

## Identification of selective signatures associated with gastrointestinal atresia in Holstein calves

H. Mohammadi<sup>1\*</sup>, M. Shamsollahi<sup>2</sup>

1. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran  
2. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Ilam, Ilam, Iran

(Received: 25-01-2023 – Revised: 12-06-2023 – Accepted: 16-06-2023)

**Introduction:** Obstructive gastrointestinal (GI) malformations are one of the most important congenital problems resulting in calf mortality within a few days of birth. The most common site for atresia, after the esophagus, is the jejunum. Jejunum atresia is the congenital absence or complete blockage of a part of the jejunum lumen. Early detection of intestinal obstruction is essential to prevent further complications. Intestinal atresia is an underdiagnosed congenital defect in cattle. It results in complete occlusion of the intestinal lumen and, unless surgically corrected, results in death or euthanasia of the affected calf. There is limited information on the incidence of this condition or risk factors, including predisposing alleles, associated with the defect. Atresia is a well-known congenital defect of the gastrointestinal system in calves and investigations into the etiology of this condition are warranted. Domestication and selection have significantly changed the behavioral and phenotypic traits in modern domestic animals. The selection of animals by humans left detectable signatures on the genome of modern dairy cattle. The identification of these signals can help us to improve the genetic characteristics of economically important traits in goats. Over the last decade, interest in the detection of genes or genomic regions that are targeted by selection has been growing. Identifying signatures of selection can provide valuable insights about the genes or genomic regions that are or have been under selection pressure, which in turn leads to a better understanding of genotype-phenotype relationships. This study aimed to identify the selection signatures using the unbiased theta method associated with gastrointestinal atresia in Holstein dairy calves.

**Materials and methods:** For calves with intestinal atresia, muscle tissue (>1 g) was collected from the *Latissimus dorsi* muscle postmortem, and submerged in RNA later solution. DNA samples from 91 atresia cases and 377 control animals were genotyped using the Illumina 777K BovineHD beadchip (Illumina Inc). The work described here is a case-control association study. Single nucleotide polymorphism (SNP) missing 5% of data, with MAF of <1% and Hardy-Weinberg equilibrium  $P$ -values <  $10^{-6}$  were removed. The genotyping efficiency for samples was also verified, and samples with more than 5% missing data were removed. Grouping was done to infer selection signatures based on  $F_{ST}$  statistic. The bioinformatics investigations were carried out using the Ensembl database for bovine genes (assembly *ARS-UCD1.2*), to identify potential candidate genes which already have been reported in/or surrounding genomic regions containing the peak of absolute extreme  $F_{ST}$  values. The regions corresponding to the upper and lower 0.01% of positive and negative obtained  $F_{ST}$  scores were considered regions under selection. Genes within a 500-kb span of the start and end of the QTL were identified using Ensembl 108 on the *ARS-UCD1.2* bovine genome assembly implemented in *biomart*. Then, using the PANTHER database, the general biological function of the genes was checked. At this stage, it is assumed that genes that belong to a functional class can be considered as a group of genes that have some specific and common characteristics, and the quantitative trait loci (QTLs) in the selected region were extracted using the Animalgenome database, and the genes were compared with other researches. GeneCards (<http://www.genecards.org>) and UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) databases were also used to interpret the function of the obtained genes.

\* Corresponding author: mohammadi13371364@gmail.com



**Results and discussion:** with a 99.90 percentile threshold of the obtained theta ( $\theta$ ) values, eight genomic regions on chromosomes 7, 12, 13, 21, 22, 23 (two regions), and 29 in the Holstein calves were identified. Further investigation using bioinformatics tools showed these genomic regions overlapped with the genes (*CSF2*, *SLAH3*, *TMEM14A*, and *SKIV2L*) associated with embryonic development, small intestine length, apoptosis, and several tumors. The population used in our study is small, owing to the challenge of collecting a substantial amount of blood on calves on commercial herds having received the diagnosis of gastrointestinal atresia and ready to be culled. Diagnosis and culling of gastrointestinal atresia animals are ineffective preventive measures. Further work is required to identify which farm-specific or management risk factors contribute to the incidence of intestinal atresia.

**Conclusions:** The results of this study may provide an important source to facilitate the identification of genomic regions and then, the genes affecting gastrointestinal atresia in calves. However, further studies are warranted to refine the findings using a larger sample size, whole-genome sequencing, and/or high-density genotyping.

**Keywords:** Genomic scan, Cell proliferation, Single nucleotide polymorphism, Candidate gene, Congenital defect

**Conflicts of interest:** The authors declare no conflicts of interest.

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

**How to cite this article:**

Mohammadi, H., & Shamsollahi, M. (2023). Identification of selective signatures associated with gastrointestinal atresia in Holstein calves. *Animal Production Research*, 12(2), 57-69. doi: 10.22124/AR.2023.23703.1748



## شناسایی نشانه‌های انتخاب مرتبط با آترزی دستگاه گوارش در گوساله‌های هلشتاین

حسین محمدی<sup>۱\*</sup>، محمد شمس‌اللهی<sup>۲</sup>

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

۲- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۵ - تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۶)

### چکیده

ضایعات انسدادی دستگاه گوارش از مهمترین مشکلات مادرزادی هستند که نتیجه آن، مرگ و میر گوساله‌ها در مدت کوتاهی بعد از تولد است. ژنوم شایع‌ترین مکان بعد از مری برای انسداد کامل یا آترزی است که فقدان مادرزادی یا انسداد کامل قسمتی از حفره روده است. شناخت زودرس آترزی برای پیشگیری از عوارض بعدی آن ضروری است. هدف پژوهش حاضر، شناسایی نشانه‌های انتخاب با استفاده از آماره ناریب تتا مرتبط با آترزی دستگاه گوارش در گوساله‌های شیری هلشتاین است. به این منظور، مجموع ۴۶۶ حیوان برای ۷۷۷۹۶۲ جایگاه نشانگری چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) با استفاده از تراشه‌های Illumina 777K BovineHD تعیین ژنوتیپ شدند. پس از کنترل کیفیت داده‌های اولیه در نهایت، ۷۰۴۲۴۲ نشانگر SNP و ۴۶۶ رأس دام (۳۷۵ رأس شاهد و ۹۱ رأس موردی) وارد تجزیه‌های بعدی شدند. با در نظر گرفتن صدک ۹۹/۹ کل ارزش‌های تتا، هشت ناحیه ژنومی روی کروموزوم‌های ۷، ۱۲، ۱۳، ۲۱، ۲۲، ۲۳ (دو نقطه) و ۲۹ شناسایی شدند. بررسی ژن‌های گزارش شده در این مناطق نشان داد که در داخل یا مجاورت این نواحی، ژن‌های *CSF2*، *SKIV2L* و *TMEM14A* قرار داشتند، که با رشد و توسعه جنین، طول روده کوچک، مرگ سلولی و انواع سرطان مرتبط هستند. همچنین بررسی بیوانفورماتیکی این مناطق نشان داد ژن‌های موجود در این مناطق با جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی مرتبط با حساسیت به بیماری و مسیرهای هستی‌شناسی مرتبط با تنظیم تفرق و تمایز سلولی، فعالیت پروتئین‌های کینازی و فعالیت سوخت و ساز سلولی هستند. نتایج این تحقیق می‌تواند منبع اطلاعاتی ارزشمندی در زمینه شناسایی مناطق ژنومی و در نتیجه ژن‌های مرتبط با آترزی در گاوهای هلشتاین فراهم آورد.

**واژه‌های کلیدی:** پویش ژنومی، تفرق و تمایز سلولی، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، ژن کاندیدا، نقص مادرزادی

\* نویسنده مسئول: mohammadi13371364@gmail.com

## مقدمه

نمو جنینی دستگاه گوارش فرآیندی بسیار پیچیده است و به همین دلیل، تعداد ناهنجاری‌های مادرزادی جنین متعدد و متنوع است. در سنین ابتدایی زندگی که مرحله مهم و حیاتی در رشد و نمو گوساله است، انسداد دستگاه گوارش به علت اختلال در عبور مواد غذایی و تأثیر بر این روند اهمیت پیدا می‌کند (Azizi et al., 2010). از سوی دیگر، در صورت ایجاد عوارضی همانند پرفوراسیون یا آسپیراسیون ریوی به علت عدم تکامل سیستم ایمنی، گوساله در مواجهه با این مشکلات با بحران روبرو خواهد شد (Lejeune et al., 2011). مکان‌های شایع برای آترزی یا انسداد کامل دستگاه گوارش، بعد از مری، ژژنوم و دئودنوم است. آترزی ژژنوم، فقدان مادرزادی یا انسداد کامل قسمتی از حفره ژژنوم است که در اغلب موارد گوساله‌های به دنیا آمده بعد از هفت روز از تولد می‌میرند. آترزی ژژنوم منجر به تجمع غیرطبیعی مایع آمنیوتیک و پلی‌هیدرآمنیوس می‌شود. در هفته ۸ تا ۱۰ جنینی، ژژنوم مانند طنابی است که در وسط این طناب رفته رفته یک کانال شکل می‌گیرد. در مواردی که این اتفاق انجام نشود، منجر به آترزی ژژنوم می‌شود (Keane et al., 2023). با توجه به عوارض ثانویه، شناخت زودرس آترزی برای پیشگیری از آن ضروری است. طی دهه‌های اخیر تمایل به شناسایی ژن‌ها و نواحی ژنومی که هدف انتخاب بوده‌اند رو به افزایش بوده است. شناسایی نشانه‌های انتخاب می‌تواند دیدگاه‌های ارزشمندی در مورد ژن‌ها و یا مناطق ژنومی که زیر فشار انتخاب بوده و یا هستند فراهم کند که به نوبه خود منجر به درک بهتر ارتباط ژنوتیپ و فنوتیپ می‌شود. چنانچه یک جهش جدید باعث افزایش شایستگی افراد حامل آن نسبت به سایر افراد جامعه شود، انتخاب باعث می‌شود افرادی که دارای شایستگی بیشتری هستند در تشکیل نسل بعد مشارکت بیشتری داشته باشند (Azizpour et al., 2020). بدین ترتیب فراوانی واریانت جهش یافته، بسته به سهم آن در افزایش شایستگی به سرعت شروع به افزایش خواهد کرد (Mohammadi et al., 2020). به عبارت دیگر، هنگامی که انتخاب مثبت به سمت افزایش فراوانی آلل مطلوب پیش می‌رود، جایگاه‌های نزدیک به این جایگاه اگر هم اثرشان خنثی باشد به علت پیوسته بودن با آلل مطلوب، تحت تأثیر قرار می‌گیرند که در نتیجه این پدیده، الگوی تنوع ژنتیکی

و عدم تعادل پیوستگی ژنی (LD) در جایگاه‌های اطراف این جهش انتخابی تغییر خواهد کرد، به طوری که هر چه به این آلل جدید نزدیک می‌شویم میزان تنوع ژنتیکی کاهش و LD افزایش پیدا می‌کند. به این الگوها، نشانه‌های انتخاب (selection signatures) یا ردپای انتخاب (selection signatures) (Rostamzadeh Mahdabi et al., 2021). یکی از مهم‌ترین آزمون‌های آماری شناسایی نشانه‌های انتخاب، آماره تمایز جمعیتی یا شاخص تثبیت ( $F_{ST}$ ) است. یکی از مشکلات اصلی روش این است که خطای نمونه‌گیری را در نظر نمی‌گیرد که این مورد با استفاده از روش ناریب تتا ( $\theta$ ) تصحیح شده است. اخیراً مطالعات گوناگونی با استفاده از آماره  $F_{ST}$  با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب مرتبط با بیماری در نژادهای مختلف گاوهای شیری انجام شده است. طی پژوهشی روی گاوهای هلشتاین، شناسایی نشانه‌های انتخاب با استفاده از آماره  $F_{ST}$  مرتبط با بیماری لکوز گاوی (BLV) انجام شده بود. نتایج این تحقیق، چهار منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های ۱، ۱۳، ۲۰ و ۲۲ گزارش کردند که ژن‌های کاندیدای موجود در این مناطق با سیستم ایمنی و سرکوب سرطان مرتبط بودند (Javan Nikkha, 2019). همچنین مطالعه پویش ژنومی با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با صفات تولیدی و بیماری با استفاده از آماره  $F_{ST}$  در نژادهای مختلف گاو شیری انجام شده بود. نتایج این تحقیق مناطق ژنومی روی کروموزوم‌های ۳، ۶، ۷، ۹ و ۲۷ شناسایی کردند که حاوی ژن‌های کاندیدای *DEFB4*، *DEFB7* و *DEFB10* مرتبط با بیماری ورم پستان بودند (Saravanan et al., 2021).

تاکنون در ارتباط با آترزی دستگاه گوارش مطالعات اندکی انجام شده است. مطالعه پویش کل ژنومی در گاوهای شیری نژاد جرسی با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با آترزی روده‌ای گزارش شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که مناطق ژنومی روی کروموزوم‌های ۱۴ و ۲۶ ارتباط معنی‌داری با آترزی روده کوچک دارند. بررسی بیوانفورماتیکی این مناطق نشان داد که ژن‌های کاندیدای *TMEM68*، *TGSI*، *LYN* و *PIK3AP1* مرتبط با این صفت بودند (Carthy et al., 2022). همچنین با مطالعه ژنومی در نژادهای مختلف خوک با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با آترزی روده، ژن کاندیدای *GLI2* گزارش شده است (Jin et al., 2013).

ژنوتیپ از دست رفته از تجزیه‌های بعدی حذف شدند. سپس دو عامل فراوانی آللی نادر (MAF) و نرخ تعیین ژنوتیپ (Call rate) برای هر نشانگر SNP محاسبه شده و SNPهایی که در مجموع دام‌ها دارای MAF و Call rate به ترتیب کمتر از یک درصد و ۹۵ درصد بودند از مراحل بعدی تجزیه کنار گذاشته شدند. سپس نشانگرهای باقیمانده که از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف داشتند ( $P\text{-value} \leq 0.000001$ ) به عنوان معیار دیگری از خطای تعیین ژنوتیپ از تجزیه نهایی کنار گذاشته شدند. در نهایت نشانگرهایی که روی کروموزوم‌های جنسی و یا با موقعیت نامشخص بودند از تجزیه‌های بعدی کنار گذاشته شدند. تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA) پس از گذراندن مراحل کنترل کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار PLINK V1.9 محاسبه و نمودار PCA با نرم‌افزار برنامه R نسخه ۴/۲ ترسیم شد.

تجزیه آماری شناسایی نشانده‌های انتخاب: در پژوهش حاضر با توجه به اینکه شمار زیاد دام‌ها تشخیص  $F_{ST}$  را با مشکل روبه‌رو می‌کند و همچنین برای گروه‌بندی بهتر و تمایز بیشتر دام‌های سالم و بیمار، با استفاده از نرم‌افزار DMU ۷6 برای گروه‌بندی افراد بیمار و سالم، اثر باقیمانده محاسبه و دام‌های یک درصد دو انتهای منحنی باقیمانده انتخاب شدند (Bagheri *et al.*, 2013). در پژوهش حاضر برای تجزیه داده‌ها از رابطه زیر استفاده شد:

$$P_{ijklm} = S_i + D_j + Y_k + H_l + BT_m + e_{ijklm}$$

که در این رابطه،  $P_{ijklm}$  فنوتیپ فرد،  $S_i$  اثر ثابت جنس  $i$ ،  $D_j$  اثر ثابت سن مادر  $j$ ،  $Y_k$  اثر ثابت سال  $k$ ،  $H_l$  اثر ثابت گله  $l$ ،  $BT_m$  اثر ثابت نوع تولد  $m$  و  $e_{ijklm}$  اثر تصادفی باقیمانده است. سپس برای شناسایی نواحی مورد انتخاب از آزمون تمایز جمعیتی  $F_{ST}$  استفاده شد. آزمون تمایز جمعیتی  $F_{ST}$  به دو روش رایت (Wright, 1965) و روش برآوردگر ناریب تتا ( $\theta$ ) (Weir and Cockerham, 1984) محاسبه می‌شود. یکی از مشکلات اصلی روش رایت، عدم در نظر گرفتن خطای نمونه‌گیری است که این مشکل در روش برآوردگر ناریب تتا تصحیح شد که مستقل از شمار گروه‌های نمونه‌گیری شده و شمار افراد داخل هر گروه است. ارزش‌های به‌دست آمده از این روش‌ها بین صفر تا یک متغیر است. به منظور بررسی الگوی انتخاب مثبت در سطح ژنوم، شاخص تشبیت در هر جایگاه با استفاده از روش

به‌طور کلی، مناطقی از ژنوم که زیر انتخاب هستند باید اهمیت شایستگی و عملکردی داشته باشند، در غیر این صورت، انتخاب آنها را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. با توجه به مطالب بیان شده، این مناطق ژنومی عمدتاً با ژن‌های عمده اثر و صفات مهم اقتصادی همراه هستند و دارای اهمیت زیادی هستند. از طرف دیگر با توجه به اهمیت صفات سلامت و آسیب‌های ناشی از بیماری‌ها در صنعت پرورش گاو شیری به خصوص نژاد هلشتاین، شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با این صفات ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از این پژوهش، کاوش ژنومی نشانده‌های انتخاب و شناسایی نواحی کاندیدای مرتبط با آترزی دستگاه گوارش در سطح ژنوم گوساله‌های شیری نژاد هلشتاین بود.

### مواد و روش‌ها

در این پژوهش از اطلاعات طرح ملی گاو شیری ایرلند که روی نژاد هلشتاین صورت گرفته است استفاده شد. در پژوهش حاضر از اطلاعات ژنوتیپی مجموع ۴۶۶ رأس گوساله‌های شیری غیر خویشاوند که شامل ۳۷۵ رأس دام سالم و بدون هیچ‌گونه انسداد گوارشی و ۹۱ رأس دام بیمار و با مشکل انسداد کامل دستگاه گوارشی (بخش‌های روده کوچک و بزرگ) که پس از هفت روز از تولد، تلف شدند، استفاده شد. برای انتخاب دام‌ها از اطلاعات ثبت شده ۵۶۴۵۴ گوساله شیری نژاد هلشتاین از ۳۹ گله مختلف که شامل هر دو جنس بودند و طی سال‌های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۹ جمع‌آوری شده بودند و شامل ۱۹۷ دام بیمار و ۵۶۲۵۷ دام سالم بود، استفاده شد. لازم به ذکر است که مدیریت استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها نیز به وسیله مرکز اصلاح نژاد گاو شیری کشور ایرلند انجام شد. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت بالای DNA استخراج شده، نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های شرکت ایلومینا با آرایه‌های Illumina 777K BovineHD تعیین ژنوتیپ شدند. داده‌های تعیین ژنوتیپ شده در پایگاه برخط ذخیره ژنومی figshare (<https://figshare.com/articles/dataset/>) با شماره دسترسی ۲۰۶۲۶۸۲۱ در دسترس است.

جهت اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ در تجزیه نهائی، ویرایش داده‌ها و مراحل مختلف کنترل کیفیت با استفاده از نرم‌افزار PLINK (نسخه ۱/۹) روی داده‌های اولیه تعیین ژنوتیپ شده انجام شد (Purcell *et al.*, 2007). در نخستین مرحله، نمونه‌هایی با بیش از پنج درصد

است که کارایی مختلفی دارند. یکی از نرم افزارهای مفید و پر کاربرد در این زمینه، نرم افزار برخط DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) است. این نرم افزار حاوی یک پایگاه اطلاعاتی گسترده مربوط به مراحل مختلف زیستی و همچنین کاربردهای متنوع به منظور درک ساز و کارهای درگیر در یک مجموعه ژنی است (Huang et al., 2009). بنابراین در این مطالعه به منظور بررسی گروه‌های کارکردی مختلف مجموعه ژن‌های شناسایی شده در آماره  $F_{ST}$ ، از نرم افزار DAVID نسخه ۶/۸ استفاده شد. تنها عبارات معنی‌دار ( $P$ -value) با روش اطمینان و مربوط به مراحل زیستی تصحیح شده در نظر گرفته شد. در نهایت برای بررسی اینکه آیا مناطق مورد نظر با QTL‌های شناسایی شده هم‌پوشانی دارند یا خیر، از مرکز اطلاعاتی برخط QTL (<http://i.animalgenome.org/jbrowse/>) بر اساس آخرین نسخه ژنومی گاو (*ARS-UCDI.2*) استفاده شد.

### نتایج و بحث

مراحل مختلف کنترل کیفیت روی مجموع ۷۷۷۹۶۲ نشانگر SNP در ۴۶۶ رأس گوساله‌های شیری نژاد هلشتاین (۳۷۵ رأس دام سالم و ۹۱ رأس مبتلا به آترزی) انجام شد. هیچ کدام از دام‌ها به علت درصد SNP تعیین ژنوتیپ شده کمتر از ۹۵ درصد حذف نشدند. از بین SNP‌های اولیه نیز تعداد ۵۴۰۰۵ و ۱۱۶۵۴ نشانگر به دلیل پایین بودن به ترتیب فراوانی آللی نادر و نرخ تعیین ژنوتیپ حذف شدند. تعداد ۸۱۶ نشانگر SNP به خاطر انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ حذف شدند و در نهایت، ۷۲۴۵ نشانگر با موقعیت ژنومی نامشخص و کروموزوم جنسی از مراحل بعدی کنار گذاشته شدند. در پایان پس از اجرای مراحل کنترل کیفیت داده‌ها، ۷۰۴۲۴۲ نشانگر و ۴۶۶ رأس دام توانستند مراحل مختلف فیلتراسیون داده‌ها را بگذرانند و برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی باقی بمانند. توزیع نشانگرهای SNP بعد از کنترل کیفیت به تفکیک هر کروموزوم در جدول ۱ ارائه شده است. همچنین به منظور بررسی نحوه قرار گرفتن حیوانات در گروه‌های شاهد-موردی، تجزیه و تحلیل PCA با استفاده از اطلاعات تعیین ژنوتیپی بین دو گروه به عنوان راهی متمایز به منظور توصیف واگرایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج تجزیه PCA نشان داد که با PC1 و PC2،

ناریب تنها در محیط R برنامه‌نویسی شد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$F_{ST} = \frac{\sigma_S^2}{\sigma_T^2} = \frac{\sigma_S^2}{\bar{P}(1 - \bar{P})}$$

در این رابطه،  $\sigma_S^2$ ،  $\sigma_T^2$  و  $\bar{P}$  به ترتیب واریانس فراوانی آللی بین جمعیت‌های مختلف (در شاخص ناریب تنها برای اندازه جمعیت تصحیح می‌شود)، واریانس فراوانی آللی در کل جمعیت و میانگین فراوانی آللی در کل جمعیت است. جهت شناسایی بهتر سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم به-جای در نظر گرفتن ارزش عددی هر SNP از میانگین‌گیری ارزش‌های عددی SNP‌های مجاور به روش Creeping Window (CW) با طول ۵۰۰ کیلو جفت باز استفاده شد (Kim et al., 2015) و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرهای مجاور ارزش بالایی داشتند، به عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند (Saravanan et al., 2021). در این تحقیق برای ترسیم گراف ارزش‌های Win10 در مقابل موقعیت ژنومی از بسته نرم‌افزاری ggplot2 در برنامه R (نسخه ۴/۱/۳) استفاده شد.

بررسی ژن‌های گزارش شده در مناطق ژنومی حاوی نشانه‌های انتخاب: پس از مرتب کردن نشانگرها بر پایه ارزش محاسبه شده با استفاده از نرم‌افزار Excel، ارزش‌های ۰/۱ درصد بالایی محاسبه و مناطقی که برای همه نشانگرهای مجاور ارزش بالایی داشتند به عنوان نشانه انتخاب در نظر گرفته شدند. مناطق دارای ارزش بالای تنها می‌توانند نشان-دهنده مناطقی از ژنوم باشند که در گروه‌های با دام سالم و بیمار به صورت متمایز هدف انتخاب قرار گرفته باشند. برای بررسی ژن‌های گزارش شده در این مناطق و ۲۵۰ کیلو جفت‌باز اطراف آنها از پایگاه اطلاعاتی برخط Genes 108 BioMart Database به وسیله Ensembl ([www.ensembl.org/biomart](http://www.ensembl.org/biomart)) مورد بررسی قرار گرفت. برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به دست آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی برخط GeneCards (<http://www.genecards.org>) و UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) استفاده شد.

به منظور شناسایی اینکه ژن‌های شناسایی شده در مرحله قبل در چه مراحل زیستی درگیر هستند، عمدتاً از تجزیه هستی‌شناسی (GO) استفاده می‌شود (Zhao et al., 2015). به منظور انجام تجزیه GO، نرم افزارهای مختلفی ارائه شده

به‌طور مستقیم و غیرمستقیم با صفت آترزی دستگاه گوارش مرتبط باشند. در مجموع ۶۷ ژن که در ارتباط با منطقه انتخابی بودند با این روش تعیین شدند. اطلاعات مربوطه به این ژن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. در این بخش، برخی از ژن‌ها که احتمالاً مورد انتخاب مثبت مرتبط با رشد و توسعه جنین و آترزی دستگاه گوارش بوده‌اند مورد بحث و تحلیل قرار می‌گیرند. شماری از ژن‌ها در این بررسی به عنوان نشانه‌های انتخاب گزارش شده‌اند که با بررسی‌های پیشین همخوانی داشتند.

ژن کاندیدای *CSF2* روی کروموزوم شماره ۷ در ناحیه ژنومی ۲۲/۳۹ مگاجفت‌بازی گونه گاو قرار دارد. ژن *CSF2* نقش کلیدی در رشد و توسعه جنین در دوره بارداری گاو داشته و نقش بازدارنده در فرآیند آپوپتوزیس دارد (Loureiro et al., 2011a). همچنین در فرآیندهای مسیرهای زیستی تولیدمثلی مؤثر است (Loureiro et al., 2011b). در مطالعه ژنومی با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب مثبت مرتبط با سیستم ایمنی و سازگاری با شرایط آب و هوایی در گاوهای نژاد روسی (Black Pied, Kazakh, Yakut و Yaroslavl)، ژن کاندیدای *CSF2* گزارش شده است (Yurchenko et al., 2018).

ژن کاندیدای *SIAH3* در ناحیه بین ۱۵/۸۴ و ۱۵/۹۱ مگاجفت‌باز روی کروموزوم ۱۲ گاو قرار گرفته است. ژن *SIAH3* نقش تنظیمی در رشد اندام‌های مختلف در بدن دارد (Genecards). مطالعه پویش ژنومی در یک جمعیت  $F_2$  جوجه‌های تلاقی داده شده بین نژادهای لگهورن سفید با Dongxiang با هدف شناسایی مناطق ژنومی و ژن‌های کاندیدای مرتبط با طول بخش‌های مختلف روده کوچک شامل دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم انجام شده بود که مشخص کرد ژن کاندیدای *SIAH3* ارتباط معنی‌داری با رشد و تفرق سلول‌های مرتبط با روده کوچک دارد (Li et al., 2018). همچنین ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی در ژن *SIAH3* با انواع سرطان از جمله پستان و پروستات در انسان گزارش شده است (Robbins et al., 2011). ژن *SIAH3* در ناحیه-ای از کروموزوم ۱۲ گاو قرار گرفته است که قبلاً QTL‌های مرتبط با صفات سیستم ایمنی (حساسیت به بیماری عفونت تنفسی گاوی) گزارش شده است (Quick et al., 2020).

دو گروه به خوبی از یکدیگر تفکیک و جدا شدند و در هیچ نقطه‌ای با هم هم‌پوشانی نداشتند (شکل ۱).

با توجه به اینکه انتخاب، علاوه بر جهش سودمند، جایگاه‌های مجاور آن را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد (Akey et al., 2002)، در این پژوهش جهت شناسایی بهتر سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم به‌جای در نظر گرفتن ارزش عددی هر SNP، میانگین‌گیری ارزش‌های عددی SNP‌های مجاور به روش CW با طول ۱۰ SNP صورت گرفت و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرهای مجاور دارای ارزش بالایی باشند، به عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند (شکل ۱). آستانه در نظر گرفته شده سخت‌گیرانه بود و مشابه با مطالعه Zhao et al. (2015) روی نژادهای مختلف گاوهای شیری و گوشتی بود. بخش‌هایی از ژنوم که ارزش  $F_{ST}$  بالایی دارند نشان‌دهنده تمایز بین گروه‌های سالم و بیمار در آن مناطق ژنومی در اثر انتخاب مثبت هستند که به دنبال انتخاب‌های طبیعی و مصنوعی طی نسل‌های مختلف برای جایگاه‌های مورد نظر به وجود آمده است. نتایج به‌دست آمده نشان داد که در چندین منطقه ژنومی، SNP‌های مجاور دارای تفرق جمعیتی بالایی بودند که شامل هشت ناحیه ژنومی روی کروموزوم‌های ۷، ۱۲، ۱۳، ۲۱، ۲۲، ۲۳ (دو نقطه) و ۲۹ بودند و در صدک ۹۹/۹، کل ارزش‌های تتا قرار داشتند و معنی‌دار بودند (شکل ۲).

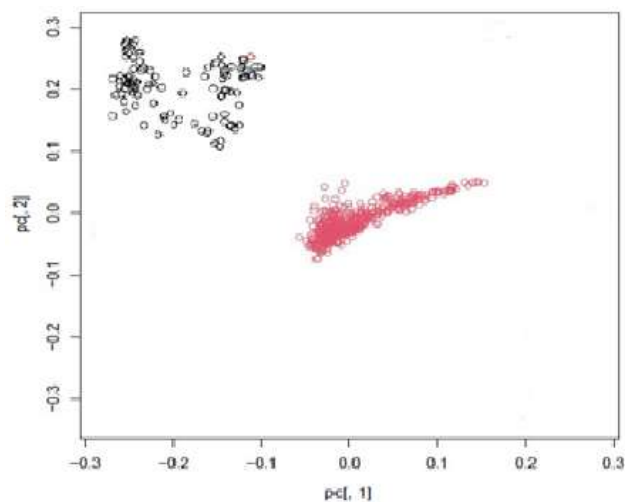
از روش نشانه‌های انتخاب و آماره تتا تاکنون جهت شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با بیماری‌های مختلف در دام‌های اهلی استفاده شده است. در یک بررسی با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین آلمان از آماره تمایز جمعیتی تتا استفاده شد. نتایج آن مطالعه منجر به شناسایی مناطق ژنومی کاندیدا روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۵، ۶، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ شده بود و بررسی بیوانفورماتیکی این مناطق نشان داد که ژن‌های موجود در این مناطق با سیستم ایمنی، بیماری‌های خود ایمنی، انواع سرطان و سیستم عصبی مرتبط هستند (Abbasi Moshaii, 2018).

پس از شناسایی نواحی ژنومی تحت انتخاب، ژن‌های موجود در این مناطق شناسایی و عملکرد بیوشیمیایی آن‌ها بررسی شدند (جدول ۱). ژن‌های مشخص شده در جدول ۱، عملکردهای متفاوتی در رشد و توسعه جنین، طول روده کوچک، آپوپتوزیس و انواع سرطان داشتند که می‌توانند

جدول ۱- توزیع تعداد نشانگرهای SNP بعد از کنترل کیفی و میانگین فاصله نشانگرهای مجاور روی کروموزوم‌های اتوزومی

Table 1. Distribution of SNPs after quality control and the average distances between adjacent SNPs on autosomal chromosomes

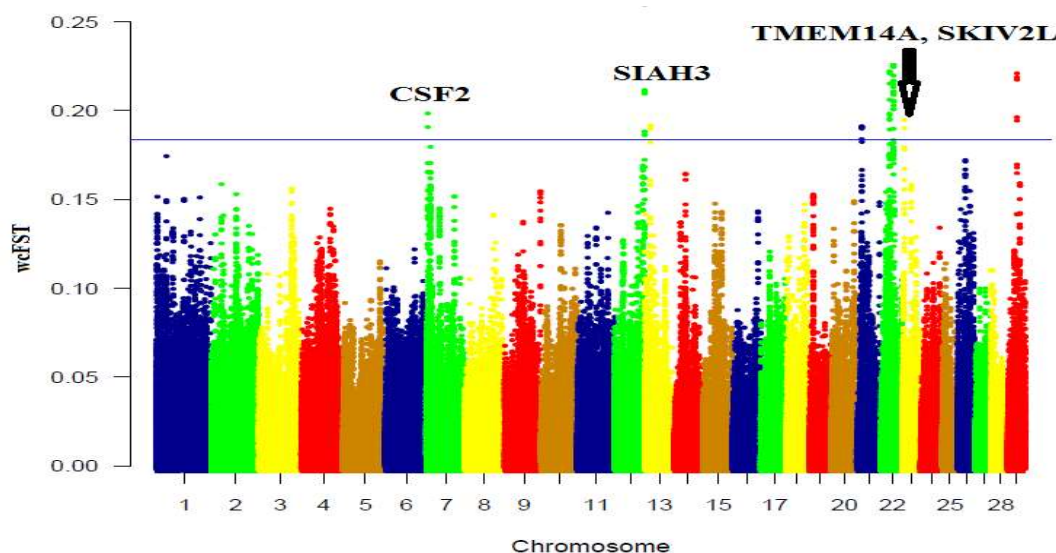
Chromosome	SNP (n)	Chromosome length (Mb)	Mean distance (kb)
1	43796	158.34	3.13
2	38490	137.06	3.56
3	34211	121.43	3.55
4	33689	120.83	3.59
5	33271	121.19	3.64
6	34301	119.46	3.48
7	31877	112.64	3.53
8	30795	113.38	3.68
9	29639	105.71	3.57
10	29332	104.31	3.56
11	31058	107.31	3.46
12	24812	91.16	3.67
13	22088	84.24	3.81
14	23236	84.65	3.64
15	23641	85.30	3.61
16	23171	81.72	3.53
17	21472	75.16	3.50
18	18750	66.00	3.52
19	18401	64.06	3.48
20	20892	72.04	3.45
21	20224	71.60	3.54
22	17594	61.44	3.49
23	14651	52.53	3.59
24	17939	62.71	3.50
25	12598	42.90	3.41
26	14816	51.68	3.49
27	12770	45.41	3.56
28	12601	46.31	3.68
29	14127	51.51	3.65
Total	704242	2512.08	3.56



شکل ۱- خوشه‌بندی حیوانات بر اساس تجزیه PCA با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی تمام حیوانات

Fig. 1. Animals clustered on the basis of principal components analysis (PCA) using genotyping information of all animals





شکل ۲- توزیع ارزش‌های win10 تتا در سطح ژنوم حیوانات سالم و بیمار مبتلا به آترزی دستگاه گوارش در گوساله‌های هلشتاین. موقعیت ژنومی SNPها روی محور X و ارزش‌های تتای آنها روی محور Y نشان داده شده است. خط ترسیم شده نشان‌دهنده ۹۹/۹ صدک کروموزوم‌ها است

Fig. 2. Distribution of 10 windowed theta values for healthy and patient (with gastrointestinal atresia) Holstein calves. The SNP position on different chromosomes shown on the X-axis, and theta values are plotted on the Y-axis. The values above the line are in the 99.9 percentile of all theta values

جدول ۲- نواحی ژنومی مورد انتخاب و ژن‌های شناسایی شده در این مناطق ژنومی مرتبط با آترزی دستگاه گوارش در گوساله‌های هلشتاین

Table 2. Genomic regions containing selection signatures related to gastrointestinal atresia, and genes (QTL) reported in these genomic regions in Holstein calves

Chromosome	Genomic position (bp)	Reported genes in the region	Reported QTLs in the region
7	22148908:22648908	<i>ACSL6, CSF2, P4HA2, PDLIM4, GATAD2A, YJEFN3, CILP2, PBX4, LPAR2, ZNF354B, JMJD4, SNAP47</i>	-
12	15596695:16096695	<i>TEX29, ARHGEF7, ANKRD10, ING1, CARS2, NAXD, SLC25A15, THSD1, VPS36, CKAP2, NEK5, ALG11, SLAH3</i>	<i>Bovine respiratory disease susceptibility</i>
13	15094268:15594268	<i>U6, U8</i>	-
21	13645869:14145869	<i>FAM174B, CHD2, RGMA,</i>	-
22	34609518:35109518	<i>SLC25A26, LRIG1, SNORD22, CNTN4</i>	<i>Age at puberty</i>
23	24806018:25306018	<i>BoLA, MCCD1, ATP6V1G2, LST1, PAQR8, EFHC1, TRAM2, TMEM14A, GSTA2, GSTA1,</i>	<i>M. paratuberculosis susceptibility</i>
23	27149202:27649202	<i>GSTA5, GSTA3, GSTA4, CILK1, FBXO9, NOTCH4, GPSM3, PBX2, AGER, AGPAT1, EGFL8, PPT2, TNXB, CYP21, STK19, SKIV2L, NELFE, CFBC2</i>	-
29	26780575:27280575	<i>OR8G3F, OR8G3L, OR10D3, OR10G9H, OR8B1AU</i>	-

(Pum *et al.*, 2022). کموکاین‌ها خانواده‌ای از سایتوکین-های کموتراکتنت ۱ را تشکیل می‌دهند که همراه با سایتوکین‌ها و پروتئازها برای مهاجرت مستقیم لوکوسیت‌ها در طول پروسه التهابی ضروری هستند (Genecards). کموکاین‌ها نقش مهمی در فراخوانی مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها دارند (UniProtKB). همچنین مسیر زیستی Regulation of cell proliferation از جمله مسیرهای فرآیند زیستی مرتبط با بیماری شناسایی شد.

از ژن‌های کاندیدا در زمینه مقاومت می‌توان ژن *PLCB1* را نام برد که خانواده‌ای از گیرنده‌های سلولی را کد می‌کند. تاکنون ۱۳ نوع ژن *PLCB* در پستانداران شناسایی شده است. این گیرنده‌ها، توالی مولکولی خاصی از عوامل بیماری‌زا (PAMP) را تشخیص می‌دهند و در آغاز پاسخ-های ایمنی بدن به عوامل بیماری‌زای میکروبی نقش محوری دارند (Genecards).

ژن کاندیدای *PYCR2* که جزء ژن‌های موجود در مسیر Cell junction در هستی‌شناسی اجزای سلولی به‌دست آمد در پاسخ سلولی به تنش اکسیداتیو نقش دارد (Genecards). در مطالعه‌ای که با رویکرد پویش کل ژنوم برای شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با غلظت آلبومین و سرم در گاو هلشتاین چینی انجام شده بود، ژن *PYCR2* به عنوان یکی از ژن‌های اصلی کاندیدا گزارش شد (Lin *et al.*, 2020).

با توجه به اهمیت صفات سلامت و خسارات ناشی از بیماری‌ها در صنعت گاو شیری، همچنین نقش مؤثر نژاد هلشتاین در تولید شیر در بیشتر کشورهای جهان، هدف از این پژوهش، کاوش ژنومی نشانه‌های انتخاب و شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با آترزی دستگاه گوارش در سطح ژنوم گوساله‌های نژاد هلشتاین بود که با توجه به ماهیت چندژنی این بیماری، نتایج حاصل از این پژوهش با بررسی الگوهای انتخاب در سطح ژنوم، دیدگاه ارزشمندی از مناطق ژنومی کاندیدای حاوی ژن‌های کنترل‌کننده آترزی دستگاه گوارش و درک بهتر ساز و کارهای ایجاد کننده این صفت فراهم آورده است. با انجام تجزیه‌های بیشتر در زمینه نشانه‌های انتخاب و همچنین بررسی تنوع در تعداد کپی (CNV) و مطالعات پویش کل ژنومی و تجزیه‌های مسیر (GSEA) می‌توان علی‌رغم کسب اطمینان بیشتر، اطلاعات ارزشمندی در این زمینه فراهم آورد. همچنین با بررسی

ژن‌های کاندیدای *TMEM14A* و *SKIV2L* به ترتیب در نواحی ژنومی ۲۵/۰۶ و ۲۷/۰۱ مگابازی کروموزوم ۲۳ گونه گاو قرار دارند. *TMEM*، خانواده‌ای از گیرنده‌های شناسایی الگو هستند که در سیر تکامل، بدون تغییر مانده و حفظ شده‌اند و در بسیاری از انواع سلول‌ها بیان می‌شوند و نقش اساسی در پاسخ‌های ایمنی ذاتی ایفاء می‌کنند (GeneCards). نتایج مطالعه ژنومی با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب با استفاده از آماره  $F_{ST}$  که در نژادهای گاو همیشه خوزستانی و آذری انجام شده بود نشان داد ژن کاندیدای *TMEM14A* نقش کلیدی در فرآیند آپوپتوزیس در بدن دارد (Mokhber *et al.*, 2018). ژن کاندیدای *TMEM14A* را می‌توان به عنوان ژن کاندیدای مکانی در نظر گرفت زیرا در ناحیه‌ای از کروموزوم ۲۳ قرار گرفته است که قبلاً QTL‌های مرتبط با سیستم ایمنی (حساسیت به عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) در گاو گزارش شده است (Canive *et al.*, 2021).

ژن کاندیدای *SKIV2L* نقش مهمی در فرآیند نقص سیستم ایمنی بدن (خود ایمنی) دارد. ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی در ژن *SKIV2L* با بیماری‌های گوارشی از جمله زخم معده و اختلالات مادرزادی از جمله سندرم تریکوهپاتوانتریک گزارش شده است (Vardi *et al.*, 2018). همچنین در مطالعه پویش ژنومی با هدف شناسایی مناطق ژنومی و ژن‌های مرتبط با مقاومت به بیماری پاراتوبرکلوزیس در گاوهای شیری نورماندی، ژن کاندیدای *SKIV2L* گزارش شده است (Sanchez *et al.*, 2020).

برای درک بهتر عملکرد مولکولی ژن‌های شناسایی شده در مناطق ژنومی مورد انتخاب مثبت، هستی‌شناسی ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه هستی‌شناسی در جدول ۳ برای برخی از مسیرهای مهم و معنی‌دار نشان داده شده است. بخش‌هایی از تجزیه هستی‌شناسی ژن در این مقایسه با مطالعات قبلی روی گاو نیز همخوانی داشت (Zhao *et al.*, 2015; Joel Jahuey-Martínez *et al.*, 2019).

از مسیرهای فرآیند زیستی معنی‌دار مرتبط با بیماری می‌توان به مسیر protein tyrosine kinase activity اشاره نمود. از بین نه ژن معنی‌دار در این مسیر، ژن کاندیدای *CCL26* در مطالعات قبلی در ارتباط معنی‌دار با مقاومت و یا حساسیت به بیماری‌های مختلف گزارش شده است

شده بودند. بررسی ژن‌ها در نواحی مورد انتخاب نشان داد ژن‌های موجود در این مناطق با رشد و توسعه جنین، طول روده کوچک، آپوپتوزیس و انواع سرطان مرتبط هستند. در مجموع، نتایج این تحقیق می‌تواند منبع اطلاعاتی با ارزشی در جهت شناسایی ژن‌های ایجاد کننده آترزی دستگاه گوارش ارائه دهد و آغازی برای بررسی‌های بیشتر در این زمینه و استفاده از اطلاعات به دست آمده در شناسایی ویژگی‌های ژنتیکی این بیماری مهم اقتصادی در صنعت پرورش گاو شیری باشد.

گاوهای هلشتاین ایران و یا نژادهای دیگر برای این صفت و مقایسه با نتایج این مطالعه می‌تواند به روشن‌تر شدن تأثیر، روند و اهداف انتخاب برای این بیماری مهم اقتصادی کمک نماید.

### نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه برای شناسایی نشانه‌های انتخاب از آماره تمایز جمعیتی تنا استفاده شد و نشانه‌های انتخاب در بخش‌هایی از ژنوم شناسایی شد که برخی از این مناطق در بررسی‌های پیشین در انسان و دام‌های اهلی دیگر نیز تأیید

جدول ۳- تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) مرتبط با آترزی دستگاه گوارش  
Table 3. Gene set enrichment analysis significantly ( $P < 0.05$ ) associated with gastrointestinal atresia

GO ID	Term (GO hierarchy level)	No. genes in the GO term	Candidate genes	FDR
<b>Biological process</b>				
GO:0044237	Cellular metabolic process	10	<i>IMP4, CDKL1, POLE2, DCLK1, MMS19, ATP5S, CA8, ACER8, LGSN, GGH</i>	0.015
GO:0032502	Developmental process	8	<i>MEGF10, SAV1, TRIP12, BATF, PROX2, FER, EIF2B2, OSTN</i>	0.001
GO:0048856	Anatomical structure development	8	<i>ATP8B1, CRTAC1, SFRP5, TTPA, TP63, TGFB3, SPG20, SMAD9VLDLR</i>	0.003
GO:0030154	Cell differentiation	11	<i>FER, WDR7, LRRC17, EIF2B2, ATP8B1, CRTC3, CHUK, FZD9, WNT8B, PIK3CD, IL2, MARCH3, DZIP3, MAP4K5, CDKL1, PTPN18, NEK9, PMPCB, ACER2, ADCK1, ASPH, SMAD9, PLCB1, HERC</i>	0.002
GO:0019538	Regulation of cell proliferation	13	<i>CLDN4, CLDN3, MYL7, NCF1, LOC102169118, CTNNA1, CTNND2</i>	0.005
GO:0055074	Protein metabolic process	7	<i>CCL24, NCF1, CHUK, GNB1, PIK3CD, ADCY1, PRKCZ, ADCY7, CCL26</i>	0.040
GO:0045778	protein tyrosine kinase activity	9	<i>CLDN4, CLDN3, MYL7, NCF1, LOC102169118, PYCR2</i>	0.045
<b>Cellular component</b>				
GO:0030054	Cell junction	6	<i>CAMK2B, PER3, CALML6, GNB1, DVL1, FZD9, WNT8B, PIK3CD</i>	0.006
GO:0034703	Cation channel complex	8		0.007

### فهرست منابع

Abbasi Moshaii, B. (2018). Genomic scan for selection signatures and identification of some candidate regions associated with mastitis in German Holstein cattle. Ph.D. Thesis, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran. [In Persian]

- Akey, J. M., Zhang, G., Zhang, K., Jin, L., & Shriver, M. D. (2002). Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Research*, 12(12), 1805-1814. doi: 10.1101/gr.631202
- Azizi, S., Mohammadi, R., & Mohammadpour, I. (2010). Surgical repair and management of congenital intestinal atresia in 68 calves. *Veterinary Surgery*, 39, 115-120. doi: 10.1111/j.1532-950X.2009.00611.x
- Azizpour, N., Khaltabadi Farahani, A. H., Moradi, M. H., & Mohammadi, H. (2020). Genome-wide association study based on gene-set enrichment analysis associated with milk yield in Holstein cattle. *Journal of Animal Science Research*, 30(1), 79-92. doi: 10.22034/AS.2020.11009 [In Persian]
- Bagheri, M., Mirai-Ashtiani, R., Moradi-Shahrbabak, M., Nejati-Javaremi, A., Pakdel, A., Von Borstel, U. U., Pimentel, E. C. G., & König, S. (2013). Selective genotyping and logistic regression analyses to identify favorable SNP-genotypes for clinical mastitis and production traits in Holstein dairy cattle. *Livestock Science*, 151, 140-151. doi: 10.1016/j.livsci.2012.11.018
- Canive, M., González-Recio, O., Fernández, A., Vázquez, P., Badia-Bringué, G., & Lavín, J. L. (2021). Identification of loci associated with susceptibility to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in Holstein cattle using combinations of diagnostic tests and imputed whole-genome sequence data. *PLoS One*, 16(8), e0256091. doi: 10.1371/journal.pone.0256091
- Carthy, T. R., Keane, O. M., Hanrahan, J. P., Matthews, D., McEwan, J., Rowe, S., & Mee, J. (2022). Investigation of Intestinal Atresia in a Jersey Sire Family. In: Proceeding of 12<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production 3-8 July. Netherlands, Pp. 11-14.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211
- Javan Nikkhah, M. (2019). Identification of selective signatures associated with resistance to bovine leukosis (BLV) in Iranian Holstein cows. Ph.D. Thesis, University of Tehran, Iran. [In Persian]
- Jin, Q., Wang, C., Li, X., Yu, M., Zhao, S. H., & Li, X. (2013). Molecular characterization and genome-wide mutations in porcine anal atresia candidate gene GLI2. *Mammalian Genome*, 24, 500-507. doi: 10.1007/s00335-013-9485-8
- Jahuey-Martínez, F. J., Parra-Bracamonte, G. M., Sifuentes-Rincón, A. M., & Moreno-Medina, V. R. (2019). Signatures of selection in Charolais beef cattle identified by genome-wide analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 136(5), 378-389. doi: 10.1111/jbg.12399
- Keane, O. M., Carthy, T. R., Hanrahan, J. P., Matthews, D., McEwan, J. C., & Rowe, S. J. (2023). Risk factors for, and genetic association with, intestinal atresia in dairy calves. *Animal Genetics*, 4, 104-112. doi: 10.1111/age.13291
- Kim, H., Song, K. D., Kim, H. J., Park, W., Kim, J., & Lee, T. (2015). Exploring the genetic signature of body size in Yucatan Miniature pig. *PLoS One*, 10(4), e0121732. doi: 10.1371/journal.pone.0121732
- Lejeune, B., Miclard, J., Stoffel, M. H., & Meylan, M. (2011). Intestinal atresia and ectopia in a bovine fetus. *Veterinary Pathology*, 48, 830-833. doi: 10.1177/0300985810383872
- Li, S., Wang, X., Qu, L., Dou, T., & Wang, K. (2018). Genome-wide association studies for small intestine length in an F<sub>2</sub> population of chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 294-300. doi: 10.1080/1828051X.2017.1368419
- Lin, S., Wan, Z., Zhang, J., Xu, L., Han, B., & Sun, D. (2020). Genome-wide association studies for the concentration of albumin in colostrum and serum in Chinese Holstein. *Animals*, 10(12), 2211. doi: 10.3390/ani10122211
- Loureiro, B., Block, J., Favoreto, M. G., Carambula, S., Pennington, K. A., Ealy, A. D., & Hansen, P. J. (2011a). Consequences of conceptus exposure to colony-stimulating factor 2 on survival, elongation, interferon- $\tau$  secretion, and gene expression. *Reproduction*, 41(5), 617-624. doi: 10.1530/REP-10-0511
- Loureiro, B., Oliveira, L. J., Favoreto, M. G., & Hansen, P. J. (2011b). Colony-stimulating factor 2 inhibits induction of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *American Journal of Reproduction Immunology*, 65, 578-588. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00953.x
- Mokhber, M., Moradi-Shahrbabak, M., Sadeghi, M., Moradi-Shahrbabak, H., Stella, A., Nicolazzi, E., Rahmaninia, J., & Williams, J. L. (2018). A genome-wide scan for signatures of selection in Azeri and Khuzestani buffalo breeds. *BMC Genomics*, 19(1), 449. doi: 10.1186/s12864-018-4759-x
- Mohammadi, H., Rafat, S. A., Moradi Shahrbabak, H., Shodja, J., & Moradi, M. H. (2020). Genome-wide association study and gene ontology for growth and wool characteristics in Zandi sheep. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 8(2), 45-55. doi: 10.22103/JLST.2020.15795.1317
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559-575. doi: 10.1086/519795
- Pum, A., Ennemoser, M., Gerlza, T., & Kung, A. J. (2022). The role of heparan sulfate in CCL26-induced eosinophil chemotaxis. *International Journal of Molecular Science*, 23(12), 6519. doi: 10.3390/ijms23126519

- Quick, A. E., Ollivett, T. L., Kirkpatrick, B. W., & Weigel, K. A. (2020). Genomic analysis of bovine respiratory disease and lung consolidation in preweaned Holstein calves using clinical scoring and lung ultrasound. *Journal of Dairy Science*, *103*(2), 1632-1641. doi: 10.3168/jds.2019-16531
- Robbins, C. M., Tembe, W. A., Baker, A., Sinari, S., Moses, T. Y., Beckstrom-Sternberg, S., Beckstrom-Sternberg, J., Barrett, M., & Carpten, J. D. (2011). Copy number and targeted mutational analysis reveals novel somatic events in metastatic prostate tumors. *Genome Research*, *21*(1), 47-55. doi: 10.1101/gr.107961.110
- Rostamzadeh Mahdabi, E., Esmailzadeh, A., Ayatollahi Mehrgardi, A., & Asadi Fozzi, M. (2021). A genome-wide scan to identify signatures of selection in two Iranian indigenous chicken ecotypes. *Genetic Selection Evolution*, *53*(1), 72. doi: 10.1186/s12711-022-00720-y
- Sanchez, M. P., Guatteo, R., Davergne, A., Saout, J., Grohs, C., Deloche, M. C., Taussat, S., Fourichon, C., & Boichard, D. (2020). Identification of the ABCC4, IER3, and CBFA2T2 candidate genes for resistance to paratuberculosis from sequence-based GWAS in Holstein and Normande dairy cattle. *Genetic Selection Evolution*, *52*(1), 14. doi: 10.1186/s12711-020-00535-9
- Saravanan, K. A., Panigrahi, M., Kumar, H., Parida, S., Bhushan, B., Gaur, G. K., Dutt, T., Mishra, B. P., & Singh, R. K. (2021). Genomic scans for selection signatures revealed candidate genes for adaptation and production traits in a variety of cattle breeds. *Genomics*, *113*(3), 955-963. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.02.009
- Vardi, I., Barel, O., Sperber, M., Schvimer, M., Nunberg, M., Field, M., Ouahed, J., Marek-Yagel, D., Weiss, B., & Shouval, D. S. (2018). Genetic and structural analysis of a SKIV2L mutation causing tricho-hepatoenteric syndrome. *Digestive Diseases and Sciences*, *63*(5), 1192-1199. doi: 10.1007/s10620-018-4983-x
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, *38*(6), 1358-1370. doi: 10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, *1*, 395-420. doi: 10.1111/j.1558-5646.1965.tb01731.x
- Yurchenko, A. A., Daetwyler, H. D., Yudin, N., Schnabel, R. D., Vander Jagt, C. J., Soloshenko, V., Lhasaranov, B., Popov, R., Taylor, J. F., & Larkin, D. M. (2018). Scans for signatures of selection in Russian cattle breed genomes reveal new candidate genes for environmental adaptation and acclimation. *Scientific Reports*, *8*(1), 12984. doi: 10.1038/s41598-018-31304-w
- Zhao, F., McParland, S., Kearney, F., Du, L., & Berry, D. P. (2015). Detection of selection signatures in dairy and beef cattle using high-density genomic information. *Genetics Selection Evolution*, *47*(1), 49. doi: 10.1186/s12711-015-0127-3