

Comparative study of gene expression and allele-specific expression in three tissues of the heart, muscle, and spleen of roosters adapted to low and high altitude regions based on open access RNA-Seq databases

M. Salimpour¹, S. Z. Mirhosseini^{2*}, M. H. Banabazi³, Sh. Ghovvati⁴, M. Khansefid^{5,6}

1. Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Guilan, Rasht, Iran
5. Researcher, Agriculture Victoria Research, AgriBio, Centre for AgriBioscience, 5 Ring Road, Bundoora, Vic. 3083, Australia
6. Researcher, School of Applied Systems Biology, La Trobe University, Bundoora, Vic. 3083, Australia

(Received: 30-11-2023 – Revised: 09-08-2024 – Accepted: 12-08-2024)

Introduction: Gene regulation can be assessed by allele-specific expression (ASE), which has the potential to cause phenotypic variation. The variants associated with gene regulation can be found using ASE. Transcriptomic variation in gene expression is known to play an important role in the formation of the phenotype. Single base variations resulting from transitions (C/T or G/A) or transversions (C/G, C/A, T/A, T/G) of nucleotides at the same position between individual nucleotides in genomic DNA sequences are known as single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNPs are important molecular markers used in breeding and genetic research. Next-generation sequencing is advancing rapidly and provides a high-throughput approach for SNP discovery in the transcriptome or genome. Transcriptome studies can bridge the gaps between genotypes and phenotypes and provide insights into the mechanisms linking sequence and function. An effective transcriptome mapping and quantification technique for studying global gene expression is RNA sequencing or RNA-Seq. For this reason, RNA-Seq is a next-generation sequencing technology that can analyze gene expression profiles and the entire transcriptome. This study aimed to identify differential gene expression and SNPs in three tissues of the heart, muscle, and spleen of roosters adapted to low and high altitude regions based on open access RNA-Seq databases.

Materials and methods: RNA-Seq data from 54 samples were collected from the SRA database in NCBI for chickens (NCBI GEO accession: GSE119387). The samples included 33.4, 30.3, and 35.3 million paired final reads of heart, muscle, and spleen tissues, each 100 bp in length. Illumina Hiseq 2000 was used to perform mRNA sequencing. The fastq-dump command in Sratoolkit 2.11 was used to convert data from SRA to FASTQ format. FastQC (version 0.11) was used to assess data quality and Trimmomatic (version 0.33) was used to trim the reads to eliminate adapters and low-quality sequences. Trimmed reads were aligned to the reference genome of the chicken species (*Gallus gallus domesticus*) and the gene annotation data (GRC6a) from Tophat2, whose core host is Bowtie2. By independently aligning and mapping the RNA-Seq reads of each sample to the chicken reference genome, the transcriptome was assembled. Then, the differential gene expression analysis was performed with cufflinks. The Samtools program performed SNP detection. Finally, using the R software (version 4.2.2), the chi-square test was used to compare the amount of expressed reference and alternative alleles in the polymorphic regions of heterozygous individuals to find the notable variations.

Results and discussion: As a result of gene expression analysis, 2260 genes were significantly differential expression ($P < 0.0002$). Gene ontology analysis showed that these genes are in pathways related to heat stress and

* Corresponding author: mirhosin@guilan.ac.ir



immune responses to the cause of trying to maintain body temperature involved and this cause was the activation of immune pathways. Identification of 1,473,176, 388,224, and 1,169,394 SNPs in the heart, muscle, and spleen tissues was enabled by SNP calling and discovery in the assembled transcriptome. The chi-square test revealed that the ASE-SNPs in the heart, muscle, and spleen tissues were 48,906 (10.3%), 28,529 (7.3%), and 76,251 (6.3%) SNPs ($P < 0.05$). These SNPs were associated with 7,919, 6,182, and 10,590 genes in the heart, muscle, and spleen tissues. In three tissues, the number of reference and alternative alleles was shifted by 4.5% in favor of the reference allele. This suggests that the superiority of the reference allele over the reference genome during mapping may be related to mapping bias. Among the twelve potential SNPs and ASE-SNP types found, four were transition types (Ts) and eight were transformation types (Tv). The transition type accounted for 74% of the most common polymorphisms in the heart and 77% in the muscle and spleen. For ASE-SNPs, transition mutations accounted for 70% of all mutations in the heart tissue and 75% in the muscle and spleen tissue. These mutations were also the most common. The Ts/Tv ratios for the heart, muscle, and spleen tissues were 2.3, 3, and 3 in the ASE-SNP and 2.9, 3.3, and 2.2 in all SNPs, respectively. This indicated a decrease in Ts/Tv for the heart and muscle tissues in the ASE-SNP compared to all SNPs.

Conclusions: The results of the current study support the validity of identifying SNPs in transcriptionally active regions of the genome using RNA-Seq data. Further research is needed to determine whether the expression differences between reference and alternative alleles found in heterozygous roosters raised in different environments are related to tolerance to environmental stressors such as low oxygen levels.

Keywords: Allele-specific expression, Transcriptome, Single nucleotide polymorphism, Rooster

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

Funding: The authors received no specific funding for this project.

How to cite this article:

Salimpour, M., Mirhosseini, S. Z., Banabazi, M. H., Ghovvati, Sh., & Khansefid, M. (2024). Comparative study of gene expression and allele-specific expression in three tissues of the heart, muscle, and spleen of roosters adapted to low and high altitude regions based on open access RNA-Seq databases. *Animal Production Research*, 13(3), 1-17. doi: 10.22124/ar.2024.26163.1805



مطالعه مقایسه‌ای پروفایل بیان ژن و بیان اختصاصی آللی در سه بافت قلب، عضله اسکلتی و طحال خروس‌های سازگار پرورش یافته در شرایط جغرافیایی کم ارتفاع و مرتفع مبتنی بر پایگاه‌های با دسترسی آزاد داده‌های RNA-Seq

مینا سلیم پور^۱، سید ضیاءالدین میرحسینی^{۲*}، محمد حسین بناءبازی^۳، شاهرخ قوتی^۴، مجید خان

سفید^۵ و ۶

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- استادیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۵- محقق، مرکز تحقیقات کشاورزی و بیوتکنولوژی، مرکز علوم زیستی کشاورزی، کمربندی شماره ۵، بندورا، ویکتوریا ۳۰۸۳، استرالیا

۶- محقق، دانشکده زیست‌شناسی سامانه‌ای، دانشگاه لا تروب، بندورا، ویکتوریا ۳۰۸۳، استرالیا

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۰۹ - تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۵/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۲)

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی مقایسه‌ای پروفایل توام بیان ژن و الگوی بیان اختصاصی آللی (ASE) در سه بافت قلب، عضله و طحال خروس‌های پرورش یافته و سازگار به مناطق کم ارتفاع و مرتفع مبتنی بر پایگاه‌های داده‌های RNA-Seq با دسترسی آزاد انجام شد. بدین منظور، مجموع داده‌های ترانسکریپتوم برای ۵۴ خروس در سه بافت مورد اشاره از راه هم‌ردیفی و نقشه‌یابی خوانش‌های خام RNA-Seq روی توالی کل ژنوم مرجع مرغ اهلی با استفاده از نرم افزار TopHat2 مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین، تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن میان خروس‌ها با استفاده از نرم افزار cufflinks، ۲۲۶۰ ژن دارای تفاوت بیان را در دو منطقه جغرافیایی نشان داد ($P=0/002$). شناسایی و یافتن چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) با استفاده از بسته نرم افزاری Samtools، به فهرستی شامل تعداد ۴۷۵۹۹۶، ۳۸۸۲۲۴ و ۱۱۶۹۳۹۴ SNP به ترتیب در بافت‌های قلب، عضله و طحال انجامید. پس از انجام آزمون کای اسکوتر، ۴۸۹۰۶ ($0/103$)، ۲۸۵۲۹ ($0/73$) و ۷۶۲۵۱ ($0/65$) SNP به عنوان ASE-ASE در بافت‌های قلب، عضله و طحال مشاهده شدند ($P<0/05$). مقایسه پروفایل بیان ژن و SNP-ASE‌های کشف شده در سویه‌های سازگار با محیط‌های پرورشی متفاوت از نظر ارتفاع می‌تواند برای شناسایی جهش‌های مقاومت در برابر بیماری‌های مرتبط با پرورش در محیط‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. در مجموع، نتایج این مطالعه می‌تواند روشی موثر و کارآمد و منبع جدید و مطلوبی را برای انتخاب، پیش‌روی متخصصان اصلاح نژاد دام و طیور قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: بیان اختصاصی آللی، ترانسکریپتوم، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، خروس

* نویسنده مسئول: mirhosin@guilan.ac.ir

مقدمه

(Gu and Wang, 2015). این پدیده، به‌عنوان یکی از عوامل ژنتیکی مهم در تنظیم بیان ژن می‌تواند موجب واریانس فنوتیپی بین افراد شود و در واقع، نحوه تاثیر تنوع ژنتیکی در بروز فنوتیپ را توضیح دهد (Mayba et al., 2014; Gaur et al., 2013). همچنین، مطالعات ASE، با غلبه بر برخی از محدودیت‌های پویس کل ژنوم (GWAS) می‌تواند به درک ساز و کارهای تنظیم‌کننده عناصر سیس تاثیرگذار بر بیان ژن و شناسایی جهش‌های سببی کمک نماید (Khansefid et al., 2018). بنا به گزارش‌ها، بسیاری از انواع SNPهای مرتبط با بیماری‌ها که در مطالعات پویس کل ژنوم شناسایی شده‌اند در مطالعات بیان اختصاصی آللی نیز قابل ردیابی بوده‌اند (Heap et al., 2010). در پژوهشی با استفاده از داده‌های RNA-Seq، بیان اختصاصی آللی در بافت‌های مختلف طیور برای شناسایی چندشکلی‌های مرتبط با بیماری مارک مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد ASE-SNPهای کشف شده می‌توانند به‌عنوان نشانگر برای مقاومت بر علیه این بیماری مورد استفاده قرار گیرند، به‌طوری که با یک نسل انتخاب به‌کمک ASE-SNP، ۲۲٪ کاهش در روند این بیماری مشاهده شد (Cheng et al., 2015). در تحقیق دیگری، ASE در مغز و کبد جنین مرغ مورد بررسی قرار گرفت که ۱۷/۸٪ از ژن‌های بیان شده در این بافت‌ها در جاتی از ASE را نشان دادند (Zhuo et al., 2017). امروزه استفاده از اطلاعات ژنتیکی مبتنی بر SNPها در برنامه‌های اصلاح نژادی به‌عنوان ابزاری کارآمد برای بهبود انتخاب فنوتیپی مرسوم است. مطالعه انواع SNPها، امکان بررسی صحت SNPهای یافت شده در سطح ترانسکریپتوم را تا حدودی فراهم می‌آورد. به‌صورت کلی، اگر جهش‌ها دارای روند تصادفی باشند، انتظار می‌رود نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی عامل (transition) به غیرعامل (transversion) یک به دو باشد. جایگزینی نوکلئوتیدی، عامل جهش نقطه‌ای است که باز نوکلئوتید پورین به باز نوکلئوتید پورین دیگر (A ↔ G) یا نوکلئوتید پیریمیدین به پیریمیدین دیگر (C ↔ T) تبدیل می‌شود، در حالی که جایگزینی نوکلئوتیدی غیرعامل باعث تغییر از باز نوکلئوتید پورین به باز نوکلئوتید پیریمیدین یا برعکس (A ↔ T, A ↔ C, G ↔ T, G ↔ C) می‌شود. طی تحقیقی روی جوجه گوشتی، شمار جایگزینی نوکلئوتیدی عامل به غیرعامل برابر با ۶۰۸۰۹۹۸/۲۲۳۶۲۴۷ (Ts/Tv) یعنی ۲/۷ برآورد شد (Dar et al., 2023). در تحقیقی دیگر روی اسب

طی مطالعات پیشین به‌روشنی مشخص شده است که تغییرات محیطی و تغییر دما، آثار مخربی بر رشد، پاسخ‌های فیزیولوژیکی، ایمنی و تولید در حیوانات اهلی دارند (Renaudeau et al., 2012). مشخص شده است که دام‌های موجود در مناطق مرتفع دارای ساختار بافتی و شاخص‌های بیوشیمیایی خونی متفاوتی نسبت به گونه‌های خویشاوند خود هستند (Dolt et al., 2007). مطالعات متعددی برای مشخص نمودن تغییر در میزان رونوشت ژن‌های مربوط به محیط‌های متفاوت (Yang et al., 2016) و تغییر فراوانی برخی آلل‌ها (Tomlinson et al., 2021) انجام پذیرفته که منجر به شناسایی ژن‌ها و فرآیندهای زیستی مرتبط شده است. اثر اقلیم بر ژنوم را می‌توان از دو بعد تاثیر محیط بر بیان ژن و تاثیر محیط بر ساختار ژن مورد بررسی قرار داد. تاثیر محیط می‌تواند به‌صورت تغییر در ساختار ژنوم باشد که جهش نامیده می‌شود. وقتی تفاوت‌ها در توالی‌های رمزگر و یا تنظیمی واقع شوند تاثیر خود را در بیان ژن و محصولات آن‌ها نیز بروز خواهند نمود. این توالی‌ها در سطح ترانسکریپتوم، امکان بررسی دقیق و کمی همه ژن‌ها در پاسخ به تغییرات محیطی (Jehl et al., 2019) به‌کمک مطالعه SNPهای دارای بیان اختصاصی آللی یا ASE-SNP واقع بر آن‌ها را در اختیار قرار می‌دهد. از دیدگاه تفسیر داده‌های امیکس، بیان اختصاصی آللی یا ASE پدیده‌ای زیستی است که در آن، بیان دو آلل به‌طور نامتعادل در یک جایگاه ژنی یکسان در یک فرد رخ می‌دهد که منجر به فراوانی بیشتر ترانسکریپت خوانش بیان ژن یک آلل اختصاصی می‌شود. اگرچه، به‌نظر می‌رسد در بسیاری از ژن‌ها، هر دو آلل به‌میزان یکسان بیان می‌شود، ولی با این وجود، تفاوت در بیان آلل‌ها برای برخی از ژن‌ها مشاهده می‌شود. در انسان، بیش از ۵۰ و در موش، ۳۰٪ از ژن‌ها دارای درجاتی از عدم تعادل بیان ژنی هستند (Lo et al., 2013; Lagarrigue et al., 2003). همچنین، ثابت شده است که این پدیده قابل انتقال به نسل بعد است (Wayne et al., 2004; Gibson and Weir, 2005; Hughes et al., 2006; Lemos et al., 2008; Ayroles et al., 2009, 2010). بیان اختصاصی آللی، روشی قدرتمند برای اندازه‌گیری میزان تفاوت بیان آللی در نقاط هتروزیگوت ژنوم از راه بررسی نسبت تعداد کپی بیان شده از آلل‌های SNP موجود در نمونه‌های RNA هر فرد است

کاسپین، شمار جایگزینی نوکلئوتیدی عامل برابر با ۱۱۵۵۴۱۷ و شمار جایگزینی نوکلئوتیدی غیرعامل برابر با ۵۱۲۹۸۶ بود که نسبت Ts/Tv نیز ۲/۲۵ برآورد شد (Arefnejad *et al.*, 2015).

مواد و روش‌ها

اطلاعات داده‌ها: داده‌های RNA-Seq از سه بافت قلب، عضله سینه و طحال ۵۴ قطعه خروس در سه زمان نمونه-گیری صبح، ظهر و عصر و در دو محیط کم ارتفاع و مرتفع به دست آمد (Te Pas *et al.*, 2018). این داده‌ها مربوط به دو دسته طیور پرورش یافته و سازگار به مناطق جغرافیایی کم ارتفاع (حدود ۹۵۰ متر از سطح دریا، آب و هوای گرم و مرطوب) و مناطق جغرافیایی مرتفع (ارتفاع بیش از ۲۴۰۰ متر از سطح دریا و آب و هوای سرد و خشک) بودند. خروس‌های منطقه مرتفع به منطقه کم ارتفاع انتقال یافت و پس از ۲۰ ساعت از انتقال، طی یک دوره یک روزه در سه نوبت صبح، ظهر و عصر ذبح و نمونه‌گیری شدند. در نهایت، ژن‌های بیان شده در شرایط تنش گرمایی مورد بررسی قرار گرفت. خوانش‌های حاصل از توالی به صورت جفتی (paired-end) با طول ۱۰۰ جفت باز بود. مجموعاً ۳۳/۴ میلیون خوانش خام در بافت قلب، ۳۰/۳ میلیون خوانش خام در بافت سینه و ۳۵/۳ میلیون خوانش خام در بافت طحال تولید شد. داده‌های خام در فرمت SRA، از پایگاه جهانی NCBI دریافت شدند.

آماده‌سازی و تجزیه تحلیل داده‌های RNA-Seq: پس از اخذ داده‌ها، تمامی مراحل آماده‌سازی و تجزیه و تحلیل داده در محیط گرافیکی (GNU) سیستم عامل لینوکس اوبونتو روی سرور آزمایشگاه مرکزی دانشگاه گیلان انجام شد. مراحل تجزیه و تحلیل شامل تبدیل فرمت sra به fastq با استفاده از نرم افزار sratoolkits نسخه 2.11.3 و سنجش کیفیت داده‌ها با استفاده از FastQC نسخه 0.11.9 انجام شد (Andrews *et al.*, 2010). سپس، آزمون کنترل کیفیت و ویرایش خوانش‌ها با استفاده از نرم افزار Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) نسخه 0.39 انجام شد. این ویرایش شامل حذف آداپتورها و خوانش‌های بی کیفیت بود.

تجزیه بیان افتراقی ژن: پروفایل بیان ژن برای هر یک از نمونه‌ها با استفاده از پکیج Tuxedo (Trapnell *et al.*, 2012) و cufflinks به دست آمد. در این مجموعه نرم افزاری، تلفیق ترانسکرپتوم با استفاده از cuffdiff و تجزیه بیان افتراقی ژن با استفاده از Cuffdiff صورت گرفت.

در این راستا، حدود ۴۰٪ از SNP‌های موجود در ژن‌ها باعث تغییر در اسید آمینه در روند ترجمه می‌شوند. جایگزینی نوکلئوتیدی غیرعامل، بیشترین تاثیر را روی اتصال عوامل رونویسی و در نهایت، میزان بیان ژن دارد. بر اساس آخرین اطلاعات ژنوم مرجع طیور، تاکنون ۲۵ تا ۳۰ هزار ژن و ۸/۲ میلیون SNP روی ۱/۶ گیگا جفت باز ژنوم طیور شناسایی شده است (International Chicken Polymorphism Map Consortium, 2004). در پژوهشی با هدف توجیه

واریانس ژنتیکی صفت باقیمانده مصرف خوراک با SNP کشف شده روی ترانسکرپتوم گاو هلشتاین، در مجموع ۵۳۴۷۸ جایگاه SNP روی ترانسکرپتوم گاو هلشتاین آمریکا شناسایی شد که تعداد ۴۲۰۸۲ عدد جایگاه SNP این فهرست شناسایی شده در پروژه ژنوم گاو نر نیز وجود داشت. با توجه به تشابه ۸۰ درصدی جایگاه‌های SNP این پژوهش و پروژه ۱۰۰۰ ژنوم گاو نر، صحت و دقت رویه شناسایی SNP مبتنی بر داده‌های ترانسکرپتوم با استفاده از فناوری RNA-Seq تایید شد (Banabazi *et al.*, 2017). در پژوهشی دیگر با هدف شناسایی و فراخوانی SNP دو جمعیت مرغ با استفاده از توالی‌یابی کل ژنوم (DNA-seq) و ترانسکرپتوم (RNA-Seq)، دقت ۹۱ درصدی داده‌های RNA-Seq در شناسایی جایگاه‌های SNP مشخص شد. در این مطالعه، تعداد ۹/۵ میلیون SNP با روش RNA-Seq شناسایی شدند که در تجزیه تحلیل DNA-Seq نیز به اشتراک گذاشته شده بودند. ۲۹ درصد SNP‌ها به همراه cis-QTL‌های مرتبط با آن‌ها، در مناطق بیان شده ژنوم قرار داشتند که به کمک داده‌های RNA-Seq با اطمینان و دقت بالایی شناسایی شدند (Jehl *et al.*, 2021). به منظور بررسی SNP‌ها در توالی رمزگر و انطباق آن‌ها با میزان بیان ژن‌ها در بین خروس‌ها که هدف اصلی مطالعه حاضر بود از توالی-یابی RNA (RNA-Seq) استفاده شده است که واجد تمامی ویژگی‌های مورد هدف این مطالعه است. هدف این پژوهش بررسی بیان ژن و بیان اختصاصی آلی توالی‌های رمزگر در نمونه‌های طحال، عضله و قلب با هدف یافتن

ویرایش و مکان‌یابی داده‌ها: با توجه به کیفیت نسبتاً مطلوب داده‌ها، تعداد خوانش‌های بی کیفیت کنار گذاشته برای هر نمونه نسبت به تعداد کل خوانش‌ها زیاد نبود و به‌طور متوسط برابر با ۳۱/۸، ۲۸/۶ و ۳۳/۷ میلیون قرائت از بافت‌های قلب، عضله و طحال (بیش از ۹۵٪ از توالی‌ها برای هر یک از بافت‌ها) بعد از کنترل کیفیت و ویرایش داده‌های خام باقی ماند و برای هم‌ردیفی و مکان‌یابی استفاده شدند (جدول ۱). در بافت عضله، دو نمونه مرتفع (H5, H9) و یک نمونه کم ارتفاع (L9) دارای هم‌ردیفی کمتر از ۸۵٪ بودند. برای مثال، در نمونه اول بافت طحال منطقه مرتفع از مجموع ۲۰،۸۶۱،۷۵۶ خوانش اولیه بعد از ویرایش، تعداد ۱۹،۹۲۵،۴۲۳ خوانش دارای کیفیت مناسب بوده و باقی ماندند. به عبارت دیگر، ۹۳۶،۳۳۳ خوانش (حدود ۴/۵٪ از کل خوانش‌ها) از ادامه تجزیه و تحلیل کنار گذاشته شدند. همچنین، از خوانش‌های رفت و برگشت ویرایش شده در این نمونه به ترتیب ۱۱،۵۴۷،۶۹۲ (۸۹/۳٪) و ۱۱،۴۷۷،۶۴۸ (۸۸/۷٪) خوانش به درستی مکان‌یابی شدند. بیش از ۰/۷٪ یعنی معادل بیش از هفتاد و پنج هزار خوانش با چند مکان هم‌ردیف شدند و به عبارت دیگر، هم‌ردیفی چندگانه داشتند. از این میان، بیش از ۵۷۰ خوانش با بیش از ۲۰ مکان ژنومی هم‌ردیف شدند. میزان مکان‌یابی کل برای این نمونه، ۸۹٪ به دست آمد. علاوه بر این، تعداد ۱۰،۹۸۴،۰۶۱ جفت خوانش (جفتی) هم‌ردیف شدند که از این تعداد، ۰/۶ درصد (معادل ۷۰،۴۹۵ جفت خوانش) هم‌ردیفی چندگانه و ۰/۱ درصد (معادل ۱۱۰۶۶ جفت خوانش) هم‌ردیفی ناجور داشتند. به عبارت دیگر، نرخ هم‌ردیفی جفتی جور شده برابر با ۸۴/۸٪ به دست آمد. نرخ مکان‌یابی کل برای تمامی نمونه‌ها بیش از ۸۵٪ به دست آمد و در مجموع و با توجه به مطالعات قبلی، در حد مطلوبی ارزیابی شد.

شناسایی ژن‌ها: نتایج تجزیه و تحلیل سطح بیان ۳۰ هزار ژن روی ترانسکریپتوم‌های تشکیل شده خروس‌ها نشان داد که در مجموع، تعداد ۲۲۶۰ ژن دارای بیان متفاوت و معنی‌دار در محیط کم ارتفاع و مرتفع بودند ($P=0/0002$). تفاوت پروفایل بیان ژن در طول یک روز برای زمان‌های "صبح و ظهر"، "ظهر و عصر" و "صبح و عصر" در هر بافت نیز بررسی شد و در مجموع، تعداد ۲۱۴۳ ژن، تفاوت بیان را نشان دادند (جدول ۲).

هم‌ردیفی خوانش‌ها و مکان‌یابی آن‌ها روی ژنوم مرجع به-ترتیب با نرم افزار Bowtie2 و Tophat2 انجام شد (Kim *et al.*, 2013). ژنوم مرجع و اطلاعات حاشیه‌نویسی نسخه ۶ برای تشکیل ترانسکریپتوم و ورودی نرم افزارهای Bowtie2 و Tophat2، از بانک اطلاعاتی Ensemble دریافت شد (https://ftp.ensembl.org/pub/release-106/fasta/gallus_gallus/dna/). اندازه فاصله درون کتابخانه‌ای و انحراف معیار آن برای استفاده از دستورات TopHat2 با استفاده از نرم افزار BWA و به‌روش نمونه-گیری از داده‌ها انجام شد (Li and Durbin, 2009)، که در حدود ۱۷۰ و ۴۰ برآورد شدند.

شناسایی و یافتن ASE-SNP: یافتن ASE-SNP روی ترانسکریپتوم نقشه‌یابی شده و فیلتر نمودن آن‌ها با استفاده از نرم افزارهای Samtools و Bedtools انجام شد (Li and Durbin, 2009). تعداد خوانش هر یک از آلل‌ها به‌ازای هر یک از جایگاه‌های SNP، بازخوانی شد و با اعمال کنترل کیفیت افزون‌تر، SNP‌های معتبر تشخیص داده شدند و آن‌هایی که کاذب مثبت و ناشی از خطاهای تکنیکی و کیفیت نامناسب نقشه‌یابی بودند کنار گذاشته شدند. SNP‌های یافت شده پس از اعمال فیلترهای مختلف دارای این مشخصه‌ها بودند: نوع آلل‌های متفاوت با آلل ژنوم مرجع (آلل جایگزین) در هر جایگاه SNP فقط شامل "A" یا "T" یا "C" یا "G" بود و چند آللی نبودند یعنی هر SNP فقط شامل دو نوع آلل بود (یک آلل مرجع و دیگری آلل جایگزین). شمارش خوانش آلل‌های کمتر بیان شده در هر جایگاه SNP حداقل یک و مجموع خوانش کل آلل‌ها در هر جایگاه SNP حداقل هشت بود. سپس، تعداد بیان آلل‌ها در نقاط چندشکل در سطح هر فرد هتروزیگوت با استفاده از آزمون کای اسکوتر در نرم افزار R نسخه 4.2.2 به‌منظور شناسایی تفاوت معنی‌دار نسبت بیان مورد انتظار بررسی شد. به‌منظور بررسی هم‌پوشانی بین نتایج از سایت <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> برای رسم نمودار ون استفاده شد. تجزیه ماهیت و مسیر-های ژنی به‌صورت برخط با استفاده از وب سرور برخط DAVID به آدرس <http://david.ncifcrf.gov> و panther به آدرس <http://www.pantherdb.org> انجام شد.

نتایج و بحث

جدول ۱- خلاصه تعداد خوانش‌ها، ویرایش و توالی‌یابی آن‌ها روی ژنوم مرجع در سه بافت

Table 1. Summary of sequenced, trimmed, and mapped reads on reference genome in three tissues

Region	Time	Sample code	Heart				Muscle				Spleen			
			Paired Read	Dropped	Percent dropped	Overall read mapping rate	Paired read	Dropped	Percent dropped	Overall read mapping rate	Paired read	Dropped	Percent dropped	Overall read mapping rate
Highland	Morning	H1	17958469	17339503	3.4	92.7	13783476	12936123	6.1	89	20861756	19925423	4.5	89
		H2	20074349	19403608	3.3	93	16786683	15737481	6.2	86.1	20011316	19135197	4.3	90.5
		H3	17771440	17148759	3.5	92.8	16922650	15916275	5.9	89.4	19687566	18826112	4.3	89.1
	Noon	H4	16847831	15981142	5.1	90.5	17680967	1683052	4.7	88.4	19378320	18516704	4.4	90.4
		H5	17688433	16882199	4.5	92.1	15919624	15104670	5.1	77.9	18228740	17415636	4.4	90.1
		H6	19275793	18407411	4.5	91.8	18305878	17404676	4.9	87.7	19111735	18243923	4.5	89.8
	Evening	H7	17878977	17019153	4.8	91.5	17576723	16783763	4.5	88.5	18288860	17442728	4.6	87.1
		H8	17537522	16723479	4.6	91.3	18623366	17352209	6.8	91.1	18480711	17556635	5	86.9
		H9	17489193	16682202	4.6	90.7	14215825	13798885	2.9	86.2	18663086	17797010	4.6	88.9
Lowland	Morning	L1	19096206	18465930	3.3	93.2	16770900	15989622	4.6	87.5	20610548	19693996	2.4	90.2
		L2	19278470	18642157	3.3	93.6	17579681	16605467	5.5	86.4	19253542	18356912	4.6	89.6
		L3	18066129	17469287	3.3	93	16132907	15147511	6.1	88.5	20263333	19409877	4.2	89.7
	Noon	L4	17156458	16435188	4.2	91.5	16171322	15158287	6.2	88.4	19953492	19024979	4.6	89.6
		L5	20029142	19378693	3.2	93.3	18198714	17353242	4.6	89	19353480	18515147	4.3	89.7
		L6	19904978	19215974	3.4	93	16305878	16117723	1.1	88.2	19165569	18304751	4.5	89.4
	Evening	L7	19404574	18746044	3.3	93	1750536	16480174	5.4	89.3	20729401	19794945	4.5	89
		L8	20011420	16435188	17.8	91.5	17321111	16148477	6.7	87.1	18662492	17829536	4.4	89.7
		L9	19137073	18452989	3.5	92.4	16619093	15505196	6.7	81.7	22548322	21568624	4.3	90.1

جدول ۲- تعداد ژن‌های متفاوت بیان شده در منطقه کم ارتفاع و مرتفع در سه زمان (صبح، ظهر و شب) و در سه بافت مختلف (قلب، عضله و طحال)

Table 2. The number of differentially expressed genes in the lowland and highland regions at different time points (morning, noon, and evening) and in three tissues (heart, meat, and spleen)

Comparison	Number of differentially expressed genes		
	Heart	Meat	Spleen
Tissue	Highland vs. lowland		
Time			
Morning	96	128	207
Noon	86	322	332
Evening	154	844	91
Highland			
Morning–noon	81	55	125
Noon–evening	42	77	86
Morning–evening	59	127	144
Lowland			
Morning–noon	89	106	226
Noon–evening	0	107	129
Morning–evening	463	166	61

بود. بیش‌ترین تعداد بیان متفاوت مربوط به صبح و عصر منطقه کم ارتفاع در بافت قلب مشاهده شد. هیچ ژن متفاوت بیان شده در ظهر با عصر منطقه کم ارتفاع بافت قلب مشاهده نشد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مسیر نشان داد ژن‌های متفاوت بیان شده بیشتر در مسیرهای مرتبط با تنش گرمایی و پاسخ‌های ایمنی با واسطه سلولی (فعال شدن سلول‌های t) و پاسخ به تنش مشاهده می‌شوند. پروفایل ترانسکریپتوم نشان از تلاش خروس‌ها برای حفظ دمای بدن داشت و این موجب فعال شدن مسیرهای ایمنی شده بود. به بیان دیگر، تنش گرمایی با ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌های ایمنی، سیستم ایمنی خروس‌های در شرایط تنش را سرکوب و در مقابل، حساسیت آن را افزایش داده بود. شکل ۱ نتایج تجزیه و تحلیل ماهیت ژنی بر اساس فرآیند زیستی را نشان می‌دهد.

بررسی هستی‌شناسی ژنی در PANTHER و DAVID، ۱۴ ژن مهم به نام‌های GADD45B، S100A8، FOS، NMI، F8، MPP1، SAT1، CEBPD، CEBPD، DHX58، IFI27L2، CMPK2 و CMPK2 را نشان داد که نقشی اساسی در مسیرهای درگیر در تنش گرمایی و ایمنی داشتند.

در این میان، ژن IGFBP4 موجود روی کروموزوم ۲۷ در هر دو زمان ظهر و عصر در بافت قلب، بیان مشترک داشت و همچنین، بیان افتراقی این ژن در منطقه کم ارتفاع نیز شناسایی شد. این ژن عضوی از خانواده پروتئین اتصال-دهنده فاکتور رشد شبه‌انسولین (IGFBP) است که به فاکتورهای رشد شبه‌انسولین متصل شده و در پلازما گردش می‌کند. اتصال این پروتئین نیمه عمر IGFها را طولانی می‌کند و تعامل آن‌ها با گیرنده‌های سطح سلول را تغییر می‌دهد. طی تحقیقی، پروتئین IGFBP4 به‌عنوان واسطه‌ای در شرایط تنش مشاهده شد که در موش، نقشی کلیدی در سیگنالینگ پاراکرین ایفا می‌کرد (Alessio *et al.*, 2020). یافته‌ها حاکی از واکنش این سه بافت به تغییرات دمایی روزانه بود، به‌طوری که با افزایش دما در طول روز، واکنش‌های مشخصی در بیان ژن بافت‌ها مشاهده شد و با کاهش دما در شب، این واکنش‌ها به‌طور متناظر تغییر می‌کردند. بیش‌ترین ژن‌های دارای تفاوت بیان مربوط به صبح و عصر در هر سه بافت بود، به‌خصوص بافت قلب در منطقه کم ارتفاع، تفاوت بیان ژن قابل توجهی را نشان داد. از تعداد ۱۲۷۸ ژن متفاوت بیان شده در بافت عضله، تعداد ۱۴ ژن با بافت قلب و ۳۷ ژن با بافت طحال، مشترک

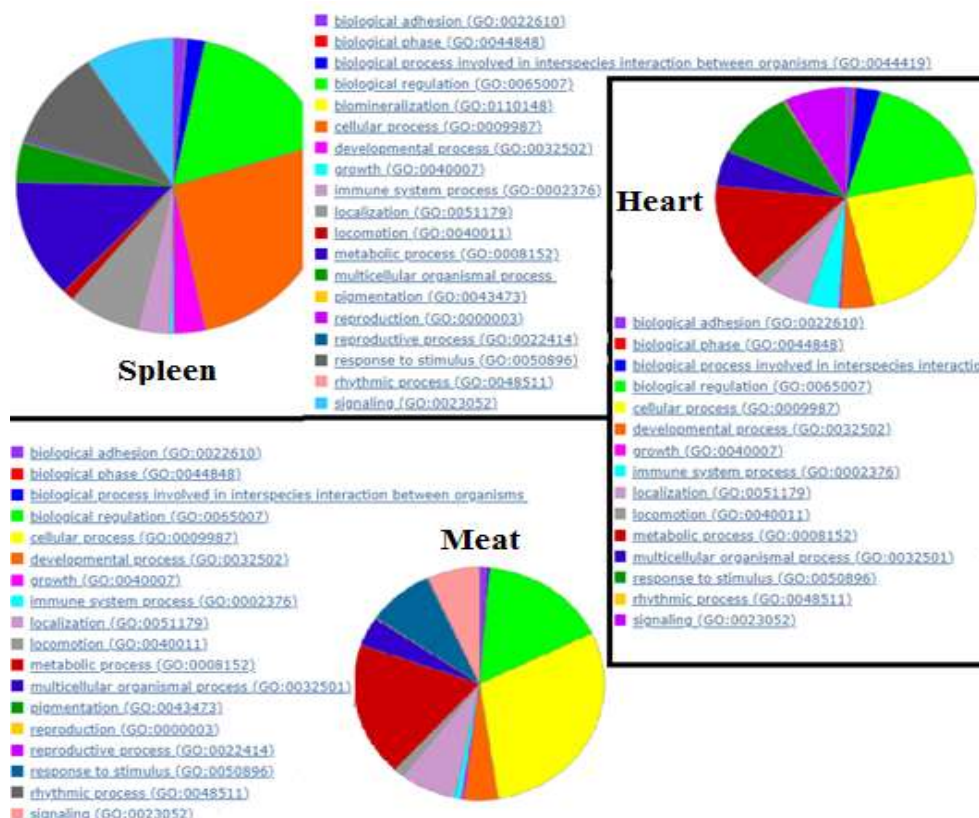


Fig. 1. The Gene Ontology classification of the biological process. The color guide along the graph shows the details of the types of biological processes

شکل ۱- دسته‌بندی ماهیت ژنی بر اساس فرآیند زیستی. راهنمای رنگی کنار نمودار، جزئیات انواع فرآیندهای زیستی را نشان می‌دهد

به ترتیب در ماهی، مرغ و گاو را در پاسخ به دما در شرایط تنش گرمایی نشان داده‌اند (Smith *et al.*, 2013; Tu *et al.*, 2016; Gates *et al.*, 2017). ارتباط ژن FOS با ژن Hsp70 (He *et al.*, 2000) و شوک گرمایی نیز مشخص شده است (Mosser *et al.*, 1997; Sonna *et al.*, 2002). علاوه بر موارد ذکر شده، در تحقیقی، ارتباط ژن SAT1 با پروتئین شوک حرارتی ۱۰ (Hsp10) مشخص شده است (Johnson *et al.*, 2005). این برهم‌کنش‌ها منجر به مهار تولید میانجی‌های التهابی ناشی از لیپوپولی‌ساکارید می‌شود (Johnson *et al.*, 2005; Czarnecka *et al.*, 2006). ژن MPP1 و CBFB با برهم‌کنش اسکلت سلولی در تنظیم و تکثیر سلولی، در مسیرهای سیگنالینگ و اتصالات بین سلولی نقش ایفا می‌کند و برای اتصالات چسبنده و مهاجرت مناسب نورون‌ها در طول توسعه قشر مغز ضروری هستند (Komori, 2003; Dudok *et al.*, 2013). علاوه بر این، دو ژن MPP1 و CBFB با سرطان مرتبط بودند

ژن GADD45B به انواع تنش محیطی و ژنتیکی با میانجی‌گری فعال‌سازی مسیر p38/JNK که تعادل آپوپتوزیس را کنترل می‌کند، پاسخ می‌دهد. عملکرد این ژن با تنظیم رشد و آپوپتوزیس مرتبط است (Zumbrun *et al.*, 2009). در تحقیقی، تاثیر این ژن در مهار رشد سلولی و تکثیر بیش از حد ویروس لوسمی طیور زیرگروه J با مهار GADD45B نشان داده شده است (Zhang *et al.*, 2016). در مطالعه حاضر، این ژن در خروس‌های سازگار با ارتفاع به صورت کم بیان شده بود که نشان می‌دهد تنش گرمایی می‌تواند تأثیر منفی بر ساز و کار پاسخ ایمنی سازگار با ارتفاع بگذارد و آن‌ها را در برابر عوامل بیماری‌زا مختلف آسیب‌پذیر کند. برهم‌کنش ژن NMI با پروتئین متصل‌کننده به Hsp105b نشان می‌دهد که فعالیت پروموتور پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (Hsp70) از راه مسیر سیگنالینگ Stat3 افزایش می‌یابد (Saito *et al.*, 2014). مطالعات مختلف، اثر ژن‌های MPP1، CBFB و CEBPD

(2019 همچنین، تجزیه تحلیل بافت کبد روی دو لاین هم‌خون مرغ لگهورن و فایومی جهت شناسایی ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با تنش گرمایی و ویروس نیوکاسل، تفاوت بیان ژن SLC01B1 جهت حفظ هموستاز بدن در طول پروسه التهابی و شرایط تنش گرمایی را نشان داد (Wang *et al.*, 2020). در مطالعه حاضر، بیان متفاوت انواع دیگری از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ناقل هم‌چون SLC2A9 و SLC04C1 مشاهده شد.

شناسایی *SNP* و *ASE-SNP*: با هم‌ردیفی خوانش‌های کوتاه روی ژنوم مرجع برای هر نمونه و سپس تجمیع آن‌ها، تعداد ۴۷۵۹۹۶، ۳۸۸۲۲۴ و ۱۱۶۹۳۹۴ *SNP* به ترتیب در بافت‌های قلب، عضله و طحال شناسایی شدند. پس از انجام آزمون کای اسکور، ۴۸۹۰۶ (۱۰/۳ درصد)، ۲۸۵۲۹ (۷/۳ درصد) و ۷۶۲۵۱ (۶/۵ درصد) *SNP* به‌عنوان *ASE-SNP* در بافت‌های قلب، عضله و طحال مشاهده شدند ($P < 0.05$). مشخص شد این *ASE-SNP*‌ها مربوط به تعداد ۷۹۱۹، ۶۱۸۲ و ۱۰۵۹۰ ژن در قلب، عضله و طحال بودند (شکل ۲). تعداد ۵۱۴۰ ژن در هر سه بافت *SNP*‌های مشترک دارای عدم تعادل در بیان نشان دادند. علاوه بر آن در نتایج هم‌پوشانی، تعداد ۱۷۳ ژن بین عضله و قلب، تعداد ۶۴۶ ژن عضله و طحال و تعداد ۲۰۵۸ ژن بین قلب و طحال -*ASE-SNP* مشترک داشتند.

تعداد *ASE-SNP* و *SNP*‌ها به تفکیک هر نمونه (خروس) در جدول ۲ قابل مشاهده است. به‌طور متوسط در هر یک مگاجفت باز ژنوم طیور، تعداد ۴۱۳، ۱۶۰ و ۱۹۶ *SNP* و تعداد ۲۳، ۴۵ و ۷۳ *ASE-SNP* به ترتیب در بافت‌های قلب، عضله و طحال کشف شد. ژن‌های مشترک در هر سه بافت که دارای فراوانی بیش از ۵۰ مورد *SNP* بودند به دلیل اهمیت این جهش‌ها در تغییر سطح بیان ژن و فراوانی بالای آن متمایز شدند که مربوط به نه ژن با کد ژن در سایت Ensemble یا نام ژن ENSGALG00010001560، notch2، ENSGALG00010026881، CFAP77، LOC101751181، ENSGALG00010021524، ENSGALG00010020997، RGS6 و GRIK3 بودند. ژن LOC100859631 با نام antigen و WC1.1-like و موجود روی کروموزوم ۱۶ طیور با تعداد ۴۱۴ *SNP* دارای بیشترین *SNP* دارای عدم تعادل در بیان در بافت طحال بود.

(Smith *et al.*, 2013; Tu *et al.*, 2016; Gates *et al.*, 2017). گزارش شده است که ژن USP18 در مسیر سیگنالینگ سیتوکین در سیستم ایمنی نقش دارد که در پاسخ به گرما در مرغ و ماهیان مشاهده شده است (Kaltenboeck and Liu, 2013; Kamineni, 2015). دو ژن IFI27L2 و F8 مرتبط با سیستم ایمنی از مسیرهای مختلفی به التهاب پاسخ می‌دهند (Chen *et al.*, 2011; Monson *et al.*, 2015). Tassanakajon *et al.*, 2013; S100A8 و CMPK2 به ترتیب در بین "قلب و عضله" و در "قلب و طحال" بود که این دو ژن نیز در تمایز سلول‌های مونوسیت و تنظیم سیستم ایمنی در پاسخ به عفونت‌های مختلف ویروسی نقش داشتند (Ma *et al.*, 2016; Zhang and Cao, 2016; Zhang *et al.*, 2017). ژن‌های S100A8 و CMPK2 در نمونه عضله-عصر بیشترین بیان را نشان دادند. از جمله مسیرهای مهم مشاهده شده، مسیر چسبندگی کانونی، مسیر آنفلوآنزای A، سیگنالینگ ErbB و سوخت و ساز گلیسروفسولپید بود. مسیر چسبندگی کانونی با تاثیر در عملکرد سیستم ایمنی، در نمونه عضله-صبح غنی شده بود. همچنین، مسیر آنفلوآنزای A که با ایمنی ذاتی در ارتباط است، در نمونه قلب-عصر مشاهده شد. مسیر سیگنالینگ ErbB که در نتایج غنی‌سازی ژن‌ها مشاهده شد، پیش‌تر در ارتباط با تنش گرمایی در اردک نیز یافت شده بود (Kim *et al.*, 2017). سوخت و ساز گلیسروفسولپید، به‌عنوان یک مسیر متابولیکی چربی، نقش مهمی در حفظ هموستاز انرژی در پاسخ‌های تنظیم‌کننده دما ایفا می‌کند و از فرآیندهای زیستی در سیستم ایمنی در شرایط تنش گرمایی محسوب می‌شود (Renaudeau *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2016). تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن میان بافت کبد مرغان تجاری کره-ای (هانهیوپ) که به کشور قرقیزستان انتقال داده شده بودند، ۳۱۵ ژن دارای تفاوت بیان را در محیط جدید نشان داد. تجزیه و تحلیل مسیر پایگاه هستی‌شناسی KEGG درگیری این ژن‌ها را در مسیرهای سوخت و ساز انرژی مانند فرآیندهای متابولیک لاکتات و فرآیند کاتابولیک گلیسرول، سوخت و ساز پیرووات، گلیکولیز/گلوکونوزن، بیوسنتز و چرخه‌های سترات نشان داد (Kumar *et al.*,

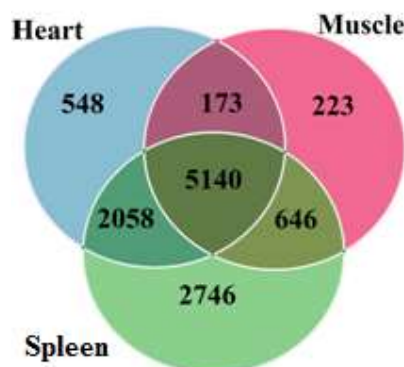


Fig. 2. Venn diagram of number of genes related to ASE-SNPs in three tissues of heart, muscle, and spleen

شکل ۲- ون دیاگرام تعداد ژن‌های مرتبط با ASE-SNP ها در سه بافت قلب، عضله و طحال

شده در جدول ۳ تابع عوامل مختلفی چون نوع بافت و ژن-های بیان شده در هر بافت، هتروزیگوت بودن جهش در مناطق بیان شده و میزان بیان ژن بود. بدین صورت که هر چه میزان کلی بیان ژن بیشتر باشد، تفاوت اندک میزان بیان دو آلل با توان آماری بیشتری قابل شناسایی است. بیشترین تعداد ASE-SNP ها روی کروموزوم شماره ۲ با تعداد ۵۲۹۵، ۲۷۳۶ و ۱۷۳۰ در قلب، عضله و طحال یافت شد (شکل ۳). نتایج نسبت تعداد ASE-SNP با طول کروموزوم‌های مختلف نشان داد که ارتباط مستقیمی بین تعداد ASE-SNP های یافت شده و طول کروموزوم‌ها وجود ندارد. رونویسی در تمام طول ژنوم با یک توزیع همگن و با پوششی یکسان صورت نمی‌گیرد، به عبارت دیگر، برخی نواحی حامل ژن‌های بیشتر و یا ژن‌هایی هستند که بیان بیشتری در بافت مورد بررسی داشته و رونویسی (بیان) در آن مناطق، بیشتر صورت گرفته است. در نتیجه، این نواحی سهم بیشتری از کل ترانسکریپتوم سرهم شده دارند. بدین ترتیب، SNP های موجود در این نواحی نیز فراوانی بالاتر داشته و بعد از فیلتر همچنان در لیست باقی مانده‌اند. در پژوهشی با استفاده از داده‌های RNA-Seq، بیش از ۱۷۴ هزار نشانگر SNP در ترانسکریپتوم جوجه گوشتی شناسایی شد و حدود ۲۴۰۰۰ (۱۴ درصد) حالت ASE نشان داده شد. از مجموع ASE-SNP های شناسایی شده فقط ۳/۷ درصد آن‌ها در هر سه بافت مشترک بودند و ۸۳ درصد از ASE ها فقط در یک بافت، بیان نامتعادل نشان دادند. نتایج نشان داد ASE یک ساز و کار وابسته به بافت در جوجه گوشتی است (Tomlinson et al., 2021).

یکی از مسیرهای درگیر این ژن، مسیر مرتبط با تنظیم رونویسی به وسیله عوامل رونویسی STAT، AP-1 و NF- κ B بود که به ترتیب در پاسخ به سیتوکین‌ها، تنش اکسیداتیو و التهاب بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کرد. سایر مسیرهای مرتبط ژنی شامل سیگنالینگ سلولی و مرگ سلولی و چرخه سلولی بودند. مسیرهای ژن‌های دارای ASE، مشابه مسیرهای درگیر در تجزیه و تحلیل بیان ژن (تنش و ایمنی) بودند. تجزیه و تحلیل ماهیت و مسیرهای ژنی به صورت برخط روی بانک اطلاعاتی Panther و DAVID، نقش این ژن را در ارسال پیام‌های مختلف به داخل سلول و ایجاد تغییراتی در عملکرد آن‌ها و انتقال سیناپس تحریکی در سراسر سیستم عصبی نشان داد. در این پژوهش، نتایج حاصل از دو تجزیه و تحلیل پروفایل بیان ژن و ASE به منظور شناسایی ژن‌های مشترک در هر دو تجزیه و تحلیل، با یکدیگر تلفیق و مقایسه شدند. مقایسه نتایج، هیچ ژن مشترکی بین دو مجموعه نتایج را نشان نداد. این یافته حاکی از آن است که تفاوت مشاهده شده در پروفایل بیان ژن، ممکن است به دلیل عوامل رونویسی و پس از رونویسی باشد و علت آن، تفاوت در بیان در سطح آلل‌ها نباشد. به طور قطع، عدم وجود اشتراک در نتایج، وجود بیان اختصاصی آللی را در ژن‌های با بیان متفاوت رد نمی‌کند. برای تفسیر دقیق‌تر یافته‌ها، لازم است اطلاعات بیشتری در مورد روش‌های مطالعه، جمعیت مورد مطالعه و سایر عوامل ژنتیکی مرتبط در نظر گرفته شود. واریانس مشاهده شده در تعداد ASE-SNP های گزارش

جدول ۳- تعداد ASE-SNP و SNPهای کشف شده در هر یک از بافت‌ها
Table 3. The number of ASE-SNP and SNP discovered in each of the tissues

Region	Time	Tube code	Heart			Muscle			Spleen		
			SNPs	ASE-SNP		SNPs	ASE-SNP		SNPs	ASE-SNP	
				No	%		No	%		No	%
Highland	AM	H1	27587	3099	11.23	20484	3105	15.16	60681	2349	3.87
		H2	30549	5585	18.28	20814	1077	5.17	66593	2420	3.63
		H3	18196	1500	8.24	14966	1583	10.58	57222	8729	15.25
	Noon	H4	17153	1926	11.23	13825	2027	14.66	60814	2202	3.62
		H5	31284	3451	11.03	17955	2348	13.08	71641	2581	3.6
		H6	22573	4245	18.81	8014	787	9.82	60731	1763	2.9
	PM	H7	25466	2458	9.65	29615	2171	7.33	71724	2988	4.17
		H8	22961	2255	9.82	24466	1490	6.09	57656	1939	3.36
		H9	35788	1150	3.21	21800	939	4.31	71469	2377	3.33
Lowland	AM	L1	25411	2507	9.87	24229	1337	5.52	56472	2166	3.84
		L2	16083	1362	8.47	27337	1509	5.52	55728	1685	3.02
		L3	22214	2036	9.17	18632	901	4.48	62834	2037	3.24
	Noon	L4	16049	1491	9.29	21218	1144	5.39	56632	2217	3.91
		L5	22389	2214	9.89	17954	2296	12.79	80898	16357	20.22
		L6	42662	1894	4.44	27585	1308	4.74	61126	1785	2.92
	PM	L7	47939	2507	5.23	26223	1574	6	66808	16425	24.59
		L8	7928	7492	5.94	22965	1022	4.45	56587	1603	2.83
		L9	43762	1734	3.96	30140	1911	6.34	93778	4628	4.94
Total		475996	48906	10.27	388224	28529	7.35	1169394	76251	6.52	

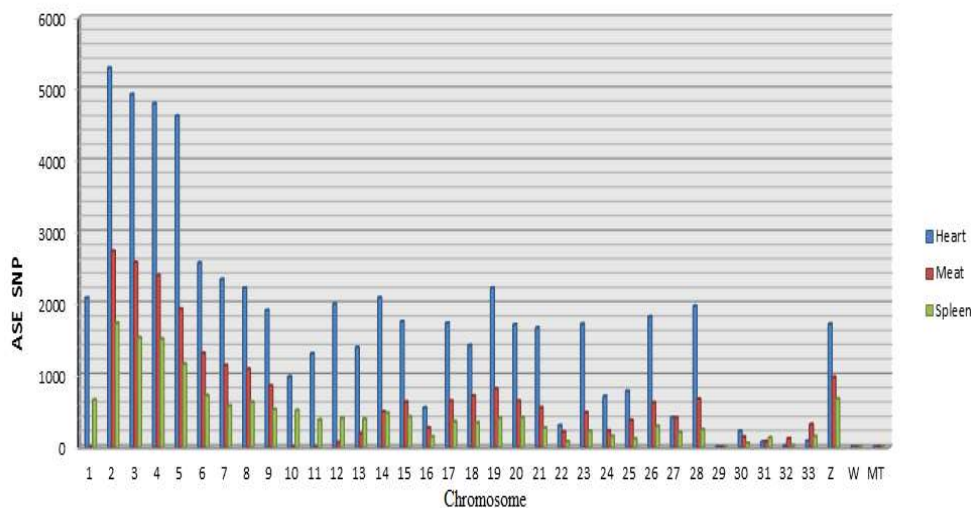


Fig. 3. Number of detected ASE-SNP in each chromosome. Blue, red, and green colors indicate the number of ASE-SNPs in heart, muscle, and spleen, respectively.

شکل ۳- تعداد ASE-SNP شناسایی شده در هر کروموزوم. رنگ آبی، قرمز و سبز به ترتیب تعداد ASE-SNP را در قلب، عضله و طحال نشان می‌دهد.

نفع آلل مرجع است که نشان می‌دهد معمولاً مقداری اریب به سمت آلل مرجع وجود دارد (Degner *et al.*, 2009). این اریب می‌تواند به دلایل متفاوتی از جمله خطای توالی‌یابی، و به خصوص خطای مکان‌یابی (نقشه‌یابی یا mapping خوانش‌های RNA-Seq روی ژنوم مرجع) باشد. بنابراین

از تعداد کل ۱۶۵۰۶۴۲۵، ۸۲۹۹۳۱۷ و ۲۷۵۴۶۷۴ جایگاه (به ترتیب در قلب، عضله و طحال)، شمارش تعداد خوانش در آلل جایگزین و مرجع سه بافت به طور متوسط ۴/۵٪ اریب به نفع آلل مرجع (۴۰ به ۵۸٪ در قلب و ۴۸ به ۵۲٪ در عضله و طحال) نشان داد. این نتایج به معنی ارجحیت به

اثر بیشتری روی چگونگی اتصال فاکتورهای رونویسی و در نهایت بیان ژن داشته باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، این مطالعه، فهرستی از تعداد قابل ملاحظه‌ای SNP روی ترانسکرپتوم خروس را ارائه می‌دهد که امکان پذیر شناسایی SNP و استفاده از داده‌های RNA-Seq را تأیید می‌نماید. مقایسه پروفایل بیان ژن و ASE-SNP کشف شده در سوبه‌های سازگار با محیط‌های پرورشی مختلف از نظر ارتفاع می‌تواند برای شناسایی ژن‌های مرتبط با پاسخ به پرورش در منطقه مرتفع یا کم ارتفاع مورد استفاده قرار گیرند و این ژن‌ها احتمالاً با سازگاری به محیط پرورشی مرتبط هستند. دلیل اختلاف تعداد SNP‌های شناسایی شده در این مطالعه و مطالعات قبلی احتمالاً ناشی از تفاوت سوبه‌ها، نوع بافت مورد ارزیابی و سایر عوامل موثر بر بیان ژن‌ها است. تفاوت بیان آلل‌ها در یک موقعیت SNP می‌تواند زمینه‌ساز تنوع فنوتیپی شده و شناسایی این‌گونه جهش‌ها موجب درک عمیق‌تری از فعالیت رونویسی، چگونگی تنظیم بیان ژن و واریانت‌های تاثیرگذار بر بیان ژن‌ها شده و احتمالاً توجیه‌کننده بخش قابل توجهی از تنوع از نظر حساسیت به بیماری بوده و تحمل تنش‌های محیطی در شرایط پرورشی متفاوت را فراهم می‌کند. بنا به گزارشات قبلی، برخی از ژن‌هایی که حالت ASE را نشان می‌دهند با صفات مهم اقتصادی رابطه دارند و به‌وسیله آن‌ها، ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ را می‌توان برقرار کرد. بنابراین، ASE-SNP، منبع جدید، مناسب و مطلوبی را برای انتخاب پیش روی متخصصان اصلاح نژاد دام و طیور قرار خواهد داد. مطالعه حاضر سرآغازی بر ورود به عصر جدیدی از ارزیابی و انتخاب در حیوانات اهلی است که می‌تواند با بهره‌گیری از سطوح مختلف داده‌های امیکس ادامه یابد و به‌عنوان روشی موثر، اقتصادی و کارآمد، روند پیشرفت ژنتیکی را در طیور بهبود بخشد.

میزان اریب نسبتاً پایین نشان می‌دهد که ژنوم مرجع مناسب برای نقشه‌یابی RNA به‌کار رفته است و کیفیت نقشه‌یابی هم مناسب بوده است. طی پژوهشی در سه بافت کبد، هیپوتالاموس و عضله مرغ پلیموث راک، بررسی عدم تعادل آللی و کشف SNP‌های مربوطه انجام شد. تعداد ASE-SNP ۱۱۳۳۸ شناسایی شده بودند. تعداد خوانش به‌ازای آلل مرجع، بیشتر از آلل جایگزین بود. این اریب تقریباً برای ۶۵ درصد SNP‌ها مشاهده شد. به‌منظور کاهش اریب مشاهده شده و دستیابی به درصد مکان‌یابی بالاتر خوانش‌ها، از راهبرد سرهم کردن یا assembly خوانش‌ها به ژنوم کاذب استفاده شد و محققین این پژوهش با استفاده از ژنوم کاذب به مکان‌یابی بیشتر دست یافتند (Lopez et al., 2014).

انواع ASE-SNP: در مطالعه حاضر، ۱۲ نوع SNP و ASE-SNP شناسایی شد. چهار نوع از نوع جایگزینی عامل و هشت نوع از آن‌ها از نوع جایگزینی غیرعامل بودند (جدول ۴). شایع‌ترین آن‌ها، از نوع جایگزینی نوکلئوتیدی عامل بودند که ۷۴٪ در بافت قلب و ۷۷٪ در بافت عضله و طحال را شامل می‌شد. همچنین، جایگزینی نوکلئوتیدی عامل در ASE-SNP‌ها به‌میزان ۷۰٪ در بافت قلب و ۷۵٪ در بافت‌های عضله و طحال مشاهده شد. نسبت جایگزینی نوکلئوتیدی عامل به جایگزینی غیرعامل (Ts/Tv) در SNP‌های دارای عدم تعادل در بیان در بافت قلب برابر با ۲/۳ و در عضله و طحال برابر با ۳ و در SNP‌ها به‌ترتیب ۲/۹، ۳/۳ و ۲/۲ در بافت قلب، عضله و طحال بود و کاهش نسبت Ts/Tv در دو بافت قلب و عضله برای SNP‌های دارای عدم تعادل در بیان نسبت به مجموع SNP‌های یافت شده را نشان داد. این نتایج با مطالعه (Dar et al., 2023) روی جوجه گوشتی و (Arefnejad et al., 2015) روی اسب کاسبین، مطابقت داشت. هر دو مدل جایگزینی می‌توانند باعث تغییر اسید آمینه شوند. اما امکان این که جایگزینی غیرعامل نسبت به جایگزینی عامل، توالی اسید آمینه پروتئین را تغییر دهد بیشتر است. همچنین، تفاوت‌های بیوشیمیایی محصولات پروتئینی مرتبط با تغییر توالی اسید آمینه برای جایگزینی نوکلئوتیدی غیرعامل بیشتر است. با توجه به این که جایگزینی نوکلئوتیدی غیرعامل سبب تغییرات گسترده در شکل رشته DNA می‌شود، می‌تواند

جدول ۴- انواع SNP و ASE-SNPها و نسبت جایگزینی عامل به غیرعامل در هر یک از بافت‌ها

Table 4. SNPs and ASE-SNP types and Ts/Tv ratios in tissues

Type	Heart				Muscle				Spleen			
	SNPs	%	ASE-SNP	%	SNPs	%	ASE-SNP	%	SNPs	%	ASE-SNP	%
Transversion SNP												
A/C	4870	2.9	1669	3.5	11697	2.7	667	2.8	7165	3.5	2014	2.6
C/A	5549	3.3	1796	3.7	12125	2.8	851	3.5	8270	4	2559	3.3
A/T	5102	3	1797	3.7	11169	2.6	688	2.8	7535	3.7	2285	3
T/A	5152	3.1	1874	3.9	11341	2.6	695	2.9	7367	3.6	2515	3.3
C/G	5708	3.4	1807	3.8	13965	3.2	820	3.4	8519	4.1	2515	3.3
G/C	5675	3.4	1844	3.8	13479	3.1	793	3.3	8382	4.1	2517	3.3
G/T	5404	3.2	1767	3.73	11998	2.8	753	3.16	7896	3.8	2498	3.2
T/G	4731	2.8	1590	3.36	11687	2.7	630	2.64	7056	3.4	2156	2.8
Transition SNP												
C/T	35777	21.5	9273	19.5	86402	20.1	4954	20.78	54601	26.8	17027	22.3
T/C	26150	15.7	7296	15.4	79297	18.5	3759	15.77	40751	2	11501	15
A/G	26029	15.6	7275	15.3	78849	18.4	3700	15.52	40464	19.8	11678	15.3
G/A	36093	21.7	9373	19.7	86034	20.1	5531	23.20	5411	2.6	16986	22.2
Total	166240	100	47361	100	428043	100	23841	100	203417	100	76251	100
Ts/Tv	2.94		2.34		3.39		3.04		2.27		3	

فهرست منابع

- Alessio, N., Squillaro, T., Di Bernardo, G., Galano, G., De Rosa, R., Melone, M. A., & Galderisi, U. (2020). Increase of circulating IGF1P-4 following genotoxic stress and its implication for senescence. *Elife*, 9, e54523. doi: 10.7554/eLife.54523
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arefnejad, B., Kohram, H., Moradi Shahrabak, M., Shakeri, M., Dong, Y., Zhang, X., Wang, W., & Hoseini Salekdeh, G. (2015). Genic variant detection of Caspian horse using high-throughput sequencing technology. *Agricultural Biotechnology Journal*, 6(4), 101-116. [In Persian]
- Ayroles, J. F., Hughes, K. A., Rowe, K. C., Reedy, M. M., Rodriguez Zas, S. L., Drnevich, J. M., Cáceres, C. E., & Paige, K. N. (2009). A genomewide assessment of inbreeding depression: gene number, function, and mode of action. *Conservation Biology*, 23(4), 920-930. doi: 10.1111/j.1523-1739.2009.01186.x
- Banabazi, M. H., Nejati Javaremi, A., Imumorin, I., & Ghaderi Zefrei, M. (2017). Genetic variance explanation of Residual Feed Intake (RFI) by SNPs discovered on transcriptome of Holstein cows. *Animal Sciences Journal*, 30(114), 169-182. [In Persian]
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Chen, C., Li, H., Xie, Q., Shang, H., Ji, J., Bai, S., & Bi, Y. (2011). Transcriptional profiling of host gene expression in chicken liver tissues infected with oncogenic Marek's disease virus. *Journal of General Virology*, 92(12), 2724-2733. doi: 10.1099/vir.0.034066-0
- Cheng, H. H., Perumbakkam, S., Pyrkosz, A. B., Dunn, J. R., Legarra, A., & Muir, W. M. (2015). Fine mapping of QTL and genomic prediction using allele-specific expression SNPs demonstrates that the complex trait of genetic resistance to Marek's disease is predominantly determined by transcriptional regulation. *BMC Genomics*, 16, 1-9. doi: 10.1186/s12864-015-2016-0
- Czarnecka, A. M., Campanella, C., Zummo, G., & Cappello, F. (2006). Heat shock protein 10 and signal transduction: a "capsula eburnea" of carcinogenesis. *Cell Stress & Chaperones*, 11(4), 287. doi: 10.1379/csc-200.1
- Dar, M. A., Bhat, B., Nazir, J., Saleem, A., Manzoor, T., Khan, M., & Ahmad, S. M. (2023). Identification of SNPs Related to Salmonella Resistance in Chickens Using RNA-Seq and Integrated Bioinformatics Approach. *Genes*, 14(6), 1283. doi: 10.3390/genes14061283

- Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, J., & Kumar, R. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World*, 9(3), 260. doi: 10.14202/vetworld.2016.260-268
- Degner J. F., Marioni, J. C., Pai, A. A., Pickrell, J. K., Nkadori, E., Gilad, Y., & Pritchard, J. K. (2009). Effect of readmapping biases on detecting allele-specific expression from RNA-Sequencing data, *Bioinformatics*, 25(24), 3207-3212. doi: 10.1093/bioinformatics/btp579
- Dolt, K. S., Mishra, M. K., Karar, J., Baig, M. A., Ahmed, Z., & Pasha, M. Q. (2007). cDNA cloning, gene organization and variant specific expression of HIF-1 α in high altitude yak (*Bos grunniens*). *Gene*, 386(1-2), 73-80. doi: 10.1016/j.gene.2006.08.004
- Dudok, J. J., Sanz, A. S., Lundvig, D. M., & Wijnholds, J. (2013). MPP3 is required for maintenance of the apical junctional complex, neuronal migration, and stratification in the developing cortex. *Journal of Neuroscience*, 33(19), 8518-8527. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5627-12.2013
- Gates, K., Sandoval-Castillo, J., Bernatchez, L., & Beheregaray, L. B. (2017). De novo transcriptome assembly and annotation for the desert rainbowfish (*Melanotaenia splendida tatei*) with comparison with candidate genes for future climates. *Marine Genomics*, 35, 63-68. doi: 10.1016/j.margen.2017.05.008
- Gaur, U., Li, K., Mei, S., & Liu, G. (2013). Research progress in allele-specific expression and its regulatory mechanisms. *Journal of Applied Genetics*, 54, 271-283. doi: 10.1007/s13353-013-0148-y
- Gibson, G., & Weir, B. (2005). The quantitative genetics of transcription. *Trends in Genetics*, 21(11), 616-623. doi: 10.1016/j.tig.2005.08.010
- He, H., Chen, C., Xie, Y., Asea, A., & Calderwood, S. K. (2000). HSP70 and heat shock factor 1 cooperate to repress Ras-induced transcriptional activation of the c-fos gene. *Cell Stress & Chaperones*, 5(5), 406. doi: 10.1379/1466-1268(2000)005<0406:hahsf>2.0.co;2
- Heap, G. A., Yang, J. H., Downes, K., Healy, B. C., Hunt, K. A., Bockett, N., Franke, L., Dubois, P. C., Mein, C. A., Dobson, R. J. & Plagnol, V. (2010). Genome-wide analysis of allelic expression imbalance in human primary cells by high-throughput transcriptome resequencing. *Human Molecular Genetics*, 19(1), 122-134. doi: 10.1093/hmg/ddp473
- Hughes, K. A., Ayroles, J. F., Reedy, M. M., Drnevich, J. M., Rowe, K. C., Ruedi, E. A., & Paige, K. N. (2006). Segregating variation in the transcriptome: cis regulation and additivity of effects. *Genetics*, 173(3), 1347-1355. doi: 10.1534/genetics.105.051474
- International Chicken Polymorphism Map Consortium. (2004). A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature*, 432, 717-721. doi: 10.1038/nature03156
- Jehl, F., Degalez, F., Bernard, M., Lecerf, F., Lagoutte, L., Désert, C., Coulée, M., Bouchez, O., Leroux, S., Abasht, B., & Tixier-Boichard, M. (2021). RNA-Seq data for reliable SNP detection and genotype calling: interest for coding variant characterization and cis-regulation analysis by allele-specific expression in livestock species. *Frontiers in Genetics*, 12, 655707. doi: 10.3389/fgene.2021.655707.
- Jehl, F., Désert, C., Klopp, C., Brenet, M., Rau, A., Leroux, S., & Lagarrigue, S. (2019). Chicken adaptive response to low energy diet: main role of the hypothalamic lipid metabolism revealed by a phenotypic and multi-tissue transcriptomic approach. *BMC Genomics*, 20, 1-16. doi: 10.1186/s12864-019-6384-8
- Johnson, B. J., Le, T. T., Dobbin, C. A., Banovic, T., Howard, C. B., Flores, F. D. M. L., & Suhrbier, A. (2005). Heat shock protein 10 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator production. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4037-4047. doi: 10.1074/jbc.M411569200
- Kaltenboeck, H. K., & Liu, Z. (2013). RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved. *Physiol. Genomics*, 45, 462-476. doi: 10.1152/physiolgenomics.00026.2013
- Kaminen, L. P. (2015). Transcriptomic analysis of hypothalamic responses to heat stress in modern and legacy chicken lines. University of Delaware.
- Kassahn, K. S., Caley, M. J., Ward, A. C., Connolly, A. R., Stone, G., & Crozier, R. H. (2007). Heterologous microarray experiments used to identify the early gene response to heat stress in a coral reef fish. *Molecular Ecology*, 16(8), 1749-1763. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03178.x
- Khansefid, M., Pryce, J. E., Bolormaa, S., Chen, Y., Millen, C. A., Chamberlain, A. J., & Goddard, M. E. (2018). Comparing allele specific expression and local expression quantitative trait loci and the influence of gene expression on complex trait variation in cattle. *BMC Genomics*, 19, 1-18. doi: 10.1186/s12864-018-5181-0
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., & Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4), 1-13. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36
- Kim, J. M., Lim, K. S., Byun, M., Lee, K. T., Yang, Y. R., Park, M., & Park, J. E. (2017). Identification of the acclimation genes in transcriptomic responses to heat stress of White Pekin duck. *Cell Stress and Chaperones*, 22(6), 787-797. doi: 10.1007/s12192-017-0809-6

- Komori, T. (2003). Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 21, 193-197. doi: 10.1007/s00774-002-0408-0
- Kumar, H., Iskender, A. U., Srikanth, K., Kim, H., Zhunushov, A. T., Chooq, H., & Park, J. E. (2019). Transcriptome of chicken liver tissues reveals the candidate genes and pathways responsible for adaptation into two different climatic conditions. *Animals*, 9(12), 1076. doi: 10.3390/ani9121076
- Lagarrigue, S., Martin, L., Hormozdiari, F., Roux, P. F., Pan, C., van Nas, A., & Lusi, A. J. (2013). Analysis of allele-specific expression in mouse liver by RNA-Seq: a comparison with Cis-eQTL identified using genetic linkage. *Genetics*, 195(3), 1157-1166. doi: 10.1534/genetics.113.153882
- Lemos, B., Araripe, L. O., Fontanillas, P., & Hartl, D. L. (2008). Dominance and the evolutionary accumulation of cis-and trans-effects on gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14471-14476. doi: 10.1073/pnas.0805160105
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Lo, H. S., Wang, Z., Hu, Y., Yang, H. H., Gere, S., Buetow, K. H., & Lee, M. P. (2003). Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Research*, 13(8), 1855-1862. doi: 10.1101/gr.1006603
- Lopes Pinto, F. A., Molin, A. M., Gilbert, E. R., Honaker, C. F., Siegel, P. B., Andersson, G., Andersson, L., & De Koning, D. J. (2014). Whole transcriptome sequencing in reciprocal crosses suggests parent-of-origin effects on gene expression in the chicken genome. *Proceedings of the 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*, Vancouver, Canada.
- Ma, Y., Ouyang, J., Wei, J., Maarouf, M., & Chen, J. L. (2016). Involvement of host non-coding RNAs in the pathogenesis of the influenza virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 39. doi: 10.3390/ijms18010039
- Mayba, O., Gilbert, H. N., Liu, J., Haverty, P. M., Jhunjhunwala, S., Jiang, Z., & Zhang, Z. (2014). MBASED: allele-specific expression detection in cancer tissues and cell lines. *Genome Biology*, 15, 1-21. doi: 10.1186/s13059-014-0405-3
- Monson, M. S., Settlege, R. E., Mendoza, K. M., Rawal, S., El-Nezami, H. S., Coulombe, R. A., & Reed, K. M. (2015). Modulation of the spleen transcriptome in domestic turkey (*Meleagris gallopavo*) in response to aflatoxin B 1 and probiotics. *Immunogenetics*, 67, 163-178. doi: 10.1007/s00251-014-0825-y
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Denis-Larose, C., & Massie, B. (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5317-5327. doi: 10.1128/MCB.17.9.5317
- Renaudeau, D., Collin, A., Yahav, S., De Basilio, V., Gourdine, J. L., & Collier, R. J. (2012). Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal*, 6(5), 707-728. doi: 10.1017/S1751731111002448
- Saito, Y., Yukawa, A., Matozaki, M., Mikami, H., Yamagami, T., Yamagishi, N., & Nakayama, Y. (2014). Nmi interacts with Hsp105 β and enhances the Hsp105 β -mediated Hsp70 expression. *Experimental Cell Research*, 327(1), 163-170. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.07.023
- Smith, S., Bernatchez, L., & Beheregaray, L. B. (2013). RNA-Seq analysis reveals extensive transcriptional plasticity to temperature stress in a freshwater fish species. *BMC Genomics*, 14, 1-12. doi: 10.1186/1471-2164-14-375
- Sonna, L. A., Fujita, J., Gaffin, S. L., & Lilly, C. M. (2002). Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *Journal of Applied Physiology*, 92(4), 1725-1742. doi: 10.1152/jappphysiol.01143.2001
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(4), 954-967. doi: 10.1016/j.fsi.2012.09.021
- Te Pas, M. F., Park, W., Srikanth, K., Kemp, S., Kim, J. M., Lim, D., & Park, J. E. (2019). Transcriptomic profiles of muscle, heart, and spleen in reaction to circadian heat stress in Ethiopian highland and lowland male chicken. *Cell Stress and Chaperones*, 24, 175-194. doi: 10.1007/s12192-018-0954-6
- Tomlinson, I. V. M. J., Polson, S. W., Qiu, J., Lake, J. A., Lee, W., & Abasht, B. (2021). Investigation of allele specific expression in various tissues of broiler chickens using the detection tool VADT. *Scientific Reports*, 11(1), 3968. doi: 10.1038/s41598-021-83459-8
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., & Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-Seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3), 562-578. doi: 10.1038/nprot.2012.016
- Tu, W. L., Cheng, C. Y., Wang, S. H., Tang, P. C., Chen, C. F., Chen, H. H., & Huang, S. Y. (2016). Profiling of differential gene expression in the hypothalamus of broiler-type Taiwan country chickens in response to acute heat stress. *Theriogenology*, 85(3), 483-494. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.028

- Wang, Y., Saelao, P., Kern, C., Jin, S., Gallardo, R. A., Kelly, T., Dekkers, J.M., Lamont, S. J., & Zhou, H. (2020). Liver transcriptome responses to heat stress and Newcastle disease virus infection in genetically distinct chicken inbred lines. *Genes*, *11*(9), 1067. doi: 10.3390/genes11091067
- Wayne, M. L., Pan, Y. J., Nuzhdin, S. V., & McIntyre, L. M. (2004). Additivity and trans-acting effects on gene expression in male *Drosophila simulans*. *Genetics*, *168*(3), 1413-1420. doi: 10.1534/genetics.104.030973
- Yang, W., Qi, Y., & Fu, J. (2016). Genetic signals of high-altitude adaptation in amphibians: a comparative transcriptome analysis. *BMC Genetics*, *17*, 1-10. doi: 10.1186/s12863-016-0440-z
- Zhang, J., Kaiser, M. G., Herrmann, M. S., Gallardo, R. A., Bunn, D. A., Kelly, T. R., & Lamont, S. J. (2017). Different genetic resistance resulted in distinct response to Newcastle disease virus. *Iowa State University Animal Industry Report*, *14*(1).
- Zhang, Y., & Cao, X. (2016). Long noncoding RNAs in innate immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, *13*(2), 138-147. doi: 10.1038/cmi.2015.68
- Zhuo, Z., Lamont, S. J., & Abasht, B. (2017). RNA-Seq analyses identify frequent allele specific expression and no evidence of genomic imprinting in specific embryonic tissues of chicken. *Scientific Reports*, *7*(1), 11944. doi: 10.1038/s41598-017-12179-9
- Zumbrun, S. D., Hoffman, B., & Liebermann, D. A. (2009). Distinct mechanisms are utilized to induce stress sensor gadd45b by different stress stimuli. *Journal of Cellular Biochemistry*, *108*(5), 1220-1231. doi: 10.1002/jcb.22354