولیکول‌ها ایفا می‌کنند [۱۰]. مسیر mTOR نیز در شرایط *in vivo* در فولیکول تخمدان یک تنظیم‌کننده مثبت رشد و توسعه فولیکول است [۲۴]. اجزای سلولی میتوکندری، دستگاه گلژی و شبکه آندوپلاسمی ارتباط تنگاتنگی با فرآیندهای تولیدمثلی دارند. میتوکندری اندامک عمده تأمین‌کننده انرژی است که در اووسیت‌ها ATP را برای لقاح و توسعه جنینی پیش از لانه‌گزینی فراهم می‌کند. علاوه بر این، میتوکندری هموستازی یون کلسیم داخل سلولی را که برای بلوغ اووسیت و لقاح ضروری است، تنظیم می‌کند [۱۴]. برای بلوغ موفق و توسعه بعدی اووسیت، اندامک‌های سلولی در سیتوپلاسم اووسیت‌ها در طول بلوغ تحت تأثیر تغییرات فیزیولوژیکی قرار می‌گیرند و دستگاه گلژی و شبکه آندوپلاسمی ارتباط نزدیکی با بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی اووسیت دارند [۷].

نتیجه آنالیز مسیرهای KEGG مرتبط با ژن‌های بیان‌شده در بافت تخمدان گوسفندان شال شامل ۱۴۹ مسیر معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. در جدول ۴ مسیرهایی با بیشترین تعداد ژن مرتبط با داده‌های بیان، آورده شده است.

در بافت تخمدان میش‌های شال، بیشترین بیان متعلق به ژن‌های COL1A1، COL1A2، EEF1A1، JNHA، COL3A1، RPLP0، ENSOARG00000016963، FLNA، SERPINE2 و MYH11 بود و این ژن‌ها در مجموع ۶/۸ درصد کل خوانش‌های نقشه‌یابی شده منحصر به فرد را شامل می‌شدند. ژن INHA به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی سنتز FSH هیپوفیز یا یک فاکتور پاراکرین داخل فولیکول‌های تخمدان در تنظیم عملکرد تخمدان نقش دارد [۲۱]. در مطالعه‌ای با هدف بررسی ترنسکرپتوم بافت تخمدان گوسفندان Finnsheep مشخص شد که ژن‌های COL1A1، COL1A2، JNHA، COL3A1 و SERPINE2 جزو ژن‌های با بالاترین میانگین در این بافت بودند [۱۹]. درحالی‌که مطالعه انجام‌شده توسط Pokharel و همکاران نشان داد که بالاترین میانگین بیان در سه گروه گوسفندان Finnsheep، Texel و آمیخته‌های نسل F1 آن‌ها متعلق به نه ژن کدکننده ژنوم میتوکندریایی بود [۲۰].

در پایگاه DAVID، از ۱۵۰۸۷ ژن بیان‌شده در بافت تخمدان گوسفندان شال تنها اطلاعات مربوط به ۱۱۳۶۷ ژن شناسایی شد، بنابراین تجزیه و تحلیل عملکردی ژن‌ها و مسیر با استفاده از این تعداد ژن انجام شد. نتایج حاصل از این آنالیز معنی‌داری ($P < 0.05$) عبارت GO را در سه گروه فرآیندهای بیولوژیکی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی نشان داد که شامل ۴۱ فرآیند بیولوژیکی، ۴۶ عملکرد مولکولی و ۷۵ جزء سلولی بود. بیشترین تعداد ژن در گروه فرآیند بیولوژیکی (۱۴۹ ژن) با GO:0008285~negative regulation of cell proliferation، در گروه عملکرد مولکولی (۹۳۷ ژن) با GO:0005524~ATP binding و در گروه جزء سلولی (۱۵۱۲ ژن) با GO:0070062~extracellular exosome مرتبط بود. فرآیندهای بیولوژیکی، عملکردهای مولکولی

تولیدات دامی

بررسی پروفایل ترنسکرپتوم بافت تخمدان در میش‌های نژاد شال با استفاده از داده‌های RNA-Seq

جدول ۳. ده عبارت با بالاترین تعداد ژن در سه گروه اصلی فرآیند بیولوژیکی، عملکرد مولکولی و جزء سلولی برای داده‌های بیان مطالعه حاضر

تعداد ژن	ترم
فرآیند بیولوژیکی	
۱۴۹	GO:0008285~negative regulation of cell proliferation
۱۱۹	GO:0006886~intracellular protein transport
۱۰۲	GO:0046777~protein autophosphorylation
۹۰	GO:0043123~positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling
۸۲	GO:0043065~positive regulation of apoptotic process
۸۰	GO:0006511~ubiquitin-dependent protein catabolic process
۷۸	GO:0007507~heart development
۷۶	GO:0030335~positive regulation of cell migration
۶۹	GO:0051092~positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity
۶۸	GO:0006457~protein folding
عملکرد مولکولی	
۹۳۷	GO:0005524~ATP binding
۶۷۶	GO:0044822~poly(A) RNA binding
۶۶۶	GO:0008270~zinc ion binding
۵۶۶	GO:0046872~metal ion binding
۳۷۷	GO:0003676~nucleic acid binding
۲۲۳	GO:0005525~GTP binding
۲۱۱	GO:0000166~nucleotide binding
۱۸۶	GO:0003682~chromatin binding
۱۶۰	GO:0004674~protein serine/threonine kinase activity
۱۱۷	GO:0000287~magnesium ion binding
جزء سلولی	
۱۵۱۲	GO:0070062~extracellular exosome
۱۴۸۷	GO:0005737~cytoplasm
۱۲۲۳	GO:0005634~nucleus
۹۷۷	GO:0005654~nucleoplasm
۶۲۵	GO:0005739~mitochondrion
۶۱۱	GO:0016020~membrane
۵۵۱	GO:0005829~cytosol
۴۰۸	GO:0005730~nucleolus
۳۵۸	GO:0005794~Golgi apparatus
۲۸۸	GO:0005783~endoplasmic reticulum

جدول ۴. ۱۰ مسیر KEGG با بالاترین تعداد ژن برای

داده‌های بیان ژن مطالعه حاضر

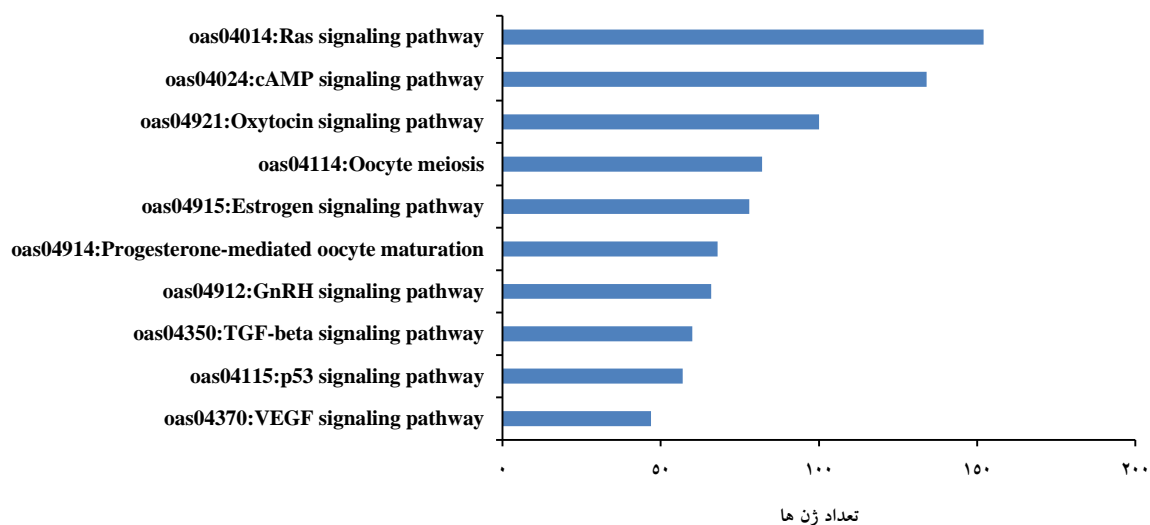
تعداد ژن	مسیر KEGG
۸۴۶	oas01100:Metabolic pathways
۲۷۹	oas05200:Pathways in cancer
۲۳۱	oas04151:PI3K-Akt signaling pathway
۱۹۰	oas04144:Endocytosis
۱۸۳	oas05166:HTLV-I infection
۱۷۵	oas04010:MAPK signaling pathway
۱۶۲	oas01130:Biosynthesis of antibiotics
۱۶۲	oas04510:Focal adhesion
۱۵۲	oas04014:Ras signaling pathway
۱۵۱	oas05205:Proteoglycans in cancer

با متابولیسم، ۱۹ مسیر با انتقال پیام و ۱۳ مسیر با سیستم اندوکرین ارتباط داشتند. مطالعه ژن‌های بیان شده در بافت تخمدان گوسفندان نژاد Finnsheep نیز نشان داد که این ژن‌ها به‌طور عمده در مسیرهای متابولیسم از جمله متابولیسم پورین، پیریمیدین و اسیدهای آمینه درگیر هستند [۱۹].

در بین مسیرهای KEGG مرتبط با ژن‌های بیان شده در بافت تخمدان گوسفندان شال، تعدادی از مسیرها ارتباط نزدیکی با فرآیندهای تولیدمثلی و باروری داشتند که از جمله آن‌ها می‌توان به مسیرهای پیام‌رسانی TGF-beta، GnRH، استروژن و سایر موارد اشاره کرد. مهم‌ترین مسیرهای معنی‌دار مرتبط با فرآیندهای تولیدمثلی در شکل (۴) نشان داده شده است.

در ادامه وضعیت بیان ژن‌های عمده تأثیرگذار بر دوقلوژی و باروری در این داده‌ها بررسی شد. از مهم‌ترین ژن‌های عمده تأثیرگذار بر این صفات می‌توان به ژن‌های FSHR، INHBA، INHA، BMPR1B، BMP15، GDF9، PRLR، ESR1، ESR2 و B4GALNT2 اشاره کرد.

در بین مسیرهای KEGG معنی‌دار، مسیرهای متابولیکی بیش‌ترین تعداد ژن (۸۴۶ ژن) را به‌خود اختصاص داده بود. نتایج مطالعات نشان داده‌اند که کیفیت و شایستگی توسعه‌ای اووسیت ارتباط نزدیکی با نرخ متابولیسم اووسیت و سلول‌های کومولوس احاطه‌کننده آن دارد [۲]. بررسی مسیرهای KEGG نشان داد که ۲۳ مسیر



شکل ۴. مهم‌ترین مسیرهای KEGG مرتبط با صفات تولیدمثلی و دوقلوژی در گوسفند

بررسی پروفایل ترنسکرپتوم بافت تخمدان در میش‌های نژاد شال با استفاده از داده‌های RNA-Seq

اعضای این خانواده را می‌توان به سه گروه لیگاندها، گیرنده‌ها و مولکول‌های پیام‌رسان پایین دست SMAD گروه‌بندی کرد [۱۰]. داده‌های بیان ژن به‌دست‌آمده در این مطالعه بیان لیگاندهای BMP1، BMP2، BMP4، BMP7، BMP8B، GDF5، GDF9، GDF10، GDF11، AMH، TGFβ1، TGFβ2 و TGFβ3 و گیرنده‌های BMPR1A، BMPR1B، BMPR2، BMPR1B، JNHA، JNHBA، ACVR1B، ACVR2A، ACVR2B، AMHR2، TGFβR1 و TGFβR3 را نشان داد. همچنین SMADs 1-9 نیز در بافت تخمدان گوسفندان شال بیان شده بودند. از جمله ژن‌های اختصاصی اووسیت که در بافت تخمدان این گوسفندان شال بیان شده بود، می‌توان به GDF9، ZP2، ZP3 و ZP4 اشاره کرد. از دیگر ژن‌های بیان شده در این بافت می‌توان به ژن‌های LEPR، VEGFA، KITLG، CALR، JFRD1، HSF1 و APC2 اشاره کرد که در مراحل مختلف تولیدمثل میش درگیرند.

در این مطالعه برای اولین بار ترنسکرپتوم بافت تخمدان میش‌های شال، یکی از نژادهای ارزشمند بومی ایران از نظر دوقلوژی و باروری، به‌طور جامع بررسی شد. داده‌های حاصل از این مطالعه نشان دادند که تعداد زیادی ژن در بافت تخمدان میش‌های شال بیان می‌شوند و این مطالعه پایه ژنتیکی مفیدی را فراهم می‌کند که ممکن است به شناخت بهتر ژن‌ها و فرآیندهای درگیر در تولیدمثل گوسفندان شال کمک کند. همچنین این مطالعه بیان اکثر ژن‌های عمده مرتبط با دوقلوژی و باروری را در تخمدان میش‌های شال نشان داد که این موضوع یافته‌های قبلی مرتبط با این صفات را بیش‌تر تأیید می‌کند و زمینه مطالعات بیش‌تر در رابطه با دوقلوژی و باروری را فراهم می‌کند. یافته‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان می‌دهند که تخمدان را می‌توان به‌عنوان یک بافت کاندید بسیار خوب برای مطالعات ژنومیک تولیدمثل با استفاده از

جدول ۵. مقادیر بیان ژن‌های عمده دوقلوژی و باروری (مقادیر بیان، میانگین بیان تصحیح‌شده بر اساس فاکتور

اندازه نمونه می‌باشد)

ژن	شماره میش				
	۱	۲	۳	۴	۵
<i>GDF9</i>	۵۷/۵۴	۵۶/۸۹	۳۰/۲۹	۵۰/۶۳	۵۴/۸۷
<i>BMP15</i>	۱۹/۱۸	۵/۴۷	۵/۵۱	۱۸/۳۱	۳/۸۵
<i>BMPR1B</i>	۱۷۲۲/۴۲	۱۷۰۷/۹۶	۱۱۶۶/۷۰	۱۲۷۰/۱۲	۱۹۴۷/۴۴
<i>INHA</i>	۶۲۶۷/۲۸	۳۱۳۵۷/۱۹	۱۶۳۸۸۶/۵۷	۱۰۱۱۱۵/۱۶۳	۳۲۴۹۴۹/۴۴
<i>INHBA</i>	۹۸۳/۹۷	۱۴۸۴۶/۴۹	۲۹۸۸/۸۲	۴۴۳۴۱/۱۰	۱۶۶۶۶۴/۶۶
<i>FSHR</i>	۴۹۳/۹۰	۳۹۴/۹۹	۸۷/۲۰	۵۲۴/۶۴	۱۵۱۵/۲۱
<i>PRLR</i>	۷/۶۷	۲۹/۵۴	۱/۸۳	۲/۱۵	۷/۷۰
<i>ESR1</i>	۶۲۱/۴۵	۶۶۴/۱۵	۷۶۳/۷۳	۳۸۲/۴۴	۵۰۸/۲۸
<i>ESR2</i>	۱۰۸/۳۷	۹۸/۴۷	۴۵/۹۰	۶۱/۴۰	۳۲۶/۳۴
<i>B4GALNT2</i>	۰	۰	۰	۱/۰۸	۰/۹۶

ژن‌های *INHA*، *INHBA* و *BMPR1B* بیان بالا و ژن‌های *BMP15* و *PRLR* بیان پایینی داشتند (جدول ۵). ژن *B4GALNT2* به‌عنوان یکی از ژن‌های عمده مرتبط با نرخ تخم‌ریزی، تقریباً هیچ بیانی را در بافت تخمدان گوسفندان شال نشان نداد. داده‌های بیان ژن بافت تخمدان گوسفندان نژاد Finnsheep نشان داد که ژن‌های *INHA* و *INHBA* بیان بالا، ژن‌های *BMPR1B*، *FSHR1* و *ESR1* بیان متوسط و ژن‌های *GDF9*، *BMP15*، *ESR2* و *PRLR* بیان پایینی دارند. همچنین در بافت تخمدان گوسفندان Finnsheep نیز، که جزء نژادهای با توان چندقلوژی بالا هست، ژن *B4GALNT2* بیان نمی‌شود [۱۹]. نتایج حاصل از این مقایسه‌ها نشان می‌دهند که بافت تخمدان گوسفندان نژادهای شال و Finnsheep دارای وضعیت بیان ژن مشابهی هستند، بنابراین به‌نظر می‌رسد استفاده از برنامه‌های اصلاح نژادی و مدیریتی می‌تواند منجر به بهبود بازده تولیدمثل نژاد شال شود. در پستانداران اعضای خانواده بزرگ TGF-β دارای نقش‌های کلیدی در تنظیم رشد و توسعه فولیکول هستند.

تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۹

- of porcine oocytes and stimulates expression of ER/Golgi transport proteins. *Development and Reproduction*, 21(2): 131-138.
8. Jafari-Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh-Koshkoieh A and Riahi-Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani sheep using real time qPCR. *Journal of Ruminant Research*, 4(4): 119-132 (in Persian).
 9. Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh-Koshkoieh A, Moradi-Shahrehabak H, Bordbar F and Ansari-Namin S (2016) Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(2): 281-289.
 10. Kristensen SG, Andersen K, Clement CA, Franks S, Hardy K and Andersen CY (2014) Expression of TGF-beta superfamily growth factors, their receptors, the associated SMADs and antagonists in five isolated size-matched populations of pre-antral follicles from normal human ovaries. *Molecular Human Reproduction*, 20(4): 293-308.
 11. Liu Q, Pan Zh, Wang X, Hu W, Di R, Yao Y and Chu M (2014) Progress on major genes for high fecundity in ewes. *Frontiers of Agriculture Science and Engineering*, 1(14): 282-290.
 12. Miao X and Luo Q (2013) Genome-wide transcriptome analysis between Small-tail Han sheep and the Surabaya fur sheep using high-throughput RNA sequencing. *Reproduction*, 145: 587-596.
 13. Miao X, Luo Q and Qin X (2015) Genome-wide transcriptome analysis of mRNAs and microRNAs in Dorset and Small Tail Han sheep to explore the regulation of fecundity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 402: 32-42.
 14. Miao YL and Williams CJ (2012) Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: Influence of subcellular localization. *Molecular Reproduction Development*, 79(11): 742-756.
 15. Mohammadabadi MR, Jafari-Darehdor AH and Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(11): e6177.
 16. Mohammadabadi MR and Sattayi-Mokhtari R (2013) Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in Kermani sheep. *Slovak Journal of Animal Science*, 46: 45-51.
 17. Notter DR (2008) Genetic aspects of reproduction in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2): 122-128.

فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید و روش‌های بیوانفورماتیکی مورد مطالعه قرار داد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت مالی از انجام این پژوهش و هم‌چنین از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین به‌خاطر در اختیار قرار دادن اطلاعات جهت انتخاب دام‌ها، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Andrade JC, Sobral LA, Ares G and Deliza R (2016) Understanding consumers' perception of lamb meat using free word association. *Meat Science*, 117: 68-74.
2. Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG and Norman RJ (2010) Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biology of Reproduction*, 83: 909-918.
3. Eghbalsaied S, Amini H, Shahmoradi S and Farahi M (2014) Simultaneous presence of G1 and G4 mutations in growth differentiation factor 9 gene of Iranian sheep. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4(4): 781-785.
4. Ghaffari M, Nejati-Javaremi A and Rahimi-Mianji G (2009) Lack of polymorphism in the oocyte derived growth factor (GDF9) gene in the Shal breed of sheep. *South African Journal of Animal Science*, 39(4): 355-360.
5. Gottfredson R (2001) Hormonal control of ewe reproduction. Department of animal science, University of Wisconsin-Madison, 42-44.
6. Hedayat-Evrigh N, Miraei-Ashtiani SR and Nejati-Javaremi A (2012) Investigate the possibility of polymorphism in FecX^L and FecX^H gene associated with twinning in Shal sheep. *Journal of Genetics*, 6(4): 29-34. (in Persian)
7. Hwangbo Y, Oh HI, Lee SH, Cheong HT, Yang BK and Park CK (2017) Treatment of epidermal growth factor (EGF) enhances nuclear maturation

بررسی پروفایل ترنسکریپتوم بافت تخمدان در میش‌های نژاد شال با استفاده از داده‌های RNA-Seq

18. Pezeshki Najafabadi S, Masoudi AA, Shirazi A and Shariati P (2017) Promoter and expression analysis of nobox, ovol1 and zp3 genes in ovarian follicles of Shall ewes. *Animal Production*, 18(4): 679-686. (in Persian)
19. Pokharel K, Peippo J, Andersson G, Li MH and Kantanen J (2015) Transcriptome profiling of Finnsheep ovaries during out-of-season breeding period. *Agricultural and Food Science*, 24: 1-9.
20. Pokharel K, Peippo J, Honkatukia M, Seppala A, Rautiainen J, Ghanem N, Hamama TM, A. Crowe M, Andersson M, Li MH and Kantanen J (2018) Integrated ovarian mRNA and miRNA transcriptome profiling characterizes the genetic basis of prolificacy traits in sheep (*Ovis aries*). *BMC Genomics*, 19(104): 1-17.
21. Rossetti R, Ferrari I, Bonomi M and Persani L (2017) Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clinical Genetics*, 91: 183-198.
22. Sun QY, Fuchimoto D and Nagai T (2004) Regulatory roles of ubiquitin-proteasome pathway in pig oocyte meiotic maturation and fertilization. *Theriogenology*, 62: 245-255.
23. Wang Z, Gerstein M and Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1): 57-63.
24. Yu J, Yaba A, Kasiman C, Thomson T and Johnson j (2011) mTOR controls ovarian follicle growth by regulating granulosa cell proliferation. *Plos One*, 6(7): 1-10.
25. Zamani P, Akhondi M and Mohammadabadi MR (2015) Associations of inter-simple sequence repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Research*, 132: 123-127.