

تجزیه و تحلیل پروفایل بیان ایزو فرم‌های ژن‌های مرتبط با باقیمانده خوراک مصرف‌شده در کبد مرغ بومی اصفهان و مرغ سویه راس با استفاده از داده‌های RNA-Seq

حمیدرضا ایزدینیا^۱ - مجتبی طهمورث پور^{۲*} - محمدرضا بختیاری زاده^۳ - محمدرضا نصیری^۴ - سعید اسماعیل خانیان^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۹

چکیده

باقیمانده خوراک مصرف‌شده (RFI) تفاوت بین مقدار واقعی خوراک مصرف شده با مقدار مورد انتظار آن در هر دام می‌باشد. انتخاب برای بهبود بازده خوراک دام از طریق RFI به دلیل استقلال فنوتیپی آن از وزن متابولیسی بدن و افزایش وزن بدن پیشنهاد شده است. جهت کشف ارتباط بین ساختار بیان ژن‌ها و ایزو فرم‌های مرتبط با آن‌ها و همچنین نقش تنظیمی آن‌ها در باقیمانده خوراک مصرف‌شده در مرغ، پروفایل ترانسکرپت‌های کبد در سن ۴۲ روزگی در دو گروه مرغ بومی اصفهان و مرغ راس مورد بررسی قرار گرفت. باقیمانده خوراک مصرف‌شده جوجه‌های بومی اصفهان و سویه راس به ترتیب $(+13.430 \pm 5.393 \text{ g/day})$ و $(-11.212 \pm 4.435 \text{ g/day})$ بود. آنالیز تفرقی بیان با استفاده از بسته نرم‌افزاری Cuffdiff (v2.2.1) برای بیش از ۴۵۰۷۰ ایزو فرم مربوط به ۱۹۰۰۳ ژن انجام شد. طبقه‌بندی ایزو فرم‌های بر اساس نتایج Cuffcompare تعداد ۱۶۱۲۱ ایزو فرم در مرغ بومی اصفهان کاهش بیان نشان دادند و ۲۸۹۴۹ ایزو فرم افزایش بیان نشان دادند. از کل ایزو فرم‌های شناسایی شده ۲۱۰۸۱ ایزو فرم جدید بودند. ۲۰۶ ایزو فرم تغییر بیان یافته بین مرغ سویه راس و مرغ بومی اصفهان شناسایی شد. از بین این ایزو فرم‌ها، در مرغ بومی اصفهان نسبت به مرغ سویه راس، تعداد ۱۲۶ ایزو فرم مربوط به ۹۹ ژن کاهش و ۸۰ ایزو فرم مربوط به ۵۵ ژن، افزایش بیان نشان دادند. نتایج تجزیه و تحلیل عملکردی ژن‌ها نشان داد ایزو فرم‌های کاهش بیان یافته‌ی گونه بومی عمدتاً در فرآیندهای زیستی مختلف از جمله واکنش‌دهی به استرس، پاسخ به ترکیب حاوی اکسیژن، واکنش‌دهی به چربی، توسعه ارگان‌های حیوان، واکنش‌دهی به مواد مغذی، واکنش‌دهی به سیتوکین‌ها، پاسخ به سطوح تغذیه، فرآیند بیوسنتز مولکول‌های تکی، فرآیندهای بیوسنتز چربی‌ها و فرآیندهای تنظیم ارگانیزم‌های چندگانه نقش داشتند. شناسایی ژن‌های اختلاف بیان یافته و ایزو فرم‌های آن‌ها بین جوجه‌های دو نژاد منجر به شناسایی ژن‌های کاندید مهم برای برنامه‌های به‌نژادی، از جمله EGR1، IL15، RSAD2 و EGR1 و DUSP16 شد. این ژن‌ها می‌توانند با باقیمانده بالاتر نژاد بومی مرتبط باشند.

واژه‌های کلیدی: ایزو فرم، باقیمانده خوراک مصرف‌شده، مرغ، RNA-Seq

مقدمه ۱

حیوانی و تخم مرغ به‌ویژه در روستاها دارد. همچنین مرغ بومی نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیماری‌ها از مقاومت بالایی برخوردار بوده و جهت نگهداری به هزینه کمتر و شرایط ساده‌تری نیاز دارند (۲۰). علی‌رغم مزایای ذکرشده، مرغ بومی در زمینه افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک بازده پایینی دارند. با توجه به سهم ۷۰ درصدی هزینه خوراک در مجموع هزینه‌های تولید فرآورده‌های دامی، بازده خوراک، تبدیل به یکی از صفات ژنتیکی مهم در دام و طیور شده است. بازده خوراک معمولاً تحت عنوان ضریب تبدیل غذایی^۶، یا مقدار خوراک مورد نیاز برای به‌دست آوردن یک واحد وزن بدن، بیان می‌شود. عامل عمده در میزان مصرف خوراک، تنوع در نیاز نگهداری است، که در محاسبه ضریب تبدیل غذایی نادیده گرفته می‌شود. مقدار زیادی از تفاوت در بهره‌وری

اکثر کشورهای جهان برای نگهداری و ارزیابی منابع ژنتیکی بومی خود ارزش قابل توجهی قائل‌اند. نژادهای بومی حیوانات هر کشور به‌عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشوری محسوب می‌شوند. مرغ بومی نقش بسیار مهم و اساسی در تولید پروتئین

۱- دانشجوی دکتری پردیس بین‌الملل دانشگاه فردوسی مشهد و محقق مرکز

تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد

۲- استاد دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

۴- دانشیار دانشگاه فردوسی مشهد

۵- دانشیار موسسه علوم دامی کشور

(*- نویسنده مسئول (Email: m_tahmoorespur@yahoo.com

DOI: 10.22067/ijasr.v10i4.69061

6- FCR=feed conversion ratio

فرم‌های مختلف ژن‌های درگیر در راندمان خوراک، در سلول‌های مرغ بومی اصفهان و مقایسه آن با سویه تجاری راس بود. اطلاعات به‌دست آمده از این مطالعه می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی مرغان بومی، در جهت افزایش میانگین تولید، مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

حیوانات، استخراج RNA و توالی‌یابی

آزمایش روی جوجه‌های سویه راس (راندمان تولید بالا) و توده بومی اصفهان (راندمان تولید پایین) انجام شد. از هر گروه ۶۰ قطعه جوجه خروس انتخاب و از روز ۲۴ تا ۴۲ روزگی به مدت ۱۹ روز در قفس پرورش داده شدند. جوجه‌های هر دو گروه در سالن مرغداری مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد، با شرایط مدیریتی یکسان پرورش داده شدند. مصرف خوراک روزانه، میانگین افزایش وزن روزانه و متوسط وزن متابولیکی برای هر دو گروه اندازه‌گیری شد و در پایان با استفاده از آن‌ها باقیمانده خوراک مصرفی (RFI) در پایان ۴۲ روزگی برای هر دو گروه محاسبه شد.

روش اندازه‌گیری باقیمانده خوراک مصرفی

برای اندازه‌گیری باقیمانده خوراک مصرفی هر پرنده در قفس‌های انفرادی قرار داده شده و خوراک مصرفی روزانه (FI) از مقدار خوراک خورده شده در طی ۱۹ روز (از روز ۲۴ تا ۴۲) تقسیم بر تعداد روزها، و افزایش وزن روزانه (DG) از تفاوت وزن ۲۴ روزگی با وزن ۴۲ روزگی تقسیم بر تعداد روزها محاسبه شد. با استفاده از این ارقام مقدار باقیمانده خوراک مصرفی از رابطه زیر محاسبه خواهد شد (۲۴).

$$RFI_i = FI_i - (\beta_0 + \beta_1 DG_i + \beta_2 MBW_i)$$

RFI_i = باقیمانده غذای مصرفی

FI_i = مقدار غذای مصرفی حقیقی روزانه

DG_i = متوسط افزایش وزن روزانه

MBW_i = وزن متابولیکی بدن

β_1 و β_2 ضرایب تابعیت مقدار غذای مصرفی حقیقی از متوسط

رشد روزانه و وزن متابولیکی هستند.

سپس از هر نژاد ۱۰ نمونه از بافت کبد (از قسمت‌های مشابه در هر پرنده) جمع‌آوری شد و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شد و به آزمایشگاه برای استخراج RNA ی کل منتقل شد (۲۹). استخراج RNA از نمونه‌های کبد هر پرنده به صورت جداگانه با استفاده از TRIzol شرکت (Invitrogen, USA) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. برای بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج

بین طيور، در میزان خوراک مصرفی قابل مشاهده است که توسط وزن متابولیکی بدن، وزن بدن (BW^1) و توده تخم‌مرغ (EM^2) قابل توضیح و تفسیر نمی‌باشد. این تفاوت در میزان مصرف غذا، در اختلاف باقیمانده خوراک مصرف شده (RFI) منعکس می‌شود (۲۶).

باقیمانده خوراک مصرف شده (RFI) تفاوت بین جذب واقعی خوراک دام و آنچه که پیش‌بینی می‌شود حیوان بر اساس وزن بدن و سطح عملکردش جذب می‌کند، می‌باشد. دام‌های کارا کمتر از حد انتظار می‌خورند و شاخص RFI^3 آن‌ها منفی یا پایین است. در حالی که دام‌های ناکارا بیش از اندازه می‌خورند و شاخص RFI آن‌ها مثبت یا بالا است. انتخاب برای بهبود بازده خوراک دام از طریق RFI به دلیل استقلال فنوتیپی آن از وزن متابولیکی بدن و افزایش وزن بدن پیشنهاد شده است (۱۷). در همه گونه‌ها، شواهد حاکی از وجود پایه و اساس ژنتیکی تنوع در بهره‌وری است (۲۸). مطالعات گذشته نشان داده است که برخی ژن‌ها، ممکن است، نقش مهمی در کنترل RFI از طریق تأثیر بر دستگاه گوارش و فرآیندهای متابولیک (۱۲) بازی کنند. به نظر می‌رسد تغییرات در باقیمانده خوراک مصرف شده نتیجه تغییرات در بیان ژن‌های مرتبط با آن باشد و بررسی تغییرات ترانسکریپتوم در جوجه‌های با RFI بالا می‌تواند به کشف سازوکارهای مؤثر بر آن کمک کند.

از فناوری توالی‌یابی RNA (RNA-Seq) به‌عنوان یک روش قدرتمند، دقیق و با حساسیت بالا می‌توان در تعیین کمیت سطح بیان ژن و بررسی پروفایل ترانسکریپتوم استفاده کرد (۲۷). اسپلایسینگ جایگزین (AS) یک سازوکار رایج در یوکاریوت‌ها است که پیچیدگی ترانسکریپتوم و تنوع عملکردی را افزایش می‌دهد (۳۳). اسپلایسینگ جایگزین فرآیندی است که به موجب آن چندین ایزو فرم mRNA بالغ از یک mRNA نابالغ ایجاد می‌شود. اسپلایسینگ فرآیندی است که در آن pre-mRNA تغییر می‌یابد تا امتدادهای خاصی از رشته‌های کد نشده که اینترون نامیده می‌شوند را حذف کند. امتدادهایی که باقی می‌مانند شامل رشته‌های کد شده پروتئینی هستند و اگرزن نامیده می‌شوند. گاهی اوقات پیام‌های pre-mRNA ممکن است به چندین روش مختلف اسپلایس شوند که سبب می‌شود تا یک ژن چندین پروتئین را رمز کند و با تغییر عملکرد پروتئین‌های متعدد تولید کند (۲۵). اسپلایسینگ جایگزین می‌تواند فنوتیپ جاندار را تحت تأثیر قرار دهد و باعث بیماری شود (۲۲) و همچنین عملکرد ژن را در بافت‌های مختلف و یا شرایط محیطی متفاوت تغییر و یا حتی ژن را به‌طور کامل غیرفعال کند (۱۳). هدف از این مطالعه مقایسه تمامی رونوشت‌های یک سلول (ترانسکریپتوم) و پروفایل ایزو

1- body weight

2- Egg mass

3- RFI=residual feed intake

4- feed intake

5- Daily Gain

شناسایی ایزو فرم‌های جدید

برای شناسایی ایزو فرم‌های مختلف ژنی و اندازه‌گیری بیان ایزو فرم‌ها، نیازمند بررسی جایگاه‌های اسپلایسینگ بین آگزون‌ها می‌باشد. بدین منظور از رونوشت‌های مونتاژ شده که به‌وسیله Cufflinks نقشه‌یابی شده بودند برای مقایسه بیان ایزو فرم‌ها به‌وسیله Cuffcompare استفاده شد. Cuffcompare رونوشت‌های مونتاژ شده را با یک ژنوم مرجع مقایسه می‌کند و هر رونوشت را به رونوشت‌های شناخته‌شده، جدید و ایزو فرم‌های جدید بالقوه طبقه‌بندی می‌کند.

نتایج و بحث

ویژگی‌های رشد و باقیمانده خوراک مصرفی

نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری باقیمانده خوراک مصرف شده نشان داد میانگین افزایش وزن و مصرف خوراک جوجه‌های بومی اصفهان و سویه راس در طول ۱۹ روز (۲۴ تا ۴۲ روزگی) به‌ترتیب $441/06 \pm 6/769$ و $1339/255 \pm 8/054$ گرم بود. باقیمانده خوراک مصرف شده جوجه‌های بومی اصفهان و سویه راس نیز به‌ترتیب $13/430$ و $11/212$ - بود.

ارزیابی داده‌های به‌دست آمده از توالی‌یابی RNA

کل توالی‌های خوانده‌شده به‌ترتیب برای نمونه اول و دوم مرغ بومی اصفهان 14510042 و 21186451 و برای نمونه‌های اول و دوم سویه راس به‌ترتیب 19034129 و 15790197 خوانش در فرمت FASTQ دریافت شد. طول متوسط قطعات توالی‌یابی شده برای دو نمونه ۱۵۰ نوکلئوتید و متوسط کیفیت قطعات (Phred quality score) برای هر دو نمونه حدود ۸۳ درصد بود. محتوای GC برای نمونه‌های مرغ بومی اصفهان ۴۵٪ و برای نمونه‌های سویه راس ۴۶٪ بود (جدول ۱). بعد از پیرایش تعداد خوانش‌ها به‌ترتیب برای نمونه اول و دوم مرغ بومی اصفهان 14246264 و 20854515 و برای نمونه‌های اول و دوم سویه راس به‌ترتیب 18723445 و 15566191 خوانش بود.

آنالیز تفرقی بیان ایزو فرم

آنالیز تفرقی بیان ایزو فرم برای بیش از ۴۵۰۷۰ ایزو فرم مربوط به ۱۹۰۰۳ ژن انجام شد. بر اساس نتایج Cuffcompare تعداد ۱۶۱۲۱ ایزو فرم در مرغ بومی اصفهان کاهش بیان و ۲۸۹۴۹ ایزو فرم افزایش بیان نشان دادند. نتایج نشان داد از کل ایزو فرم‌های شناسایی شده ۲۱۰۸۱ ایزو فرم جدید بودند و ۲۰۶ ایزو فرم با بیان متفاوت و معنی‌دار بین مرغ سویه راس و مرغ بومی اصفهان شناسایی

شده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific™ Nano Drop2000) و ژل الکتروفورز استفاده شد. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت RNA استخراجی، از هر نژاد دو نمونه pooled شده (هر نمونه متشکل از سه نمونه RNA استخراج شده) آماده و جهت توالی‌یابی با روش Illumina توالی‌یاب پلت فرم HiSeq 2000 به شرکت BGI چین ارسال شد.

قبل از انجام هم‌ردیفی^۱ کیفیت توالی خوانش‌های خام با استفاده از نرم‌افزار Fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) بررسی شد (۱). برای حذف خوانش‌های باکیفیت پایین و یا خوانش‌های خام حاوی توالی‌های مربوط به آدپتور و پرایمر و Poly-N از نرم‌افزار Trimmomatic (نسخه ۰/۳۶) (۱۹) استفاده شد. خوانش‌های پیرایش شده جهت بررسی کیفیت مجدداً با نرم‌افزار Fastqc بررسی شدند.

نقشه‌یابی با ژنوم مرجع

ژنوم مرجع برای مرغ (Galgal4) و فایل حاشیه‌نویسی GTF از <http://asia.ensembl.org/info/data/ftp/index.html> ensembl دریافت شد. پس از کنترل کیفیت و ویرایش خوانش‌ها به منظور نقشه‌یابی خوانش‌های دست آمده با ژنوم مرجع از نرم‌افزار Hisat2 انجام شد (۱۶). به منظور قابل استفاده کردن قطعات کوتاه توالی‌یابی شده و تشکیل قطعه بلندتری از mRNA هر ژن (Contigs) این قطعات کوتاه سر هم^۳ گردیدند. سر هم کردن و اتصال دادن توالی‌های کوتاه اسیدنوکلئیک‌ها به منظور احیا و بازسازی توالی مبداء، از ژنوم مرجع (Reference Genome) مرغ (Galgal4) و با استفاده از نرم‌افزار Cufflinks انجام شد. حدود ۰/۸۳٪ از قطعات توالی‌یابی شده با ژنوم مرجع سر هم شدند.

آنالیز تفرقی بیان ژن با استفاده از بسته نرم‌افزاری Cuffdiff(v2.2.1) صورت گرفت. بررسی آنتولوژی ایزو فرم‌های تغییر بیان یافته شامل فرایندهای بیولوژیکی ژن‌ها توسط سایت دیوید (<https://david.ncifcrf.gov>) انجام گرفت (۶). بدین منظور لیست ایزو فرم‌های افزایش و کاهش بیان یافته به‌طور مجزا با لیست ژن‌های مرغ به‌عنوان مرجع مورد مقایسه آماری قرار گرفتند. در آنالیز نهایی از P-value تصحیح‌شده در سطح کمتر از ۵ درصد ارائه‌شده است استفاده گردید.

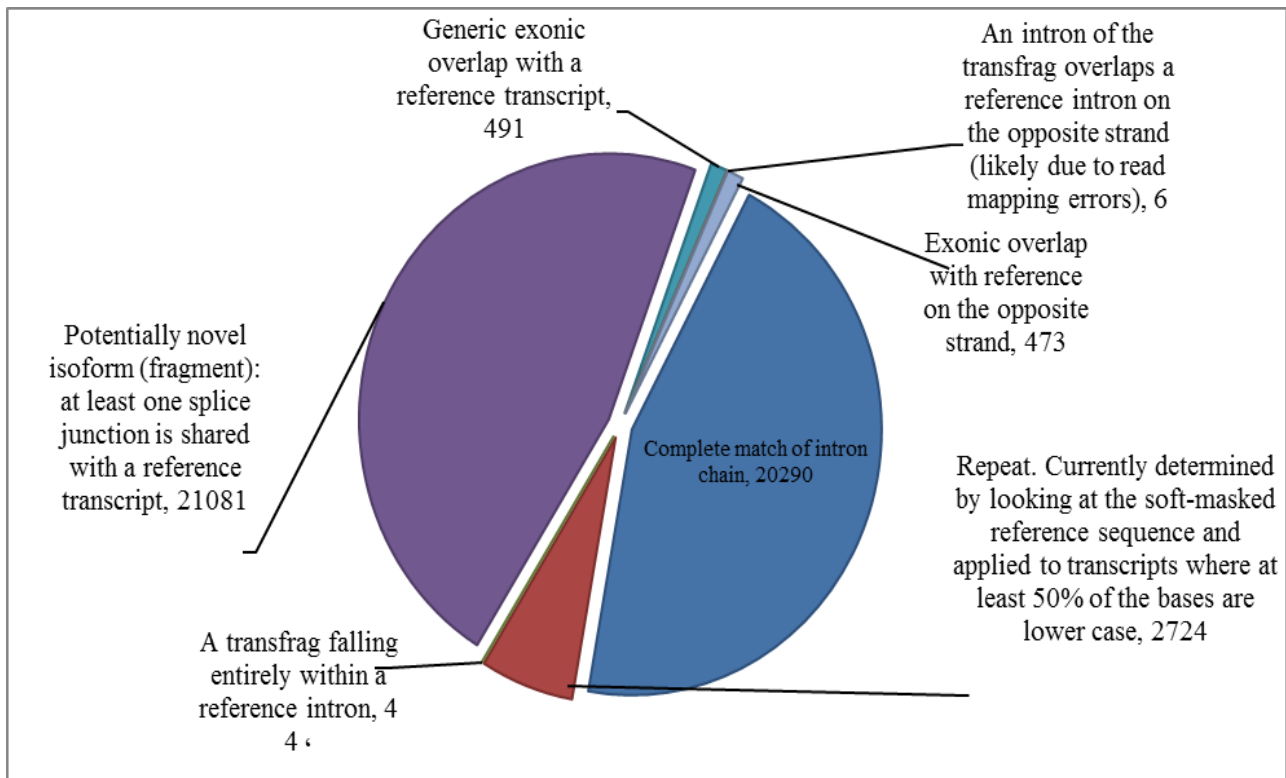
- 1- Alignment
- 2- Messenger RNA
- 3- Assembly

شد (شکل ۱).

جدول ۱- مشخصات توالی‌یابی برای هر یک از نمونه‌های مرغ بومی و سویه راس با استفاده از Illumina HiSeq-2000.

Table 1- Sequencing characteristics for each indigenous chicken and Ross strain using Illumina HiSeq-2000

Sample name نمونه	Raw data کل خوانش‌ها	Cleaned data داده‌های پیرایش شده	Read lengths of sequences Nucleotide طول توالی‌های خوانده شده (نوکلئوتید)	GC% درصد سیتوزین به گوانین	Overall alignment rate (%) میانگین هم‌ترازی (%)
Native 1 نژاد بومی نمونه ۱	14510042	14246264	150	45%	83.23
Native 2 نژاد بومی نمونه ۲	21186451	20884515	150	45%	84.82
Commercial 1 سویه راس نمونه ۱	19034129	18723445	150	46%	83.11
Commercial 2 سویه راس نمونه ۲	15790197	15566191	150	46%	82.41



شکل ۱- طبقه‌بندی ایزو فرم‌های شناسایی شده بر اساس کد کلاس داده مای RNA_Seq

Figure 1- Classification of identified Isoform Based on Data Class Code RNA_Seq.

به‌دلیل تخصصی بودن کلمات، از ترجمه فارسی اجتناب گردید.

بیشترین ایزو فرم مربوط به ژن C11H19ORF12 با ۹ ایزو فرم بود که از این تعداد ۸ ایزو فرم جدید بودند (جدول ۲). همچنین در (شکل ۲)، ۱۰ ژن با بالاترین و پایین‌ترین بیان نسبی نشان داده شده

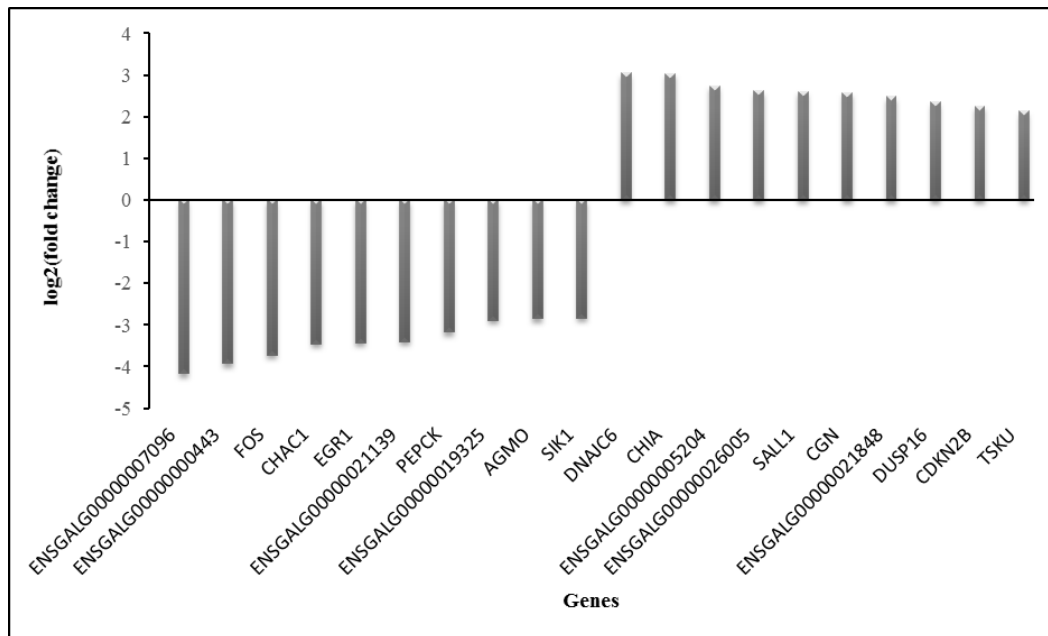
از بین این ایزو فرم‌ها، در مرغ بومی اصفهان نسبت به مرغ سویه راس، تعداد ۱۲۶ ایزو فرم مربوط به ۹۹ ژن کاهش و ۸۰ ایزو فرم مربوط به ۵۵ ژن، افزایش بیان نشان دادند ($q\text{-value} \leq 0.05$).

است.

جدول ۲- ژن‌های تغییر بیان یافته در مرغ بومی و تجاری با کمترین و بیشترین ایزو فرم

Table 2- Differentially expressed genes in native and commercial chicken with the lowest and highest isoform

Gene ژن	Cuff compare category to distinguish transcripts by symbols						Sum مجموع	DEG ژن‌های تغییر بیان یافته
	Generic exonic overlap with a reference transcript همپوشانی کلی اگزون‌ها با رونوشت مرجع	Complete match of intron chain مطابقت کامل زنجیره اینترون	Potentially novel isoform قابلیت ایزو فرمی جدید	Exonic overlap with reference on the opposite strand همپوشانی اگزون‌ها با زنجیره مخالف رونوشت مرجع	An intron of the transfrag overlaps a reference intron on the opposite strand قطعات ترانسکریپتی اینترونی همپوشانی کرده با اینترون مرجع در رشته مخالف	A transfrag falling entirely within a reference intron قطعات ترانسکریپتی با تطابق کامل با اینترون مرجع		
FNBP1	0	2	5	0	0	0	7	Yes
DUSP16	0	1	6	0	0	0	7	Yes
SLC25A47	0	1	6	0	0	0	7	Yes
C11H19ORF12	0	1	8	0	0	0	9	Yes
ENSGALG000000015101	0	1	0	0	0	1	2	Yes
ENSGALG000000016648	0	1	0	1	0	0	2	Yes
BUB1	0	1	1	0	0	0	2	Yes
CD3D	0	1	1	0	0	0	2	Yes



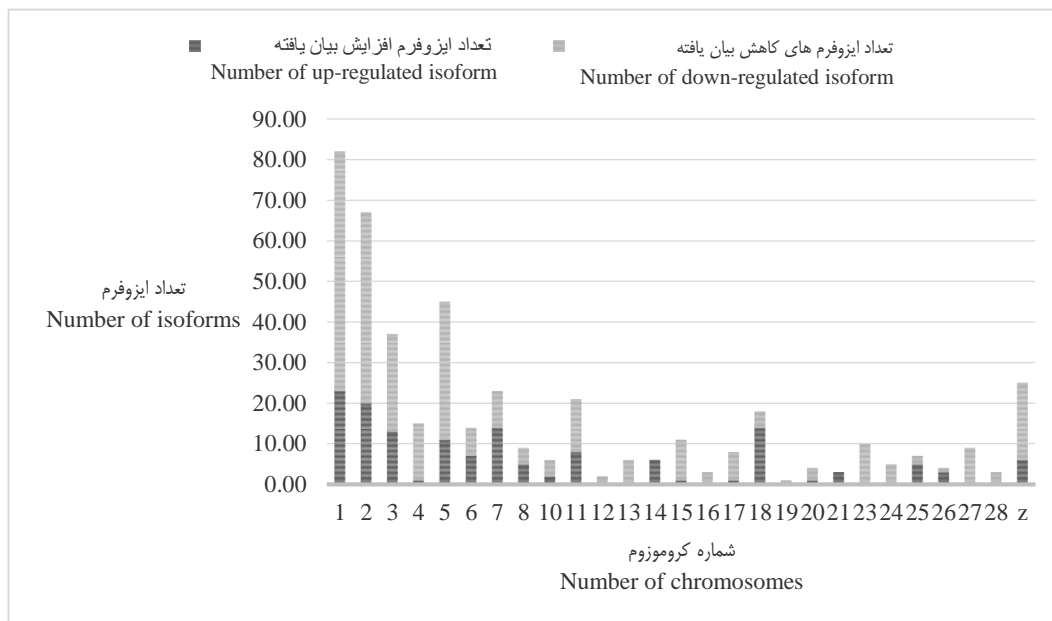
شکل ۲- ۱۰ ایزو فرم افزایش و کاهش بیان یافته در مرغ بومی اصفهان

Figure 2- 10 isoform up- and down-regulated in the Isfahan Native Chickens

به دلیل تخصصی بودن کلمات، از ترجمه فارسی اجتناب گردید.

کاهش بیان یافته در نژاد مرغ بومی اصفهان نشان داد بیشترین ایزوفرم‌های کاهش بیان یافته روی کروموزوم ۱ و کمترین آنها روی کروموزوم ۱۹ بود (شکل ۳).

رتبه‌بندی ژن‌ها بر اساس میزان بیان نسبی صورت گرفت. بیان‌های به‌دست آمده نرمال و تبدیل به FPKM شده و مقادیر با بیش از ۱۰ مقدار میانگین خوانش‌ها و سطح معنی‌داری بنجامینی کوچکتر از ۵ درصد به‌عنوان بیان‌های متفاوت معنی‌دار بین دو گروه بومی و تجاری مشخص شد. بررسی پراکندگی ایزوفرم‌های افزایش و



شکل ۳- پراکندگی ایزوفرم‌های افزایش بیان یافته و کاهش بیان یافته روی کروموزوم‌ها در مرغ بومی اصفهان

Figure 3- Dispersion of the up- and down-regulated isoform on Chromosomes in Isfahan Native Chicken

مورد توصیف مشخصات ترانسکریپتوم بافت کبدی در مرغ‌های بومی اصفهان با بهره‌گیری از فناوری RNA-Seq محسوب می‌شود. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد در جوجه‌های بومی اصفهان سرعت رشد کند و مصرف خوراک نسبت به مقدار پیش‌بینی شده بیشتر بود و دارای باقیمانده خوراک مصرف شده بالای (+ RFI) بودند. به نظر می‌رسد قابلیت هضم انرژی و مواد مغذی در این گروه پایین‌تر از سویه رأس بود و مشاهدات نشان داد جوجه‌های بومی در طول دوره پرورش فعالیت فیزیکی بیشتری داشتند. مطالعات قبلی حاکی از همبستگی احتمالی میان فعالیت فیزیکی و تغییر RFI در طیور، خوک‌ها و گاوهای گوشتی بود (۲۴).

پیرایش متناوب mRNA نقش مهمی در ایجاد تنوع رونوشت‌ها (Transcript) و پروتئین‌های سلولی ایفا می‌کند (۴). بیشتر ژن‌ها در ژنوم موجودات واریاتتها و ایزوفرم‌های مختلف در سطح mRNA ایجاد می‌کنند که منجر به ساخت پروتئین‌هایی با عملکرد زیستی متفاوت می‌گردد. اسپلاسینگ جایگزین تنظیم‌کننده ژنتیکی و اپی ژنتیکی پردازش pre-mRNA برای افزایش تنوع ترانسکریپتوم و پروتئوم است (۳۴).

آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های کاهش بیان یافته در مرغان بومی اصفهان نسبت مرغان سویه راس منجر به گروه‌بندی ژن‌ها در ۱۳۶ گروه عملکرد زیستی شد ($P\text{-value} > 0.05$). در این مطالعه بیشتر ایزوفرم‌های کاهش بیان یافته در پرندگان با باقیمانده خوراک مصرفی بالا (high RFI) در ارتباط با پاسخ ایمنی و فرایند متابولیک بدن و رشد و توسعه بافت‌ها و استرس بود. از بین این ۱۳۶ عملکرد زیستی ۱۰ عملکرد مهم در ارتباط با متابولیسم و راندمان خوراک مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های افزایش یافته در مرغان بومی اصفهان نسبت به مرغان سویه راس منجر به گروه‌بندی ژن‌ها در ۲ عملکرد زیستی شد ($P\text{-value} > 0.05$) (جدول ۳).

در این مطالعه با استفاده از فناوری RNA-Seq، ترانسکریپتوم بافت کبدی دو نژاد مرغ با باقیمانده خوراک مصرف‌شده مختلف بررسی شد. فرآیندهای زیستی مهم، ژن‌های کلیدی و ترانسکریپت‌های جدید مربوط به RFI شناسایی شدند. که می‌توان از آن‌ها برای درک مکانیسم‌های ژنتیکی شکل‌دهنده تفاوت‌ها در RFI و نرخ رشد در مرغ‌ها استفاده کرد. مطالعه حاضر اولین گزارش در

جدول ۳- گروه‌بندی ایزو فرم‌های افزایش و کاهش بیان یافته در مسیرهای بیولوژیکی

Table 3- Grouping down and up-regulated isoform in biological Pathways

Term نام مسیر	Count تعداد	% درصد	P-value سطح معنی‌داری
Down regulated کاهش بیان یافته			
Response to stress پاسخ به استرس	27	36.48648649	0.000741399
Response to oxygen-containing compound پاسخ به ترکیب حاوی اکسیژن	15	20.27027027	0.001229044
Response to cytokine پاسخ به سیتوکین	10	13.51351351	0.003584148
Response to nutrient پاسخ به مواد مغذی	5	6.756756757	0.004337417
Response to lipid پاسخ به چربی	10	13.51351351	0.005648751
Animal organ development توسعه اندام حیوانات	21	28.37837838	0.012460537
Single-organism biosynthetic process فرایند بیوسنتز مولکول‌های تکی	12	16.21621622	0.01316849
Regulation of multi-organism process فرایندهای تنظیم ارگانیزم‌های چندگانه	6	8.108108108	0.015269748
Response to nutrient levels پاسخ به سطوح مواد مغذی	6	8.108108108	0.019975104
Lipid biosynthetic process فرایند مای بیوسنتز چربی‌ها	7	9.459459459	0.033346723
Up regulated افزایش بیان یافته			
Single-organism process فرایند بیوسنتز مولکول‌های تکی	29	85.29411765	0.040237742
Glucosamine-containing compound metabolic process پروتئین متابولیک ترکیبی حاوی گلوکوزامین	2	5.882352941	0.042036261

واکنش‌دهی به مواد مغذی^۵، واکنش‌دهی به سیتوکین‌ها^۶، پاسخ به سطوح تغذیه^۷، فرایند بیوسنتز مولکول‌های تکی^۸، فرایند مای بیوسنتز چربی‌ها^۹ و فرایندهای تنظیم ارگانیزم مای چندگانه^{۱۰} نقش داشتند. اکثر این عبارات مربوط به مواد مغذی (اسیدهای چرب، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها) و متابولیسم بودند. می‌دانیم که متابولیسم پروتئین‌ها و لیپیدها عواملی مهم در راندمان خوراک هستند.

مطالعات قبلی نشان داد چندین ژن قادر به ایفا کردن نقش‌های مهم در تغییر میزان RFI از طریق تأثیرگذار گذاشتن بر فرایندهای متابولیکی و سیستم گوارشی هستند (۱۲). هم‌راستا با مطالعات قبلی (۳۵)، نتایج آنالیز ژن آنتالوژی این پژوهش نشان داد ایزو فرم‌های کاهش بیان یافته‌ی گونه مرغ بومی عمدتاً در فرایندهای زیستی مختلف از جمله واکنش‌دهی به استرس^۱، پاسخ به ترکیب حاوی اکسیژن^۲، واکنش‌دهی به چربی^۳، توسعه ارگان‌های حیوان^۴،

- 5- response to nutrient
- 6- response to cytokine
- 7- response to nutrient levels
- 8- single-organism biosynthetic process
- 9- lipid biosynthetic process
- 10- regulation of multi-organism process

- 1- response to stress
- 2- response to oxygen-containing compound
- 3- response to lipid
- 4- animal organ development

فرم شناخته‌شده و دو ایزو فرم جدید بر روی کروموزوم ۷ بود. فاکتورهای خانواده STAT پروتئین‌های سیتوپلاسمی هستند که در پاسخ به فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها و هورمون‌ها فعال می‌شوند (۵). سیتوکین‌ها دسته‌ای از مولکول‌های پروتئینی محلول در آب هستند که از سلول‌های گوناگون و بیشتر در پاسخ به یک تحریک، ترشح می‌شوند و وظیفه انتقال پیام بین سلول‌ها را بر عهده‌دارند. پی‌آمد حضور سیتوکین، تغییر در رفتار سلول‌های دارای گیرنده سیتوکین ترشح‌شده از جمله رشد، تغییر و یا مرگ سلول است (۱۱). STATها کارکردهای مهمی از جمله افزایش تولید IFN- γ و افزایش پیام‌دهی دارند. مطالعات گذشته نشان داده بیان این ژن‌ها با تجمع چربی در بدن مرتبط است (۳۱). گزارشات گذشته نشان داد بین راندمان تبدیل خوراک طیور و رسوب چربی در بدن مرغ همبستگی منفی وجود دارد (۷). به نظر می‌رسد تغییر بیان ایزو فرم‌های ژن STAT1 می‌تواند در راستای تفاوت RFI بین مرغان سویه راس و بومی اصفهان باشد.

فرایند پاسخ به سطح مواد مغذی شامل فرایندهایی است که منجر به تغییر در حالت یا فعالیت یک سلول یا یک ارگانیزم (از نظر جنبش، ترشح، تولید آنزیم، بیان ژن و غیره) می‌شود. این تغییر فعالیت به‌عنوان نتیجه یک محرک، منعکس‌کننده وجود، عدم وجود یا غلظت مواد مغذی هستند. در این مسیر بیولوژیکی ژن IL15 در مرغ بومی نسبت به مرغ تجاری کاهش بیان داشت. سه ایزو فرم از این ژن شناسایی شد. که دو ایزو فرم جدید بودند. این ژن می‌تواند متابولیسم گلوکز و تمایز سلول‌های چربی را تنظیم کند (۲۱). بنابراین، کاهش بیان این ژن در نژاد بومی می‌تواند در ارتباط با افزایش رسوب چربی باشد. مرغ‌های با راندمان خوراک پایین، چربی شکمی بیشتری دارند و به نظر می‌رسد انرژی به‌دست‌آمده از مواد مغذی را برای تجمع چربی بیشتر مصرف می‌کنند (۳۷). در این مطالعه، کاهش بیان IL15 در نژاد بومی را می‌توان به راندمان پایین‌تر این نژاد از لحاظ متابولیسم مواد مغذی و چربی‌ها نسبت داد که می‌تواند به افزایش RFI آن نسبت به مرغ‌های تجاری منجر شود. فرایندهای پاسخ به ترکیب حاوی اکسیژن مربوط به تغییر حالت یا فعالیت سلول‌ها یا ارگانیزم (از نظر جنبش، ترشح و تولید آنزیم، بیان ژن و غیره) در نتیجه ترکیبات حاوی اکسیژن است. کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک مولکول‌های پیچیده‌ای هستند که حاوی اکسیژن هستند. اختلاف متابولیسم میتوکندریایی کبد با تولید بیشتر رادیکال‌های اکسیژن در مرغ و خوک باراندمان خوراک پایین قبلاً گزارش شده است (۲، ۳، ۹، ۱۰ و ۱۵). از ژن‌های مرتبط با RFI که در این مسیر بیولوژیکی گروه‌بندی شدند ژن EGR1 با دو ایزو فرم (یک ایزو فرم جدید) و بر روی کروموزوم ۱۳ بود. مطالعات گذشته نشان داد ژن EGR1 در مرغ‌های با باقیمانده خوراک مصرفی پایین (LRFI) افزایش بیان داشت. تنظیم‌کننده‌های اصلی ژن به رشد سلولی و تمایز

در فرایند زیستی پاسخ به استرس تعداد ۲۷ ژن گروه‌بندی شدند. این عملکرد زیستی شامل فرایندهای که منجر به تغییر در وضعیت و یا فعالیت یک سلول و یا یک موجود زنده (از نظر جنبش، ترشح، تولید آنزیم، بیان ژن، و غیره) به‌عنوان نتیجه یک اختلال در هموستاز سلولی شناخته می‌شود و معمولاً در اثر عوامل خارجی (به‌عنوان مثال دما، رطوبت، اشعه) بروز می‌کند. پاسخ به استرس اکسیداتیو یک عامل مهم مؤثر بر RFI هست. افراد با باقیمانده خوراک مصرف‌شده پایین، به استرس حساس هستند (۱۴ و ۳۲). از ژن‌های مهم مرتبط با باقیمانده خوراک مصرف‌شده در این عملکرد زیستی ژن RSAD2 می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد ۳ ایزو فرم از این ژن شناسایی شد که یک ایزو فرم از آن‌ها جدید بود. این ژن نقش یک تعدیل‌کننده چربی را ایفا کرده و نسبت چربی به پروتئین را در کبد تحت تأثیر قرار می‌دهد. کاهش بیان RSAD2 در جوجه‌های بومی اصفهان ممکن باعث افزایش خوراک مصرفی و کاهش راندمان مصرف انرژی شود. در مطالعات قبلی گزارش شده که این ژن در نژادهای که باقیمانده خوراک پایین داشتند افزایش بیان نشان داد و هدر رفت انرژی را، با تنظیم سوخت‌وساز لپتین و اسیدهای چرب تعدیل می‌کند.

عملکرد زیستی توسعه اندام حیوانات مربوط به توسعه یک بافت یا بافت‌های است که با یکدیگر برای انجام یک عملکرد خاص کار می‌کنند. این عملکرد زیستی شامل زیرشاخه‌های توسعه قلب، بازسازی ارگان‌های حیوانات، توسعه مجاری تنفسی، توسعه مغز، توسعه سیستم‌های عصبی معده و چند زیرشاخه مهم دیگر که به‌طور مستقیم و غیرمستقیم می‌توانند بر باقیمانده خوراک مصرف‌شده مؤثر باشند. مطالعات گذشته نشان داد فرایندهای بیولوژیکی عمده که سبب تنوع در باقی‌مانده خوراک مصرف‌شده (RFI) می‌شوند، شامل میزان مصرف خوراک، هضم غذا، سوخت‌وساز بدن (آنابولیسم و کاتابولیسم مرتبط با آن)، همچنین تنوع در ترکیب بدن، فعالیت بدنی و حرارت هستند (۲۳).

گرابس و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند فاکتورهای مؤثر میزان تأثیر آن‌ها را در انتخاب گاوهای گوشتی برای RFI پایین و بالا شامل فعالیت حیوان (۱۰ درصد)، قابلیت هضم خوراک (۱۰ درصد)، حرارت افزایشی (۹ درصد)، ترکیب بدن (۵ درصد)، الگوهای تغذیه‌ای (۲ درصد) و سایر فاکتورها (۲۷ درصد) می‌باشد. ۳۷ درصد باقی‌مانده تغییرات توسط متابولیسم بافت‌ها، ترن‌آور پروتئین و استرس شامل استرس اکسیداتیو تعریف می‌شود. در ارتباط با عوامل تغییر بهره‌وری خالص خوراک، نقش متابولیسم، ترن‌آور پروتئین و استرس از بین هفت فاکتور ذکرشده، کمتر از سایر موارد مورد بحث و بررسی قرار گرفته است (۸). اطلاعات مربوط به نقش فعالیت، الگوهای تغذیه‌ای (۳۳)، قابلیت هضم خوراک (۸) و ترکیب بدن (۳۰)، در خوک‌هایی که برای RFI انتخاب شده‌اند موجود است. از ژن‌های مهم این عملکرد زیستی، ژن STAT1 با چهار ایزو فرم شامل دو ایزو

مرتبط با آن‌ها به دست داد. یافته‌های ما نشان می‌دهد تعداد زیادی از ژن‌های مرتبط با متابولیسم (چربی، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها و همچنین ویتامین‌ها)، رشد، استرس اکسیداتیو و ایمنی می‌تواند باعث اختلاف در باقیمانده خوراک مصرف‌شده باشند. شناسایی ژن‌های تغییر بیان یافته و ایزو فرم‌های آن‌ها بین جوجه‌های دو گروه بومی و تجاری منجر به شناسایی ژن‌های کاندید مهم برای برنامه‌های به‌نژادی، از جمله *RSAD2*، *IL15*، *EGR1* و *DUSP16* شد. این ژن‌ها می‌توانند با باقیمانده خوراک مصرف‌شده بالاتر نژاد بومی مرتبط باشند.

مربوط هستند همچنین در پاسخ به استرس اکسیداتیو فعال می‌شوند. که با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر همخوانی داشت. علت کاهش بیان این ژن در مرغان بومی اصفهان می‌تواند به علت راندمان پایین این پرندگان باشد. تحقیقات گذشته در حیوانات مختلف حساس بودن دام‌های باراندام بالا را به استرس را تأیید می‌کنند.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر یک تصویر از تغییرات بیان ژن‌ها و ایزو فرم‌های ژن‌های مرتبط با باقیمانده خوراک مصرف‌شده در بافت کبد مرغان بومی و مرغان سویه راس (تجاری) و همچنین عملکردهای زیستی

منابع

- Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30:2114-2120.
- Bottje, W., and G. Carstens. 2009. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. *Journal of Animal Science*, 87: E48-E63.
- Bottje, W., N. Pumford, C. Ojano-Dirain, M. Iqbal, and K. Lassiter. 2006. Feed efficiency and mitochondrial function. *Poultry Science*, 85:8-14.
- Chen, M., and J. L. Manley. 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10:741-754.
- Darnell, J. E. 1997. STATs and gene regulation. *Science*, 277:1630-1635.
- Dennis G., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane, and R. A. Lempicki. 2003. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biology*, 4: R60.
- Gandomani, V. T., A. Mahdavi, H. Rahmani, A. Riasi, and E. Jahanian. 2014. Effects of different levels of clove bud (*Syzygium aromaticum*) on performance, intestinal microbial colonization, jejunal morphology, and immunocompetence of laying hens fed different n-6 to n-3 ratios. *Livestock Science*, 167:236-248.
- Grubbs, J. K. 2012. Protein profile and reactive oxygen species production in mitochondria from pigs divergently selected for residual feed intake.
- Grubbs, J. K., A. Fritchen, E. Huff-Lonergan, J. C. Dekkers, N. K. Gabler, and S. M. Lonergan. 2013a. Divergent genetic selection for residual feed intake impacts mitochondria reactive oxygen species production in pigs. *Journal of Animal Science*, 91:2133-2140.
- Grubbs, J. K., A. N. Fritchen, E. Huff-Lonergan, N. K. Gabler, and S. M. Lonergan. 2013b. Selection for residual feed intake alters the mitochondria protein profile in pigs. *Journal of Proteomics*, 80:334-345.
- Hardman, J. G., and L. Limbird. 2001. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th. USA: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Herd, R., and P. Arthur. 2009. Physiological basis for residual feed intake. *Journal of Animal Science*, 87: E64-E71.
- Hiller, D., H. Jiang, W. Xu, and W. H. Wong. 2009. Identifiability of isoform deconvolution from junction arrays and RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25:3056-3059.
- Iqbal, M., N. Pumford, Z. Tang, K. Lassiter, T. Wing, M. Cooper, and W. Bottje. 2004. Low feed efficient broilers within a single genetic line exhibit higher oxidative stress and protein expression in breast muscle with lower mitochondrial complex activity. *Poultry Science*, 83:474-484.
- Iqbal, M., N. Pumford, Z. Tang, K. Lassiter, C. Ojano-Dirain, T. Wing, M. Cooper, and W. Bottje. 2005. Compromised liver mitochondrial function and complex activity in low feed efficient broilers are associated with higher oxidative stress and differential protein expression. *Poultry Science*, 84:933-941.
- Kim, D., B. Langmead, and S. L. Salzberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods*, 12:357-60.
- Kutner, M., C. Nachtsheim, J. Neter, and W. Li. 2004. *Applied linear statistical models*, McGraw Hill.
- Liu, W., D. Li, J. Liu, S. Chen, L. Qu, J. Zheng, G. Xu and N. Yang. 2011. A genome-wide SNP scan reveals novel loci for egg production and quality traits in white leghorn and brown-egg dwarf layers. *PLoS ONE*, 6:E28600.
- Lohse, M., A. Bolger, A. Nagel, A. R. Fernie, J. E. Lunn, M. Stitt, and B. Usadel. 2012. RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic acids research*, gks540.

20. Lu, L., C. Ji, X. Luo, B. Liu, and S. Yu. 2006. The effect of supplemental manganese in broiler diets on abdominal fat deposition and meat quality. *Animal Feed Science and Technology*, 129:49-59.
21. Lu, H., D. Huang, R. M. Ransohoff, and L. Zhou. 2011. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *The FASEB Journal*, 25:3344-3355
22. Lu, Z. X., P. Jiang, and Y. Xing. 2012. Genetic variation of pre-mRNA alternative splicing in human populations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3:581-592.
23. Luiting, P., J. Schrama, W. Vander-Hel, and E. Urff. 1991. Metabolic differences between White Leghorns selected for high and low residual food consumption. *British Poultry Science*, 32:763-782.
24. Luiting, P., and E. Urff. 1991. Residual feed consumption in laying hens. 2. Genetic variation and correlations. *Poultry Science*, 70:1663-1672.
25. Modrek, B., and C. Lee. 2002. A genomic view of alternative splicing. *Nature genetics*, 30(1): 3-9.
26. Ojano-Dirain, C., M. Iqbal, D. Cawthon, S. Swonger, T. Wing, M. Cooper, and W. Bottje. 2004. Determination of mitochondrial function and site-specific defects in electron transport in duodenal mitochondria in broilers with low and high feed efficiency. *Poultry Science*, 83:1394-1403.
27. Oszolak, F., and P. M. Milos. 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews. Genetics*, 12:87.
28. Pitchford, W. 2004. Genetic improvement of feed efficiency of beef cattle: what lessons can be learnt from other species? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44:371-382.
29. Rekaya, R., R. Sapp, T. Wing, and S. Aggrey. 2013. Genetic evaluation for growth, body composition, feed efficiency, and leg soundness. *Poultry Science*, 92:923-929.
30. Smith, R., N. Gabler, J. Young, W. Cai, N. Boddicker, M. Anderson, E. Huff-Lonergan, J. Dekkers, and S. Lonergan. 2011. Effects of selection for decreased residual feed intake on composition and quality of fresh pork. *Journal of Animal Science*, 89:192-200.
31. Stewart, W. C., R. F. Morrison, S. L. Young, and J. M. Stephens. 1999. Regulation of signal transducers and activators of transcription (STATs) by effectors of adipogenesis: Coordinate regulation of STATs 1, 5A, and 5B with peroxisome proliferator-activated receptor- γ and C/AAAT enhancer binding protein- α . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1452:188-196.
32. Van-Eerden, E., H. Van-Den-Brand, H. Parmentier, and M. De Jong. 2004. Phenotypic selection for residual feed intake and its effect on humoral immune responses, in growing layer hens. *Poultry science*, 83:1602-1609.
33. Vuong, C. K., D. L. Black, and S. Zheng. 2016. The neurogenetics of alternative splicing. *Nature Reviews Neuroscience*, 17:265-81.
34. Xu, Y., Y. Wang, J. Luo, W. Zhao, and X. Zhou. 2017. Deep learning of the splicing (epi) genetic code reveals a novel candidate mechanism linking histone modifications to ESC fate decision. *Nucleic acids research*.
35. Yi, G. 2015. Interrogation of Differentially Expressed Genes Governing Residual Feed Intake in Chickens Using RNA-Seq. In: *Plant and Animal Genome XXIII Conference*. Plant and Animal Genome.
36. Young, J., W. Cai, and J. Dekkers. 2011. Effect of selection for residual feed intake on feeding behavior and daily feed intake patterns in Yorkshire swine. *Journal of animal science*, 89P639-47.
37. Zhuo, Z., S. J. Lamont, W. R. Lee, and B. Abasht. 2015. RNA-Seq analysis of abdominal fat reveals differences between modern commercial broiler chickens with high and low feed efficiencies. *PLOS ONE*, 10:E0135810.



Isoform Expression Profile Analysis of Residual Feed Intake for Isfahan Native and Ross Chickens Using RNA-Seq Data

H. R. Izadnia¹- M. Tahmoorespur^{2*}- M. R. Bakhtiarizadeh³- M. R. Nassiri⁴- S. Esmailkhanien⁵

Received: 29-11-2017

Accepted: 28-02-2018

Introduction:

In the past decade, many performance traits in chickens have greatly improved to meet the growing demand for chicken meat (Rekaya et al 2013). On the other hand, due to the 70% share of feed costs in the total cost of livestock production, feed efficiency has become one of the most important genetic traits in livestock and poultry. Residual feed intake (RFI) is the difference between the actual absorption of animal feed and the expected of the animal absorption based on body weight and its level of performance. Selection to improve feed efficiency through RFI is suggested due to its phenotypic independence from body weight and body weight gain (Kutner et al 2004). There is evidence for the genetic basis of variation in productivity in all species (Pitchford 2004). Previous studies have shown that some genes may play an important role in controlling RFI through effects on the digestive system and metabolic processes (Herd & Arthur 2009). It seems that changes in the amount of residual feed intake is the result of changes in the expression of the genes associated with it, and the study of transcript changes in chickens with high RFI helps to identify the mechanisms that affect it.

Materials and Methods:

Experiments were conducted on Commercial breeds (high production efficiency) and Isfahan Native Chickens (low production efficiency). From each breed, 60 chicks were harvested and caged from day 24 to 42 days for 19 days. The chicks of both groups were raised under the same management conditions. In order to measure the residual feed intake of each bird in individual cages and daily intake (FI) of the amount of feed consumed in 19 days (from day 24 to 42) divided by number of days, and daily gain (DG) of the weight difference 24. Using these figures, the amount of residual feed consumed will be calculated from the following equation (Luiting & Urff 1991) :

$$RFI = FI - (b_0 + b_1 BWG + b_2 MBW^{0.75})$$

where FI, RFI, MBW^{0.75}, and BWG are the daily feed intake, residual feed intake, metabolic body weight, and daily body weight gain, respectively. Also, b₀, b₁ and b₂ indicate the intercept and partial regression coefficients, respectively.

Ten samples of liver tissue were then collected from each breed and immediately transferred to liquid nitrogen and transferred to the laboratory for total RNA extraction (Druzhyna et al 2008). Two pooled samples of every breed (each consisting of three extracted RNA sample) were prepared and sent to the BGI Company of China by the Illumina method of sequencing the HiSeq 2000 platform.

Prior to Alignment, the quality of the raw readings sequence was evaluated using the Fastqc software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (Bolger et al 2014). The use of Trimmomatic software (version 0.36) (Lohse et al 2012) was used to remove the low-quality reads. The reference genome for the chicken (Galgal4) and the annotated file were obtained from the Ensembl database (<http://asia.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>). After controlling the quality and Trimming the reads, the Hisat2 software was used (Kim et al 2015) to mapping obtain reads from the genome of the reference. Analysis of differential gene expression was performed using Cufflinks (version 2.2.1) (Trapnell et al., 2012). The ontology

1- PhD student of animal breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, and a researcher in Animal Science Research Department, Safiabad Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Dezful, Iran

2- Professor, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Animal Science Department, University of Tehran, Iran

4- Associate Professor, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

5- Associate Professor, Animal Breeding, Research Institute of Animal Science

(*- Corresponding author email: m_tahmoorespur@yahoo.com)

examination of differential Isoform expression, including the biological processes of genes, was carried out by David's site (<https://david.ncifcrf.gov>)(Dennis et al 2003) . To identify different isoform of the gene and to measure the expression of isoform, it is necessary to examine the position of microwave splicing between the exons. For this purpose, assembled transcripts mapped by Cufflinks were used to compare the expression of isoform with Cuffcompare. Cuffcompare compares the transcripts that are assembled with a reference genome and categorizes each transcript into known, new, and potential new isoform.

Results and Discussion:

The phenotypic results showed that the difference in the mean RFI values between the native ($+13.430 \pm 5.393$ g/day) and commercial (-11.212 ± 4.435 g/day) chickens was highly significant ($P < 0.001$). About 83% of the sequenced fragments were matched to the reference genome and Duplex analysis of gene expression was performed using Cuffdiff software package (v2.2.1). Differential expression analysis for more than ۴۵۰۷۰ isoform Related to 19003 genes using Cuffdiff (v2.2.1) showed that 28949 and ۱۶۱۲۱ isoform were up- and down-regulated (adjusted $P \leq 0.05$) in the native breed, respectively. 206 Isoform was identified as a change in expression between the native and commercial chickens. Moreover 21081 novel isoform were identified which have not been included in the gene annotation so far. Moreover, the functional enrichment analysis showed that the down-regulated isoform in the native chickens were mainly involved in the different response to stress.response to oxygen-containing compound.response to cytokine.response to nutrient.response to lipid.animal organ development.single-organism biosynthetic process.regulation of multi-organism process response to nutrient level and lipid biosynthetic process. The Differentially Expressed Genes and their isoform explored between the chickens of the two breeds led to the identification of some important candidate genes for further breed improvement programs, including RSAD2, IL15, EGR1, and DUSP16. These genes could be related to the higher RFI of the native.

Conclusion:

Our findings showed that a large number of related genes with metabolism (fat, amino acids, carbohydrates, and vitamins), growth, as well as oxidative stress and immunity, can make a difference in the RFI. Identification of the difference genes and their isoform between two breeds of chickens led to the identification of important candidate genes for breeding programs, including RSAD2, IL15, EGR1 and DUSP16.

Keywords : Isoform, RNA_Seq, residual feed intake, chicken