

شناسایی همریخت RNA های بیان شده در ماهیچه اسکلتی مرغ بومی و تجاری با روش توالی‌یابی

سید نادر آلبوشوکه^{۱*}، محمدرضا بختیارزاده^۲ و مجتبی طهمورث‌پور^۳

۱. مربی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی خوزستان، اهواز، ایران

۲. استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، ایران

۳. استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۵)

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی و شناسایی همریخت (ایزوفرم) های RNA مرتبط با ساختار پروتئین‌های ماهیچه‌ای بین مرغ بومی اصفهان و جوجه تجاری راس با سرعت رشد‌های متفاوت، انجام شد. بدین منظور و پس از استخراج کل RNA از نمونه‌های ماهیچه سینه مرغان یادشده در سن ۲۸ روزگی، توالی‌یابی جفتی با استفاده از پلاتفرم illumine Hiseq 2000 انجام شد. برای همترازی خوانش‌ها به ژنگان (ژنوم) مرجع مرغ اهلی، از نرم‌افزار Hisat2 و برای اسمبلی ترانسکرپت‌ها و شناسایی بیان ژن‌های با تفاوت معنی‌دار از بسته Cufflinks استفاده شد. مقایسه آماری همریخت‌های توالی‌یابی شده بین دو گروه، ۲۵۹ همریخت (۱۶۱ همریخت در جوجه تجاری و ۹۸ همریخت در مرغ بومی) با تفاوت بیان معنی‌دار را مشخص کرد. در بین همریخت‌های جوجه تجاری، ۴ ژن ACTC1، ATF3، CYR61 و FABP4 هر یک با دو همریخت مختلف افزایش بیان داشتند. در جوجه تجاری فراوانی همریخت‌های مرتبط به ماهیچه کالبدی (اسکلتی) با انقباضات آهسته بیشتر از همریخت‌های ماهیچه اسکلتی با انقباض سریع بود. بررسی عملکردی نشان داد، همریخت‌ها در جوجه تجاری در ارتباط با افزونش و تمایز یاخته‌ای، پررشدی (هایپرتروفی) و ساخت پروتئین‌های ساختمانی ماهیچه‌ای بوده درحالی‌که در مرغ بومی مرتبط به فرآیندهای ایمنی، حاملان یون‌ها و فلزها، نوار (باند) شونده‌های به فلزها، DNA و RNA، و عامل‌های شرکت‌کننده در شکست پروتئین‌های ماهیچه‌ای بودند. نتایج این بررسی نشان داد، چنین تغییرهایی به‌احتمال توانسته با کاهش دادن سطح نیازهای مرغ بومی و افزایش توان ایمنی و سازگاری، امکان تداوم و چیره شدن بر شرایط سخت محیطی و غذایی را در طول دوره تکاملی این مرغ تقویت کند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، جوجه تجاری راس، مرغ بومی اصفهان.

Identification of RNA isoforms expressed in skeletal muscle of native and commercial chickens by sequencing method

Seyed Nader Albooshoke^{1*}, Mohammad Reza Bakhtiarzadeh² and Mojtaba Tahmoorespur³

1. Instructor, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ahwaz, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Campus of Aburaihan, Iran
3. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: Jan. 7, 2018 - Accepted: May 26, 2018)

ABSTRACT

This experiment was conducted to investigate and identify the isoforms related to the structure of muscular proteins between Isfahani native and Ross commercial chickens with different growth rates. We extracted total RNA from breast muscle samples of two groups at end of 4 weeks of age. After paired-end sequencing of samples using the Illumina Hiseq 2000 platform, Hisat2 was applied to align clean reads to chicken reference genome. Then, Cufflinks package was used to assemble transcripts and identify significantly differentially expressed genes. The statistical comparison of the isoforms between two groups revealed 259 isoforms with significant difference in expression, of which 161 isoforms were up-regulated and 98 isoforms were downregulated in commercial chickens. Among the commercial chicken isoforms, four genes (ACTC1, ATF3, CYR61 and FABP4) were upregulated with two different isoforms. In addition, in commercial chicks, the frequency of isoforms associated with slow contraction fibers was greater than that of rapid contraction fibers. Functional study showed that the isoforms in commercial chickens were more related to cell proliferation and differentiation, hypertrophy growth and biosynthesis of muscle proteins, whereas in native chickens, mainly they were associated to immune processes, carriers of ions and metals, binding to metals, DNA and RNA, and factors contributing to degradation of muscle proteins. The results of this study showed that such changes may have been able to strengthen the ability to maintain and overcome the severe environmental and nutritional conditions during the developmental period of the chicken by reducing the level of requirements and enhancing immunity and adaptability in native chicken.

Keywords: Gene expression, Isfahan native chicken, Ross broiler chickens.

* Corresponding author E-mail: albooshoke@mail.um.ac.ir

مقدمه

در مرغ خانگی ماهیچه کالبدی (اسکلتی) یکی از بزرگ‌ترین بافت‌های بدنی بوده و نزدیک به ۵۰ درصد توده بدن را تشکیل می‌دهد. این بافت به‌عنوان بزرگ‌ترین محل ذخیره پروتئین بدن، عمده تولیدکننده گوشت نیز به‌شمار می‌آید (Matsakas & Patel, 2009). ماهیچه اسکلتی نه‌تنها موتور حرکتی بدن به‌شمار می‌آید بلکه بخشی از شبکه غده‌های درون‌ریز (آندوکروینی) بوده و در تنظیم سوخت‌وساز (متابولیسم) کلی بدن نیز شرکت می‌کند (Matsakas & Patel, 2009). ماهیچه کالبدی بافتی بسیار ناهمگون (هتروژن) بوده و متشکل از انواع لیف‌های با عمل مختلف است (Choi & Kim, 2009). ترکیب نوع تار ماهیچه (میوفیبر) می‌تواند رشد ماهیچه را در دوره پس از جوجه‌کشی (هچری) متأثر کند (Yuan et al., 2010). ماهیچه کالبدی را می‌توان تحت عنوان لیف‌های قرمز (نوع I و II، اکسایش یا اکسیداتیو) و سفید (نوع IIB، گلایکولیک) از یکدیگر تمیز داد. ماهیچه کالبدی قرمز مویرگ، میوگلوبین، چربی و میتوکندری بیشتری در مقایسه با ماهیچه کالبدی سفید دارد (Kim et al., 2004). در گوشت نژادهای مختلف مرغ خانگی تفاوت‌های فراوانی از نظر ویژگی‌های ماهیچه کالبدی دیده می‌شود. در مدت ۸۰ سال گذشته به‌گزینی ژنتیکی جوجه‌های گوشتی باهدف افزایش سرعت رشد و افزایش حجم ماهیچه و در مرغ تخم‌گذار باهدف تولید تخم‌مرغ انجام شده است. بنابراین در شرایط رشد مناسب، اندازه بدنی مرغ تخم‌گذار به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی در مقایسه با جوجه‌های گوشتی کوچک‌تر است. در نتیجه نظام‌های مقایسه‌ای جوجه گوشتی با مرغ تخم‌گذار برای بررسی سازوکارهای مولکولی مؤثر در ماهیچه‌زایی (میوژن) بسیار مطلوب هستند (Griffin & Goddard, 1994). مرغ بومی اصفهان جز مرغان دومنظوره است و سرعت رشد پایین و اندازه بدنی به‌نسبت کوچکی بوده و مقاومت خوبی در مقابل بیماری‌ها و سازگاری بالایی نسبت به شرایط محیطی دارد (Yousefi Zonuz et al., 2013). از سوی دیگر جوجه تجاری راس ۷۰۸ سرعت رشد بالایی داشته و قادر است در عرض ۸

هفته دوره پرورش از وزن حدود ۴۰ گرم در روز نخست، به وزن بیش از ۴ کیلوگرم برسد. برخی ویژگی‌های کیفی گوشت به‌ویژه مواردی که در نتیجه نوع لیف‌های ماهیچه‌ای و اندازه آن‌ها متأثر می‌شوند، بین مرغ‌های بومی با جوجه تجاری متفاوت است (Klont et al., 1998). تفاوت‌های نژادگانی (ژنوتیپی) و میزان بیان همریختی (ایزوفرمی) برخی ژن‌ها یکی از علل اصلی چنین اختلاف‌هایی عنوان شده است (Li et al., 2013). به دلیل تفاوت‌های عمده در رشد ماهیچه جوجه گوشتی با مرغ تخم‌گذار این فرضیه وجود دارد که بیان همریختی پروتئین‌های ساختمانی مانند میوزین در این دو مرغ متفاوت از یکدیگر باشد (Reddish et al., 2005). به‌گزینی ژنتیکی برای افزایش حجم ماهیچه سینه سبب افزایش بیان موقتی برخی همریخت‌های میوزینی لیف‌های ماهیچه‌ای سریع شده است (Lee et al., 2012).

همریخت‌های ژنی در نتیجه فرایند جایگیری (اسپلاسینگ) ایجاد می‌شوند. برای یک ژن، ایجاد رونوشت‌های (همریخت) چندی می‌تواند موجب بروز فعالیت‌های مختلف زیستی (بیولوژیکی) شود. موجودهای پریاخته‌ای با استفاده از این سازوکار می‌توانند با توجه به وضعیت‌های مختلف، تنوع پروتئینی به‌دست‌آمده از شمار محدودی ژن را بدون نیاز به افزایش اندازه ژنگان (ژنوم)، افزایش داده و بدین ترتیب دامنه تأثیرگذاری محصول‌های به‌دست‌آمده از کددهی خود را گسترده‌تر کنند (David et al., 2010; Karni et al., 2007).

این آزمایش به‌منظور بررسی ارتباط بین تفاوت در رشد ماهیچه کالبدی با بیان همریخت‌های ساختمانی پروتئین‌های ماهیچه‌ای و نیز وضعیت بیان همریختی ژن‌های مرتبط با ویژگی‌های پروتئینی ماهیچه کالبدی این دو مرغ با استفاده از روش توالی‌یابی RNA-Seq انجام شد.

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌گیری

برای انجام این آزمایش از ۲۰۰ قطعه جوجه یک‌روزه سویه تجاری راس ۷۰۸ و ۲۰۰ قطعه جوجه یک‌روزه

مربوط به آداپتور و پرایمر و Poly-N از نرم‌افزار Trimmomatic (Lohse *et al.*, 2012) استفاده شد. خوانش‌های پیرایش‌شده برای تأیید کیفیت، دوباره با نرم‌افزار Fastqc بررسی شدند.

نقشه‌یابی خوانش‌ها با استفاده از HISAT2

مرجع ژنگانی مرغ (*Gallus_gallus-5.0*) و فایل آنوتیشن GTF (نسخه ۸۹) مربوط به مرغ خانگی (حاوی ۱۷۹۵۴ ژن در بانک اطلاعاتی Ensembl) از پایگاه داده به آدرس تارنمای (<http://asia.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>) (دانلود شد. جفت خوانش‌های مربوط به هر نمونه که پالایش‌های کیفی را گذرانده بودند، با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 نسخه ۲/۰۴ (Kim *et al.*, 2015) به ژنگان مرجع نقشه‌یابی شدند.

اسمبلی ترانسکریپتومی با استفاده از Cufflinks

خوانش‌های همتراز شده پس از آن با استفاده از نرم‌افزار Cufflinks نسخه 2.2.1 به رونوشت‌ها سرهم‌بندی شدند. پس از پایان فرایند سرهم‌بندی خوانش‌ها و ایجاد رونوشت‌ها، با استفاده از ابزار Cuffmerge رونوشت‌های همه نمونه‌ها ادغام شد تا مجموعه رونوشتی واحدی ایجاد شود. در مرحله بعدی با استفاده از نرم‌افزار Cuffcompare رونوشت‌های جدید شناسایی شدند (Trapnell *et al.*, 2012). به منظور کاهش خطاهای مرجع‌دهی، تنها رونوشت‌های جدید تک‌اگزونی با اندازه طولی بیش از ۲۰۰ جفت باز، به‌عنوان رونوشت جدید بررسی شدند. در این زمینه رونوشت‌های با کلاس Z به‌عنوان رونوشت جدید شناسایی و برای ارزیابی‌های بعدی انتخاب شدند. همه همریخت‌های شناسایی‌شده توسط Cuffcompare بر پایه بیان انحصاری‌شان در گروه بومی، گروه تجاری و یا بیان مشترک در هر دو گروه طبقه‌بندی شدند. سپس این گروه‌های همریخت‌های جدید با استفاده از ژن درون‌شناختی (آنتولوژی) DAVID و معیارهای مربوط به آن بررسی شدند.

تجزیه تفاوت بیان

در این بررسی میزان بیان ژن‌ها به‌صورت FPKM

از توده مرغ بومی اصفهان استفاده شد. جوجه‌ها بی‌درنگ پس از خریداری به سالن‌های مرغداری مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد دزفول انتقال داده شده و تا پایان آزمایش با شرایط یکسان تغذیه، نگهداری و مدیریت شدند. همه جوجه‌ها از یک جیره غذایی متعادل با ۳۰۰۰ کیلوکالری انرژی در کیلوگرم وزن ماده خشک و ۲۰ درصد پروتئین خام تغذیه شدند. دسترسی به آب آشامیدنی و خوراک آزاد بود. در پایان ۲۸ روزگی، ۱۲ قطعه جوجه خروس (۶ جوجه از گروه تجاری و ۶ جوجه از گروه بومی) به‌طور تصادفی انتخاب، توزین و کشتار شد. در هر جوجه از یک مکان همسان در ماهیچه سمت چپ سینه (Pectoralis major muscle) یک نمونه نزدیک به ۲ گرمی گرفته و در کریوتیوب‌های سترون (استریل) و بدون RNase قرار داده شد. نمونه‌های گرفته شده بی‌درنگ به تانک نیتروژن مایع منتقل و تا زمان استخراج RNA در فریزر دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جدا و خالص‌سازی RNA و توالی‌یابی

با استفاده از کیت تریزول (Invitrogen, USA) و بنابر دستورکار شرکت سازنده از نمونه‌ها RNA استخراج شد. خلوص RNA با استفاده از نانودراپ (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000) بررسی شد. نسبت جذب 260 به 280 نانومتر در نمونه‌های RNA در محدوده ۱/۸ تا ۲ بود. سه نمونه RNA مربوط به هر گروه به نسبت برابر با یکدیگر مخلوط شده تا در کل و به ازای هر یک از دو گروه آزمایشی، دو تکرار از نمونه‌های ادغام‌شده (Pooled) به دست آید. چهار نمونه به‌دست‌آمده با دستگاه Illumina Hiseq 2000 و بنابر دستورکار مربوطه در شرکت BGI چین توالی‌یابی شد.

بررسی کمی و کیفی داده‌ها

پیش از انجام همترازی کیفیت توالی خوانش‌های خام با استفاده از نرم‌افزار Fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) برای حذف خوانش‌های با کیفیت پایین و یا خوانش‌های خام حاوی توالی‌های

بیانگر بالاتر بودن شمار رونوشت‌های جایگزین در مرغ بومی است (فایل مکمل کاربرگ شماره ۱). با این وجود از نظر رونوشت‌های با بیان متفاوت و معنی‌دار، جوجه تجاری شمار همریخت RNA بیشتری داشت. در این زمینه بیان ۲۵۹ همریخت (۳۵ همریخت جدید و ۲۲۴ همریخت شناخته شده) بین دو نژاد اختلاف معنی‌دار داشت ($q < 0.05$). از این شمار ۱۶۱ همریخت در جوجه تجاری (۱۴۵ شناخته شده و ۱۶ جدید) و ۹۸ همریخت در مرغ بومی (۷۹ شناخته شده و ۱۹ جدید) بیان بالاتری داشتند (شکل ۱). در واقع این ۲۲۴ همریخت شناخته شده مربوط به ۲۲۰ ژن مختلف بوده و چهار ژن ACTC1، ATF3، CYR61 و FABP4 در جوجه تجاری هر یک با دو همریخت مختلف بیان شده بودند (جدول ضمیمه شماره ۱). دامنه تغییرهای بیان چند برابری (fold change) در دو نژاد از ۶/۵۴- در مرغ بومی تا ۶/۴۳ در جوجه تجاری متفاوت بود.

ژن ACTC1 جزء ژن‌های مرتبط با ماهیچه بوده و نقش مهمی در رشدونمو جنینی، بقای یاخته‌ای، تمایز و رشدونمو ماهیچه ایفا می‌کند (Wu et al., 2013). در جوجه‌های گوشتی، به‌گزینی در جهت افزایش سرعت رشد منجر به بروز نقص‌های قلبی-عروقی و کالبدی شده است (Mendoza et al., 2011). با توجه به این موضوع و نقش ژن ACTC1 در شکل‌گیری پروتئین اکتین در ماهیچه قلبی، بیان بالا و شمر همریخت‌های آن در جوجه تجاری به‌احتمال در ارتباط با توانایی این جوجه در تحمل استرس‌های قلبی و عروقی ناشی از رشد سریع ماهیچه‌های کالبدی بوده است.

ژن ATF3 پروتئینی باندشونده به DNA و جز خانواده عامل‌های رونویسی است که در واکنش به استرس، عامل رشد فیبروبلاست، عامل رشد لایه سطحی یا اپیدرم (Weir et al., 1994) و گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species) افزایش می‌یابد (Okamoto et al., 2006). در موجودهای زنده در نتیجه سوخت‌وساز یاخته‌ای، گونه‌های اکسیژن فعال تولیدشده و میزان آن مرتبط با شدت سوخت‌وساز یاخته‌ای است (Cadenas & Davies, 2008).

استانداردسازی شد تا خطاهای ناشی از تفاوت عمق خوانش و تفاوت اندازه ژنی رونوشت‌ها از بین برود. برای تشخیص تفاوت بیان ژنی مابین مقادیر FPKM مربوط به مرغ بومی و جوجه تجاری از نرم‌افزار Cuffdiff استفاده شد.

تجزیه مؤلفه‌های اصلی (Principal Components Analysis)

از جمله روش‌های مشاهده تنوع آزمایشی استفاده از این آزمون است (Yeung & Ruzzo, 2001). برای بررسی یکنواختی بین تکرارهای جوجه راس (دو تکرار pool شده از سه جوجه) و تکرارهای جوجه بومی اصفهان (دو تکرار pool شده از سه جوجه) تحلیل مؤلفه‌های اصلی با استفاده از بسته نرم‌افزار آماری R انجام شد (<http://www.R-project.org>). پیش از تجزیه و تحلیل PCA همه داده‌ها با استفاده از فرمول z استاندارد شدند. امتیازهای به‌دست‌آمده از تحلیل PCA برای سه مؤلفه نخست، در ترسیم پلات استفاده شدند.

بررسی عملکرد ژن‌های با بیان متفاوت

تجزیه عملکردی برای ژن‌های با بیان متفاوت و تجزیه مسیرهای زیست‌شناختی ژن‌ها (KEGG) به ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای برخط geneontology (<http://geneontology.org>) (نسخه 6.8) و DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (Dennis et al., 2003) انجام شد. نتایج بررسی عملکردی برای فرایند بیولوژیکی با سطح معنی‌دار تصحیح‌شده برای خطای چند آزمونی با روش FDR ($P\text{-adjusted} \leq 0.05$) بررسی شد.

نتایج و بحث

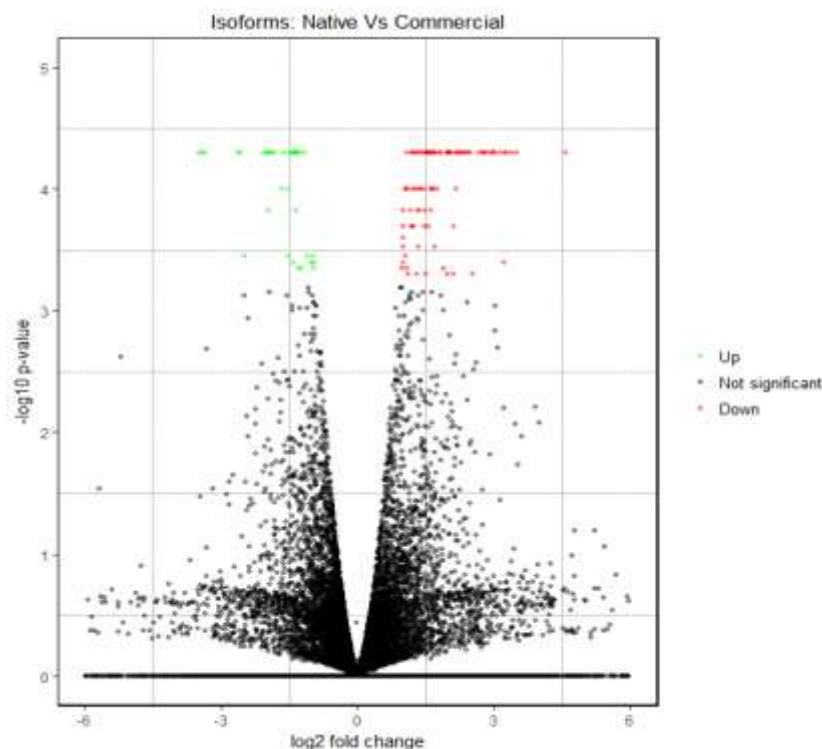
نتایج بیان همریختی

با استفاده از همترازی خوانش‌های RNA به‌دست‌آمده با ژنگان مرجع، در مجموع ۴۷۵۸۱ رونوشت مختلف شناسایی شد. از این شمار، ۳۴۶۰۷ رونوشت در هر دو نژاد، ۳۳۰۵ رونوشت تنها در مرغ بومی و ۲۹۱۷ رونوشت نیز تنها در جوجه تجاری بیان داشتند که

با مرغان تخم‌گذار در میزان مصرف خوراک، سرعت رشد، بازده تبدیل مواد غذایی و سرعت رشد چربی ماهیچه‌ای و مقدار آن بوده است (Reyer *et al.*, 2015). به‌گزینی‌های شدید ژنتیکی در جوجه‌های گوشتی افزون بر ناهنجاری‌های قلبی عروقی همچنین سبب کاهش شدید و کیفیت گوشت و افزایش حجم بافت چربی (Dong *et al.*, 2015) شده است. بنابراین گزارش شده است، همریخت‌های مختلف ژن FABP در انتقال اسیدهای چرب به میتوکندری برای اکسایش بتا (بتا‌اکسیداسیون) دخالت کرده و همچنین در تنظیم انتقال سیگنال، رونویسی ژن و کنترل فعالیت‌های آنزیمی شرکت می‌کنند (Tyra *et al.*, 2011). بنابراین و با توجه به بالا بودن فرآیندهای رشد و سوخت‌وساز در جوجه تجاری می‌توان حدس زد افزایش بیان FABP4 در دو همریخت مختلف در راستای برآورده کردن تقاضای انرژی انجام شده است.

(2000). به‌گزینی طیور در جهت افزایش ماهیچه‌های گوشتی و سرعت رشد بالا باعث مستعد شدن آن‌ها به تنش‌های اکسایشی (اکسیداتیو) شده است (Sihvo *et al.*, 2014). بنابراین می‌توان احتمال داد، افزایش بیان دو همریختی این ژن نیز برای چیرگی بر تنش‌های اکسایشی ناشی از سرعت رشد و سوخت‌وساز بالای این جوجه باشد.

گزارش شده ژن CYR61 در رشدونمو سامانه قلبی-عروقی، آنژیون‌زایی (آنژیوژنز)، مهار التهاب و لیف‌زایی (فیبروژنز) شرکت می‌کند (Babic *et al.*, 1998; Lau, 2011). بنابراین همانند بحث گفته‌شده در مورد ژن ACTC1 می‌توان احتمال داد، دو همریخت با بیان بالای این ژن در جوجه تجاری در ارتباط با توسعه بیشتر سامانه قلبی-عروقی در این مرغ باشد. عمده تفاوت‌های قابل‌مشاهده جوجه‌های گوشتی



شکل ۱. نمایش پراکندگی بیان همریخت‌ها با استفاده از نمودار Volcano. لگاریتم پایه دو مقدار Fold Change به‌عنوان مقیاس عرضی نمودار و سطح معنی‌داری (P-value) مربوط به تفاوت بیان ژن در مقیاس منفی لگاریتم پایه ۱۰ به‌عنوان مقیاس عمودی نمایش داده شده است. همریخت‌های با تفاوت بیان معنی‌دار در جوجه تجاری به رنگ قرمز و در مرغ بومی به رنگ سبز و همریخت‌های با بیان همسان به رنگ مشکی نمایش داده شده‌اند.

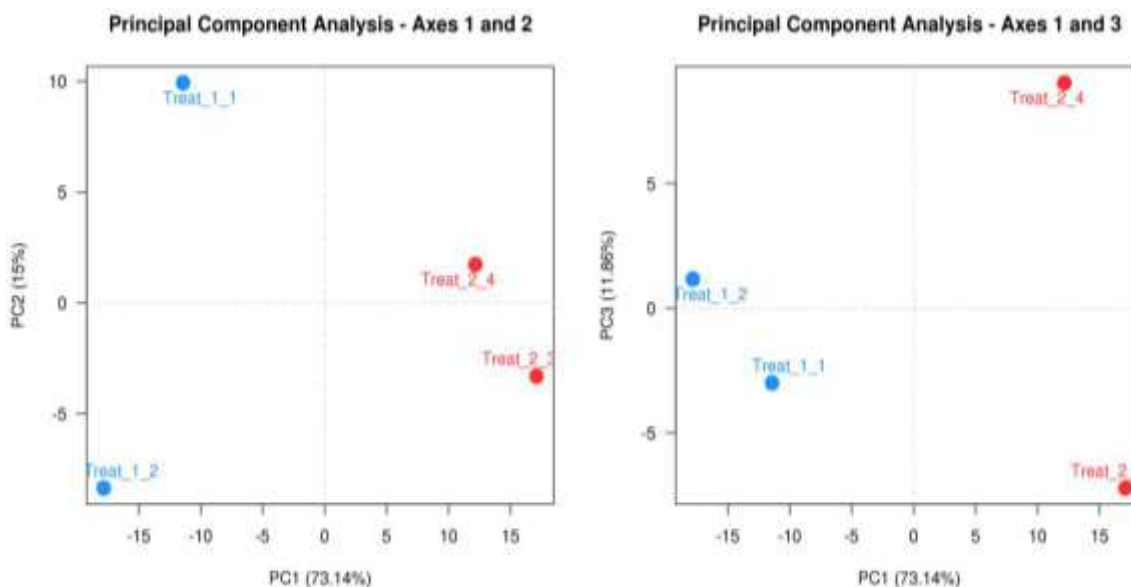
Figure 1. The volcano plot of Fold Changes distribution of isoform expressions. Plots of \log_2 Fold Change vs. $-\log_{10}$ of P-value for differentially expressed isoforms. Red dot represents significant up-regulated isoforms in commercial broilers, and green dot represents significant up-regulated isoforms in native chicken and identical expressed isoforms are shown in black.

نتایج تحلیل مؤلفه‌های اصلی

در شکل ۲ نتایج این تحلیل نمایش داده شده است. این پلات هر نمونه موجود در مجموعه داده را با توجه به دو مؤلفه نخست اصلی نمایش داده و در نتیجه می‌تواند مفسر خوبی برای رابطه‌های بین نمونه‌ای به شمار آید. بدین ترتیب نمونه‌های پرت و دورافتاده (Outliers) به‌خوبی قابل شناسایی خواهند بود. در شکل ۲، نخستین مؤلفه اصلی (PC1) تکرارهای نمونه‌ای زیستی را از یکدیگر جداسازی کرده است و مفهوم آن این است که تنوع زیستی عمده منبع ایجادکننده واریانس در مشاهدات است. به‌طوری‌که در این نمودار مشخص شده بیش از ۷۳ درصد از واریانس موجود در مشاهدات ناشی از تکرارهای زیستی بوده است.

مسیرها و فرآیندهای زیستی غنی‌شده (Enriched)

در جدول‌های ۱ و ۲، مسیرها و فرایندهای زیستی غنی‌شده مربوط به همریخت‌های با تفاوت بیان معنی‌دار ارائه شده است (فایل مکمل کاربرگ‌های ۲، ۳ و ۴). همه مسیرهای نمایش داده شده در جدول ۱ از نظر مقادیر P تصحیح‌نشده برای خطای چند آزمونی ($P < 0.05$) معنی‌دار بودند. با این حال از نظر سطح معنی‌داری P تصحیح‌شده بنیامینی (P-adjust) (Benjamini & Hochberg, 1995) تنها دو مسیر نخست کوچک‌تر از ۵ درصد بودند. برای فرایندهای زیستی مربوط به مرغ بومی تنها مقادیر مربوط به P تصحیح‌نشده معنی‌دار بودند (جدول ۲).



شکل ۲. تحلیل مؤلفه‌های اصلی برای دو عامل نخست به همراه درصد واریانس توأم با هر محور. تکرارهای نمونه‌ای در مرغ بومی با حرف‌های Treat_1_1 و Treat_1_2 و در جوجه تجاری با Treat_2_1 و Treat_2_2 نشان داده شده‌اند.

Figure 2. First two components of a Principal Component Analysis, with percentages of variance associated with each axis. Biological replications in native chickens are shown with Treat_1_1 and Treat_1_2 and in commercial chickens are shown with Treat_2_1 and Treat_2_2.

جدول ۱. مسیرهای غنی‌شده برای همریخت‌های با تفاوت بیان معنی‌دار در ماهیچه جوجه تجاری

Table 1. Enriched pathway for differential expression isoforms in muscle of commercial chickens

Term	Isoforms	P-Value	P-adjust
ECM-receptor interaction	SDC1, CD36, ITGA6, ITGA8, COMP, COL6A2, THBS1, COL5A2, COL5A1, FN1	6.3E-08	3.72E-06
Focal adhesion	MYL12A, COL5A2, COL5A1, MYL9, ITGA6, ITGA8, JUN, COMP, COL6A2, PDGFRB, THBS1, PIK3R3, FN1	4.17E-07	1.23E-05
PPAR signaling pathway	LPL, CD36, PLIN1, FABP4, FADS2	0.003799	0.072117
Regulation of actin cytoskeleton	ITGA6, ITGA8, PDGFRB, MYL12A, PIK3R3, MYL9, FN1	0.012318	0.167085
Phagosome	CD36, COMP, TUBA8B, TUBAL3, THBS1	0.047735	0.438509

(velleman *et al.*, 2017). معنادار شدن این فرایندها در جوجه تجاری، نشانه بیشتر بودن فعالیت‌های مرتبط با فرایندهای ساخت ماهیچه و بافت‌های پیرامونی آن در مقایسه با مرغ بومی است.

در سه فرایند معنی‌دار شده در مرغ بومی در مجموع پنج همریخت شرکت داشتند (جدول ۲). یکی از این فرآیندهای زیستی، تنظیم مثبت انتقال NF-kappaB به هسته یاخته (positive regulation of NF-kappaB import into nucleus) بود. NF-kB یک کمپلکس پروتئینی است که در واکنش‌های ایمنی شرکت دارد (Baeuerle & Henkel, 1994). یکی از دو همریخت موجود در این فرایند CCL19 بود. پروتئین کدشونده توسط ژن CCL19 که جز سیتوکین‌ها دسته‌بندی می‌شود، در واکنش‌های مرتبط با تنظیم ایمنی و التهابی و فعال شدن لنفوسیت‌ها شرکت دارد (Robbiani *et al.*, 2000). بیش بیان شدن همریخت این ژن در مرغ بومی می‌تواند در ارتباط با سازگاری این مرغ با شرایط منطقه‌ای و افزایش مقاومت نسبی نسبت به برخی بیماری‌ها باشد. همریخت GREM1 یکی دیگر از سیتوکین‌های بیان شده در مرغ بومی بود. این ژن تأثیر ناهمسازی (آنتاگونیستی) با خانواده BMP داشته و با اتصال به آن‌ها مانع باند شدن این خانواده به گیرنده‌های اختصاصی‌شان در سطح یاخته‌ای می‌شود (Merino *et al.*, 1999). این در حالی است که در مرغ بومی همریخت BMP7 نیز بیش بیان شده بود. به احتمال این موضوع می‌تواند به دلیل بیان همریختی این دو باشد که باعث شده همزمان هر دو همریخت در سطح بالا بیان شوند.

مسیرهای مرتبط با اتصال یاخته‌ای مانند کانون چسبندگی (فوکال آدهژن Focal adhesion) و اثر متقابل با گیرنده ماتریکس خارج یاخته‌ای (ECM-receptor interaction) با مجموع ۲۳ همریخت و از جمله همریخت‌های زنجیره سبک میوزینی و همچنین همریخت‌های کولاژنی در جوجه تجاری معنادار بودند. این موضوع نشان می‌دهد، مسیرهای حیاتی به لحاظ حفظ پایداری بافتی، در سن چهار هفتگی رشد جوجه تجاری شرکت دارند. کانون چسبندگی به‌عنوان کمپلکسی از اتصال‌های مکانیکی در ماتریکس خارج یاخته‌ای عمل کرده و برای بسیاری از مسیرهای درون‌یاخته‌ای مرتبط با حرکت یاخته‌ای، افزونش و تمایز یاخته‌ای، مراکز سیگنالی به شمار می‌آید. اجزا ماتریکس خارج یاخته‌ای نیز نقش‌های اساسی در ساخت جایگاه یاخته‌های ماهواره‌ای (Satellite Cell) ماهیچه داشته و اثر متقابل خاص آن‌ها با یاخته‌های ماهواره‌ای می‌تواند کانون چسبندگی، مهاجرت، تمایز، افزونش و نوسازی مؤثر را کنترل کند (Thomas *et al.*, 2015).

مهم‌ترین فرایندهای زیستی معنادار مربوط به جوجه تجاری عبارت بودند از سازماندهی لیف‌های کولاژنی و کانون چسبندگی و پاسخ به محرک‌های خارج یاخته‌ای که همگی مرتبط به دو مسیر بحث شده هستند (جدول ۲). به‌عنوان مثال سازماندهی لیف‌های کولاژنی در بافت‌های همبند پیرامون متصل‌کننده (باندل)‌های لیف ماهیچه‌ای (پری میوزوم) و نیز در اطراف لیف‌های ماهیچه‌ای (اندومیوزوم) موجب انعطاف‌پذیری بافتی و توانایی تحمل کشش می‌شود

جدول ۲. برخی از مهم‌ترین فرایندهای زیستی غنی‌شده برای همریخت‌های با تفاوت بیان معنی‌دار در ماهیچه مرغ بومی و جوجه تجاری

Table 2. Some of the important enriched biological processes for differential expression isoforms in muscle of native and commercial chickens

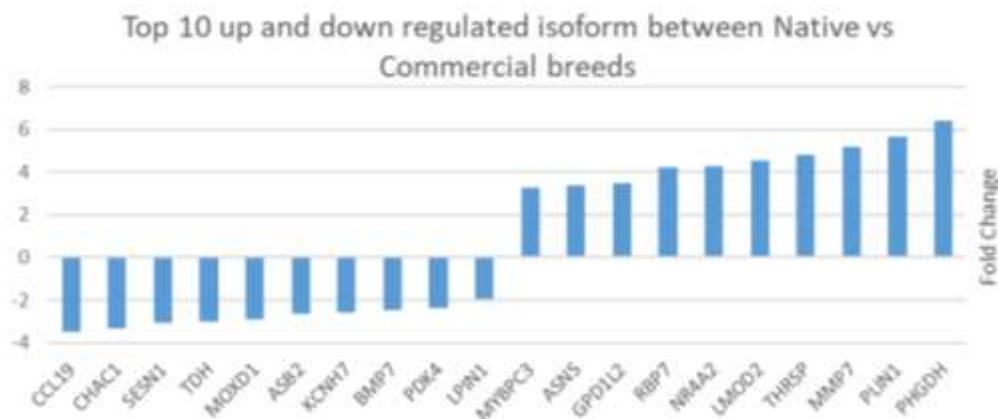
GO Term	Isoforms	P-Value	P-adjust
Enriched Biological process in Commercial chicken			
Collagen fibril organization	SFRP2, LUM, COL5A2, COL5A1, TGFB2, ANXA2, DPT	1.4058E-07	0.000113
Peptide cross-linking	F13A1, ANXA1, CSTA, THBS1, FN1	8.0799E-06	0.003231
Cell adhesion	COL18A1, ITGA6, ITGA8, COMP, MYBPC3, COL6A2, THBS1, COL5A1, CYR61, FN1	1.8278E-05	0.004868
Cellular response to extracellular stimulus	FOS, ITGA6, SFRP2, NR4A2	5.231E-05	0.010421
Enriched Biological process in Native chicken			
Positive regulation of peptidyl-tyrosine autophosphorylation	ACE, GREM1	0.0115304	0.969169
Fibroblast migration	ZFAND5, TMEM201	0.0342016	0.994593
Positive regulation of NF-kappaB import into nucleus	CCL19, GREM1	0.0508695	0.994598

همریخت‌های با بالاترین مقادیر بیان در مرغ بومی از نظر میزان بیان در مقیاس بیان چند برابری و در مبنای لگاریتم ۲، ده همریخت شناخته‌شده با بالاترین مقدار بیان مربوط به جوجه تجاری و مرغ بومی در شکل ۲ نمایش داده شده‌اند.

یکی از همریخت‌های جالب که بیان بالاتر و معناداری در مرغ بومی داشت، MOXD1 بود. پروتئین به‌دست‌آمده از کدهی این ژن در مسیر تیروزین هیدروکسیلاز و در نتیجه در ساخت دوپامین و نوراپی نفرین شرکت می‌کند. گزارش‌های چندی نشان داده‌اند، مسیر هیدروکسیلاز تیروزین و سامانه ایجادکننده دوپامینی به‌دست‌آمده در ایجاد رفتارهای اجتماعی و اکتشافی مؤثر هستند (Cavanaugh & Lonstein, 2010). با توجه به فراوانی رفتارهای جنب‌وجوشی مرغ بومی در مقایسه با جوجه تجاری می‌توان افزایش بیان این همریخت را به این نوع رفتار مرتبط دانست.

در مرغ بومی همریخت TDH یکی از همریخت‌های با بیان بسیار بالا بود. این پروتئین آنزیم اصلی آغازکننده زیست‌سوز اسیدآمین ترئونین است. بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند، در مرغ اهلی فعالیت TDH توسط سطح پروتئین جیره غذایی متأثر می‌شود، به‌طوری‌که در جوجه‌هایی که جیره غذایی حاوی سطوح بالاتری از پروتئین را در مقایسه با جیره حاوی سطح پایه پروتئین مصرف کرده‌اند، بیان این ژن بالاتر بود (Davis & Austic, 1997).

یکی دیگر از همریخت‌های شرکت‌کننده در این فرایندها، ACE بود. ژن ACE با تبدیل آنژیوتنسنین غیرفعال به صورت فعال آن، آنژیوتنسنین II، موجب افزایش شکست پروتئین‌های ماهیچه کالبدی با سامانه پروتئین‌شکنی (پروتئولیزی) یوبیکوتین می‌شود (Yoshida *et al.*, 2010). درنهایت آنژیوتنسنین II سطح IGF1 را کاهش داده که موجب کاهش ساخت پروتئین و پررشدی (هایپرتروفی) ماهیچه کالبدی می‌شود (Brink *et al.*, 1996). یکی دیگر از همریخت‌های مربوط به این سه فرایند، ZFAND است. پروتئین کدشونده توسط ZFAND5 نیز در پس‌روی (آتروفی) ماهیچه کالبدی دخالت می‌کند (Hishiya *et al.*, 2006). در شرایط زیست‌سوزی (کاتابولیکی) مانند پایین بودن سطح انسولین، پرکاری غده تیروئید (هایپرتیروئیدیسم)، سرطان و برخی دیگر موارد، شکست پروتئین‌های ماهیچه کالبدی (پس‌روی) افزایش می‌یابد. در پس‌روی‌های ماهیچه‌ای، سامانه یوبیکوتین پروتئوزوم نقش اصلی را در شکست پروتئینی ایفا می‌کند (Tawa Jr *et al.*, 1997). در مرغ بومی بیان همریخت‌های FBXO32 و UBE2B تفاوت معنی‌داری نسبت به جوجه تجاری داشت. این دو ژن جز لیگازهای یوبیکوتینی بوده و توأم با FOXO3 در شکست پروتئین‌های ماهیچه کالبدی شرکت می‌کنند (Polge *et al.*, 2015). بیان همریخت FOXO3 نیز در مرغ بومی در مقایسه با جوجه تجاری افزایش معنی‌دار نشان داد.



شکل ۲. ده ژن نخست با بالاترین مقادیر بیان معنی‌دار در جوجه تجاری و نیز در مرغ بومی

Figure 2. The top 10 isoforms with the highest expression values in the commercial broiler and in the native chicken

وضعیت می‌تواند دلیل کم بودن اشتها و پایین بودن میزان مصرف خوراک این نژاد را در مقایسه با نژاد تجاری توجیه کند.

پروتئین به‌دست‌آمده از کددهی ژن PDK4 موجب جلوگیری از فعالیت آنزیمی کمپلکس پاپیرویت دهیدروژناز (PDC) می‌شود و بدین ترتیب تبدیل پاپیرویت به استیل کوانزیم A را کاهش می‌دهد. FOXO می‌تواند به ناحیه راه‌اندازی (پروموتری) این ژن متصل شده و موجب افزایش رونویسی آن شود (Furuyama *et al.*, 2003). افزایش بیان PDK4 در مرغ بومی، باعث افزایش گلوکونئوز (از طریق حفظ گلوکز و دیگر سوسترهای گلوکونئوز مانند آلانین) و نیز همزمان موجب کاهش تجزیه گیلوکژن یا گلاکولیز (از طریق غیرفعال کردن PDC) شده است. این نوع سوخت‌وساز در تلاش برای سازگاری با شرایط روزه‌داری‌های درازمدت گزارش شده است.

یکی دیگر از همریخت‌های مرتبط با پس‌روی SESN1 بود که بیان بالاتری در مرغ بومی نسبت به مرغ تجاری داشت. این ژن در تنش‌های محیطی و سوخت‌وسازی مانند تنش اکسایشی، هیپوکسی، تخلیه انرژی، کمبود اسیدهای آمینه و یا در حضور عامل‌های رونویسی مانند FOXO افزایش بیان می‌یابد (Lee *et al.*, 2013). برجسته‌ترین اثر سستری‌ها جلوگیری از رشد یاخته‌ای از طریق فعال‌سازی AMPK و سرکوب کردن محور mTORC1 و در نتیجه کاهش رشد ماهیچه با جلوگیری از مسیر ساخت پروتئین است (Parmigiani *et al.*, 2014).

پروتئین به‌دست‌آمده از کددهی ژن CHAC1 موجب تجزیه گلوکوتایون به پرولین و دی پپتید Cys-Gly می‌شود. گلوکوتایون از مهم‌ترین پاداکننده (آنتی‌اکسیدانت)‌های بدن در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال و محافظت از آسیب به اجزای یاخته‌ای می‌شود (Pompella *et al.*, 2003). از CHAC1 به‌عنوان ژن آغازکننده و مرتبط با مرگ یاخته‌ای یاد می‌شود. یکی از ویژگی‌های بارز آلودگی به ویروس، آغاز مرگ یاخته‌ای در یاخته میزبان است و این نشان‌دهنده مقاومت میزبان در مقابل آلودگی ویروسی است (Barber, 2001). بنابراین افزایش بیان این همریخت

در این بررسی جوجه‌های هردو نژاد یک جیره غذایی همسان را دریافت کردند. بنابراین شاید بتوان نتیجه گرفت اضافه مصرف پروتئین با جیره غذایی که بر پایه نیازمندی‌های جوجه تجاری ترکیب‌بندی (فرموله) شده بود، موجب افزایش بیان این ژن در مرغ بومی شده است.

در میان ده همریخت با بیان بالا در مرغ بومی، LPIN1 یکی از مهم‌ترین ژن‌هایی است که مورد توجه محققان قرار گرفته است. ژن LPIN1 به‌طور عمده در ماهیچه‌های کالبدی بیان شده (Donkor *et al.*, 2007) و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت دارای نقش اختصاصی در این بافت باشد. افزایش بیان LPIN1 در ماهیچه کالبدی به‌طور معنی‌داری تعادل انرژی را تغییر می‌دهد و با کاهش بیان این ژن در ماهیچه کالبدی مصرف انرژی نیز متعادل می‌شود (Phan & Reue, 2005). این موضوع ثابت می‌کند، بیان این ژن در بافت ماهیچه می‌تواند اثر مستقیمی بر سوخت‌وساز انرژی داشته باشد. در مرغ خانگی محدودیت انرژی دریافتی به‌طور معنی‌داری سطح mRNA ژن LPIN1 را افزایش می‌دهد (Liand Chen *et al.*, 2013). گرسنگی، تغذیه مقادیر بالای چربی و قند (دیابت) موجب افزایش بیان این ژن شده و بیان آن برای فعال‌سازی ژن‌های اکسیدکننده چربی‌ها مورد نیاز است (Reue and Dwyer, 2009). بنابراین افزایش بیان این همریخت می‌تواند بیانگر وجود نوعی محدودیت غذایی و گرسنگی در این مرغ باشد.

یکی دیگر از همریخت‌های با بیان بالا BMP7 بود. این پروتئین جز ابرخانواده TGF-B بوده و ویژگی‌های استخوان‌زایی (استئوژنیک) دارد (Zamani & Brown, 2010). در سال‌های اخیر مشخص شده است که BMP7 می‌تواند به‌عنوان یک کاهش‌دهنده اشتها از طریق مسیر mTOR مرکزی و مستقل از لپتین، موجب کاهش اشتها و در نتیجه کاهش مصرف خوراک شود (Townsend *et al.*, 2012). از این نظر یک داروی دارای قابلیت چربی‌سوزی و کاهش‌دهنده وزن به شمار می‌آید. بیان خام این ژن در مرغ بومی بیش از شش برابر میزان آن در جوجه تجاری بود. این

نتیجه باید محتوای میتوکندریایی بیشتری نیز داشته باشند.

در این بررسی شماری از همریخت‌های کدکننده پروتئین‌های مربوط به لیف‌های نوع کند در جوجه تجاری بیش بیان شدند (جدول ۳). میزان بیان خام همریخت LMOD2 در جوجه تجاری نزدیک به ۲۳ برابر مرغ بومی بود. LMOD2 یکی از اعضای خانواده تروپومودولین و پروتئین افزایش‌دهنده طول اکتین است. بیان این ژن محدود به ماهیچه کالبدی و قلبی است (Conley, 2001). همریخت MYBPC3 نیز به‌طور عمده در ماهیچه قلبی و به‌ویژه ماهیچه کالبدی کند (نوع اول) بیان می‌شوند (Kong *et al.*, 2017). MYOZ2 نیز یک فسفاتاز کلیدی برای تنظیم نوع لیف عضلانی بوده و در ماهیچه کالبدی کند یافت می‌شود. بتا تروپومیوزین یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های متصل شونده به رشته (فیلامنت) اکتین بوده و توأم با کمپلکس تروپونین در تنظیم انقباض ماهیچه مخطط مهره‌داران نقش اصلی را ایفا می‌کند. این پروتئین توسط ژن TPM2 و به‌طور عمده در لیف‌های ماهیچه نوع اول (آهسته) کددهی می‌شود (Bottje *et al.*, 2017). با توجه به بیش بیان شدن این همریخت‌ها در جوجه تجاری راس می‌توان نتیجه گرفت ترکیب لیف‌های ماهیچه‌ای سینۀ چهار هفتگی این جوجه در مقایسه با مرغ بومی باید به‌طور عمده از نوع لیف‌های کند باشد. موثرین و همکاران در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، در جوجه‌های گوشتی مبتلا به عارضۀ میوپاتی سینۀ چوبی (Wooden breast myopathy muscle)، بیان ژن‌های TNNI1، MYBPC1 و MYOZ2 افزایش یافته و این می‌تواند در نتیجۀ تغییر و تغییر ترکیب لیف‌های ماهیچه‌ای از سریع به کند باشد (Mutryn *et al.*, 2015). افزون بر این گزارش شده، افزایش بیان ژن NR4A3 نشانه تغییر لیف‌های ماهیچه‌ای از سریع به کند است (Lin *et al.*, 2002). در تأیید این گزارش، در این بررسی افزایش بیان ۱۹ برابری این همریخت در جوجه تجاری در مقایسه با مرغ بومی مشاهده شد.

همچنین افزایش بیان همریخت‌های مربوط به زنجیره‌های سبک (MYL9، MYL12A) و سنگین (MYH13، MYH1D) میوزینی در جوجه تجاری،

می‌تواند ناشی از تکامل سازوکارهای ایمنی در مرغ بومی و یا افزایش شکست پروتئین‌های ماهیچه‌ای ناشی از پس‌روی باشد.

یکی دیگر از همریخت‌های شرکت‌کننده در شکست پروتئینی ASB2 است. این همریخت با شرکت در ایجاد کمپلکس لیگازهای یوبیکویتینی E3 فعال، باهدف قرار دادن فیلامنت‌های وصل‌شونده به اکتین، موجب شکست پروتئوزومی پروتئین‌های ماهیچه‌ای می‌شود (Bello *et al.*, 2009).

یکی از مهم‌ترین سازوکارهای مهارکننده پروتئین‌شکن در یوکاریوت‌ها سامانۀ یوبیکویتین-پروتئوزوم است. تودۀ ماهیچه در نتیجۀ حفظ یک تعادل بسیار دقیق بین فرآیندهای ساخت و شکست، کنترل می‌شود. تحلیل تودۀ ماهیچه‌ای شامل پس‌روی لیف‌های ماهیچه‌ای به دلیل فعال شدن مسیرهای سیگنالی شکست پروتئین است. پس‌روی نیز در پاسخ به شرایط تنشی و برای زیست‌سازی (هموستاز) بافتی و حفظ بقای یاخته فعال می‌شود (Liu *et al.*, 2016). در دورۀ فراوانی مواد غذایی، سیگنال‌دهی شبه انسولین (IGF-1) در ماهیچه کالبدی مسیرهای زیست‌سازی را تحریک کرده تا ساخت پروتئین و هایپرتروفی ماهیچه‌ای بیشتر شود. چنانچه سطح گلوکز در گردش پایین باشد، پروتئین ماهیچه کالبدی شکسته و اسیدهای آمینۀ آزادشده تا برای گلوکززایی و ساخت پروتئین‌های ضروری استفاده شوند. افزایش بیان همریخت‌های بحث‌شده در مرغ بومی نشان می‌دهد، تعادل پروتئینی در نتیجۀ افزایش شکست پروتئین و کاهش ساخت ماهیچه تغییر کرده است تا بدین ترتیب حجم ماهیچه‌های کالبدی کوچک‌تر شده و در نتیجۀ نیازهای غذایی این مرغ برای فرایندهای رشدی کاهش یابد.

همریخت‌های مرتبط با نوع پروتئین‌های ماهیچه‌ای

ماهیچه سینۀ مرغ اهلی یکی از معدود ماهیچه مهره‌داران است که تاحدودی کل لیف آن از نوع لیف سفید است. لیف‌های کند نوع اول (Slow type fiber) در مقایسه با لیف‌های سریع نوع دوم (Fast type fiber) میتوکندری فراوان و سوخت‌وساز هوازی داشته و در

همچنین چهار همریخت مهم *ATF3*، *ACTC1*، *CYR61* و *FABP4* نیز در جوجه تجاری در دو فرم مختلف بیش بیان شده بود. نتایج این آزمایش نشان داد، در جوجه تجاری فراوانی همریخت‌های مرتبط به ماهیچه کالبدی با انقباض‌های آهسته بیشتر از همریخت‌های ماهیچه کالبدی با انقباض سریع است. افزون بر این در جوجه تجاری همریخت‌های با تفاوت بیان معنی‌دار بیشتر در ارتباط با فرایندهای زیستی و مسیرهای سوخت‌وسازی مرتبط با افزونش و تمایز یاخته‌ای، پررشدی و ساخت پروتئین‌های ساختمانی ماهیچه‌ای بوده درحالی‌که در مرغ بومی این‌ها به‌طور عمده مرتبط به فرایندهای ایمنی، متصل‌شونده‌ها به فلزات، DNA و RNA، حاملان یون‌ها و فلزها و عامل‌های شرکت‌کننده در شکست پروتئین‌های ماهیچه‌ای بودند. برآیند این‌گونه فرایندها نشان می‌دهد، چنین تغییراتی توانسته با کاهش نیازهای مرغ بومی، امکان تداوم و چیرگی بر شرایط سخت محیطی و غذایی را در طول دوره تکاملی او تقویت کرده است.

می‌تواند نشانه فعالیت بیشتر فرایندهای زیست‌سازی مرتبط با پروتئین‌های لیفی ماهیچه‌ای در مقایسه با مرغ بومی باشد. به‌رحال هیچ‌کدام از همریخت‌های مرتبط با ساختمان پروتئین‌های ماهیچه‌ای در مرغ بومی بیش بیان نبود.

جدول ۳. همریخت‌های بیش بیان مرتبط با ساختمان

پروتئینی لیف ماهیچه‌ای در جوجه تجاری

Table 3. Muscle fiber structural protein-related isoforms upregulated in commercial chickens

Location of expression	Gene	Log ₂ FC	P-adjusted
Thin filament	MYL12A	3.18541	0.018433
	MYL9	1.36547	0.007786
	TPM2	1.86954	0.007786
	LMOD2	4.56494	0.007786
Tick filament	MYBPC3	3.28817	0.0134521
	MYH13	1.0668	0.007786
	MYH1D	1.89717	0.007786
Z-disk	MYOZ2	2.04249	0.007786

نتیجه‌گیری کلی

بررسی ساختار بیان ژنی ماهیچه سینه در سن چهار هفتگی مرغ بومی و جوجه تجاری راس نشان داد، شمار زیادی همریخت در هر دو نژاد بیان داشته و هر مرغ نیز به‌طور جداگانه همریخت‌های اختصاصی دارد.

REFERENCES

- Babic, A. M., Kireeva, M. L., Kolesnikova, T. V. & Lau, L. F. (1998). *CYR61*, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6355-6360.
- Bauerle, P. A. & Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annual review of immunology*, 12(1), 141-179.
- Barber, G. (2001). Host defense, viruses and apoptosis. *Cell death and differentiation*, 8(2), 113-126.
- Bello, N. F., Lamsoul, I., Heuzé, M. L., Métais, A., Moreaux, G., Calderwood, D. A., Duprez, D., Moog-Lutz, C. & Lutz, P. G. (2009). The E3 ubiquitin ligase specificity subunit ASB2 β is a novel regulator of muscle differentiation that targets filamin B to proteasomal degradation. *Cell Death & Differentiation*, 16(6), 921-932.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the royal statistical society. Series B (Methodological)*, 289-300.
- Bottje, W., Kong, B.-W., Reverter, A., Waardenberg, A. J., Lassiter, K. & Hudson, N. J. (2017). Progesterone signalling in broiler skeletal muscle is associated with divergent feed efficiency. *BMC systems biology*, 11(1), 29.
- Brink, M., Wellen, J. & Delafontaine, P. (1996). Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *Journal of Clinical Investigation*, 97(11), 2509.
- Cadenas, E. & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 222-230.
- Cavanaugh, B. L. & Lonstein, J. S. (2010). Social novelty increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the extended olfactory amygdala of female prairie voles. *Physiology & Behavior*, 100(4), 381-386.
- Choi, Y. & Kim, B. (2009). Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. *Livestock Science*, 122(2), 105-118.
- Conley, C. A. (2001). Leiomodin and tropomodulin in smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280(6), C1645-C1656.

12. David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P. & Manley, J. L. (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*, 463(7279), 364-368.
13. Davis, A. J. & Austic, R. E. (1997). Dietary protein and amino acid levels alter threonine dehydrogenase activity in hepatic mitochondria of Gallus domesticus. *The Journal of Nutrition*, 127(5), 738-744.
14. Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C. & Lempicki, R. A. (2003). DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biology*, 4(9), 1.
15. Dong, J.-Q., Zhang, H., Jiang, X.-F., Wang, S.-Z., Du, Z.-Q., Wang, Z.-P., Leng, L., Cao, Z.-P., Li, Y.-M. & Luan, P. (2015). Comparison of serum biochemical parameters between two broiler chicken lines divergently selected for abdominal fat content. *Journal of animal science*, 93(7), 3278-3286.
16. Donkor, J., Sariahmetoglu, M., Dewald, J., Brindley, D. N. & Reue, K. (2007). Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *Journal of Biological Chemistry*, 282(6), 3450-3457.
17. Furuyama, T., Kitayama, K., Yamashita, H. & Nozomu, M. (2003). Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochemical Journal*, 375(2), 365-371.
18. Griffin, H. & Goddard, C. (1994). Rapidly growing broiler (meat-type) chickens. Their origin and use for comparative studies of the regulation of growth. *International Journal of Biochemistry*, 26(1), 19-28.
19. Hishiya, A., Iemura, S. I., Natsume, T., Takayama, S., Ikeda, K. & Watanabe, K. (2006). A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *The EMBO Journal*, 25(3), 554-564.
20. Karni, R., de Stanchina, E., Lowe, S. W., Sinha, R., Mu, D. & Krainer, A. R. (2007). The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(3), 185-193.
21. Kim, D., Langmead, B. & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4), 357-360.
22. Kim, N. K., Joh, J. H., Park, H. R., Kim, O. H., Park, B. Y. & Lee, C. S. (2004). Differential expression profiling of the proteomes and their mRNAs in porcine white and red skeletal muscles. *Proteomics*, 4(11), 3422-3428.
23. Klont, R., Brocks, L. & Eikelenboom, G. (1998). Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science*, 49, S219-S229.
24. Kong, B.-W., Hudson, N., Seo, D., Lee, S., Khatri, B., Lassiter, K., Cook, D., Piekarski, A., Dridi, S. & Anthony, N. (2017). RNA sequencing for global gene expression associated with muscle growth in a single male modern broiler line compared to a foundational Barred Plymouth Rock chicken line. *BMC genomics*, 18(1), 82.
25. Lau, L. F. (2011). CCN1/CYR61: The Very Model of a Modern Matricellular Protein. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68(19), 3149-3163.
26. Lee, A., Suh, Y., Wick, M. & Lee, K. (2012). Temporal myosin heavy chain isoform expression transitions faster in broiler chickens compared with Single Comb White Leghorns. *Poultry Science*, 91(11), 2872-2876.
27. Lee, J. H., Budanov, A. V. & Karin, M. (2013). Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging. *Cell Metabolism*, 18(6), 792-801.
28. Li, S., Chen, W., Kang, X., Han, R., Sun, G. & Huang, Y. (2013). Distinct tissue expression profiles of chicken Lpin1- α/β isoforms and the effect of the variation on muscle fiber traits. *Gene*, 515(2), 281-290.
29. Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E. & Olson, E.N. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418(6899), 797-801.
30. Liu, C.-C., Lin, Y.-C., Chen, Y.-H., Chen, C.-M., Pang, L.-Y., Chen, H.-A., Wu, P.-R., Lin, M.-Y., Jiang, S.-T. & Tsai, T.-F. (2016). Cul3-KLHL20 ubiquitin ligase governs the turnover of ULK1 and VPS34 complexes to control autophagy termination. *Molecular Cell*, 61(1), 84-97.
31. Lohse, M., Bolger, A. M., Nagel, A., Fernie, A. R., Lunn, J. E., Stitt, M. & Usadel, B. (2012). R obi NA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W622-W627.
32. Matsakas, A. & Patel, K. (2009). Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histology and Histopathology*, 24(5), 611-629.
33. Mendoza, K., Sporer, K., Strasburg, G., Tempelman, R. & Velleman, S. (2011). Differential Cardiac Gene Expression in Turkeys Genetically Selected for Increased Body Weight. *J Veterinar Sci Technol S*, 7, 2.
34. Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A. & Hurler, J. (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*, 126(23), 5515-5522.
35. Mutryn, M. F., Brannick, E. M., Fu, W., Lee, W. R. & Abasht, B. (2015). Characterization of a novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA-sequencing. *BMC Genomics*, 16(1), 399.

36. Okamoto, A., Iwamoto, Y. & Maru, Y. (2006). Oxidative stress-responsive transcription factor ATF3 potentially mediates diabetic angiopathy. *Molecular and Cellular Biology*, 26(3), 1087-1097.
37. Parmigiani, A., Nourbakhsh, A., Ding, B., Wang, W., Kim, Y. C., Akopiants, K., Guan, K.-L., Karin, M. & Budanov, A. V. (2014). Sestrins inhibit mTORC1 kinase activation through the GATOR complex. *Cell Reports*, 9(4), 1281-1291.
38. Phan, J. & Reue, K. (2005). Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metabolism*, 1(1), 73-83.
39. Polge, C., Attaix, D. & Taillandier, D. (2015). Role of E2-Ub-conjugating enzymes during skeletal muscle atrophy. *Frontiers in Physiology*, 6.
40. Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V. & Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology*, 66(8), 1499-1503.
41. Reddish, J., Wick, M., St-Pierre, N. & Lilburn, M. (2005). Analysis of myosin isoform transitions during growth and development in diverse chicken genotypes. *Poultry science*, 84(11), 1729-1734.
42. Reue, K. & Dwyer, J. R. (2009). Lipin proteins and metabolic homeostasis. *Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), S109-S114.
43. Reyer, H., Hawken, R., Murani, E., Ponsuksili, S. & Wimmers, K. (2015). The genetics of feed conversion efficiency traits in a commercial broiler line. *Scientific Reports*, 5, 16387.
44. Robbiani, D. F., Finch, R. A., Jäger, D., Muller, W. A., Sartorelli, A. C. & Randolph, G. J. (2000). The Leukotriene C4 Transporter MRP1 Regulates CCL19 (MIP-3 β , ELC)-Dependent Mobilization of Dendritic Cells to Lymph Nodes. *Cell*, 103(5), 757-768.
45. Sihvo, H.-K., Immonen, K. & Puolanne, E. (2014). Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Veterinary Pathology*, 51(3), 619-623.
46. Tawa Jr, N. E., Odessey, R. & Goldberg, A. L. (1997). Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *Journal of Clinical Investigation*, 100(1), 197.
47. Thomas, K., Engler, A. J. & Meyer, G. A. (2015). Extracellular matrix regulation in the muscle satellite cell niche. *Connective Tissue Research*, 56(1), 1-8.
48. Townsend, K. L., Suzuki, R., Huang, T. L., Jing, E., Schulz, T. J., Lee, K., Taniguchi, C. M., Espinoza, D. O., McDougall, L. E. & Zhang, H. (2012). Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) reverses obesity and regulates appetite through a central mTOR pathway. *The FASEB Journal*, 26(5), 2187-2196.
49. Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L. & Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, 7(3), 562-578.
50. Tyra, M., Ropka-Molik, K., Eckert, R., Piórkowska, K. & Oczkiewicz, M. (2011). H-FABP and LEPR gene expression profile in skeletal muscles and liver during ontogenesis in various breeds of pigs. *Domestic animal endocrinology*, 40(3), 147-154.
51. Velleman, S. G., Clark, D. L. & Tonniges, J. R. (2017). Fibrillar Collagen Organization Associated with the Broiler Wooden Breast Fibrotic Myopathy. *Avian Diseases*, 61(4), 481-490.
52. Weir, E., Chen, Q., DeFrances, M. C., Bell, A., Taub, R. & Zarnegar, R. (1994). Rapid induction of mRNAs for liver regeneration factor and insulin-like growth factor binding protein-1 in primary cultures of rat hepatocytes by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Hepatology*, 20(4 Pt 1), 955-60.
53. Wu, T., Zhang, Z., Yuan, Z., Lo, L. J., Chen, J., Wang, Y. & Peng, J. (2013). Distinctive genes determine different intramuscular fat and muscle fiber ratios of the longissimus dorsi muscles in Jinhua and landrace pigs. *PloS one*, 8(1), e53181.
54. Yeung, K. Y. & Ruzzo, W. L. (2001). Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics*, 17(9), 763-74.
55. Yoshida, T., Semprun-Prieto, L., Sukhanov, S. & Delafontaine, P. (2010). IGF-1 prevents ANG II-induced skeletal muscle atrophy via Akt-and Foxo-dependent inhibition of the ubiquitin ligase atrogin-1 expression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 298(5), H1565-H1570.
56. Yousefi Zonuz, A., Alijani, S., Mohammadi, H., Rafat, A. & Daghigh Kia, H. (2013). Estimation of genetic parameters for productive and reproductive traits in Esfahan native chickens. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 1(2), 34-38.
57. Yuan, Y., Liu, Y.-G., Shi, X. & Yang, G.-S. (2010). Signaling pathways in skeletal muscle fiber-type transition. *Chinese Journal Biochemistry Molecular Biology*, 26, 796-801.
58. Zamani, N. & Brown, C. W. (2010). Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocrine reviews*, 32(3), 387-403.