DOI: 10.22092/VJ.2022.358915.1982
شماره ۱۳۹ تابستان ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مطالعه ترانسکریپتومی lncRNAها در مرغ بومی اصفهان و تجاری راس

• **مهنوش عسکری‌منش**
گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
• **جمال فیاضی(نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
• **محمد تقی بیگی نصیری**
گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
• **آیه سادات صدر**
پژوهشکده آبزی پروری آبهای جنوب کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۰۳-۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۰۶-۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱-۰۵-۲۹ تاریخ انتشار:۱۴۰۲-۰۴-۰۱
Emali: j_fayazi@asnrukh.ac.ir

چکیده

به کمک روش RNA-seq می‌توان اطلاعات کاملی در خصوص شناسایی ژن‌ها بدست آورد که نتایج آن ممکن است در ژنتیک و اصلاح دام و طیور سودمند باشد. تاکنون مطالعات کمی در خصوص استفاده از این روش در ارزیابی ترانسکریپتوم طیور بومی گزارش شده است، با توجه به اهمیت lncRNAها در فرآیندهای بیولوژیکی، در مطالعه حاضر به بررسی lncRNAهای حاصل از ترانسکریپتوم مرغ بومی اصفهان و سویه تجاری راس ۷۰۸ و تفاوت بیان آن‌ها پرداخته شده است. در این مطالعه با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید، ۵۶۸ lncRNA شناسایی شد که تغییرات بیان ۱۱۶ lncRNA معنی‌دار بود (P-value ≤ ۰/۰۵). نتایج نشان داد lncRNA های دارای بیان متفاوت در مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با متیلاسیون لایزین و هیستون، فعال‌سازی لکوسیت‌های میلوئیدی، تنظیم مثبت تولید سایتوکین و تنظیم فعال‌سازی لنفوسیت‌ها نقش دارند. آنالیز عملکرد مولکولی این ژن‌ها نشان داد فعالیت پروتئین تیروزین کیناز غیر غشایی، پروتئین متیل ترانسفراز، متیل ترانسفراز وابسته به S-آدنوزیل متیونین، و انتقال گروه‌های یک کربنی و اتصال گیرنده سیگنال به طور معنی‌داری غنی می‌شوند. بر اساس نتایج حاصل، lncRNAهایی که تفاوت بیان معنی‌داری در دو گروه بومی و تجاری دارند با مسیرهای سیستم ایمنی و متیلاسیون مرتبط می‌باشند که می‌توانند به عنوان بیومارکر استفاده شوند.

کلمات کلیدی: الگوی بیان ژن، lncRNA، نژاد مرغ بومی، سویه راس، RNA-seq

Veterinary Researches & Biological Products No 139 pp: 60-70

Transcriptomic Study of lncRNAs in Native Isfahan and Ross Commercial Chicken

By: Askari Manesh, M., Department of Animal Science, Animal Science and Food Technology Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources, University of Khuzestan, Mollasani, Iran. fayazi, J., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Animal Science and Food Technology Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. Beigi Nassiri, M.T., Department of Animal Science, Animal Science and Food Technology Faculty, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. and Sadr, A.S., South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Ag-ricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.

Received: 2022-06-04 **Accepted: 2022-08-24**
Revised: 2022-08-20 **Published: 2023-07-22**

Emali: j_fayazi@asnrukh.ac.ir

Based on the RNA-seq method, a thorough set of information can be obtained from the identification of geneswhich the results may be beneficial in the genetics and breeding of livestock and poultry. So far, few studies have been reported regarding the use of this method in the evaluation of native poultry transcriptome. Considering the importance of lncRNAs in biological processes, the present study has investigated the lncRNAs from the transcriptome of native Isfahan chicken and the commercial Ross 708 strain as well as differences in their expression. In this study using next generation sequencing, 568 lncRNAs were identified, out of which the expression changes of 116 lncRNAs were meaningful (P-value ≤0.05). The results showed differently-expressed incRNAs which are associated with the biological pathways including histone and lysine methylation, myeloid leukocyte activation, positive regulation of cytokine production ,, , and regulation of lymphocyte activation. The analysis of molecular functions of the genes indicated the activity of non-membrane-spanning tyrosine kinase, protein methyltransferase, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, and transfer of one-carbon groupsacting on a protein, and signaling receptor binding are enhanced meaningfully. Based on the results, lncRNAs that vary in expression between native and commercial groups are associated with immune and methylation pathways, and can be used as biomarkers.

Keywords: Gene expression pattern, lncRNA, Native chicken breed, Ross strain, RNA-seq

مقدمه

همزمان با افزایش جمعیت جهان و نیاز روز افزون به غذا، به ویژه مواد پروتئینی، تأمین نیازهای غذایی انسان یکی از مسائل جوامع بشری است. گوشت مرغ به دلیل سطح پروتئین بالا، کلسترول پائین و کالری کم، منبع پروتئینی با کیفیت بالا برای انسان است. صنعت طیور نقش بسیار مهمی در تبدیل غلات به گوشت و تخم‌مرغ برای انسان دارد(۲). در پرورش طیور پیشگیری از وقوع بیماری‌ها از طریق اجرای صحیح برنامه‌های زیستی است و اگر احتمالاً اشکالی در اجرای برنامه‌های امنیت زیستی پیش آید و بیماری به وقوع بپیوندد، باید مطمئن بود که طیور از نظر عملکرد سیستم ایمنی در حد مطلوبی قرار دارند و قادر به دفاع از خود می‌باشند، سیستم ایمنی طیور به دو دسته مکانیزم‌های اختصاصی و غیراختصاصی تقسیم می‌شود. مکانیزم‌های غیراختصاصی شامل راه‌های ذاتی است که سبب مقاومت طیور به بیماری می‌شود. این سیستم‌ها در هنگام طراحی برنامه سلامت طیور در نظر گرفته نمی‌شود. بسیاری از برنامه‌ها بر پایه واکسیناسیون و آنتی‌بیوتیک استوار است. به همین دلیل اهمیت مکانیزم‌های غیراختصاصی، درک کامل و صحیح از این مکانیزم‌ها لازم و ضروری است (۱۵).

خصوصیات زیستی نه تنها در سطح DNA بلکه در سطح mRNA قبل و پس از رونویسی به دقت کنترل و تنظیم می‌گردد، به طوری که بخش اعظم ژنوم (بیش از ۹۰٪) می‌تواند مورد رونویسی قرار گیرد. با این حال فقط بخش کوچکی از آن (۱٪ تا ۲٪) RNAهای رمزکننده پروتئین بوده و باقیمانده، شامل ده‌ها هزار مکان بین‌ژنی، مرتبط با RNA های غیررمزکننده پروتئینی می‌باشند. RNAهای طولانی غیرکدکننده (lncRNA) نقش مهمی در تنظیم بیان ژن در سطح رونویسی دارند(۴). lncRNAها رونوشت‌هایی غیررمزکننده و بدون چهارچوب خوانش باز (Open reading frame) دارای طولی بین ۲۰۰ تا افزون بر ۱۰۰ هزار نوکلئوتید بوده که اکثراً توسط آنزیم RNA پلیمراز II رونویسی شده و همچنین بیشتر آن‌ها دارای دم پلی A و کلاهک (Cap) در سمت ۵ خود می‌باشند. معمولاً سطح بیان lncRNA کمتر از سطح بیان mRNAها بوده و برخی از آن‌ها دارای بیان اختصاصی در یک بافت یا سلول می‌باشند(۹). RNA-seq تکنیکی است که برای توالی‌یابی کل ترانسکریپتوم استفاده می‌شود که همراه با روش‌های محاسباتی، امکان

بازسازی ترانسکریپتوم و کمی‌سازی بیان ژن را فراهم می‌کند، این روش با ارائه یک پوشش جامع‌تر از کل ترانسکریپتوم، بر کاستی‌های فناوری ریزآرایه‌ها غلبه می‌کند و به توالی‌های شناخته شده محدود نمی‌شود بنابراین RNA-seq یک فرصت قابل توجه برای حاشیه‌نویسی و مشخص کردن RNA های طولانی غیر کد کننده (lncRNA) ارائه می‌دهد (۱۲). کشف lncRNAها فصل جدیدی را برای درک انسان از RNA غیر کدکننده باز می‌کند و راه جدیدی برای تنظیم بیان ژن در سلول‌های جانوری ارائه می‌دهد و همچنین تنظیم سریع‌تر و موثرتر مولکول‌های mRNA هدف را در سطح RNA تکمیل می‌کند. به هر حال، شناسایی و حاشیه نویسی lncRNA عملکرد جدیدی را برای ما به منظور مطالعه مکانیسم مولکولی و فرآیندهای بیولوژیکی در طیور ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

پرورش طیور و جمع‌آوری نمونه

این مطالعه در سالن مرغداری مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد دزفول انجام شد. برای این منظور از جوجه راس ۷۰۸ به عنوان سویه تجاری و جوجه اصفهانی بعنوان توده بومی استفاده شد. جوجه‌ها تا پایان ۲۸ روزگی با شرایط یکسان و مشابه از نظر مدیریت پرورش (دما، رطوبت و نور) نگه‌داری شدند. دما در شروع دوره c ۳۲ و پس از آن روزانه c ۰/۵ کاهش یافت تا در ۲۶ روزگی به دمای c ۲۴ رسید. دسترسی به آب آشامیدنی و خوراک آزاد بود. در پایان ۴۸ روزگی از هر یک از دو گروه شش قطعه جوجه مرغ به طور تصادفی برای RNA-seq انتخاب و توزین شد.

استخراج و توالی‌یابی RNA

۲ ml نمونه خون از ورید بال براکیال/ اولنار جمع‌آوری گردید. RNA کل با استفاده از محلول ترایزول شرکت سیگما طبق دستورکار شرکت استخراج شد. استخراج RNA با مخلوط کردن مقادیر مساوی سه نمونه RNA در هر گروه برای ایجاد چهار نمونه RNA ادغام شده(دو نمونه در هر گروه) تهیه شد. نمونه‌ها برای توالی‌یابی به شرکت BGI چین ارسال شد و توالی‌یابی با استفاده از چارچوب فنی Illumina Hiseq ۲۰۰۰ قطعات ۱۵۰ جفت بازی تولید گردید.

آنالیز داده

نمایش شماتیک از مراحل اجرای پژوهش در شکل یک نمایش داده شده است. بعد از توالی‌یابی کیفیت توالی خوانش‌های خام با استفاده از نرم‌افزار FastQC نسخه (۰/۱۱/۹) به آدرس (http://www. bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) بررسی شد (۳) و خوانش‌های با کیفیت پایین و خوانش‌های حاوی نوکلئوتید ناشناخته "N" و توالی‌های تکراری شناسایی گردید. ویرایش داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic نسخه (۰/۴۵) انجام گردید (۵). خوانش‌های پیرایش شده برای تایید کیفیت مجدد با نرم‌افزار FastQC بررسی شدند. به منظور مکان‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع و تشکیل ترانسکریپتوم از آن‌ها، به اطلاعات ژنوم مرجع (ژنوم مرجع ویرایش ششم و فایل حاشیه‌نویسی، ویرایش ۱۰۴ به آدرس برخط (http://asia. ensembl.org/info/data/ftp/index.html) و نیز حاشیه‌نویسی‌های آن نیاز است. هم‌ردیفی خوانش‌های کوتاه بر روی ژنوم مرجع با استفاده از نرم‌افزار HISAT۲ نسخه (۰/۲/۲) انجام شد (۱۳). خوانش‌های هم‌تراز شده برای هر نمونه به طور جداگانه و با استفاده از نرم‌افزار StringTie (نسخه ۲/۱/۶) سرهم‌بندی شدند (۲۲). بعد از اتمام هم‌ردیفی هر کدام از نمونه‌ها، ترانسکریپتوم‌های تشکیل شده از هر نمونه با استفاده از StringTie merge ادغام شد و یك فایل ترنسکریپتوم جدید مرجع ادغام شده حاصل گردید.

شناسایی lncRNAها

برای شناسایی ماهیت رونوشت‌ها از نرم‌افزار Cuffcompare نسخه (۲/۲/۱) و فایل رفرنس‌دهی ژنوم مرغ (فایل GTF) استفاده شد (۲۳). به این ترتیب رونوشت‌های با حروف i به عنوان اینترونی، u به عنوان بین ژنی و x به عنوان رفرنس‌دهی شده (ژن‌های شناخته نشده) گروه‌بندی شدند، در ادامه رونوشت‌های تک اگزونی که طولی بیش از ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید داشتند حذف شدند. به منظور حذف رونوشت‌ها با توان رمزکنندگی پروتئین، از سه ابزار آنلاین CPC نسخه (۲) (۱۴)، CNIT (http://www.cnit.noncode.org/CNIT) (۷) و PLEK نسخه (۱/۲) (۱۶) استفاده گردید. رونوشت‌هایی که توسط ابزار فوق دارای پتانسیل رمزکنندگی پروتئینی تشخیص داده شدند از مجموعه‌ی داده‌ها حذف شد. رونوشت‌های دارای حداقل یک مورد معنی‌دار درسطح ۰/۰۰۰۱ مقایسه شده با پایگاه‌های داده Uniprot به آدرس (http://

جدول ۱- نتایج حاصل از هم‌ترازی رونوشت‌ها با ژنوم مرجع مرغ و درصد نوکلئوتید سیتوزین و گوانین در توالی‌های شناسایی شده.

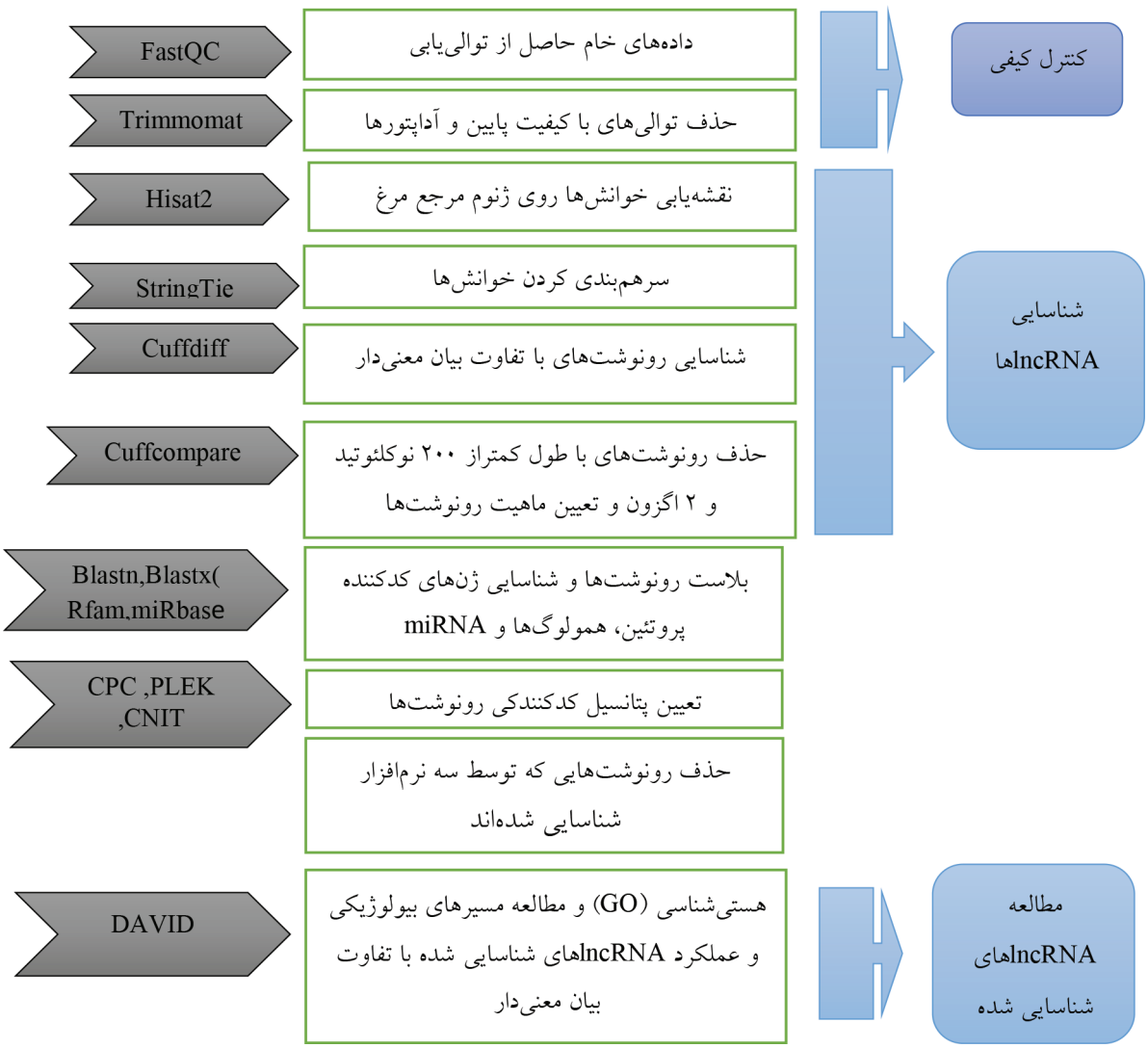
	تکرار	مجموع خوانش ها	خوانش های پیرایش شده	GC (٪)	درصد هم‌ترازی با ژنوم مرجع نسخه شش
بومی	نمونه ۱	۱۸۷۶۸۳۰۷	۱۸۵۰۹۴۲۰	۴۷	٪۹۳/۲۵
	نمونه ۲	۱۷۹۹۵۶۳۲	۱۷۶۵۰۵۵۸	۴۸	٪۹۳/۱۱
تجاری	نمونه ۱	۱۵۹۲۳۸۳۸	۱۵۶۷۷۳۵۷	۴۷	٪۹۲/۴۹
	نمونه ۲	۱۵۶۲۱۱۶۴	۱۵۳۱۳۶۴۹	۴۸	٪۹۲/۴۱

www.uniprot.org)، miRbase به آدرس (https://mirbase.org/ftp.shtml) و Rfam به آدرس (http://rfam.xfam.org) حذف شدند. پس از پایان عملیات حذف رونوشت‌های کدکننده، رونوشت‌های باقیمانده به عنوان lncRNAهای غیرکننده بلند در نظر گرفته شدند.

در نهایت با استفاده از نرم‌افزار FEELnc (۰/۲) (۲۴) مجموعه رونوشت‌های باقیمانده به عنوان lncRNA دسته‌بندی شدند. با توجه به این که تا به حال تعداد زیادی از lncRNAها در ژنوم مرغ در بانک اطلاعاتی NONCODE گزارش شده ولی در فایل رفرنس‌دهی ژنوم وارد نشده است. lncRNAهای مرغ خانگی از پایگاه داده NONCODE به آدرس http://www.noncode.org دریافت شد، سپس از BLASTn برای جستجوی هومولوژی lncRNAهای کاندید با lncRNAهای گزارش شده در مرغ اهلی استفاده شد. رونوشت‌های در سطح معنی‌دار ۰/۰۰۰۵ با توالی‌های مورد بررسی به عنوان lncRNA شناخته شده و باقیمانده رونوشت‌ها بعنوان lncRNA های جدید گزارش شدند. در مرحله بعدی رونوشت‌هایی که به عنوان lncRNA شناسایی شدند از لحاظ معنی‌داری بیان مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین بررسی عملکردی ژن‌های کاندیدای هدف از طریق آنالیز عملکردی و آنالیز مسیرهای زیستی ژن‌ها (KEGG) با استفاده از سایت (http://david.ncifcrf.gov/ (DAVID) صورت گرفت (۶).

نتایج

به منظور شناسایی ترانسکریپت و LncRNAهای با تفاوت بیان معنی‌دار، از چهار کتابخانه‌ی cDNA در دو سطح متفاوت طیور توده بومی و طیور



شکل ۱- نمایش شماتیک از مراحل اجرای پژوهش.

سویه تجاری راس ۷۰۸ استفاده شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی بیش از ۶۸/۳ میلیون خوانش جفتی ۱۵۰ نوکلئوتیدی را نشان داد. بررسی کیفیت خوانش‌ها نشان داد که تمامی آن‌ها دارای میانگین کیفی بالاتر از ۳۸ و GC٪ (درصد نوکلئوتید سیتوزین و گوانین در توالی های شناسایی شده) در مرغان بومی و تجاری ۴۷/۵ ٪ بدست آمد. این دو فاکتور نشان‌دهنده کیفیت بالای خوانش‌ها و مناسب بودن آن‌ها برای آنالیزهای بعدی است. بیشتر از ۹۲ ٪ خوانش‌های پردازش شده با رفرنس ژنوم طیور همردیف شدند (جدول ۱).

در مرحله بعد با استفاده از نرم‌افزار Stringtie و cuffcompare و فایل حاشیه‌نویسی مرغ اهلی، تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq نشان داد در مجموع ۲۰۰۳۴ ژن بیان شده است. به منظور شناسایی lncRNAهای مرغ، رونوشت‌های با پتانسیل بالای کدکنندگی با در نظر گرفتن معیارهای مختلف حذف شده و در نهایت بعد از اعمال فیلترهای بیان شده در بخش مواد و روش‌ها و آنالیز توالی‌ها ۵۶۸ ژن به عنوان LncRNA شناسایی شد. از این تعداد، ۴۶۷ رونوشت در مرغ تجاری و ۵۳۵ رونوشت در مرغ بومی بیان شده بودند. همچنین نه رونوشت فقط در مرغ بومی و ۳۳ رونوشت فقط در مرغ تجاری بیان شده بودند. در مقایسه lncRNAهای شناسایی شده (۵۶۸) با lncRNAهای گزارش شده در فایل رفرنس‌دهی ژنوم مرغ، تعداد ۵۱ lncRNA مشابه یافت شد که lncRNA Annotated نامگذاری شدند. lncRNAهای باقیمانده با lncRNAهای موجود در بانک اطلاعاتی NONCODE بلست شدند که منجر به شناسایی ۱۰۲ رونوشت گردید و به عنوان شناخته شده طبقه‌بندی شدند و ۴۱۵ رونوشت باقیمانده به عنوان جدید (New) طبقه بندی شدند به دلیل اینکه با هیچ‌کدام از فایل‌های مرجع پایگاه‌های داده شناسایی نشدند. و در نهایت lncRNA شناسایی شده بر اساس ژن‌های همجوار و فایل حاشیه‌نویسی مرغ در چهار گروه بین ژنی شناخته شده (known lincRNA) و اینترونی شناخته شده (intronic lncRNA) و بین ژنی جدید (novel lincRNA) و اینترونی جدید (intronic lncRNA) قرار گرفتند (جدول ۲).

همچنین مطالعه‌ی lncRNAهای شناسایی شده بر اساس طول آن‌ها نشان داد که بیشتر lncRNAها طولی بین ۲۰۰-۲۰۰۰۰ نوکلئوتید دارند(شکل ۲) و میانگین طول آن‌ها در نمونه های توالی یابی شده ۱۳۱۹۶,۵ نوکلئوتید می‌باشد. طول lncRNA در انسان ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید و در موش ۵۵۰ نوکلئوتید می‌باشد(۸). نتایج مطالعه نشان داد که طول lncRNAهای شناسایی شده از طول lncRNA در انسان و موش بزرگتر است. وجود مقادیر بالاتر میزان سیتوزین-گوانین (GC) در نواحی اگزونی نسبت به اینترونی، مشخصه توالی‌های رمزکننده بوده و به معنای رونویسی، اسپلایسینگ و ترجمه کارآمدتر این نواحی نسبت به اینترونی مشاهده شده است(۸) نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین میزان سیتوزین-گوانین(GC) نواحی بین ژنی بیشتر از میانگین میزان سیتوزین-گوانین (GC) نواحی اینترونی می‌باشد.

علاوه بر این، توزیع و مکان‌های کروموزومی آن‌ها نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که lncRNAها در سراسر کروموزوم‌های مرغ توزیع شده‌اند (کروموزوم‌های یک تا ۳۳ و z)، کروموزوم‌های یک تا پنج و ۱۸ حاوی بیشترین تعداد lncRNA هستند. رونویسی گسترده در تمام کروموزوم‌ها با برخی تمایلات در فعالیت رونویسی بر روی کروموزوم‌های خاص نشان می‌دهد که وجود lncRNA ها به دلیل خطا در فرآیند رونویسی نیستند (شکل ۳).

در این مطالعه میزان بیان lncRNAهای شناسایی شده در دو گروه

جدول ۲- خصوصیات رونوشت‌ها و ژن‌های lncRNAها در دو گروه مرغ بومی و سویه تجاری.

خصوصیات	بین ژنی شناخته‌شده	اینترونی شناخته‌شده	بین ژنی جدید	اینترونی جدید
تعداد ژن	۱۱۰	۴۳	۲۷۳	۱۴۲
میانگین طول	۶۹۰۳	۸۹۰۰	۱۳۸۴۶	۱۳۸۸۷
میانگین میزان گوانین-سیتوزین	۰/۴۴۷	۰/۴۴۵	۰/۴۸۵۵	۰/۴۸۶

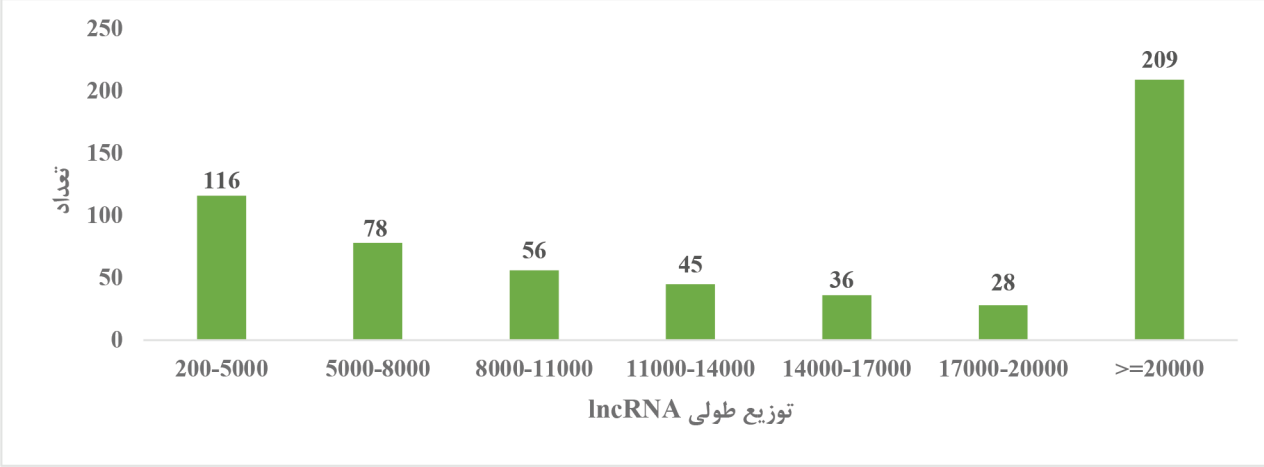
جدول۳- lncRNAهای با بیشترین افزایش و کاهش بیان در مرغ بومی و تجاری بر اساس (fold change log۲).

نام ژن/ رونوشت	طول	شماره کروموزوم	$-\log^2FC$	ژن پایین‌دست	فاصله	ژن بالادست	فاصله
MSTRG.7468	۱۲۹۸۲	۳	۳/۲۱	CLVS۲	۶۰۳۸۵	FABP۷	۲۴۸۴
MSTRG.166	۲۸۶۲۵	۱	۳/۰۲	LOC۴۱۷۷۴۱	۱۸۲۴۰	MAPK۱۱	۱۰۱۴۳
MSTRG.1088	۱۹۲۹	۱	۲/۲۰	SLC۹A۷	۱۳۸۹۶	CHST۷	۲۰۱۵
MSTRG.5014	۱۳۰۳۴	۲	-۲/۳۷	ENSGALG۰۰۰۰۰۰۲۱۹۳۸	۶۱۳۳	RIDA	۳۱۰۱
MSTRG.6350	۳۹۹۳۴	۲۶	-۲/۰۹	GOLT۱A	۹۴۰	ENSGALG۰۰۰۰۰۰۲۷۶۷۳	۳۹۷۴

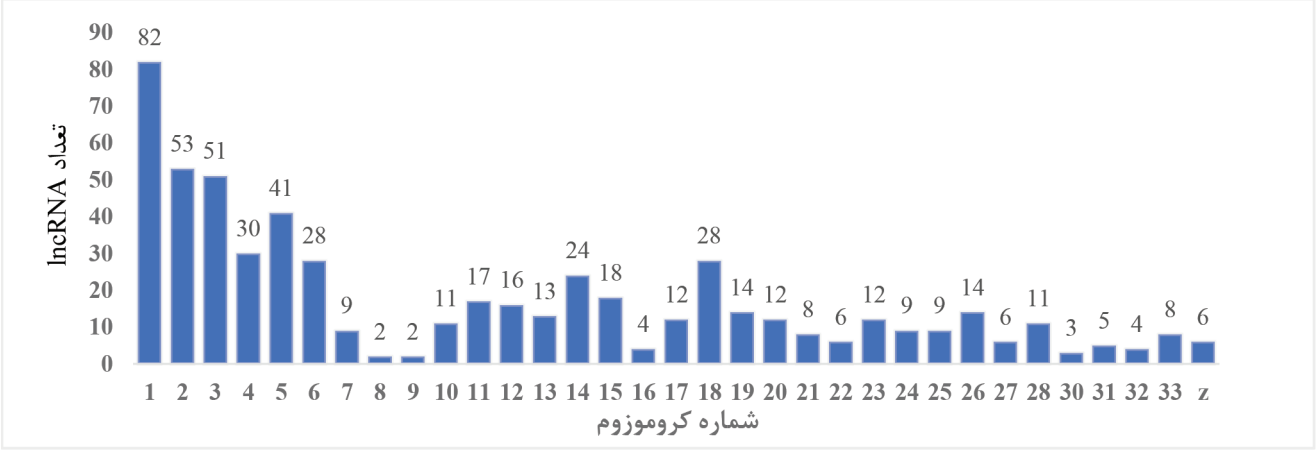
مرغ بومی و تجاری مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات بیان بین دو گروه مشخص شد (شکل ۴ و ۵). در نتیجه از مجموع lncRNAهای شناسایی شده ۱۱۶، lncRNA بین دو گروه طیور بومی و تجاری دارای تفاوت بیان معنی‌دار بودند که از این تعداد lncRNA با تفاوت بیان معنی‌دار ۸۴، lncRNA بین ژنی و ۳۲، lncRNA اینترونی می‌باشند و همچنین نتایج نشان داد که ۵۷، LncRNA افزایش بیان (Up-regulated) و ۲۱، LncRNA کاهش بیان (Down-regulated) داشتند و دارای $\log^2$ fold change بالای یک بودند. lncRNAهای MSTRG.7468 و MSTRG.166 و MSTRG.1088 در مرغ تجاری نسبت به بومی بیشترین افزایش بیان و MSTRG.5014 و MSTRG.6350 در مرغ تجاری نسبت به بومی بیشترین کاهش بیان را داشته‌اند (جدول ۳).

نمودار گرمایی نیز به صورت مقایسه‌ای عمل می‌کند و تفاوت بیان را با تغییر رنگ نشان می‌دهد. تغییر در شدت رنگ بین یک ژن در دو نژاد نشان‌دهنده تفاوت بیان آن lncRNAها می‌باشد (شکل ۶).

برای روشن شدن بیشتر نقش‌های عملکردی ژن‌های مرتبط با lncRNA هایی که تفاوت بیان داشتند از دیتا بیس DAVID برای بررسی هستی‌شناسی و آنالیز غنی‌سازی مسیرها استفاده شد. در آنالیز هستی‌شناسی ژن(Gene ontology)، مسیرهای بیولوژیکی (Biological process) مربوط به عملکردهای متیلاسیون لایزین هیستون (Histone lysine methylation)، فعال‌سازی لکوسیت‌های میلوئیدی (Myeloid leukocyte activation)، تنظیم مثبت تولید سایتوکین (Positive regulation of cytokine production)، تنظیم فعال‌سازی لنفوسیت‌ها (Regulation of lymphocyte activation)، فعال‌سازی سلول‌های میلوئیدی دخیل در پاسخ ایمنی(Myeloid cell activation involved in immune



شکل ۲- تعداد LncRNAهای شناسایی شده در مرغ و سویه تجاری راس بر اساس توزیع طول LncRNAها.



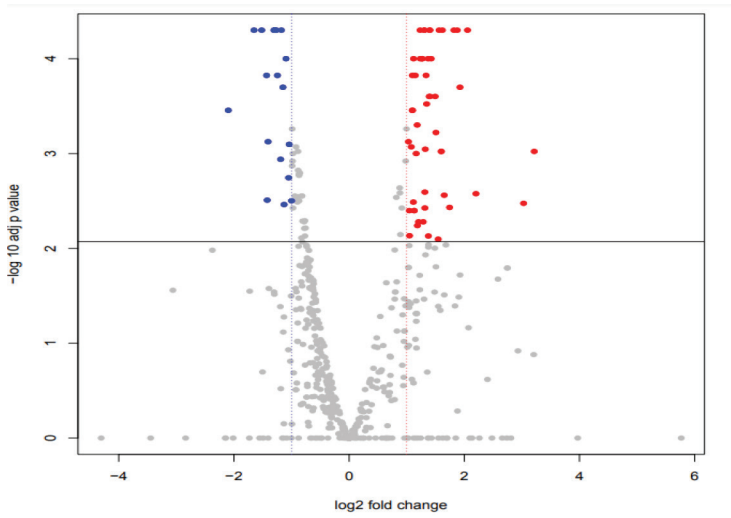
شکل ۳- توزیع کروموزومی lncRNAهای شناسایی در مرغ بومی و تجاری.

response) با (P-value≤۰/۰۵) معنی‌دار بودند. در بخش عملکرد مولکولی فعالیت پروتئین تیروزین کیناز غیرغشایی (Non-membrane spanning tyrosine kinase activity)، فعالیت پروتئین متیل ترانسفراز (Protein methyltransferase activity) و فعالیت متیل‌ترانسفراز وابسته به S-آدنوزیل متیونین (S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity) معنی‌دار بودند (P-value≤۰/۰۵) (شکل۷).

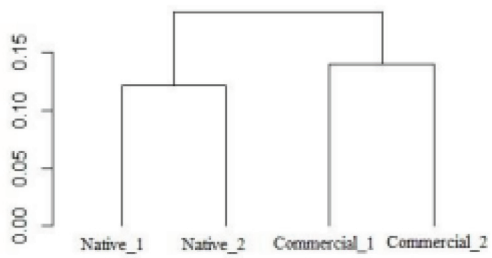
بحث

داده‌های ترانسکریپتومی به طور قابل ملاحظه‌ای بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها را تسهیل نموده است و اطلاعات کاملی از شناسایی گونه‌ها و ارتباط بین آن‌ها را در اختیار قرار می‌دهد. اطلاعات حاصل از تراسکریپتوم می‌تواند درک زیستی از تمایز فنوتیپی شامل ظاهر، رفتار و صفات تولیدی را فراهم نماید. مطالعه lncRNAها شکاف موجود در مکانیسم مولکولی فعالیت‌های زیستی در موجودات را پر می‌کند (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، روش توالی یابی با توان بالا(RNA-seq) برای ارزیابی ترانسکریپتوم دو گروه مرغ راس به عنوان سویه تجاری و اصفهانی به عنوان توده بومی با تفاوت در صفات مشابه به منظور شناسایی و آنالیز بیان lncRNAهای بین دو گروه استفاده شد. نتایج تجزیه و تحلیل نشان داد از ۵۶۸ ژن که به عنوان lncRNA شناسایی شد، ۱۵۳lncRNA به عنوان شناخته شده(Known) و ۴۱۵ lncRNA به عنوان جدید (novel) بودند. از این تعداد lncRNAهای شناسایی شده ۱۱۶ lncRNA دارای تفاوت بیان معنی‌دار می‌باشند که ۵۷lncRNA افزایش بیان و ۲۱lncRNA کاهش بیان نشان دادند. کریمی و همکاران (۲۰۲۲) در تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم مرتبط با نقش بالقوه lncRNA ها در بازده خوراک مرغ بین دو گروه توده مرغ بومی اصفهان و سویه تجاری راس، در مجموع ۲۲۹۰ lncRNA شناسایی کردند که از این تعداد ۱۱۱۰ حاشیه نویسی شده (Annotated) و ۵۹۳ شناخته شده (Known) و ۵۸۷ جدید (novel) بودند و ۵۳ lncRNA بین مرغ بومی و تجاری دارای تفاوت بیان معنی‌دار بودند(۱۱). آلبوشوکه

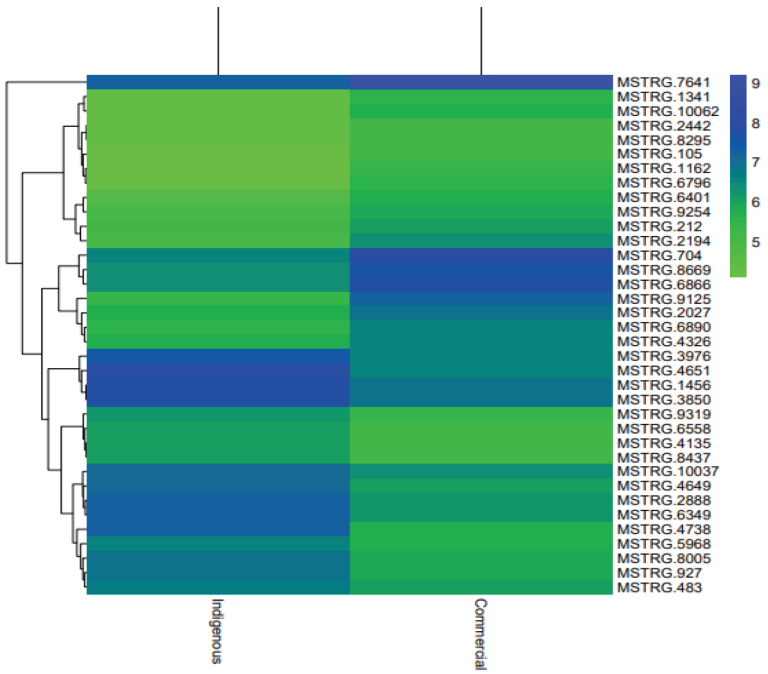


شکل ۴- میزان تغییرات بیان lncRNA بر اساس(fold change log۲) بین توده مرغ بومی اصفهان و سویه تجاری راس. نقاط آبی و قرمز نشاندهنده ژن‌های متفاوت بیان شده بین دو گروه است.



شکل۵- دندودیاگرام بیان lncRNA در دو نژاد بومی و تجاری.

و همکاران (۲۰۱۹) به منظور شناسایی lncRNAهای مرتبط با رشد عضله سینه در مرغ بومی اصفهان و سویه تجاری راس، در مجموع ۱۰۹۷ lncRNA شناسایی کردند که ۱۹ ژن دارای تفاوت بیان معنی‌دار بین دو گروه بودند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، lncRNAهای شناسایی شده احتمالاً پتانسیل تنظیم ژن‌های درگیر در رشد عضله اسکلتی را داشته و می‌توانند بخشی از تفاوت در سرعت رشد مشاهده شده بین دو گروه مرغ مورد بررسی را توجیه نمایند(۱) صدر و همکاران (۲۰۱۷) در سطح بررسی ژن‌ها بین دو گروه مرغ بومی و سویه تجاری راس با تأکید بر سیستم ایمنی گزارش دادند که ۳۱۰ ایزوفرم بین دو گروه دارای تفاوت بیان معنی‌دار هستند که ۲۵۱ ایزوفرم دارای افزایش بیان و ۵۱ ایزوفرم دارای کاهش بیان بودند و در بررسی هستی‌شناسی گزارش دادند که در میان ایزوفرم‌های با افزایش بیان برخی مسیرها مرتبط با سیستم ایمنی ذاتی مانند سلول‌های کشنده طبیعی (NK) می‌باشند(۲۱). ویژگی‌های lncRNA ها، مانند تنوع، ساختار، حفاظت شدگی و شکل‌پذیری، نقش عملکردی پیچیده آن‌ها را در فرآیند بیولوژیکی تعیین می‌کند. تنوع، انعطاف‌پذیری و تنوع ویژگی‌های ساختاری lncRNAها در دینامیک ژنومی باعث می‌شود که آنها جزء مهمی در تنظیم اپی ژنتیکی باشند(۹). متیلاسیون DNA به عنوان یک عامل مهم تغییرات اپی ژنتیکی می‌تواند بیان ژن‌ها را در سطح رونویسی تغییر دهد. متیلاسیون DNA پدیده‌ای اپی‌ژنتیک است که با اضافه شدن گروه متیل (CH^3) به سیتوزین ایجاد می‌شود. متیلاسیون DNA با به کارگیری پروتئین‌های درگیر در بیان ژن یا ممانعت از اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری به DNA سبب تنظیم بیان ژن می‌شوند(۱۸). در مطالعه‌ی حاضر، نتایج تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی lncRNA (Gene Ontology)هایی که دارای تفاوت بیان معنی‌دار بودند، نشان داد مسیرهای عملکرد بیولوژیکی مرتبط با مسیرهای متیلاسیون هیستون بین دو گروه مورد مطالعه دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند و بیان lncRNAهای مرتبط با این مسیرها در مرغ بومی نسبت به تجاری دارای افزایش بیان بوده است که می‌تواند بر میزان بیان ژن‌ها در مرغ بومی نسبت به تجاری از طریق تغییرات اپی‌ژنتیک تأثیر بگذارد. نتایج مطالعه حسانی و همکاران(۲۰۱۷) بر روی بیان ژن‌های آپوپتوزیس بین دو گروه مرغ بومی اصفهان و تجاری راس نشان داد برخی ژن‌ها مربوط به آپوپتوزیس در مرغ بومی دارای بیان کمتری نسبت به مرغ تجاری می‌باشند. با توجه به اینکه شرایط محیط رشد مرغان بومی و تجاری یکسان بوده اما اثرات متفاوت روی بیان ژن‌های دو نژاد داشته است و از آنجایی که در نژادهای بومی نسبت به شرایط محیطی مقاومت بیشتری وجود دارد و ژن‌های آپوپتوزیز نیز بخشی از سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند، می‌توان بیان کمتر ژن‌های مرغ بومی را به تغییرات اپی‌ژنتیک نسبت داد (۱۰). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که متیلاسیون DNA به عنوان پدیده‌ای اپی‌ژنتیک، می‌تواند بر بیان ژن‌ها در سطح رونویسی تأثیرگذار باشد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مسیرهای مرتبط با سیستم ایمنی ذاتی، GO:0001819 (Positive regulation of cytokine) GO:0002274 (myeloid leukocyte activation و GO:0051249 (regulation of lymphocyte activation معنی‌دار می‌باشند. lncRNA های مرتبط با این مسیرها در مرغ بومی نسبت به تجاری دارای افزایش بیان می‌باشند که می‌تواند یکی از دلایل بالاتر بودن مقاومت مرغ بومی به بیماری‌ها نسبت به مرغ تجاری باشد. تاکنون شناسایی و

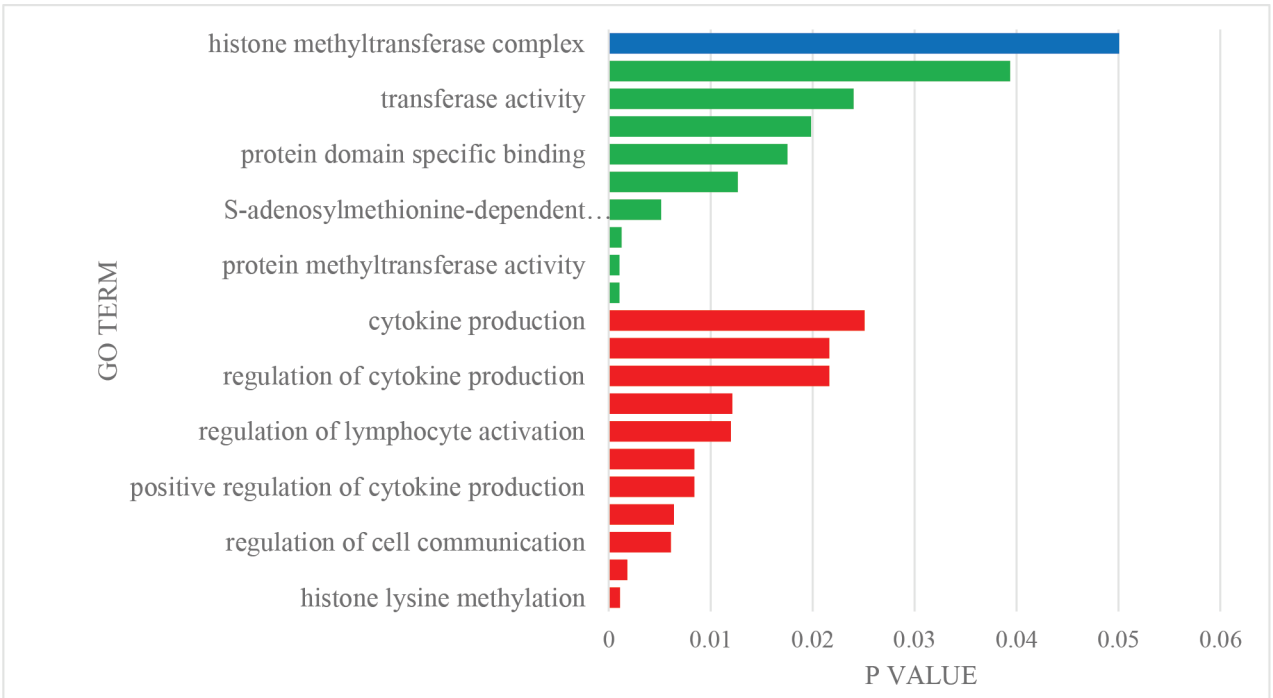


شکل ۶- نمودار گرمایی و میزان بیان lncRNAهای شناسایی شده در نمونه های دو گروه مرغ بومی و تجاری.

آنالیز بیان lncRNAهای درگیر در سیستم ایمنی ذاتی از طریق مقایسه بین گروه‌های مختلف مرغ گزارش نشده است. این اولین مطالعه برای شناسایی lncRNAهای با تفاوت بیان بین دو گروه مرغ است هر چند مطالعات مختلفی روی مرغ انجام شده که بیشتر آنها روی بیماری‌ها تأکید دارند. در مطالعه ای با استفاده از تکنیکRNA-seq توالی رونوشت سلول‌های HD۱۱ و CEF آلوده به آدنوویروس (ALV-J) مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۴۸۰۴ lncRNA جدید(novel) شامل lncRNA های بین ژنی(intergenic)، اینترونی (intron) و آنتی سنس(antisense) شناسایی شد. نتایج نشان داد که lncRNAهای (NONGGAT۰۰۱۹۷۵,۲)، (NONGGAT۰۰۵۸۳۲,۲) و (NONGGAT۰۰۹۷۹۲,۲) با پاسخ ایمنی مرتبط می‌باشند(۱۹). یو و همکاران(۲۰۱۹) در بررسی lncRNA و mRNA طحال مبتلا در بیماری مارک و شناسایی ژن‌های مقاوم به بیماری مارک گزارش دادند ۱۳۱۵ lncRNA جدید و ۱۱۶۶ lncRNA شناخته شده در بافت طحال شناسایی شد. ۵ lncRNA شامل (*MSTRG.360.1,MST RG.6725.1,MSTRG.6754.1,MSTRG.15539.1* و *MSTRG.7747.5*) همبستگی زیادی با ژن‌های کاندید مقاوم به بیماری مارک مانند IGF-CD۷۲,SWAP۷۰,HDAC۹,I,CTLA۴ و CD۸B داشتند. و نتایج، نگرشی درباره دو عامل اپی‌ژنتیک و رونویسی بر روی بیماری مارک و مکانیسم‌های بیماری‌زایی را ارائه داد (۲۵). لی و همکاران(۲۰۲۱) در مطالعه‌ای به منظور شناسایی و آنالیز lncRNA ها و mRNAها در بیماری برونشیت کروناویروس گزارش دادند در مقایسه با سلول‌های غیر عفونی ۱۵۳mRNA با تفاوت بیان معنی‌دار (۱۰۶ mRNA دارای افزایش بیان، ۴۷mRNA دارای کاهش بیان) و ۱۸۱ lncRNA دارای تفاوت بیان(۵۹ lncRNA دارای افزایش بیان و ۱۲۲ lncRNA دارای کاهش بیان) در سلول‌های HD۱۱ آلوده به عفونت برونشیت کروناوبروس شناسایی شد و نتایج تجزیه و تحلیل هستی شناسی نشان داد که mRNA و lncRNA های شناسایی شده بیشتر در مسیرهای ایمنی ذاتی سلولی، متابولیسم آمینواسیدها و متابولیسم نوکیئک اسیدها درگیر می‌باشند. علاوه بر این ۲۶۴۰ lncRNA شناخته نشده(novel) شناسایی گردید(۱۷).

نتیجه‌گیری کلی

با استفاده از روش RNA-seq در بررسی دام‌های بومی می‌توان اطلاع بهتر و کامل‌تری در خصوص شناسایی ژن‌ها بدست آورد که نتایج آن ممکن است در ژنتیک و اصلاح دام و طیور سودمند واقع شود. تاکنون مطالعات محدودی در خصوص استفاده از این روش در بررسی طیور بومی گزارش شده است با توجه به اهمیت lncRNAها در فرآیندهای بیولوژیکی که در بسیاری از مطالعات مشخص شده است و همچنین نقش lncRNAها در فرآیندهای مرتبط با سیستم ایمنی مرغ که در مطالعه حاضر پی برده شد می‌توان نتیجه گرفت از آنجا که برخی ژن‌های مرتبط با lncRNA های شناسایی شده در مسیرهای پاسخ ایمنی ذاتی نقش دارند، مانند مقابله با باکتری‌ها و ویروس‌ها پس می‌توان در برنامه‌های اصلاح نژادی از این ژن‌های مرتبط با lncRNAهای خاص درگیر استفاده کرده و در



شکل ۷- طبقه‌بندی سلولی، مولکولی و بیولوژیک مرتبط با ژن‌های هدف lncRNAهای با بیان متفاوت در مرغ بومی و تجاری.

جهت خاص مورد نظر میزان بیان آن‌ها را با روش‌های مناسب سلولی و مولکولی و یا با استفاده از روش‌های اپی‌ژنتیک تنظیم نمود.

تشکرو قدردانی

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان بابت حمایت‌های مادی و معنوی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

1-Albooshoke, S. N. and M. R. Bakhtiarizadeh.2019. Identification of LncRNAs related to growth of chicken's breast muscle using RNA-seq. *Animal Production*. 21: 165-180. (In Farsi).

2- Alsafar, A. and F. Khalil. 2015. Why poultry welfare in Kuwait is an obstacle to trade? In: The 5th International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries. *Pattaya, Thailand*. pp. 711- 714.

3- Andrew, S. 2010. FASTQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Bobraham Bioinformatics. https://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/. Accessed 7 July 2011.

4- Au, P. C. K., Zhu, Q.H., E.S. Dennis and M. B. Wang. 2011. Long non-coding RNA-mediated mechanisms independent of the RNAi pathway in animals and plants. *RNA Biology*. 8(3):404-414.

5- Bolger, A. M., M. Lohse and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*. 30:2114-2120.

6- Dennis, G. B., Sherman, T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., H. C. Lane and R. A. Lempicki. 2003. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome biology* .4:617-628.

7- Guo, J. C. and Y. Zhao.2019. CNIT: a fast and accurate web tool for identifying protein-coding and long non-coding transcripts based on intrinsic sequence composition. *Nucleic acids research*. 47:516-522.

8- Haerty, W. and C.P. Ponting. 2015. Unexpected selection to retain high GC content and splicing enhancers within exons of multiexonic lncRNA loci. *RNA society journal*. 21(3):333-346.

9-He, Y., Ding, Y., Zhan, F., Zhang, H., Han, B., Hu, G., Zhao, K., Yang, N., Yu, Y., L. Mao and J. Song. 2015. The conservation and signatures of lincRNAs in Marek's disease of chicken. *Scientific Reports*. 5:15184.

10-Hesani, ZH., Nasiry, M.R., Bakhtiarizadeh, M.R., M. Tahmorespur and A. Javadmanesh. 2017. Gene Expression Analysis on Apoptosis network and design it in Esfahani and Ross Breeds. I*ranian Journal of Animal Science Research*. (10):117-130. (In Farsi).

11- Karimi, P., Bakhtiarizadeh, M.R., A. Salehi and H.R. Izadnia. 2022. Transcriptome analysis reveals the potential roles of long non coding RNAs in feed efciency of chicken. *Scientific reports*.12:2558.

12- Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Morales, D.R., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B.E., A. Van Oudenaarden, and A. Regev. 2009. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* .106(28): 11667-11672.

13- Kim, D., J.M. Paggi and C. Park. 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*. 37(8): 907–915.

14- Kong, L., Zhang, Y., Ye, Z.Q., Lio, X.Q., Zhao, S.Q., L. Wei and G. Gao. 2007. CPC: Assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic acids research*. 35: 345- 349.

15-Lamont, S. 2006. Integrated, whole-genome approaches to enhance disease resistance in poultry. Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Instituto Prociência*. 1-7.

16- Li, A., J. Zhang and Z. Zhou. 2014. PLEK: A tool for predicting long non-coding RNAs and messenger RNAs based on an improved k-mer scheme. *BMC bioinformatics*. 15 (1): 311-321.

17-Li, H., Cui, P., Fu, X., L. Zhang and X. Yang. 2021. Identification and analysis of long non-coding RNAs and mRNAs in chicken macrophages infected with avian infectious bronchitis coronavirus. *BMC Genomics*. (22): 67-80.

18-Pértille, F., Brantsæter, M., Nordgreen, J., Coutinho, L.L., Janczak, A.M., P. Jensen and C. Guerrero-Bosagna . 2017. DNA methylation profiles in red blood cells of adult hens correlate with their rearing conditions. *Journal of Experimental Biology*. (19):3579-3587.

19-Qiu, L., Li, Z., Chang, G., Bi. Y., X. Liu and L. Xu. 2017. Discovery of novel long non-coding RNAs induced by subgroup J avian leukosis virus infection in chicken. *Developmental and Comparative Immunology*. 76:292-302.

20-Ren, T., Li, Z., Zhou, Y., Liu, X., Han, R., Y. Wang and X. Kang. 2018. Sequencing and characterization of lncRNAs in the breast muscle of Gushi and Arbor Acres chickens. *Genome*. 61(5): 337-347.

21-Sadr, A.S., Nassiri, M.R., Salami, S.A.R., Bakhtiarizadeh, M.R., M. Tahmoorespur and A.R. Shafeinia. 2017. RNAseq Reveals Novel and Differentially Expressed Isoforms In Native and Commercial Poultry. *Journal of Cell and Molecular Research*. 9 (1):16-22

22- Trapnell, C., Hendrickson, D., Sauvageau, S., Goff, L., J. L. Rinn and L. Pachter. 2013. Differential analysis of gene regula-

tion at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*. 31:46-53.

23-Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., G. Kwan and M. J. van Baren. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*. 28: 511–515.

24- Wucher, v. 2017. FEElnc: a tool for long non – coding RNA annotation and its application to the dog transcriptome. *Nucleic Acids Research*. 45(8):e57.

25-You, Z., Zhang, Q., Liu, C., Song, J., Y. Ning and L. Lian. 2019. Integrated analysis of lncRNA and mRNA repertoires in Marek's disease infected spleens identifies genes relevant to resistance. *BMC Genomics*. 245-260.