



Research Paper

Comparison of Skin Tissue Gene Expression Between Tick-Susceptible and Tick-Resistant Cattle Using Transcriptomics Data

Hossein MoradiShahrbabak^{1*}, Milad GholamiTahoone², Shaghayegh Jalilian³, Shakila Farmani³, Marjan Jafari³

1- Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: hmoradis@ut.ac.ir,  0000-0002-6680-7662

2- PhD Candidate in Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

3- MSc Student in Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	Tick infestation is one of the major challenges facing the livestock industry. The present study aimed to identify key differentially expressed genes (DEGs) and perform gene ontology (GO) analysis between two groups of tick-resistant and tick-susceptible cattle using RNA-sequencing (RNA-seq) data from skin tissue (10 samples in two groups, with 5 biological replicates each). Cattle were classified into resistant and susceptible groups based on the number of adult female ticks attached to the animal's body surface under natural infestation conditions. Preprocessing, alignment, and differential expression analysis of the reads were performed using FastQC, Trimmomatic, Hisat2, Samtools, and Cufflinks, respectively, while gene ontology analysis was carried out using the DAVID database. After quality control, and with an alignment rate to the reference genome exceeding 99.9%, 44 genes out of 37,820 annotated gene IDs were identified as significantly differentially expressed ($q\text{-value} < 0.05$); applying the threshold $\log_2(FC) > 2$ ultimately yielded 19 key candidate genes. The results of gene ontology and KEGG pathway analyses revealed the key genes such as MX2, ISG15, IFI27, RSAD2, CCL20, IL1B, and CXCL3 play essential roles in the innate immune response, interferon signaling pathway, regulation of inflammatory cytokines, apoptosis, and immune cell chemotaxis. In resistant breeds, the rapid, targeted, and controlled activation of these genes appears to prevent chronic inflammation and tissue damage at the bite site. The identified key interferon-responsive genes and cytokines (particularly ISG15, MX2, and IL1B) can be considered as molecular candidates for explaining the differential response of resistant and susceptible cattle to tick infestation.
Article history: Received: 29 June 2026 Accepted: 31 August 2026 Published online: Summer 2026	
Keywords: Cattle, Differential Genes Expression, RNA-seq (transcriptomics), Gene ontology, Tick	

Cite this article: MoradiShahrbabak, H., GholamiTahoone, M., Jalilian, Sh. Farmani, Sh. & Jafari, M. (2026). Comparison of Skin Tissue Gene Expression Between Tick-Susceptible and Tick-Resistant Cattle Using Transcriptomics Data. *Journal of Livestock Research*, 8 (2), 111-124. DOI: 10.22077/jlr.2026.11944.1069

Publisher: The University of Birjand Press.

DOI: <https://doi.org/10.22077/jlr.2026.11944.1069>

Extended Abstract

Introduction

Tick infestation caused by hard ticks remains one of the most economically important challenges in livestock production, reducing weight gain, milk yield, hide quality, and animal welfare. The widespread development of resistance to chemical acaricides has increased interest in host genetic resistance as a sustainable component of tick control. However, the molecular mechanisms underlying inter-individual and breed-level differences in tick resistance are not fully understood. The present study was therefore designed to identify key differentially expressed genes (DEGs) and to characterize their gene ontology (GO) and biological pathways in skin tissue of tick-resistant and tick-susceptible Braford cattle using RNA-sequencing (RNA-seq) data. A further objective was to determine whether the identified genes could serve as candidate molecular markers for genetic improvement of tick resistance in cattle.

Methods

This study used publicly available RNA-seq data originally generated from skin tissue of Braford cattle and deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under BioProject PRJNA931982 (SRAx19292483). The animals were maintained at the Embrapa Pecuária Sul research station in Bagé, southern Brazil. Before the experiment, cattle were kept tick-free for three months and treated with acaricides every two weeks. Artificial infestation was performed with approximately 20,000 *Rhipicephalus microplus* larvae. Phenotypic classification was based on estimated breeding values (EBV) for tick counts: resistant animals had EBV at least one standard deviation below the population mean, whereas susceptible animals had EBV at least one standard deviation above the mean. For the present analysis, 10 skin tissue RNA-seq samples were selected, comprising five resistant and five susceptible animals. The sequencing reads were paired-end with a length of 100 bp. Quality control was performed with FastQC (v0.11.9), and read trimming was conducted using Trimmomatic (v0.39). Reads were aligned to the bovine reference genome ARS-UCD2.0 with annotation ARS-UCD2.0.115 from Ensembl using Hisat2 (v2.2.1). BAM files were processed with Samtools, and transcript assembly and differential expression analysis were carried out using Cufflinks/Cuffdiff (v2.2.1). Genes with $q\text{-value} < 0.05$ were considered significantly differentially expressed. A stricter threshold of $|\log_2 \text{fold change}| > 2$ was then applied to identify key indicator genes. Functional enrichment analysis, including GO terms and KEGG pathways, was performed using the DAVID database. Protein–protein interaction (PPI) networks were analyzed using the STRING database.

Results

After quality control and bioinformatic filtering, more than 99.9% of reads aligned to the reference genome, indicating high data reliability. Among 37,820 annotated gene IDs, 44 genes showed significant differential expression ($q < 0.05$) between resistant and susceptible cattle. Applying the $|\log_2 \text{FC}| > 2$ threshold reduced this set to 19 key indicator genes. These included interferon-responsive genes such as MX2, ISG15, IFI27, RSAD2, IFI44, and IFI44L, as well as immune and inflammatory genes such as CCL20, IL1B, CXCL3, GRO1, and PLIN1. Functional enrichment analysis revealed that the key genes were significantly enriched in biological processes related to immune response ($\text{FDR} = 1.02\text{e-}05$), defense response to other organisms ($\text{FDR} = 5.12\text{e-}05$), defense response to virus ($\text{FDR} = 0.0017$), response to stress ($\text{FDR} = 0.0017$), response to cytokine ($\text{FDR} = 0.0050$), innate immune response ($\text{FDR} = 0.0476$), positive regulation of T-cell cytokine production, and response to stimulus. KEGG pathway analysis identified involvement in influenza A, cytokine–cytokine receptor interaction, chemokine signaling, TNF signaling, and NF-kappa B signaling.

The STRING PPI network showed that many of these genes formed an interconnected module centered on interferon signaling, innate immunity, cytokine regulation, apoptosis, and immune cell chemotaxis. In resistant cattle, the expression pattern suggested rapid, targeted, and controlled activation of interferon-responsive and inflammatory genes at the tick bite site, which appeared to limit chronic inflammation and tissue damage. In contrast, susceptible cattle showed delayed and prolonged expression of inflammatory and chemotactic genes, leading to excessive neutrophil recruitment, dysregulated inflammation, and tissue injury without effective tick rejection.

Conclusion

Taken together, these findings indicate that tick resistance in cattle is a complex polygenic trait governed by coordinated modules of innate immune, interferon-related, and inflammatory genes in the skin. The identified key genes, especially ISG15, MX2, IL1B, CCL20, and CXCL3, may serve as candidate molecular markers for understanding the differences between resistant and susceptible animals and for future validation studies on genetic resistance to ticks. Incorporating such markers into breeding programs could support more sustainable and targeted selection of tick-resistant cattle, although further experimental validation in independent populations is warranted.

Keywords: Cattle, Differential Gene Expression, Gene Ontology, Tick, Transcriptomics

Author Contributions

“Conceptualization, Supervision, Project administration, and Final approval: H.M.Sh.; Methodology, Formal analysis, and Statistical processing: M.Gh.T.; Writing – original draft, Editing, and Reviewing: Sh.J.; Investigation, Validation, and Interpretation of secondary results: Sh.F.; Data curation and Resources: M.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Conflict of interest

The authors have no competing interests.

مقاله پژوهشی

مقایسه‌ی بیان ژن‌های بافت پوست بین گاوهای حساس و مقاوم به کنه با استفاده از داده‌های حاصل از رونوشت‌ها

حسین مرادی شهرابک^{۱*}، میلاد غلامی طاحونه^۲، شقایق جلیلیان^۳، شکیلا فرمانی^۳، مرجان جعفری^۳

۱- دانشیار گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. hmoradis@ut.ac.ir

۲- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام و طیور، گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام و طیور، گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

آلودگی به کنه‌های سخت از چالش‌های عمده صنعت دامپروری است. پژوهش حاضر با هدف شناسایی ژن‌های شاخص با بیان افتراقی و آنالیز هستی‌شناسی آن‌ها بین دو گروه گاوهای حساس و مقاوم به کنه با استفاده از اطلاعات رونوشت بافت پوست (۱۰ نمونه در قالب دو گروه ۵ تکراری) انجام شد. تفکیک گاوها به دو گروه حساس و مقاوم بر اساس شمارش تعداد کنه‌های بالغ ماده چسبیده به سطح بدن دام تحت شرایط آلودگی طبیعی صورت گرفته بود. پیش‌پردازش، هم‌ردیفی و آنالیز بیان افتراقی توالی‌ها به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای *Trimmomatic*، *FastQC*، *Samtools*، *Hisat2* و *Cufflinks* انجام پذیرفت و تحلیل هستی‌شناسی ژن‌ها از طریق پایگاه داده *DAVID* صورت گرفت. پس از کنترل کیفی و کسب نرخ هم‌ردیفی بیش از ۹۹٫۹ درصد بر ژنوم مرجع، از میان ۳۷٫۸۲۰ شناسه ژنی، تعداد ۴۴ ژن دارای بیان افتراقی معنادار ($q\text{-value} < 0.05$) شناسایی شد که در نهایت با اعمال آستانه $|\log_2(FC)| > 2$ تعداد ۱۹ ژن شاخص تعیین گردید. نتایج آنالیز هستی‌شناسی و مسیرهای *KEGG* نشان داد ژن‌های کلیدی نظیر *IL1B*، *CCL20*، *RSAD2*، *IFI27*، *CXCL3* نقش اساسی در پاسخ ایمنی ذاتی، مسیرهای سیگنال‌دهی اینترفرون، تنظیم سایتوکاین‌های التهابی، آپوپتوز و کموتاکسی سلول‌های ایمنی ایفا می‌کنند؛ به‌طوری‌که نژادهای مقاوم با فعال‌سازی سریع، هدفمند و کنترل‌شده این ژن‌ها، مانع از بروز التهاب مزمن و آسیب بافتی در محل گزش می‌شوند. ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به اینترفرون و سایتوکاین‌های شناسایی‌شده (به‌ویژه *IL1B* و *MX2*) می‌توانند به عنوان کاندیدا‌های مولکولی برای تبیین تفاوت پاسخ گاوهای مقاوم و حساس به آلودگی کنه قرار گیرند.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۴/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۰۹

تاریخ انتشار: تابستان ۱۴۰۵

واژگان کلیدی:

بیان افتراقی ژن، رونوشت، کنه، گاو، هستی‌شناسی

استناد: مرادی شهرابک، حسین؛ غلامی طاحونه، میلاد؛ جلیلیان، شقایق؛ فرمانی، شکیلا و جعفری، مرجان (۱۴۰۵). مقایسه‌ی بیان ژن‌های بافت پوست بین گاوهای حساس و مقاوم به کنه با استفاده از داده‌های حاصل از رونوشت‌ها. *مجله تحقیقات دام و طیور*، دوره ۸، شماره ۱، ۱۱۱-۱۲۴.

DOI:10.22077/jlr.2026.11944.1069

مقدمه

آلودگی به کنه‌های سخت و بیماری‌های پوستی ناشی از آن، یکی از چالش‌های جدی صنعت دامپروری است که با کاهش بهره‌وری و افت کیفیت محصولات دامی، خسارات اقتصادی سنگینی به همراه دارد و پایداری سیستم‌های تولید دام را با چالش مواجه می‌سازد (FAO, 2020; Jonsson et al., 2000). یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های پوستی در گاوها، آلودگی به کنه‌های سخت به‌ویژه گونه‌های متعلق به جنس *Rhipicephalus* است. این انگل‌های خارجی با تغذیه از خون میزبان، علاوه بر ایجاد ضایعات پوستی و تحریک واکنش‌های التهابی، به‌عنوان ناقل عوامل بیماری‌زای متعددی عمل می‌کنند. آلودگی به کنه موجب کاهش وزن، افت راندمان تولید شیر، افزایش حساسیت به سایر بیماری‌ها و در موارد شدید، ضعف عمومی و کاهش طول عمر اقتصادی دام می‌شود. از سوی دیگر، مقاومت روزافزون کنه‌ها به کنه‌کش‌های شیمیایی، ضرورت اتخاذ رویکردهای پایدارتر و مبتنی بر ویژگی‌های زیستی میزبان را بیش از پیش آشکار ساخته است (Ghosh et al., 2013). با این حال، مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پاسخ گاوها به آلودگی کنه یکنواخت نیست و تفاوت‌های فردی قابل‌توجهی در میزان مقاومت یا حساسیت به این انگل وجود دارد که بخش مهمی از آن می‌تواند ریشه در تفاوت‌های ژنتیکی داشته باشد. مطالعات اولیه نشان داده‌اند که تفاوت‌های نژادی، نقش اساسی در مقاومت به آلودگی کنه دارد؛ نژادهای *Bos indicus* نسبت به *Bos taurus* بار کنه پایین‌تری دارند که این تفاوت، به پاسخ ایمنی ذاتی و سلولی بستگی دارد (Turner et al., 2022).

با این حال، حتی درون نژادهای *Bos taurus* نظیر برفورد نیز تفاوت‌های فردی چشمگیری در مقاومت یا حساسیت به کنه مشاهده می‌شود. مطالعات رونوشت نشان داده‌اند که در گاوهای مقاوم، فرآیندهای التهاب و بازسازی بافتی سطح بیان بالاتری دارند. در مقابل، گاوهای حساس اغلب افزایش بیان ژن‌هایی را نشان می‌دهند که می‌تواند به تضعیف پاسخ ایمنی یا افزایش جذابیت میزبان برای کنه‌ها منجر شود (Piper et al., 2010; Franzin et al., 2017; Mantilla Valdivieso et al., 2024).

در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های چشمگیر در حوزه مطالعات رونوشت، امکان بررسی جامع الگوهای بیان ژن را فراهم ساخته است. تحلیل بیان ژن با استفاده از تکنیک‌هایی نظیر *RNA-Seq* به‌عنوان ابزاری قدرتمند برای شناسایی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در پاسخ‌های ایمنی، التهاب، ترمیم بافت و سازگاری میزبان با عوامل بیماری‌زا مطرح شده است. این رویکردها امکان شناسایی ژن‌های کاندید، مسیرهای بیولوژیکی کلیدی و تغییرات تنظیمی در سطح ژنوم را فراهم می‌کنند و می‌توانند اطلاعات ارزشمندی برای استفاده در برنامه‌های اصلاح نژاد دام ارائه دهند (Tromp et al., 2018; Bhat et al., 2019).

با توجه به اهمیت اقتصادی آلودگی کنه، تنوع پاسخ‌های میزبان و ظرفیت بالای تحلیل داده‌های رونوشت، این مطالعه با هدف شناسایی ژن‌های شاخص با بیان افتراقی و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با مقاومت به کنه در بافت پوست گاوهای برفورد طراحی شده است. پرسش اصلی این پژوهش آن است که چه تفاوت‌هایی در پروفایل بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی، التهاب و ترمیم بافت بین گاوهای مقاوم و حساس وجود دارد و آیا این ژن‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاح نژاد و انتخاب دام‌های مقاوم به کنه مورد استفاده قرار گیرند؟

در مطالعات جدیدتر نیز استفاده از داده‌های رونوشت و روش‌های زیست‌شناسی سامانه‌ای، اطلاعات ارزشمندی درباره‌ی سازوکارهای مولکولی مقاومت به کنه فراهم کرده است. برای نمونه، Carvalho و همکاران (۲۰۲۴) با تلفیق داده‌های ژنومی و بیان ژن در گاوهای برفورد، ژن‌ها و مسیرهای متعددی از جمله مسیرهای *JAK/STAT*، *NF-kB* و *WNT/B-catenin* را در ارتباط با مقاومت به کنه شناسایی کردند. همچنین، Mantilla Valdivieso و همکاران (۲۰۲۴) با بررسی رونوشت پوست گاو، تفاوت‌های بیان ژن میان دام‌های با مقاومت بالا و پایین به کنه را نشان داده و نقش پاسخ‌های ایمنی و التهابی را در تفاوت مقاومت میزبان مورد تأکید قرار دادند. این یافته‌ها اهمیت استفاده از داده‌های بیان ژن و تجزیه و تحلیل‌های عملکردی را برای شناسایی عوامل مولکولی مؤثر بر مقاومت به کنه نشان می‌دهد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از داده‌های رونوشت بافت پوست دو گروه گاو برافورد (مقاوم و حساس به کنه) استفاده شد که توسط بخش سلامت حیوانات شرکت تحقیقات کشاورزی برزیل (*Embrapa*) تولید و در پایگاه اطلاعاتی *NCBI* با فرمت *SRA* و شماره دسترسی *SRX19292485* به صورت عمومی منتشر شده است (*More' et al., 2019*). این حیوانات (تلیسه‌های نژاد برافورد) در ایستگاه آزمایشی *EMBRAPA Pecua'ria Sul* واقع در شهر باژه، در جنوب برزیل، نگهداری شدند. پیش از شروع آزمایش، دام‌ها به مدت سه ماه در مرتع عاری از کنه و تحت درمان ضدکنه (هر دو هفته یکبار) نگهداری شدند تا کاملاً عاری از آلودگی گردند. سپس هر دام تحت چهار مرحله آلودگی مصنوعی با فاصله‌ی ۱۴ روز قرار گرفت؛ در هر مرحله، حدود ۲۰۰۰۰ لارو کنه‌ی *Rhipicephalus microplus* (حاصل از یک گرم تخم کنه) بر روی خط پشتی بدن دام، از ناحیه‌ی گردن تا دم، رهاسازی شد. تعیین گروه حساس (*S*) و مقاوم (*R*) بر اساس ارزش‌های اصلاحی برآوردشده برای شمارش تعداد کنه، از میان جمعیتی بزرگ‌تر از دام‌ها صورت گرفت؛ به‌طوری‌که دام‌های مقاوم دارای *EBV* پایین‌تر (حداقل یک انحراف معیار زیر میانگین گروه) و دام‌های حساس دارای *EBV* بالاتر (حداقل یک انحراف معیار بالای میانگین گروه) بودند. نمونه‌برداری بافت پوست از هر دام در دو نوبت انجام شد: پیش از اولین آلودگی مصنوعی (به عنوان نمونه پایه) و ۲۴ ساعت پس از چهارمین آلودگی مصنوعی. کتابخانه *mRNA* تهیه شده شامل ۱۰ نمونه بافت پوست (هر گروه شامل پنج نمونه) است، که با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید (سامانه *Illumina HiSeq 1500*) توالی‌یابی شده بودند. خوانش‌های حاصل از توالی، به صورت دوسویه (رفت و برگشت) با طول ۱۰۰ جفت باز بودند. داده‌های خام تولید شده در آن پژوهش، از تاریخ ۰۱ دسامبر ۲۰۲۳ به صورت رایگان و عمومی در پایگاه اطلاعاتی *NCBI* تحت شماره دسترسی: *PRJNA931982* در دسترس قرار گرفته‌اند. این پروژه مجموعاً شامل ۵۰ نمونه‌ی توالی‌یابی شده است که از میان آن‌ها، ۱۰ نمونه‌ی مربوط به بافت پوست (پنج نمونه از گروه حساس و پنج نمونه از گروه مقاوم به کنه) جهت انجام تجزیه و تحلیل‌های پژوهش حاضر انتخاب و استفاده شدند. پس از اخذ داده‌ها، تمامی مراحل آماده سازی و تجزیه و تحلیل آن‌ها در محیط گرافیکی (*GNU*) سیستم‌عامل *Linux Ubuntu* نسخه ۲۴،۰۲ سری ۶۴ بیت به ترتیب مراحل انجام شد: تبدیل فرمت داده‌ها از *sra* به *fastq* با استفاده از نرم‌افزار *sratoolkit* (v2.10.2) انجام شد؛ سنجش کیفیت داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار *fastQC* (v0.11.9) (*Andrews, 2010*) در محیط جاوا با کمک منوی اصلی، سنجش برای خوانش‌ها به طور جداگانه با ۱۰ آزمون مختلف انجام شد. آزمون‌های انجام شده عبارت‌اند از: گزارش حاوی آماره‌های پایه، کیفیت توالی به ازای هر باز، امتیاز کیفیت به ازای توالی، محتوای نوکلئوتیدی توالی به ازای هر باز، محتوای *GC* به ازای توالی، محتوای باز خواننده نشده (*N*) به ازای هر باز، توزیع طول توالی‌ها، تکراری بودن توالی، توالی‌هایی که بیش از حد وجود دارند و محتوای آدپتوری جهت ویرایش داده‌ها با در نظر گرفتن حداقل طول خوانش‌ها ۲۵ جفت باز و نیز کیفیت توالی به ازای هر باز، از نرم‌افزار *Trimmomatic* (v0.39) استفاده شد (*Bolger et al., 2014*) و به منظور اطمینان از ویرایش صحیح، کیفیت سنجی مجدد با نرم‌افزار *fastQC* انجام گرفت شد. به منظور هم‌ردیفی و مکان‌یابی خوانش‌ها، آخرین نسخه به‌روز شده قابل دسترس در زمان انجام پژوهش ژنوم مرجع گاو، *ARS-UCD2.0*، به همراه فایل حاشیه‌نویسی مربوطه، *ARS-UCD2.0.115*، از بانک اطلاعاتی *Ensemble* دریافت شد. نمایه کردن ژنوم مرجع و نیز هم‌ردیفی خوانش‌های کوتاه بر روی ژنوم مرجع با استفاده از نرم‌افزار *Hisat2* (v2.2.1) انجام شد (*Kim et al., 2015*). جهت تولید فایل با فرمت *BAM* و نیز مرتب و ایندکس کردن فایل‌های *BAM* تولید شده، از پکیج نرم‌افزاری *Samtools* استفاده شد (*Li et al., 2009*). به منظور هم‌ردیفی خوانش‌ها و سرهم کردن رونوشت‌های موجود، از بسته نرم‌افزار *Cufflinks* (v2.2.1) استفاده شد (*Trapnell et al., 2012*)، سپس رونوشت‌های تشکیل شده از هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار *Cuffmerge* با یکدیگر ادغام شده و برای تست آماری میزان بیان ژن بین دو زیرگروه، از نرم‌افزار *Cuffdiff* استفاده شد. فایل خروجی آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها با استفاده از *Excel* قابل مشاهده است ولی برای مصورسازی نتایج در قالب پلات و گراف‌های قابل فهم‌تر از نرم‌افزار *R* استفاده شد. در انتها، آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های شاخص به وسیله پایگاه *DAVID* انجام گردید.

نتایج و بحث

پس از اخذ داده‌ها از پایگاه اطلاعاتی و انجام سنجش کیفیت بر روی خوانش‌های رفت و برگشت هر یک از نمونه‌ها، طبق گزارش حاوی آماره‌های پایه قبل از ویرایش مشخص گردید، توالی‌ها چهار میلیون خوانش کوتاه جفتی با طول ۱۰۰ جفت باز و میزان *CG*

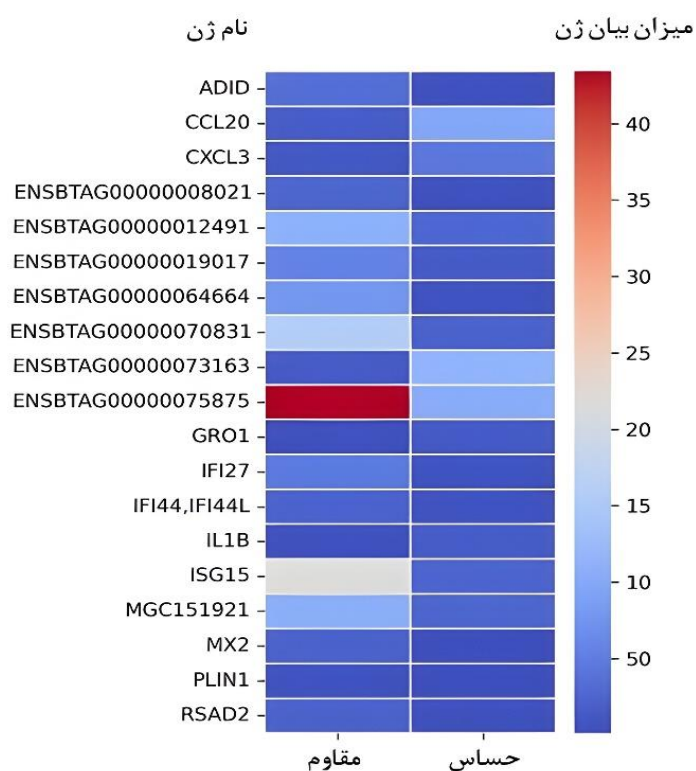
۵۰ درصد هستند؛ در نتیجه طبق گزارش حاوی آماره‌های پایه پس از ویرایش مشخص گردید، نزدیک سه میلیون خوانش با کیفیت مناسب برای نمونه‌ها باقی ماند و کمتر از ۲۵ درصد از کل خوانش‌ها کنار گذاشته شد. طبق اطلاعات خروجی در انتهای آنالیز هم‌ردیفی و مکان‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع، میانگین درصد مکان‌یابی خوانش‌ها بر یک محل مشخص، بیش از ۹۰ درصد و نیز نرخ هم‌ردیفی کلی بیش از ۹۹٫۹ درصد برآورد گردید. در ادامه با تشکیل پروفایل بیان ژن برای هر یک از گروه‌های حاوی نمونه، انجام آنالیز بیان افتراقی بین دو گروه و نیز تجزیه و تحلیل نتایج، ۳۷۸۲۰ شناسه ژن شناسایی شد. از ۳۷۸۲۰ شناسه ژن شناسایی شده، ۴۴ شناسه ژن در مقایسه بین این دو گروه بیان متفاوت و معناداری داشتند ($P < 0.05$)، در نهایت به جهت رسیدن به تصویر مناسبی از تغییرات بیان و نیز شناسایی شاخص‌ترین ژن‌ها، تنها ژن‌های با $\log_2(\text{fold_change})$ بیشتر از ۲+ و کمتر از ۲- برای مطالعه انتخاب شدند، که شامل ۱۹ ژن می‌باشد (جدول ۱ و شکل ۱).

در مجموع، نتایج تجزیه و تحلیل بیان افتراقی نشان داد که اگرچه ۴۴ ژن بین دو گروه مقاوم و حساس دارای تفاوت بیان معنادار بودند، اعمال معیار $|\log_2(FC)| > 2$ سبب شناسایی ۱۹ ژن شاخص با شدت تغییر بیان بیشتر شد. این ژن‌ها عمدتاً در فرآیندهای مرتبط با پاسخ‌های ایمنی و التهابی، پاسخ به اینترفرون و دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا مشارکت داشتند. بنابراین، تمرکز بر ژن‌های دارای تغییر بیان شدید و معنادار، مجموعه‌ای محدودتر از ژن‌های شاخص را مشخص کرد که از نظر عملکرد زیستی می‌توانند در تبیین تفاوت میان گاوهای مقاوم و حساس به آلودگی کنه مورد توجه قرار گیرند.

جدول ۱- ویژگی ژن‌های کلیدی با بیان متفاوت و معنادار میان دو گروه گاوهای حساس و مقاوم

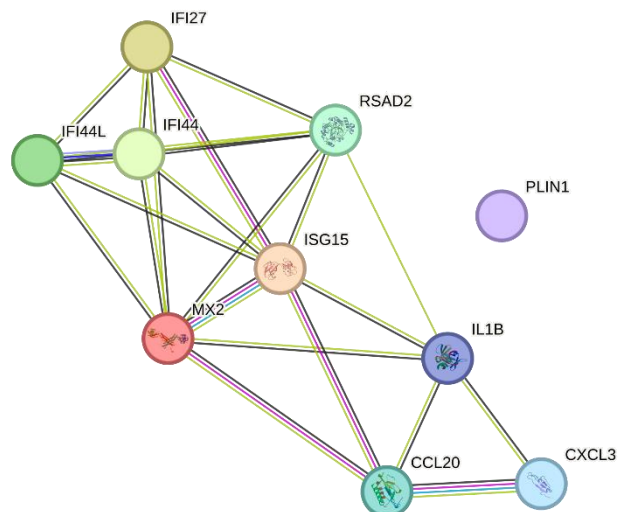
Table 1- Characteristics of key genes with differential and significant expression between two groups of susceptible and resistant cattle.

نام ژن	جایگاه	میزان معیار $\log_2(FC)$	سطح معناداری $P\text{-value}$
MX2	1:141621130-141658223	-3.59	0.017
ENSBTAG00000064664	NKLS02002204.1:130128-204814	-3.58	0.017
ADID	1:80414395-80427624	-3.35	0.017
ISG15	16:51464069-51465109	-3.25	0.017
IFI27	21:58735049-58744444	-3.12	0.017
ENSBTAG00000073163	Y:2699032-2709150	3.12	0.017
ENSBTAG00000070831	17:71096222-71137610	-2.97	0.017
CCL20	2:115948296-115951983	2.65	0.017
RSAD2	11:90038204-90056373	-2.45	0.017
ENSBTAG00000008021	7:5726477-5739649	-2.36	0.017
ENSBTAG00000019017	29:51003745-51006379	-2.17	0.017
MGC151921	Y:2929132-2936415	-2.13	0.017
IFI44, IFI44L	3:66023941-66071430	-2.10	0.017
IL1B	11:46543407-46551924	2.09	0.017
GRO1	6:89072772-89075121	2.09	0.017
ENSBTAG00000012491	X:137255133-137260688	-2.08	0.046
ENSBTAG00000075875	Y:2814979-2821820	-2.07	0.028
PLIN1	21:21077997-21092420	-2.06	0.017
CXCL3	6:89061304-89063355	2.06	0.017



شکل ۱- نقشه حرارتی بر اساس سطوح بیان ژن دو گروه گاو حساس و مقاوم

Figure 1-Heatmap based on the gene expression levels of the two groups of susceptible and resistant cattle.



شکل ۲- شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین ژن‌های شاخص با بیان متفاوت بین دو گروه گاو حساس و مقاوم (تجزیه و تحلیل شده با پایگاه STRING)

Figure 2-Protein-protein interaction network of key differentially expressed genes between the two groups of susceptible and resistant cattle (analyzed using the STRING database)

جدول ۲- نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی ژن‌های شاخص با پایگاه STRING
Table 2-Results of functional enrichment analysis of key genes using the STRING database.

رده	شناسه	توضیح	تعداد ژن در شبکه	FDR
GO-BP	GO:0006955	پاسخ ایمنی	۸ از ۹۹۵	1.02e-05
GO-BP	GO:0098542	پاسخ دفاعی به سایر ارگانیسم‌ها	۷ از ۷۷۵	5.12e-05
GO-BP	GO:0006950	پاسخ به استرس	۸ از ۲۵۲۷	0.0017
GO-BP	GO:0051607	پاسخ دفاعی به ویروس	۴ از ۱۹۳	0.0017
GO-BP	GO:0034097	پاسخ به سیتوکین	۵ از ۶۵۳	0.0050
GO-BP	GO:0045087	پاسخ ایمنی ذاتی	۴ از ۵۲۴	0.0476
GO-BP	GO:0002726	تنظیم مثبت تولید سیتوکین سلول T	۲ از ۲۰	0.0348
GO-BP	GO:0050896	پاسخ به محرک	۱۰ از ۷۳۵۰	0.0159
KEGG	Bta05164	آنفلوآنزای A	۳ از ۱۶۰	0.0156

به منظور بررسی الگوی عملکردی مشترک میان ژن‌های شاخص شناسایی شده، تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی با استفاده از پایگاه STRING بر روی این مجموعه ژن انجام شد (شکل ۲ و جدول ۲). نتایج نشان داد که این ژن‌ها به طور معنا داری در فرآیندهای زیستی "پاسخ ایمنی" ($FDR=1.02e-05$; GO:0006955)، "پاسخ دفاعی به سایر ارگانیسم‌ها" ($FDR=5.12e-05$)، "پاسخ دفاعی به ویروس" ($FDR=0.0017$; GO:0051607) غنی شده‌اند. همچنین این ژن‌ها در مسیر "آنفلوآنزای A" (KEGG: bta05164) نقش مشترک دارند. این یافته‌ها به روشنی نشان می‌دهند که ژن‌های شاخص شناسایی شده در این پژوهش، به‌جای عمل مستقل و مجزا از یکدیگر، بخشی از یک شبکه‌ی هماهنگ پاسخ ایمنی ذاتی و ضدویروسی هستند که عمده‌تاً توسط مسیر سیگنال‌دهی اینترفرون تنظیم می‌شود.

با توجه به آنالیز هستی‌شناسی و نیز آنالیز مسیر دانشنامه کیوتو ژن و ژنوم (KEGG) مربوط به ژن‌های شاخص با بیان متفاوت و معنادار، ژن *MX2* در پاسخ ایمنی و پاسخ دفاعی در برابر ویروس، پاسخ به اینترفرون آلفا، تنظیم چرخه سلولی و مسیرهای مربوط به بیماری‌های هپاتیت، سرخک و انواع آنفلوآنزا نقش دارد؛ با افزایش بیان بیش از ۱۲ برابری آن در گروه مقاوم، خود می‌تواند به عنوان عاملی بر افزایش سطوح انواع پاسخ‌های ایمنی باشد. ژن *ISG15* در تنظیم فرآیند سیستم ایمنی، فرآیند کاتابولیک پروتئین وابسته به یوبیکوئیتین، پروتئین پس از ترجمه که غشای شبکه آندوپلاسمی را هدف قرار می‌دهد، کونژوگاسیون پروتئین *ISG15*، پاسخ دفاعی به باکتری، تنظیم مثبت فرآیند های ارگانیسم‌های چند سلولی، پاسخ دفاعی به ویروس و اتصال پروتئین وابسته به اصلاح پلی یوبیکوئیتین نقش دارد؛ در پژوهشی با هدف بررسی رونوشت‌های پوست گاوهای *Brangus* با مقاومت بالا (*HR*) و مقاومت پایین (*LR*) در دو دوره قبل از آلودگی (*T0*) و ۱۲ هفته پس از چالش با *Rhipicephalus australis*، نتایج نشان داده است که در دوره قبل از آلودگی، هیچ ژن افتراقی بین دو گروه با مقاومت بالا و با مقاومت پایین وجود نداشته و در ۱۲ هفته‌ی بعد از آلودگی، در گاو های حساس (*LR*)، بیان ژن *ISG15* افزایش یافته و منجر به پاسخ التهابی مزمن و فعال شدن اینترفرون نوع ۱^۱ شده است (زارع و همکاران، ۱۴۰۲). لازم به ذکر است که مطالعه مذکور، بر روی نژاد و مجموعه داده های کاملاً متفاوتی (گاوهای برانگوس، طراحی طولی قبل و پس از آلودگی مصنوعی با *Rhipicephalus australis*) نسبت به مجموعه داده‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر (گاوهای برافورد) انجام شده است و هم‌سویی نتایج دو مطالعه در ژن *ISG15*، مؤید نقش این ژن در پاسخ ایمنی ضدکنه در نژادهای مختلف گاو است. در پژوهشی دیگر، نشان داده شده که پروتئین *ISG15* در رحم گاو نقش کلیدی در اوایل بارداری داشته و بیان آن توسط اینترفرون نوع I تحریک می‌شود؛ درواقع، ثابت شده که این ژن در سلول های لوتئال تخمدان فعال می‌شود تا محیط را برای پذیرش جنین آماده کند (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۴). ژن *IFI27*، در آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری، مسیر سیگنالینگ آپوپتوز داخلی و غشای میتوکندری نقش دارد؛ پایپر و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهش خود، با هدف بررسی

دلیل مقاومت بیشتر گاو های نژاد برهمن نسبت به گاو های نژاد هلشتاین^۲ در برابر کنه، متوجه شدند که در محل گزش کنه، گاو های هلشتاین، پاسخ التهابی شدید و غیرمؤثر نشان می‌دهند، در حالیکه گاو های برهمن، پاسخ های ایمنی کنترل شده‌تری دارند و به محض ترشح اینترفرون در محل گزش، بیان *IFI27* به شدت بالا می‌رود؛ این ژن با تنظیم تکثیر سلول های اپیدرمی و پاسخ های آپوپتوز، نقش کلیدی در محدود کردن نقش تغذیه‌ای کنه‌ها ایفا میکند. در پژوهشی دیگر نیز پایپر و همکاران (۲۰۰۹)، مشخص کردند که ژن های پاسخ دهنده به اینترفرون (*IFI27*) در نژاد مقاوم، بلافاصله بعد از نشستن کنه روی پوست، بیان بالایی پیدا می‌کنند که باعث می‌شود پوست سریعاً سد دفاعی ایجاد کند تا کنه نتواند به عروق خونی دسترسی پیدا کند. ژن *RSAD2* در پاسخ ایمنی ذاتی، تنظیم مثبت پاسخ ایمنی، پاسخ دفاعی به ویروس، فعالیت کاتالیزوری، اتصال یون فلزی و اتصال خوشه ای ۴ آهن، ۴ گوگرد نقش دارد؛ در پژوهش های ذکر شده مانند (مطالعه زارع و همکاران، ۱۴۰۲)، ژن *RSAD2* به عنوان یک عنصر کلیدی در پاسخ های ایمنی ذاتی، شناسایی شده است؛ و با توجه به یافته های پایپر (۲۰۰۹)، بیان بالای این ژن که ناشی از مسیرهای اینترفرونی است، در نژادهای مقاوم دیده شده که به عنوان یک سازوکار دفاعی برای محدود کردن آسیب‌های ناشی از بزاق کنه و عوامل بیماری‌زا در محل گزش عمل میکند. ژن *CCL20*، در کموتاکسی مونوسیت، پاسخ التهابی، پاسخ ایمنی، مسیر سیگنالینگ گیرنده متصل به پروتئین *G*، کموتاکسی نوتروفیل، تنظیم مثبت فعالیت *GTPase*، کموتاکسی لنفوسیت‌ها، مسیر سیگنالینگ با واسطه کموکاین، تنظیم مثبت آبشار *ERK1* و *ERK2*، پاسخ سلولی به اینترفرون نوع ۲، پاسخ سلولی به اینترلوکین-۱، پاسخ سلولی به فاکتور نکروز تومور، اتصال به گیرنده کموکاین *CCR* و فعالیت کموکاین نقش دارد؛ بر اساس آنالیزهای انجام شده توسط پایپر و همکاران (۲۰۰۸، ۲۰۰۹)، این ژن نقش کلیدی در فراخوانی سلول‌های ایمنی به محل گزش کنه در پوست گاو ایفا میکند. افزایش بیان این ژن در نژاد های مقاوم، نشان‌دهنده توانایی بالاتر این نژاد در پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی برای مقابله با انگل های خارجی است. در پژوهشی دیگر، با هدف بررسی تفاوت پاسخ گاو های حساس با گاو های مقاوم، نشان می‌دهد که در گاوهای حساس، برخلاف مقاوم، بیان *CCL20*، در محل گزش به شدت بالا می‌رود و این پاسخ، بیش از حد و ناهماهنگ است و عملاً به جای از بین بردن کنه، باعث آسیب بیشتر به بافت پوست گاو میشود (Piper et al., 2010). در تحقیقی، با هدف مقایسه پاسخ پوست به کنه در گاو های مقاوم و حساس، نتایج نشان داده است که در گاو های حساس، پاسخ های ایمنی با تأخیر اتفاق می‌افتد و سپس منجر به تولید شدید کموکاین‌هایی مانند *CCL20* می‌شود و باعث جذب گرانولوسیت‌ها و سلول‌های *T* به محل نیش می‌شود که این امر منجر به ایجاد پاسخ التهابی ناهماهنگ و در نهایت عدم مقاومت در برابر کنه می‌شود (Franzin et al., 2017). بر اساس نتایج تحلیل شبکه بیان ژن که توسط لی و همکاران (۲۰۲۰) انجام شده است، مسیرهای مربوط به کموکاین ها (*CCL20*)، جزء خوشه های اصلی هستند که مقاومت به کنه را تعیین می‌کنند؛ و مشخص شده که چندین ژن کلیدی از جمله *ISG15* و *CCL20*، به عنوان قطب اصلی در ایمنی پوست گاو شناسایی شده‌اند؛ بنابراین، مقاومت به کنه یک صفت چند ژنی پیچیده است که از طریق ماژول های ژنی در نژاد های مقاوم مدیریت می‌شود. ژن *ENSBTAG00000008021*، در پاسخ دفاعی به ویروس، پاسخ ایمنی ذاتی و فعالیت مهارکننده متالوآندوپتیداز نقش دارد. ژن *ENSBTAG00000019017*، در پاسخ به اینترفرون نوع ۲، پاسخ به اینترفرون آلفا، پاسخ به اینترفرون بتا، تنظیم منفی تکثیر ژنوم ویروسی، سرکوب تهاجم همزیست توسط میزبان، پاسخ دفاعی به ویروس و مسیر سیگنالینگ با واسطه اینترفرون نوع ۱، نقش دارد. ژن *MGC151921*، در اتصال مولکول‌های کوچک نقش دارد. ژن *IFI44*، در پاسخ به ارگاناسم دیگر و پاسخ ایمنی نقش دارد؛ در مطالعه‌ای با هدف شناسایی ژن‌های کلیدی در ایمنی پوست گاو در برابر کنه و درک تفاوت های نژادی در این مورد، مشخص شد که ژن *IFI44*، به عنوان یک ژن اصلی در پاسخ به آلودگی‌های پوستی شناسایی شد. افزایش بیان این ژن در همبستگی با سایر ژن‌های تحریک شونده توسط اینترفرون، نقش تعیین کننده‌ای در مدیریت پاسخ‌های دفاعی ذاتی در پوست گاو ایفا می‌کند (زارع و همکاران، ۱۴۰۲). فرانزین و همکاران (۲۰۱۷)، در بررسی پاسخ های ایمنی پوست دریافتند که ژن *IFI44*، به عنوان یک فاکتور کلیدی در مسیر سیگنال دهی اینترفرون، الگوی بیان متفاوتی در دو نژاد گاو نشان می‌دهد. نتایج نشان داده است که در نژادهای مقاوم، تحریک زود هنگام و هدفمند این ژن، منجر به ایجاد یک سد دفاعی مؤثر می‌شود، درحالیکه در نژادهای حساس، بیان با تأخیر و کنترل شده این ژن باعث بروز واکنش های التهابی شدید و عدم

1. Brahman

2. Holstein

3. Granulocytes

دفع کنه می‌شود. ژن *IFI44L* نیز در پاسخ ایمنی نقش دارد. ژن *ENSBTAG00000075875* نیز مانند *MGC151921* در اتصال مولکول‌های کوچک نقش دارد. در ارتباط با ژن *IL1B*، در پژوهشی، با هدف شناسایی و مقایسه مکانیسم‌های ژنتیکی و ایمنی در پوست گاوهای مقاوم و حساس برای درک چگونگی تفاوت در بیان سایتوکاین‌های اولیه (مثل *IL1B*)، که باعث ایجاد مقاومت یا حساسیت در برابر کنه می‌شود، مشخص شده است که بیان این ژن در گاوهای مقاوم، خیلی زودتر به اوج می‌رسد. برخلاف گاوهای حساس، در گاوهای مقاوم، مکانیسم‌های کنترل کننده بلافاصله بیان *IL1B* را پایین می‌آورد تا از التهاب مزمن جلوگیری شود. درواقع، توانایی ژنتیکی گاو در کنترل میزان ترشح *IL1B*، یکی از فاکتورهای تعیین کننده در مقاومت است (Carvalho et al., 2010). با توجه به مطالعات پایپر و همکاران (۲۰۰۸) که به آن اشاره شد، و هدف، کشف تفاوت‌های مولکولی که باعث مقاومت در کنه است، بود، نتایج نشان داده که تنظیم دقیق بیان این ژن در نژاد های مقاوم، مانع از بروز التهاب‌های سیستماتیک و مخرب در بافت پوست می‌شود؛ و نیز بر اساس پژوهش فرانزین و همکاران (۲۰۱۷)، که به آن اشاره شده، ژن *IL1B*، نه تنها به عنوان یک محرک التهابی، بلکه به عنوان تنظیم کننده پاسخ های بیوشیمیایی در پوست عمل می‌کند. در نژادهای حساس، بیان تأخیری و مزمن این ژن منجر به تضعیف سد دفاعی پوست می‌گردد، درحالی‌که در نژادهای مقاوم، بیان هماهنگ آن با سایر فاکتورهای ایمنی، مقاومت مؤثری در برابر کنه ایجاد می‌کند؛ در مطالعه‌ای دیگر، با هدف شناسایی ژن‌های محوری (*Hub*) و مسیرهای بیولوژیکی پنهانی که تفاوت مقاومت به کنه را در پوست دو نژاد مقاوم و حساس رقم می‌زند، با استفاده از تحلیل شبکه بیان ژن، مشخص شده است که در گاوهای مقاوم، شبکه *IL1B* به سرعت و به صورت هدفمند فعال و سپس غیرفعال می‌شود تا از بافت محافظت کند، و در گاوهای حساس، این ژن، باعث ایجاد یک پاسخ التهابی طولانی مدت و ناهماهنگ شده و به بافت آسیب می‌زند (De Silva et al., 2018). در ارتباط با ژن *CXCL3*، با توجه به یافته‌های پژوهش‌هایی که ذکر شده، به عنوان مثال در پژوهش پایپر و همکاران (۲۰۰۸)، در گاو های مقاوم، بیان ژن *CXCL3*، به صورت بسیار سریع و کوتاه مدت، افزایش می‌یابد و هدف فقط همان بخشی است که گزش رخ داده، ولی در گاوهای حساس، بیان این ژن ممکن است با تأخیر شروع شود و یا بیش از حد طول بکشد که این امر باعث می‌شود نوتروفیل‌ها به صورت پراکنده و زیاد، پوست را مورد هدف قرار دهند و موجب التهاب وسیع، ورم و آسیب به بافت گاو، بدون دفع کنه شوند. در پژوهش بعدی پایپر (۲۰۱۰)، نیز نتایج نشان داد که شدت پاسخ *CXCL3* در گاوهای حساس، مستقیماً با میزان ورم و آسیب‌های پوستی در محل نیش کنه در ارتباط است. بر اساس یافته‌های زارع و همکاران (۱۴۰۲) نیز، نتایج بیانگر این است که ژن *CXCL3*، مانند یک ایستگاه مرکزی عمل می‌کند که با تعداد زیادی از ژن‌های دخیل در التهاب و فراخوانی سلول‌ها در ارتباط مستقیم است. درواقع در نژادهای مقاوم، این ژن در شبکه‌ای با پایداری بیشتر قرار دارد و پاسخ را سریع‌تر شروع می‌کند و به محض رفع خطر، شبکه را به حالت تعادل برمی‌گرداند تا پوست آسیب نبیند. به منظور بررسی الگوی عملکردی مشترک میان این ژن‌ها، نتایج آنالیز هستی‌شناسی و مسیر *KEGG* با استفاده از پایگاه *DAVID* در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳- نتایج آنالیز هستی‌شناسی و مسیر KEGG ژن‌های شاخص با پایگاه DAVID ($P\text{-Value} < 0.05$)TABLE 3- RESULTS OF ONTOLOGY ANALYSIS AND KEGG PATHWAY OF KEY GENES USING THE DAVID DATABASE ($P\text{-VALUE} < 0.05$)

ژن‌های مرتبط	P-Value	تعداد ژن	عنوان	رده
CCL20, IL1B, GRO1, CXCL3	0.0001	4	مسیر سیگنال‌دهی TNF	KEGG
CCL20, IL1B, GRO1, CXCL3	0.0003	4	پاسخ التهابی	UP_KW_BP
RSAD2, ENSBTAG00000019017, ISG15	0.0003	3	تنظیم منفی همانندسازی ژنوم و ویروسی	GO-BP
CCL20, GRO1, CXCL3	0.0004	3	فعالیت کموکاینی	GO-MF
CCL20, IL1B, GRO1, CXCL3	0.0016	4	برهم‌کنش گیرنده سیتوکین- سیتوکین	KEGG
IL1B, GRO1, CXCL3	0.0030	3	مسیر سیگنال‌دهی NF-kappa B	KEGG
RSAD2, MX2, ISG15	0.0034	3	دفاع ضد ویروسی	UP_KW_BP
IFI44, IFI44L	0.0048	2	دامنه TLDc	INTERPRO
CCL20, ENSBTAG00000073163, ISG15, GRO1, CXCL3	0.0072	5	ناحیه‌ی خارج سلولی	GO-CC
MX2, ENSBTAG00000019017	0.0081	2	پاسخ به اینترفرون-آلفا	GO-BP
RSAD2, IL1B, MX2	0.0088	3	آنفلوآنزای A	KEGG
ENSBTAG00000008021, RSAD2, MX2	0.0273	3	پاسخ ایمنی ذاتی	GO-BP
RSAD2, PLIN1	0.0454	2	قطره لیپیدی	UP_KW_CC

مقایسه نتایج این پژوهش با مطالعه MORE^۲ و همکاران (۲۰۱۹) که با استفاده از تحلیل شبکه‌ای بر روی همین جمعیت گاوهای BRAFORD، ۵۱ ژن با بیان افتراقی معنادار بین گروه‌های حساس و مقاوم را شناسایی کرده بودند، نشان می‌دهد که رویکردهای تحلیلی متفاوت می‌تواند به شناسایی مجموعه‌های نسبتاً متفاوتی از ژن‌های کاندید منجر شود؛ با این حال، هر دو مطالعه بر نقش محوری مسیرهای ایمنی و التهابی در تعیین سطح مقاومت میزبان به کنه تأکید دارند.

لازم به ذکر است که معیار انتخاب ژن‌های شاخص در پژوهش حاضر ($LOG2(FC) > 2$ و $LOG2(FC) < -2$) اگرچه رایج‌ترین روش در مطالعات مشابه است، اما دارای یک محدودیت زیستی مهم است: بسیاری از مولکول‌های تنظیمی کلیدی، به‌ویژه فاکتورهای رونویسی، معمولاً با تغییرات بیانی اندک (کمتر از دو برابر) عمل می‌کنند و با این حال به‌واسطه‌ی جایگاه محوری خود در شبکه تنظیم بیان ژن، می‌توانند اثرات پایین‌دستی گسترده‌ای بر بیان تعداد زیادی از ژن‌های دیگر بگذارند. بنابراین، اعمال آستانه‌ی سخت‌گیرانه‌ی افزایش بیان دو برابری می‌تواند منجر به حذف بخش قابل‌توجهی از این گونه ژن‌های تنظیمی کلیدی از تحلیل نهایی شود، هرچند نقش زیستی آن‌ها در فیزیولوژی مورد مطالعه با اهمیت باشد. پیشنهاد می‌شود مطالعات آتی، در کنار آستانه‌ی تغییر بیان، از رویکردهای تکمیلی مانند تحلیل شبکه‌ی هم‌بیانی ژن‌ها یا اولویت‌بندی ژن‌ها بر اساس اهمیت گره‌ای در شبکه‌های تنظیمی استفاده کنند تا احتمال نادیده گرفتن ژن‌های تنظیمی مؤثر با تغییر بیان اندک کاهش یابد.

در مجموع، یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که تفاوت میان گاوهای مقاوم و حساس به کنه با تغییر هم‌زمان مجموعه از ژن‌های مرتبط با پاسخ ایمنی، التهاب و مسیرهای وابسته به اینترفرون همراه است. از میان ۴۴ ژن دارای بیان افتراقی معنادار،

شناسایی ۱۹ ژن با $|LOG_2(FC)| > 2$ امکان تمرکز بر ژن‌هایی با شدت تغییر بیان بیشتر را فراهم کرد. بررسی عملکردی این ژن‌ها نشان داد که بخش قابل توجهی از آن‌ها در محورهای مرتبط با ایمنی ذاتی، پاسخ به اینترفرون، کموتاکسی سلول‌های ایمنی و تنظیم التهاب قرار دارند. این الگوی هماهنگ بیان ژن‌ها نشان می‌دهد که مقاومت به کنه احتمالاً حاصل عملکرد یک ژن منفرد نیست، بلکه مجموعه‌ای از پاسخ‌های مولکولی هماهنگ در بافت پوست در ایجاد این تفاوت نقش دارند. بر این اساس، ژن‌های شاخص شناسایی شده در این مطالعه می‌توانند به عنوان کاندیداهای مولکولی برای مطالعات آزمایشی و اعتبارسنجی‌های آینده در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با مقاومت به کنه مورد توجه قرار گیرند.

یافته‌های این پژوهش با مطالعات جدیدتر نیز هم‌راستا است. Mantilla Valdivieso و همکاران (۲۰۲۴) در بررسی رونوشت پوست گاوهای برافورد، ژن‌های با بیان متفاوت و مسیرهای مرتبط با پاسخ ایمنی و بیماری‌های عفونی را شناسایی کردند و نشان دادند که تغییرات تنظیمی ژن‌ها در بافت پوست می‌تواند با تفاوت مقاومت میزبان به کنه مرتبط باشد. همچنین، Carvalho و همکاران (۲۰۲۴) با استفاده از تلفیق داده‌های ارتباط ژنومی و بیان ژن در گاوهای برافورد، مجموعه‌ای از ژن‌های کاندید مرتبط با تعداد کنه و مسیرهای زیستی مؤثر بر مقاومت به کنه را شناسایی کردند. بنابراین، نتایج مطالعات اخیر نیز بر نقش مجموعه‌ای ژن‌ها و مسیرهای مولکولی، به جای یک ژن منفرد، در تعیین مقاومت به کنه تأکید دارند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که بین گاوهای مقاوم و حساس به آلودگی کنه، تفاوت‌های معناداری در الگوی بیان ژن‌های بافت پوست وجود دارد. از میان ۳۷۸۲۰ شناسه ژن شناسایی شده، ۴۴ ژن دارای بیان افتراقی معنادار بودند که با اعمال معیار $|log_2(FC)| > 2$ ، تعداد ۱۹ ژن به عنوان ژن‌های شاخص با تغییر بیان بیشتر شناسایی شدند. تجزیه و تحلیل عملکردی نشان داد که بخش عمده‌ی این ژن‌ها در پاسخ ایمنی و التهابی، پاسخ به اینترفرون و دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا نقش دارند. در مجموع، یافته‌های این پژوهش بیانگر آن است که مقاومت به کنه احتمالاً حاصل عملکرد هماهنگ مجموعه‌ای از ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با پاسخ ایمنی پوست است. ژن‌های شاخص شناسایی شده می‌توانند به عنوان ژن‌های کاندید در مطالعات آینده برای شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با مقاومت به کنه و بهره‌گیری از آن‌ها در برنامه‌های اصلاح نژاد مورد توجه قرار گیرند.

پس از اخذ داده‌های رونوشت‌نگاری از پایگاه اطلاعاتی، در ادامه مات گشت سنجش کیفیت خوانش‌های رفت و برگشتی از هر ۱۰ نمونه، حدود ۴ میلیون خوانش کوتاه جفتی با طول ۱۰۰ جفت‌باز و میزان CG برابر ۵۰ درصد مورد آنالیز قرار گرفت. پس از اعمال ویرایش‌های بیوانفورماتیکی، نزدیک به ۳ میلیون خوانش باکیفیت باقی‌ماند که معادل با رد کمتر از ۲۵٪ از خوانش‌های اولیه بود. مرحله هم‌ردیفی با مکان‌یابی میانگین بیش از ۹۰٪ خوانش‌ها بر یک محل منحصر و نرخ هم‌ردیفی کلی بالاتر از ۹۹٫۹٪ بر ژنوم مرجع تکمیل پذیرفت که شاهده‌ی بر استواری و اعتبار بیوانفورماتیکی نتایج است (Li et al., 2020; Dos Santos et al., 2022). بر اساس پروفایل بیان ژن و آنالیز بیان افتراقی میان دو گروه حساس و مقاوم، در مجموع ۳۷۸۲۰ شناسه ژنی بر روی رونوشت این نمونه‌ها تعیین گردید. از این میان، ۴۴ شناسه ژنی در مقایسه بین دو گروه دارای بیان متفاوت و معنادار بودند ($q\text{-value} < 0.05$) (Li et al., 2020). در ادامه و با اعمال آستانه سخت‌گیرانه‌تر $|log_2(fold\ change)| > 2$ ، از بین ۴۴ ژن افتراقی، تعداد ۱۹ ژن شاخص با بیان معنادار و متفاوت انتخاب شدند که منطبق با یافته‌های پژوهش‌های رونوشت پیشین در زمینه گزینش ژن‌های کاندید مقاومت به کنه است (Dos Santos et al., 2022; Marima et al., 2020).

نتایج آنالیز هستی‌شناسی (GO) و مسیرهای KEGG نشان داد مهم‌ترین ژن‌های شاخص از جمله *IFI27*، *ISG15*، *MX2*، *IL1B* و *IFI44*، *CCL20*، *RSAD2* در اطلاق و تنظیم پاسخ‌های ایمنی ذاتی، مسیرهای سیگنال‌دهی اینترفرون نوع ۱ و ۲، آپوپتوز، کموتاکسی سلول‌های ایمنی و مسیرهای بازسازی و سد دفاعی پوست نقش اساسی دارند (Li et al., 2020; Mantilla Valdivieso et al., 2024). به‌طور خاص، افزایش بیان چندبرابری ژن‌های پاسخ‌دهنده به اینترفرون نظیر *ISG15* و *MX2* در بافت پوست گاوهای مقاوم، نشان‌دهنده هماهنگی این مسیرها در فعال‌سازی ایمنی ذاتی و محدودکردن تغذیه انگل در محل گزش است (Marima et al., 2020; Mantilla Valdivieso et al., 2024).

از منظر مقایسه فنوتیپی، الگوی بیان ژن در گاوهای مقاوم حاکی از فعال‌سازی سریع، هدفمند و کنترل‌شده ژن‌های التهابی و کموکایینی چون *CCL20*، *CXCL3* و *IL1B* در محل گزش است؛ به‌طوری‌که با محدودکردن شدت و مدت التهاب، از بروز پاسخ‌های التهابی مزمن و مخرب بافتی جلوگیری می‌شود. در مقابل، در گاوهای حساس، بیان تأخیری و طولانی این ژن‌ها منجر به تجمع بیش‌ازحد سلول‌های نوتروفیل، التهاب وسیع و ناهماهنگ و در نهایت کمک‌ای به تداوم تغذیه کنه می‌گردد (Mantilla Valdivieso *et al.*, 2024). این یافته‌ها بر این نکته کلیدی تأکید دارد که مقاومت به کنه یک صفت چندژنی پیچیده است که حاصل تعامل ماژول‌های ژنی متعدد در مسیرهای ایمنی ذاتی و التهابی در بافت پوست میزبان بوده و از طریق گزینش ژنومی قابل پیش‌بینی است (Dos Santos *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2020). بازدیدگاه کاربردی، ژن‌های شاخص شناسایی‌شده در این پژوهش، به‌ویژه ژن‌های پاسخ‌دهنده به اینترفرون و سایتوکاین‌های التهابی، می‌توانند بستری ارزشمندی برای برنامه‌های اصلاح نژاد و انتخاب دام‌های مقاوم به کنه فراهم سازند (Marima *et al.*, 2020).

منابع

- زارع، م.، علی پور، م.، و مرادی، ح. ۱۴۰۲. تحلیل شبکه بیان ژن‌های درگیر در پاسخ ایمنی پوست گاو به آلودگی‌های پوستی. نشریه پژوهش‌های علوم دامی (دانشگاه فردوسی مشهد)، ۳۳(۲)، ۵۸-۴۵.
- قاسمی، ع.، ضمیری، م. ج.، حیدری، م.، و نیازی، ا. ۱۳۹۴. القا *ISG15* گاوی توسط اینترفرون نوع I و کشت و بیان در سلول‌های لوتال. نشریه تولیدات دامی، ۱۷(۴)، ۶۹۳-۶۸۳.
- Bhat, S. S., Ganai, N. A., Nazir, S., *et al.* 2019. Transcriptomic insights into the molecular mechanisms of tick resistance in cattle: a review. *Front Vet Sci.* 6:125.
- Carvalho, W. A., Ferreira, B. R., Pappas Jr, G. J., Santos, S. S., Anyangwe, S. Z., Rodrigues, B. R., & Santos, I. K. 2010. Genetic and immunological comparisons of tick resistance in cattle. *Veterinary Parasitology*, 171(3-4), 312-321.
- Carvalho, W. A., Gaspar, E. B., Domingues, R., Regitano, L. C. A., & Cardoso, F. F. 2024. Genetic factors underlying host resistance to *Rhipicephalus microplus* tick infestation in Braford cattle: a systems biology perspective. *Mammalian Genome*, 35, 186-200.
- De Silva, M. G., Magalhaes, A. F. B., Tizioto, F. K., Somavilla, A. L., Matos, M. C., Chardulo, L. A., ... & Regitano, L. C. 2018. Network analysis reveals hypothetical genes acting on the skin of cattle infested with *Rhipicephalus microplus*. *Scientific Reports*, 8(1), 1-3.
- Dos Santos, C. G., Sousa, M. F., Vieira, J. I. G., Verardo, L. L. 2022. Candidate genes for tick resistance in cattle: a systematic review. *Embrapa*.
- FAO. 2020. *The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Franzin, A. M., Maruyama, S. R., Garcia, G. R., Oliveira, R. P., Ribeiro, J. M. C., Bishop, R. P., ... & Santos, I. K. F. M. 2017. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasites & Vectors*, 10(1), 1-18.
- Ghosh, S., Azhahianambi, P., Sural, S. 2013. Tick-host-pathogen interactions: Impact on livestock and potential control strategies. *Front Biosci.* 5:485-500.
- Jonsson, N. N., Hope, M., Bock, R. E. 2000. The relative importance of host genetics and environment on resistance to cattle ticks. *Vet Parasitol.* 88(1-2):17-24.
- Li, Y., Wang, Y., Zhang, Z., & Chen, L. 2020. Network analysis reveals putative genes affecting tick resistance in cattle skin. *Frontiers in Genetics*, 11, 598-610.
- Mantilla Valdivieso, E.F., Ross, E. M., Raza, A., *et al.* 2024. Expression network analysis of bovine skin infested with *Rhipicephalus australis* identifies pro-inflammatory genes contributing to tick susceptibility. *Scientific Reports*, 14, 4419.
- Marima, J. K., Nel, C. L., Marufu, M. C., Jonsson, N. N., Dube, B. 2020. A genetic and immunological comparison of tick-resistance in beef cattle. *Experimental and Applied Acarology*.

- Piper, E. K., Jackson, L. A., Bielefeldt-Ohmann, H., Constantinoiu, C. C., & Lew-Tabor, A. E. 2008. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 157(3-4), 287-295.
- Piper, E. K., Jackson, L. A., Bielefeldt-Ohmann, H., Constantinoiu, C. C., & Lew-Tabor, A. E. 2009. A microarray analysis of the differential gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 160(1-2), 145-156.
- Piper, E. K., Jackson, L. A., Bielefeldt-Ohmann, H., Constantinoiu, C. C., & Lew-Tabor, A. E. 2010. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. *International Journal for Parasitology*, 40(4), 431-441.
- Reza, A., Schulz, B. LL., Nouwens, A., Mantilla Valdivieso, E. 2023. Application of quantitative proteomics to discover biomarkers for tick resistance in cattle. *Frontiers in Immunology*.
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., & Chang, W. 2022. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216-W221.
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. 2023. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638-D646.
- Tromp, A., Bagnall, N. H., Hogg, R., et al. 2018. RNA-Seq analysis of skin from cattle resistant or susceptible to *Rhipicephalus microplus* ticks. *BMC Genomics*. 19:452.
- Walker, J. B, Keirans, J. E, Horak, I. G. 2003. *The genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): A guide to the brown ticks of the world*. Cambridge: Cambridge University Press.