

Identification of long noncoding genes associated with Ascites Syndrome

M Aghazadeh ¹, SA Rafat,^{2*} K Hasanpur³ and A Javanmard³

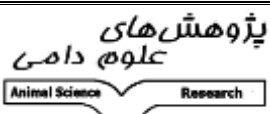
Received: June 26, 2022 Accepted: January 30, 2024

1 PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2 Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3 Associate Professor Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author: RAFATA@tabrizu.ac.ir

	Journal of Animal Science Research/ vol.34 No.2/ 2024/pp 31-44 https://animalscience.tabrizu.ac.ir	
© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/) DOI: 10.22034/as.2024.57278.1713		

Introduction: Ascites syndrome (AS), a complex and multifactorial genetic-metabolic disorder with wide prevalence in especially meat-type chickens, causes substantial economic losses in poultry farms worldwide as its mortality rate is increasing with the age of the bird. Although the susceptibility to AS has genetic base, the harsh and stress-full environmental conditions such as cold ambient temperature, energy-rich diets, salty waters trigger the incidence of AS significantly. As compared to the resistant ones, the susceptible birds demonstrate physiological modifications as well as severe changes in gene expression during or before the onset of the diseases. Long non-coding RNAs, acting as the modulators or regulators of the protein-coding genes, play key roles in the regulation of gene expression (Wang et al., 2012). Here, the main objective of the current work was to detect some novel long non coding RNAs as well as to assess their potential association with AS using the next generation sequencing data originated from four tissues of the ascitic and healthy broiler chickens.

Materials and methods: Six data sets in four tissues (liver, kidney, heart and pulmonary artery) were used for this research. Hisat2 software was used to align the reads with chicken reference genome and Sting Tie software package was used to assemble the transcripts. To identify long non-coding genes, we used various software (CPC2, CNIT PLEK, FEELNC, PLIT) and BLAST methods. meta-RNAseq software and Fisher's method were used to perform meta-analysis.

Results: Examination of the results of this research revealed that 188 lncRNAs were detected in the examined tissues and identified as new long non-coding RNAs. Of these, 160 lncRNAs were located within 50,000 contiguous 689 genes. Coexpression analysis showed that there was a correlation of 0.9 between 13 lncRNAs and 17 neighboring genes. Of these 17 neighboring genes, 6 coding genes were known. Examination of the level of significance between the healthy group and the ascites group in the examined tissues showed that in the pulmonary artery tissue the expression of 4 genes was significantly different and these 4 adjacent coding genes with 3 lncRNAs, i.e. H. an lncRNA that controls two adjacent genes. In the meta-analysis, 9 lncRNA genes were differentially expressed between healthy chickens and ascites chickens.

Conclusion: The results of this research showed that lncRNAs play an important role in the occurrence of ascites disease and that genetic management can reduce the occurrence of this complication in poultry farms and control economic losses.

Key words: Ascites, Fisher, Long non-coding RNAs, Meta-analysis

بررسی ژن‌های غیرکدکننده مرتبط با سندرم آسیت در طیور

مینا آقازاده بوکت^۱، سید عباس رافت^{۲*}، کریم حسن پور^۳ و آرش جوانمرد^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۰

^۱دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

^۲استاد گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

^۳دانشیارگروه علوم دامی دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه RAFATA@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: سندرم آسیت، یک ناهنجاری متابولیکی-ژنتیکی است که معمولاً در جوجه‌های گوشتی تندرشد در تمام نقاط دنیا رخ می‌دهد و یکی از علل مهم تلفات و ضررهای اقتصادی مزارع پرورش مرغ گوشتی می‌باشد چرا که عمده مرگ و میر مرتبط با آسیت در اواخر دوره پرورش اتفاق می‌افتد. اگرچه دلیل اصلی حساسیت به سندرم آسیت پایه ژنتیکی دارد ولی عوامل محیطی متعدد از قبیل تنش سرمایی، غذاهای پرانرژی و آبهای شور باعث تحریک شیوع آن میشوند. پرندگان حساس به آسیت در مقایسه با پرندگان مقاوم، قبل و یا در حین بیماری، تغییرات چشمگیر زیادی در فیزیولوژی و بیان ژن نشان میدهند. در این میان، ژنهای غیرکدکننده بلند، که وظیفه تنظیم بیان ژنهای کدکننده پروتئین را بر عهده دارند، نقش کلیدی دارند. لذا هدف از تحقیق حاضر، شناسایی و کشف ژنهای غیرکدکننده مؤثر و مرتبط با سندرم آسیت در جوجه‌های گوشتی بود. برای این کار از داده‌های نسل جدید توالی یابی که از چهار بافت مرتبط با آسیت در جوجه‌های گوشتی حساس و مقاوم به آسیت تولید شده بودند، استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: از شش مجموعه داده مربوط به تحقیقات جباری، ملکشاهی و حسن‌پور که بر روی لاین آرین مرغان گوشتی به ترتیب در بافت‌های کبد، کلیه و قلب انجام گرفته بود استفاده شد. داده‌های بافت سرخرگ ششی هم براساس تحقیقات یانگ ازسایت NCBI گردآوری شد. جهت شناسایی ژنهای غیرکدکننده از انواع نرم‌افزارها (CPC2, CNIT, PLEK, FEELNC, PLIT)، انواع بلاستها و همچنین سایر ابزارهای شناسایی رونوشت‌ها استفاده شد. برای انجام متاآنالیز از نرم‌افزار meta-RNAseq و روش فیشر استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که ۱۸۸ رونوشت lncRNA به عنوان RNA غیرکدکننده جدید در بافت‌های مورد بررسی کشف و شناسایی شدند. از این تعداد، ۱۶۶ lncRNA در فاصله ± 50 هزار باز نوکلئوتیدی با ۶۸۹ تعداد ژن همجوار بودند. آنالیز همبستگی نشان داد که بین ۱۳ عدد lncRNA و تعداد ۱۷ ژن همجوار همبستگی بالای ۰/۹۰ وجود داشت. از این ۱۷ تعداد ژن همجوار، ۶ تعداد ژن کدکننده شناخته شده بودند. بررسی سطح معنی‌داری بین گروه پرندگان سالم و آسیتی نشان داد که در بافت سرخرگ ششی بیان ۴ ژن به صورت معنی‌داری متفاوت بود که این ۴ ژن همجوار کدکننده با ۳ تا lncRNA ارتباط بیانی داشتند. به عبارت دیگر، یک lncRNA دو ژن همجوار را کنترل می‌کرد. در متاآنالیز نیز تعداد ۹ ژن lncRNA بین پرندگان سالم و آسیتی بطور معنی‌داری دارای بیان افتراقی بود که بررسی‌های بیشتر آنها نشان دهنده ارتباطات آنها با سندرم آسیت بود.

نتیجه گیری: پژوهش حاضر ضمن شناسایی lncRNA های جدید در چهار بافت درگیر در سندرم آسیت، عملکرد lncRNA ها در مرغان مبتلا به آسیت را شناسایی کرد و نشان داد RNA-seq به خوبی قادر به شناسایی lncRNA ها بوده و آن‌ها نیز نقش قابل توجهی در تنظیم بیان ژن‌های همجوارشان دارند. مولکول‌های lncRNA ضمن این‌که می‌توانند به عنوان یک عامل پیش آگاهی دهنده برای تشخیص آسیت باشند، در اصلاح نژاد دام و طیور نیز به عنوان یک بیومارکر می‌توان از آن‌ها بهره برد.

واژگان کلیدی: آسیت، متآنالیز، RNA های غیرکدکننده بلند، فیشر

مقدمه

(۲۰۲۳). هر ساله میلیاردها جوجه برای تامین نیاز دائمی پروتئین حیوانی پرورش می‌یابد. سندرم آسیت، یک بیماری متابولیکی است که هنوز در قسمتهای مختلف جهان، مشکل جدی برای صنعت طیور محسوب می‌شود. آسیت، در سویه‌های با رشد سریع به دلیل عدم هماهنگی رشد شش‌ها و قلب با رشد توده بدن ایجاد می‌شود. بطور کلی، می‌توان گفت کلیه عواملی که باعث افزایش نیاز پرنده به اکسیژن می‌شوند و یا در دریافت و انتقال اکسیژن و دفع دی اکسیدکربن اختلال ایجاد می‌کنند و یا توان انتقال یا آزاد سازی اکسیژن از خون به بافت را کاهش می‌دهند، در ایجاد آسیت اثر دارند (حسن‌زاده ۱۳۸۷). آن‌چه پیش‌بینی می‌شود اصلاح نژاد علیه این سندروم با روش‌های سنتی بسیار هزینه‌بر خواهد بود. خوشبختانه، به دلیل پیشرفت‌های بسیار زیاد در حوزه ژنتیک مولکولی و توسعه تکنولوژی‌های توالی-یابی نسل آینده در حال حاضر، تحقیقات گسترده‌ای بر روی صفاتی نظیر آسیت، که یک صفت کاملاً اقتصادی است، در سطح نوکلئوتید فراهم شده است. RNA های طویل غیرکدکننده (lncRNA)، گروه جدیدی از RNA های غیرکدکننده هستند که امروزه در مقیاس ژنومی گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفتند. این مولکول-ها دارای وظایف گسترده‌ای شامل سازماندهی سنتز پروتئین، تنظیم سنتز پروتئین و تنظیم بیان ژن در سطوح رونویسی و پس از رونویسی می‌باشند (ونگ و

پرورش طیور در ایران و توزیع آن در این کشور سابقه بسیار قدیمی دارد (شهادنژاد و همکاران ۲۰۱۶). ایران از قرن پنجم پیش از میلاد تا تقریباً قرن هفتم میلادی امپراتوری بزرگی بود و از هند (دهلی) تا دریای سیاه و مدیترانه امتداد داشت (محمدی فر و همکاران ۲۰۱۴). در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی، ایران در محل تلاقی راه‌های حمل و نقل فرآورده‌هایی مانند طیور از شرق به غرب چه از طریق زمین و چه از طریق دریا قرار داشت. جنگ‌های بسیاری در اطراف ایران و کشورهای همسایه در این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت طیور را تسهیل کرد. کاوش‌های باستان‌شناسی وجود مرغ در ایران در دوران باستان را تایید کرده است (محمدآبادی و همکاران ۲۰۱۰). بر اساس تحقیقات انجام شده، استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه یافت شده است: دو اکتشاف در تپه یحیی (جنوب شرقی ایران) به ترتیب مربوط به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ سال قبل از میلاد و ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد (محمدی‌فرو همکاران ۲۰۱۴ و محمدی‌فر و محمدآبادی ۲۰۱۷). از سوی دیگر، مرغ در تامین منبع اصلی پروتئین با کیفیت بالا (تولید گوشت و تخم مرغ) برای انسان و همچنین به عنوان حیوان نمونه در مطالعات ژنومی اهمیت دارد (شهادنژاد و همکاران ۲۰۱۶، خیبری و همکاران

lncRNA جدید در چهار بافت مهم کبد، کلیه، قلب و سرخرگ ششی که در بروز علایم بیماری آسیب نقش دارند و انجام متاآنالیز lncRNA های جدید و کشف شده برای شناسایی lncRNA های با بیان افتراقی بود.

مواد و روش‌ها

بمنظور انجام این تحقیق از داده‌های RNA-seq خانواده-های ناتنی پدري سويه تجاری آرین که در دوفاز تحت شرایط نرمال و تحت شرایط تنش‌زا پرورش یافته بودند استفاده شد. داده‌های پرندگان سالم و آسیب در بافت‌های قلب، کبد و کلیه به ترتیب توسط حسن‌پور و همکاران ۱۳۹۴، جباری و همکاران ۱۳۹۸ و ملک‌شاهی و همکاران ۱۳۹۷ جمع‌آوری شده بود. به علاوه، داده‌های RNA-seq مربوط به بافت سرخرگ ششی نیز از پایگاه داده NCBI با شماره دسترسی SRP06824 اخذ شد. برای بافت‌های کبد و کلیه، پرندگان نر و ماده به صورت مجزا آنالیز شدند. در کل، ۲۴ نمونه (۸ نمونه برای هر کدام از بافت‌های کلیه و کبد و چهار نمونه برای هر کدام از بافت‌های قلب و سرخرگ ششی) مورد استفاده قرار گرفت. پروفایل ترنسکرپتومی بین پرندگان مقاوم و حساس به آسیب مورد مقایسه قرار گرفت. در جدول ۱ اطلاعات مربوط به داده‌های RNA-Seq مورد استفاده در مطالعه حاضر نشان داده شده است.

همکاران (۲۰۱۲). شواهد علمی زیادی نشان می‌دهد که مناطق اینترژنیک با بیان RNA های غیرکدشونده طولانی بیماری‌های پیچیده مرتبط بوده و استفاده از RNA های غیرکدکننده بعنوان نشانگر در تشخیص بیماری مفید خواهد بود. به دلیل اینکه داده‌های واقعی ترنسکرپتوم دارای محدودیت‌هایی در جمعیت و اندازه نمونه می‌باشد، می‌توان از متاآنالیز به عنوان یک روش جایگزین استفاده کرد، چون که متاآنالیز با فرضیات مختلفی می‌تواند سطح وسیعی از مشکلات مرتبط با تکرار کم را برطرف کرده و به دقت و اعتبار خروجی و یافته‌های آزمایش‌ها افزایش داد (راماسامی ۲۰۰۸). لی و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای lncRNA های مرتبط با کیفیت گوشت مرغ را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. در آن مطالعه که در دو مرحله از رشد مرغان (در حال رشد و تخمگذاری) صورت گرفت، تعداد ۱۸۶ ژن lncRNA دارای بیان افتراقی شناسایی شدند. گوپتا و همکاران (۲۰۱۹) پروفایل بیان lncRNA در ماکروفاژهای گاو در پاسخ به عفونت پاراتوبرکلوزیس با استفاده از داده‌های RNA-seq مورد تجزیه قرار دادند. در این تحقیق تعداد ۳۹۷ تا lncRNA کاندید در ماکروفاژها شناسایی شد که ۳۸ تا از آنها بطور معنی‌دار عفونت را تنظیم و کنترل می‌کردند. لیو و همکاران (۲۰۲۱) آنالیز ترنسکرپتومی ژن‌های غیرکدکننده بلند را در طول رشد ماهیچه جوجه‌ها از مرحله جوجه‌کشی تا مرحله پس از جوجه‌کشی (یک روزگی تا ۹۸ روزگی) مورد بررسی قرار دادند. در آن مطالعه ۲۸۵۸ ژن lncRNA و ۴۲۸۲ ژن mRNA از روز اول جنینی تا روز ۹۸ پس از جوجه‌کشی به طور متفاوت بیان شدند. نتایج تحقیق مذکور نشان داد که RNA غیرکدکننده بلند نقش مهمی در تنظیم رونویسی ژن‌های رشد ماهیچه‌های اسکلتی در جوجه‌ها دارند. تاکنون، مطالعه جامعی برای بررسی بیان ژنهای غیرکدکننده در مرغان حساس و مقاوم به سندرم آسیب انجام نشده است. لذا هدف از این تحقیق شناسایی

Table1. Summary of information related to the RNA-Seq data used

Type of reads	Sequencing platform	Number of sample used	Type Of Test	Refrence	Tissue
Paired-end	Illumina Technology, BGI Co	12 chickens were selected from each of the healthy and ascites groups (24 chickens in total). An equal amount of RNA extracted from the tissue of the right ventricle of the heart of all six chickens (all male) was pooled together and four pooled samples (two replicates for the healthy group and two replicates for the diseased group) were created.	Case-control	Hasanpur (1394)	Heart ight ventricle
Paired-end	Illumina Technology, Novogene Co	16 chickens were selected from each of the healthy and ascites groups (32 chickens in total). An equal amount of RNA extracted from the liver tissue of four chickens (two male and two female) was pooled together and eight pooled samples were created (four replicates for the healthy group and four replicates for the diseased group).	Case-control	Jabbari-Ori et al., (1398)	Liver
Paired-end	Illumina Technology, Novogene Co	16 chickens were selected from each of the healthy and ascites groups (32 chickens in total). An equal amount of RNA extracted from the kidney tissue of four chickens (two male and two female) was pooled together and eight pooled samples were created (four replicates for the healthy group and four replicates for the diseased group).	Case-control	Malekshah dehi et al., (1397)	Kidney
Single-end	Illumina Technology, Novogene Co	6 chickens were selected from each of the healthy and ascites groups (12 chickens in total). The appropriate amount of RNA extracted from the pulmonary artery tissue of three chickens (all male) was pooled together and four pooled samples (two replicates for the healthy group and two replicates for the diseased group) were created.	Case-control	Yang et al., (2010)	Pulmonary artery

مراحل آنالیز تفاوت بیان ژن

در مطالعه حاضر، در مرحله نخست، یک آنالیز عمومی کنترل کیفیت با استفاده از نرم‌افزار FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/pr>) نسخه ۰.۱۱.۲ تحت سیستم عامل لینوکس انجام شد که در آن کیفیت کلی میلیون‌ها خوانش مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله دوم پیش پردازش خوانش‌ها برای حذف بازهای با کیفیت پایین و آداپتورها، توالی‌های ساخت کتابخانه حاصل از خوانش‌های منفرد،

دم‌های پلی A و توالی‌های میکروبیوم استفاده شد. پس از شناسایی مشکلات و معایب موجود در توالی‌ها، از نرم‌افزار Trimmomatic نسخه ۰.۳۵ برای فیلتر خوانش‌های نامطلوب استفاده شد. ژنوم رفرنس مرغ از سایت NCBI به نشانی (<ftp://ftp.ensembl.org/pub/release/fasta/dna/gallus/>) و فایل GTF از (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release79/gtf/gallus_gallus) مربوط به مرغ از پایگاه داده به آدرس

<http://asia.ensembl.org/info/data/ftp/index.htm>

دریافت شد.

جفت خوانش‌های مربوط به هر نمونه که فیلترهای کیفی را طی کرده بودند با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 (<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2>) با ژنوم رفرنس هم‌ردیف شدند.

خوانش‌های هم‌تراز شده برای هر نمونه سپس به طور جداگانه و با استفاده از نرم‌افزار StringTie <http://ccb.jhu.edu/software/stringtie/dl/stringtie> ادرس <http://ccb.jhu.edu/software/stringtie/dl/stringtie> (e-2.2.1.tar.gz) به ترنسکرپت‌ها سرهم‌بندی شدند. پس از اتمام سرهم‌بندی خوانش‌ها و ایجاد ترنسکرپت‌ها، با استفاده از نرم‌افزار StringTie ترنسکرپت‌های تمام نمونه‌ها ادغام شد تا مجموعه ترنسکرپتی واحدی ایجاد شود. برای شناسایی ماهیت ترنسکرپت‌ها از نرم‌افزار Cuffcompare و فایل رفرنس‌دهی ژنوم مرغ (فایل GTF) استفاده شد.

کشف و شناسایی ژن‌های غیرکدکننده طولانی جدید

برای شناسایی lncRNAهای جدید در چهار بافت مذکور، ترنسکرپت‌های ناشناخته حاصل از StringTie مورد فیلتراسیون قرار گرفت و با استفاده از معیارهای زیر حذف شدند:

۱) انتخاب ترنسکرپت‌های دارای class code های o, u, i, x (به ترتیب رونوشت‌های با حروف ا بعنوان اینترونی، u بعنوان بین ژنی، o بعنوان هم‌پوشانی با ژن‌های شناخته شده و x بعنوان هم‌پوشانی با ژن‌های شناخته شده رشته مقابل). ترنسکرپت‌های مربوط به سایر دسته‌ها حذف شدند.

۲) ترنسکرپت‌های دارای $FPKM > 1$ انتخاب شدند.

۳) ترنسکرپت‌های تک اگزونه و همچنین، کوتاه‌تر از ۲۰۰ نوکلئوتید حذف شده و فقط ترنسکرپت‌های چنداگزونی بزرگتر از ۲۰۰ نوکلئوتید نگه داشته شدند.

۴) ترنسکرپت‌های دارای پتانسیل کدکنندگی پروتئین با استفاده از نرم‌افزارهای CPC2, CNIT, PLEK, FEELNC, PLIT شناسایی شده و سپس، حذف شدند. ۵) BLASTN برای حذف ترنسکرپت‌های منطبق بر ترنسکرپت‌های موجود در پایگاه داده های Rfam, miRbase, piRbase و Noncode انجام شد و موارد معنی دار ($E\text{-value} = 1 \times 10^{-3}$) حذف شدند. همچنین دو آنالیز BLASTx و Pfamsacan به ترتیب بر روی پایگاه داده های UniprotKB و Pfam انجام شد و ترنسکرپت‌های مربوط به ژن‌های کدکننده پروتئین حذف شدند. ۷) Transdecoder برای داشتن ORFهای بلند طولانی‌تر ۳۰۰ نوکلئوتید بررسی شده و آنهایی که طول بلندتر داشتند حذف گردیدند. ۸) از نرم‌افزار RepeatMasker برای شناسایی و حذف ترنسکرپت‌های دارای توالی‌های تکراری متعدد استفاده شد. توالی‌های به جای مانده به عنوان ترنسکرپت‌های بالقوه lncRNA جدید (novel-lncRNA) معرفی شدند.

آنالیز همبستگی بین lncRNA جدید شناسایی شده و ژن‌های کدکننده مجاور

ژن‌های همجوار موجود در فاصله ± 50 هزار باز نوکلئوتیدی از lncRNAها شناسایی شده و همبستگی پیرسون بین الگوی بیان آنها مورد بررسی قرار گرفت.

متاآنالیز بیان lncRNAهای جدید

برای انجام متاآنالیز از بسته نرم‌افزاری metaRNASeq در محیط Rstudio و به روش ترکیب کردن P-value ها براساس روش فیشر استفاده شد (ماروت و همکاران ۲۰۱۵).

آنالیز هستی شناسی ژن‌های همجوار

برای بررسی عملکردی، ساختاری و مولکولی ژن‌های کاندیدای هدف از طریق آنالیز عملکردی از سایت DAVID^۲ انجام شد.

نتایج و بحث

آنالیز صحیح و اصولی بیان ژن در این روش مستلزم پیرایش خوانش‌ها با کیفیت نامطلوب و حذف خوانش‌هایی که اطلاعات مفیدی به دست نمی‌دهند، می‌باشد. به طور کلی کیفیت خوانش‌های حاصل از توالی‌یابی مناسب بود و

متوسط کیفیت بازهای خوانده شده بالای ۲۵ (احتمال وجود یک باز اشتباه در هر ۴ خوانش ۱۵۰ بازی) بود. بعد از پیرایش با معیارهای بسیار سخت‌گیرانه، داده‌ها وارد مراحل بعدی آنالیز شدند. جدول ۲ اطلاعات آماری مربوط به نمونه‌ها قبل از پیرایش و بعد از پیرایش را نشان می‌دهد.

Table 2- Statistical information of readings for each sample before and after pre-processing

The percentage of trimmed reads	Length of each read after trimming	The number of reading after trimming	Length of each raw(open) read	Number of raw reading	Sample specifications (biological replication)	sample	Tissue
83.58	140	17534144	150	20977690	Healthy female1	RA	Liver(female)
75.79	140	19157986	150	25244062	Healthy female2	RB	
83.81	140	21584522	150	25755634	Ascites female1	RE	Liver(male)
84.11	140	17417203	150	23661938	Ascites female2	RF	
83.04	140	19648578	150	23661938	Healthy male1	RC	
83.22	140	17664167	150	21236809	Healthy male2	RD	
83.89	140	19280568	150	22959272	Ascites male1	RG	
84.53	140	19949382	150	23599115	Ascites male2	RH	
98.43	180	24992539	100	25389617	Ascites male1	As-1	Right ventricle of the heart
98.74	180	25061262	100	25380387	Ascites male2	As-2	
98.89	180	25061262	100	25367470	Healthy male1	He-1	
98.84	180	25070763	100	25364938	Healthy male2	He-2	
98.21	40	12804234	50	13172095	Healthy male1	N1	pulmonary artery
97.64	40	15533762	50	15908860	Healthy male2	N2	
99.10	40	15533762	50	13919353	Ascites male1	D1	
97.29	40	13613664	50	13992954	Ascites male2	D2	
96.09	140	22941001	150	23873210	healthy female1	HA	Kidney(female)
92.29	140	20146341	150	21828930	healthy female2	HB	
95.96	140	20959656	150	21841017	Ascites female1	HE	Kidney(male)
95.48	140	22995329	150	24083126	Ascites female2	HF	
95.47	140	24651459	150	25821102	Healthy male1	HC	
94.36	140	23421951	150	21519315	Healthy male2	HD	
94.64	140	21873949	150	23111009	Ascites male1	HG	
94.41	140	19825013	150	20996784	Ascites male2	HH	

با استفاده از نرم‌افزار Hisat2 حدود ۹۰ درصد از خوانش‌ها بر روی ژنوم مرغ نقشه‌یابی شدند که بیانگر اینست که کیفیت خوانش‌ها بسیار مطلوب بوده و با حداقل خطا توالی‌یابی شده‌اند. در مرحله بعدی و با استفاده از نرم‌افزار Stringtie و Cuffdiff و فایل حاشیه‌نویسی ژنوم مرغ، تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq نشان داد

که در مجموع ۲۸۳۴۴ ترنسکرپت کدکننده پروتئین و ۵۴۵۳ lncRNA شناخته شده در شش مجموعه داده دریافت‌های درگیر بیان شده‌اند. برای شناسایی lncRNAهای جدید معیارهای مختلفی در نظر گرفته شد تا ترنسکرپت‌های با پتانسیل بالای کدکنندگی حذف گردند. اولین قدم در شناسایی lncRNAهای جدید

با استفاده از Blastn ، Blastx ، Pfamscan و Pfam (piRbase, UniprotKB, noncode, Rfam) و به ترتیب ۸۸۴، ۷۵۵، ۷۰۷، ۶۴۸، ۴۵۴ و ۴۴۸ ترنسکرپت در آخر هر فیلتراسیون باقی ماندند. بعد از حذف ترنسکرپت‌های دارای ORF بزرگتر از ۳۰۰ نوکلئوتید با استفاده از نرم افزار TransDecoder تعداد ۲۷۳ عدد ترنسکرپت وارد نرم افزار RepeatMasker شدند و در مرحله آخر فیلتراسیون تعداد ۱۸۸ ترنسکرپت به عنوان lncRNA جدید کشف و شناسایی شدند. سطح بیان و طول lncRNA جدید، lncRNAهای شناخته شده و ترنسکرپت‌های کدکننده پروتئین در شکل ۱ نشان داده شده است. در شکل ۱ گراف C نیز تعداد اگزون مربوط به سه نوع ترنسکرپت ذکر شده نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود تعداد اگزون ژن‌های کدکننده پروتئین از ۲ تا ۶۰ و تعداد اگزون-novel lncRNA از ۲ تا ۵ بود که به ترنسکرپت‌های غیرکدکننده بلند شناخته شده مشابهت بیشتری داشت.

انتخاب ترنسکرپت‌های دارای کدهای u، i، o و x بود که با استفاده از نرم افزار Coffcompare در مجموع uiox=3372 (u=1709 و o= 638 , x= 622, i=403) ترنسکرپت انتخاب شدند. بعد از انجام فیلتراسیون بر حسب $FPKM > 1$ حداقل در دو نمونه، ۴۴۵۵ عدد ترنسکرپت انتخاب و وارد مرحله بعد شدند تا فقط ترنسکرپت‌های چنداگزون باقی بمانند که ۳۱۶۹ عدد ترنسکرپت چنداگزون و دارای $FPKM > 1$ باقی ماندند. در مرحله بعد ترنسکرپت‌های بالای ۲۰۰ نوکلئوتید که توسط نرم افزارهای CPC2, CNIT, PLEK, FEELNC, PLIT بعنوان ترنسکرپت غیرکدکننده شناخته شده بودند انتخاب و بقیه حذف شدند. این مرحله با سختگیری بالایی انجام شد. حتی اگر یک ترنسکرپت در یک نرم افزار کدکننده و در بقیه غیرکدکننده شناسایی شده بود حذف گردید. در مجموع ۱۰۷۵ عدد ترنسکرپت به عنوان ژن غیرکدکننده باقی ماندند. در مرحله بعدی فیلتراسیون براساس پایگاه داده‌های مختلف (miRbase,)

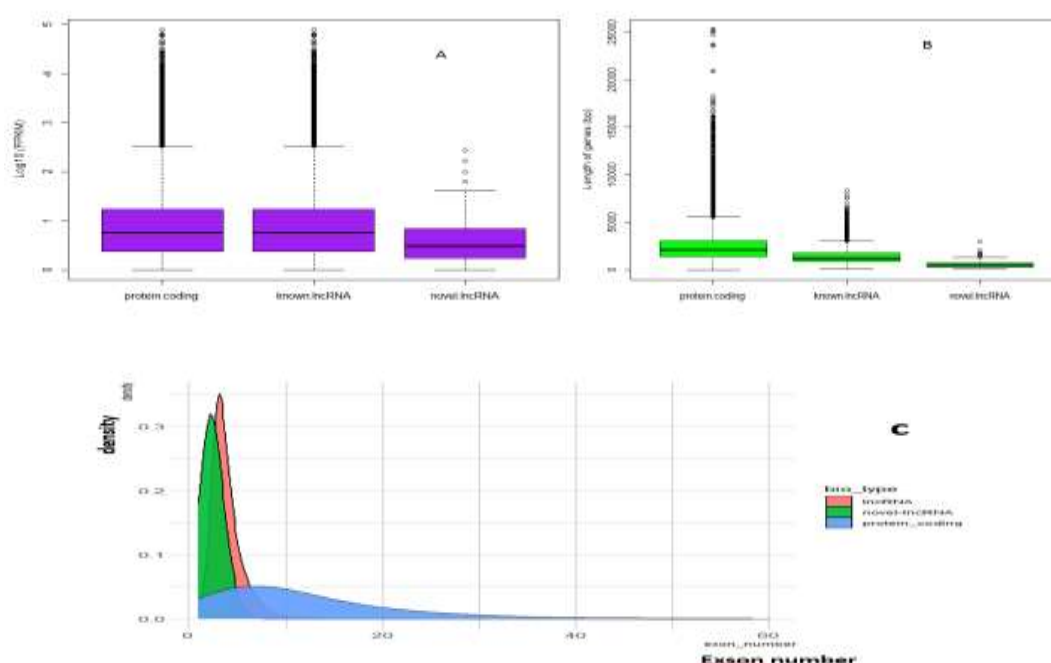


Figure 1. Features and specifications of novel LncRNA, known LncRNAs and protein coding genes. **Figure A.** Expression level (log10 FPKMs), **Figure B** shows the length and **Figure C** shows the number of new LncRNA exons, known LncRNAs and protein coding genes

بعد از شناسایی و کشف lncRNAهای جدید، تمامی ژن-هایی که در همسایگی ژن‌های غیرکدکننده بودند شناسایی شدند، ولی فقط آنهایی که در فاصله ± 50 باز بودند و بیشتر به ژن‌های غیرکدکننده نزدیک بودند مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۱۶۰ تا lncRNA با ۶۸۹ ژن همجوار بودند. همبستگی پیرسون بین بیان lncRNAهای جدید و همه ژن‌های همجوار محاسبه شد. تعداد ۱۷ ژن همجوار با ۱۳ lncRNA جدید دارای همبستگی بالای ۹۰ درصد بود که از این ۱۷ ژن، ۶ ژن دارای مشخصات کامل ولی بقیه ناشناخته بودند. بررسی این ۶ ژن همجوار در شش مجموعه داده نشان داد که ۴ تا از آنها در بافت سرخرگ ششی بین پرندگان سالم و آسیتی بیان افتراقی داشتند. در سایر بافت‌ها بیان ژن‌های همجوار معنی‌دار نبود. یکی از ۶ ژن همجوار ذکرشده با یک میکروآرنا

همپوشان بود و در جدول ۳ نیز اسم همان میکروآرنا ذکر شده است. به دلیل این‌که در مراحل تشکیل کتابخانه برای انجام توالی‌یابی همه RNAهای کوچک حذف می‌شوند و فقط RNAهای واجد دم پلی A نگهداری می‌شوند، لذا نمی‌توان متصور شد که همپوشان بودن لوکوس مزبور با میکروآرنا به مفهوم بیان شدن آن ژن میکروآرنا باشد. بلکه به احتمال زیاد صرفاً به مفهوم همپوشان بودن ژن کدکننده ناشناخته با ژن میکروآرنای مزبور بوده است. جدول ۳ اسامی lncRNAهای دارای ژن همجوار با همبستگی بالای ۹۰٪ را در بافت ریه نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود؛ تا lncRNAهای جدید هرکدام بیش از یک ژن همجوار را کنترل می‌کنند و این می‌تواند اهمیت نقش تنظیمی آنها در بیان ژن‌های کدکننده همجوار را نشان دهد.

Table3. lncRNA names have neighbor genes with high correlation of %90 in pulmonary artery tissue

Novel lncRNA	Neighboring gene	Correlation coefficient	Gene names	Adjusted P-value	Significant in pulmonary artery tissue
MSTRG.18408	MSTRG.18409	0.9	MIGA1	0.0029	*
MSTRG.18408	MSTRG.18407	0.92	-	0.00035	*
MSTRG.2137	MSTRG.2147	0.92	-	1	-
MSTRG.2137	MSTRG.2139	0.9	-	0.63775	-
MSTRG.6073	MSTRG.6077	0.95	gga-mir-1705	0.22	-
MSTRG.6073	MSTRG.6072	0.99	PTGS1	0.0005	*
MSTRG.12436	MSTRG.12435	0.94	-	1	-
MSTRG.12436	MSTRG.12537	0.91	-	1	-
MSTRG.5721	MSTRG.5720	0.91	-	1	-
MSTRG.4298	MSTRG.4305	0.91	-	1	-
MSTRG.19485	MSTRG.19471	0.92	-	1	-
MSTRG.16208	MSTRG.16209	0.93	MEIS2	0.2066	-
MSTRG.8958	MSTRG.8960	0.94	-	0.5894	-
MSTRG.3007	MSTRG.3008	0.94	FBXL22	0.0005	*
MSTRG.19485	MSTRG.19490	0.95	-	1	-
MSTRG.16727	MSTRG.16733	0.95	-	1	-
MSTRG.16079	MSTRG.16080	0.99	EHD4	1	-

* Significant at level (0/05)

بررسی تفاوت بیان ژن

تعداد ۶ آنالیز افتراقی مجزا برای ۶ مجموعه داده مختلف انجام شد. با توجه به اینکه مطالعه حاضر دو تیمار اصلی سالم و آسیتی داشت، آنالیز تفاوت بیان ژن به صورت مقایسه پرنده‌های سالم با پرنده‌های

آسیتی انجام شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، ژن‌های با بیان متفاوت در هر یک از مجموعه داده‌های RNA-Seq با در نظر گرفتن آستانه معنی‌داری $\log_2\text{-Fold change} > 1$ و $\text{Adjusted-p-value} < 0.05$ شناسایی شدند. در هر شکل اسم ژن‌های معنی‌دار در هر بافت گزارش شده است.

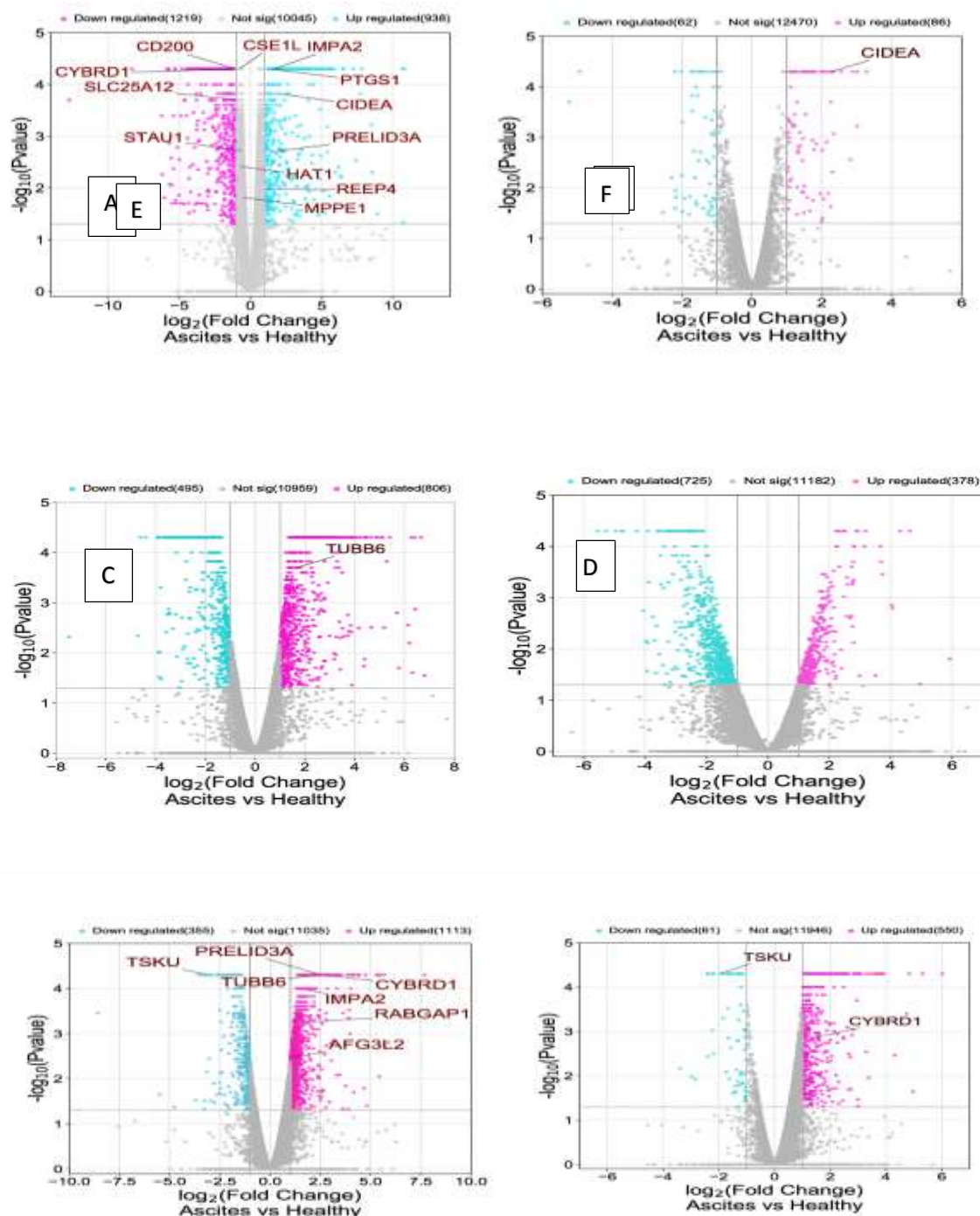


Figure 2- Volcano plots related to the differential expression of genes in healthy and ascites chickens. A pulmonary artery tissue, B heart tissue, C liver tissue of female chickens, D liver tissue of male chickens, E kidney tissue of female chickens and F kidney tissue of male chickens. Red points have up-regulated expression, blue points have down-regulated expression, and gray points have similar expression. The names of the important genes identified in each tissue are indicated on the figures

متآنالیز

بالایی می‌باشد. پس از شناسایی lncRNA های جدید، تعداد ۱۸۸ ژن غیرکدکننده وارد متآنالیز شد و از نرم افزار meta-RNA-seq و روش ادغام p-value ها بر اساس روش فیشر استفاده شد. تعداد ۹ عدد lncRNA

روش متآنالیز با ادغام نتایج حاصل از بررسی اختصاصی ترنسکرپتوم هر یک از بافت‌های مورد مطالعه نسبت به آنالیزهای انفرادی داده‌ها دارای اعتبار

داده دارای $P\text{-value} < 0.05$ و معنی‌دار بودند. در جدول ۴ ژن‌های lncRNA جدید دارای بیان افتراقی گزارش شده است و جدول ۵ ژن‌های همجوار معنی‌دار را نشان می‌دهد. در این نتایج آستانه معنی‌داری برای انتخاب ژن‌های با بیان متفاوت $FDR \text{ adjusted } P\text{-value} < 0.05$ انتخاب شد.

معنی‌دار (که meta-lncRNA خوانده خواهند شد) شناسایی شد (جدول ۴). در ادامه، ژن‌های همجوار این meta-lncRNA نیز بررسی شد. Meta-lncRNA های شناسایی شده دارای ۵۳ ژن همجوار بودند که ۳۳ مورد از آنها دارای اطلاعات انوتیشن بود و ۱۶ مورد از آنها حداقل در یک مجموعه

Table 4- New lncRNAs with significant differential expression between healthy and ascites chickens from meta-analysis of six RNA-seq datasets.

Meta-lncRNA	Genomic location	P-value
MSTRG.1555.1	1:89929468-89933791	0.0116
MSTRG.17731.1	7:1795995-17962275	0.0091
MSTRG.2763.1	1:1949921492-194935562	0.0165
MSTRG.6073.1	17:9070661-90711276	0.04
MSTRG.8142.1	2:97258480-97270754	0.002
MSTRG.8369.1	2:115276415-115280420	0.0101
MSTRG.8422.1	20:119966894-119971658	0.0339
MSTRG.8958.1	20:6465938-6470536	0.0004
MSTRG.9509.1	22:71575-72238	0.0128

Table 5-Name,p-value and location of neighbor genes in meta-lncRNAs that were significant in at least one data set.

Neighbor gene	Genomic location	Gene name	P-value	Name of significant tissue
MSTRG.1558	1:89972836-89986926	CD200	0.00005	pulmonary artery
MSTRG.17729	7:17886473-17959918	SLC25A12	0.0002	pulmonary artery
MSTRG.17730	7:17886473-17959918	HAT1	0.0038	pulmonary artery
MSTRG.17734	7:18009895-18018295	CYBRD1	0.00005	pulmonary artery, male and female kidney
MSTRG.2762	1:194858471-194874960	TSKU	0.0028	male and female kidney
MSTRG.6072	17:9061883-9070028	PTGS1	0.00027	pulmonary artery
MSTRG.6079	17:9107719-9178650	RABGAP1	0.00055	Male kidney
MSTRG.8139	2:97199689-97210085	PRELID3A	0.00721	pulmonary artery, male kidney
MSTRG.8140	2:97210206-97233990	AFG3L2	0.00335	Male kidney
MSTRG.8141	1:89972836-89986926	TUBB6	0.0	Male kidney, male liver
MSTRG.8143	2:97258480-97270754	CIDEA	0.00074	pulmonary artery, heart
MSTRG.8144	2:97288556-97308603	IMPA2	0.00027	pulmonary artery, male kidney
MSTRG.8145	2:97308614-97516665	MPPE1	0.041	pulmonary artery
MSTRG.8956	20:6401874-6424447	CSE1L	0.00027	pulmonary artery
MSTRG.8957	20:6430020-6463664	STAU1	0.0079	pulmonary artery
MSTRG.9508	22:69105-71510	REEP4	0.01035	pulmonary artery

بررسی ریشه‌شناسی ژن‌های مجاور با بیان معنی-

داری meta-lncRNA ها

یکی از روش‌های بسیار مهم در تعیین گروه‌های کارکردی یک مجموعه ژنی (با بیان مشابه) انجام آنالیز ریشه‌شناسی ژن می‌باشد. در مطالعه حاضر آنالیز ریشه‌شناسی با استفاده از پایگاه داده DAVID برای همه ژن‌های مجاور شناخته شده در سه رویه پروسه

بیولوژیکی، اجزا سلولی و عملکرد مولکولی مورد آنالیز قرار گرفتند. در هر رویه گروه‌های ریشه‌شناسی با سطح معنی‌داری $P\text{-value} < 0.05$ گزارش شده است. نتایج ریشه‌شناسی پروسه بیولوژیکی و عملکرد مولکولی به همراه مسیرهای متابولیکی KEGG در جدول ۶ نشان داده شده است.

Table 6- gene ontology results of neighbor genes of meta-LncRNAs

Category	Term	Count	%	P-value	Gene
GO-BP	Respiratory gaseous exchange	2	6.1	0.023	SFTPC
GO-MF	RNA-polymerase II regulatory region sequence-specific DNA-binding	3	9.1	0.03	LHX6, TCF24, ZBTB26
GO-MF	Metal ion binding	3	18.2	0.068	COPS5, LHX6, CYBRD1, IMPA2, PTGS1, TUB6
KEGG-PATHWAY	Salmonella infection	3	9.1	0.028	CSE1L, DYNC112, TUBB6

بررسی نتایج DAVID نشان می‌دهد که ژن همجوار سورفاکتانت C (SFTPC) در فرآیند بیولوژیکی تبادل گازهای تنفسی معنی‌دار است. ژن SFTPC دستورالعمل‌هایی را برای ساخت پروتئینی به نام سورفاکتانت پروتئین C ارائه می‌دهد. این پروتئین یکی از چهار پروتئین (هر کدام از یک ژن متفاوت تولید می‌شود) در سورفاکتانت، مخلوطی از چربی‌های خاص (فسفولیپیدها) و پروتئین‌هایی است که توسط سلول‌های آلوئولار نوع دوم تشکیل می‌شوند و با کاهش کشش سطحی باعث سهولت اتساع آلوئولها هنگام دم در بافت ریه شده و تنفس را آسان می‌کنند. از آنجایی که این ژن همجوار با متاژن‌های غیرکدکننده ارتباط معنی‌دار دارد، می‌توان نتیجه گرفت که lncRNA ها بر روی بیان این ژن دخیل در عمل تنفس، در هنگام بروز بیماری آسیب اثر تنظیمی دارند. ژن CYBRD1 عضوی از خانواده سیتوکروم (b561) است که کدکننده یک پروتئین تنظیم شده با آهن است. همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود بیان این ژن در بافت سرخرگ ششی و کلیه معنی‌دار می‌باشد. بررسی تحقیقات نشان می‌دهد که بیان ژن TUB6 با کاهش دما و استرس سرمایی کاهش می‌یابد که این می‌تواند با بیماری آسیب در ارتباط باشد، بدین گونه که ژن TUB6 پروتئین توبولین را کد می‌کند و این پروتئین در ساختار میکروتوبول‌ها نقش دارد. وقتی پرندگان در معرض استرس سرمایی قرار می‌گیرند میکروتوبول‌ها که در تقسیم میتوز دخالت دارند، ناپدید می‌شوند. این

باعث می‌شود سلول‌ها نتوانند تقسیم میتوز را انجام داده و بدنبال آن سلول‌های آسیب دیده بافت‌ها نتوانند ترمیم شوند. پس بر اساس این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که ژن‌های غیرکدکننده بلند بیان ژن‌های کدکننده را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بررسی نتایج هستی‌شناسی ژن PTGS1 نشان می‌دهد که این ژن در فرایند بیولوژیکی بیوسنتز پروستوگولاندین، پاسخ التهابی، پاسخ به استرس اکسیداتیو، تنظیم فشارخون، مسیریسیکلوآکسیژنازدخیل می‌باشد. در مسیر UP-KW-LIGAND در اتصال به هم، آهن و یون‌های فلزی دخیل است. این نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن PTGS1 توسط lncRNA های مرتبط با سندرم آسیب تحت تاثیر قرار می‌گیرد و هنگام بروز سندرم آسیب، lncRNA ها سبب بیان این ژن کدکننده پروتئین می‌شوند و این ژن با تولید پروتئین‌های مربوطه به اندام‌های درگیر کمک می‌کند تا عوارض این سندرم کاهش بیاید. لئو و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای بر نقش lncRNA روی رشد عضله اسکلتی پای جنین جوجه‌های کوه شیکاگو، ۸۷۴ ژن غیرکدکننده جدید کشف و شناسایی کردند که الگوی بیان ژن روز دوازدهم در بین جوجه‌ها متفاوت بود. به همین دلیل به نقش lncRNA در بیان ژن-های روز دوازدهم پرداختند. نتایج بررسی‌های آنها نشان داد که ژن‌های غیرکدکننده بلند نقش مهمی در رشد عضله پا دارند و پیشنهاد کردند که تحقیقات بیشتری به صورت مولکولی انجام بگیرد.

پژوهش نشان داد، lncRNAهای شناسایی شده احتمالاً پتانسیل ژن‌های درگیر در رشد عضله اسکلتی را داشته و می‌توانند بخشی از تفاوت در سرعت رشد مشاهده شده بین دونژاد مرغ مورد بررسی را توجیه کنند.

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر ضمن شناسایی lncRNAهای جدید در چهار بافت درگیر در سندرم آسیت، عملکرد lncRNAها در مرغان مبتلا به آسیت را شناسایی کرد و نشان داد RNA-seq به خوبی قادر به شناسایی lncRNAها است و آن‌ها نیز نقش قابل توجهی در تنظیم بیان ژن‌های همجوارشان دارند. مولکول‌های lncRNA ضمن این‌که می‌توانند به عنوان یک عامل پیش آگاهی دهنده برای تشخیص آسیت باشند. در اصلاح نژاد دام و طیور نیز به عنوان یک بیومارکر می‌توان از آن‌ها بهره برد. پیش بینی می‌شود lncRNAهایی که دارای تفاوت معنی‌دار در دو گروه سالم و آسیت هستند با احتمال زیاد با مسیرهای ضروری با سندرم آسیت مرتبط باشند.

ژای و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای بر روی مرغان گاش در هفته‌های مختلف رشد و نقش lncRNA در تشکیل بافت چربی شکم ۳۸۲۷ ژن غیرکدکننده جدید شناسایی کردند. بررسی هستی شناسی ژن‌ها نشان داد که lncRNA نقش تنظیمی مهمی در متابولیسم لیپید، تکثیر و تمایز سلول‌های چربی ایفاء می‌کنند. چن و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای بر روی ژن‌های دخیل در تشکیل چربی بر روی پرده ادیپوسیت شکم بر روی مرغ نقش تنظیمی RNAهای غیرکدکننده را بررسی کردند و مشاهده کردند که lncRNAها نقش مهمی در تشکیل پرده آدیپوسیت و تشکیل چربی بر روی آن دارند. تینگ و همکاران (۲۰۱۲) تحقیقی را در ارتباط با طول رشد ماهیچه اسکلتی مرغ انجام دادند و ۲۸۱ تا lncRNA جدید کشف کردند. آلبوشکه و همکاران (۱۳۹۸) در مطالعه‌ای بر روی عضله اسکلتی مرغان بومی اصفهان و جوجه تجاری راس به ترتیب ۱۴۳ و ۱۲۸ تا lncRNAهای جدید بین ژنی و اینترونی کشف و شناسایی کردند. بررسی جایگاه‌های ژنی lncRNAهای با بیان تفاوت معنی‌دار نشان داد که این ژن‌ها در مجاور ۴۵ ژن رمزکننده پروتئینی قرار داشتند. نتایج حاصل از آن

منابع مورد استفاده

- آلبوشکه، سیدنادر، بختیارزاده محمدرضا. ۱۳۹۸. شناسایی lncRNAهای مرتبط با رشد عضله سینه مرغ به وسیله روش RNA-seq. ۱۸۰-۱۶۵:۲.
- حسن پور کریم. ۱۳۹۴. بررسی ترنسکرپتوم و پروفایل بیان ژن مرغان حساس به آسیت. رساله دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
- حسن زاده، محمد. ۱۳۸۷. بیماریهای متابولیکی طیور، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران. صفحات ۸۹-۸۶.
- جباری رقیه. ۱۳۹۸. آنالیز پروفایل ترنسکرپتومی و فاکتورهای متابولیکی سندرم آسیت القا شده در یک لاین مرغ گوشتی، رساله دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- محمدی فر آمنه، فقیه ایمانی سید علی، محمدآبادی محمد رضا، سفلائی محمد. (۱۳۹۲). تأثیر ژن TGFβ3 بر ارزش های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۵(۴)، ۱۲۵-۱۳۶.
- Chen L, Zhang SH, Huang J, Zhang G, Xie K, Wang J, Wu H and Dai G, 2019. identification of Long Non-Coding RNA-Associated Competing Endogenous RNA Network in the Differentiation of chicken Preadipocytes Animal Genetics and Genomics. 10,795, doi.org/10.3390/10100795.
- Gupta P, Peter S, Jung M, Lewin A, Hemmrich-Stainsak G, Franke A, Kleist M., Schutte C, Einspanier R., Shabati S and Brugge J, 2019. Analysis of long non-coding RNA and mRNA expression in bovine macrophages brings up novel aspects of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infections. Scientific Reports, 9:1571. https://doi.org/10.1038/s41598-018-38141-x.
- Khabiri A, Toroghi R, Mohammadabadi M, Tabatabaeizadeh S, 2023. Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII. 1.1) isolated in Iran. Vet Res Forum 14 (4): 221-228.

- Liu J, Zhou Y, Hu X, Yang J, Lei Q, Liu W, Han H, Li F and Cao D, 2021. Transcriptome analysis reveals the profile of long non-coding RNAs during chicken muscle development. *Sec. Developmental Physiology*. Volume 12, <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.660370>.
- Li D, Li F, Jiang K, Zhang M, Han R, Jiang R, 2019. Integrative analysis of long noncoding RNA and mRNA reveals candidate lncRNAs responsible for meat quality at different physiological stages in Gushi chicken. *PLoS ONE* 14(4): e0215006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215006>.
- Liu L, Ren L, Liu A, Wang J, Wang, J and Wang Q, 2022. Genome-wide identification and characterization of long non-coding RNAs in embryo muscle of chicken. *Animals* 12, 1274. <https://doi.org/10.3390/ani12101274>.
- Marot A, Trepo E, Doerig C, Moreno C, Moradpour D and Deltenre P. 2015. Systematic review with meta-analysis: self-expanding metal stents in patients with cirrhosis and severe or refractory oesophageal variceal bleeding. *Journal Evidence based on Medicine*. 42:1250–1260. doi:10.1111/apt.13424125.
- Mohammadabadi MR, Nikbakhti M, Mirzaee HR, Shandi A, Saghi DA, Romanov DA, Moiseyeva IG. 2010. Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*. 46, 505-509.
- Mohammadifar A, Faghieh Imani SA, Mohammadabadi MR, Soflaei M, 2014. The effect of TGFb3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. *Agricultural Biotechnology Journal*. 5, 125-136 (In Persian).
- Mohammadifar A and Mohammadabadi MR, 2017. the effect of uncoupling protein polymorphisms on growth, breeding value of growth and reproductive traits in the fars indigenous chicken. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 7: 679-685.
- Mohammadifar A and Mohammadabadi MR, 2018. Melanocortin-3 receptor (mc3r) gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. *Malays Appl Biol* 47: 85–90.
- Ramasamy A, Mondry A, Holmes A and Altman D, 2008. key issues in conducting a meta-analysis of gene expression microarray datasets. *Plos Medicine*, doi.org/10.137/journal.pmed.0050184.
- Shahdadnejad N, Mohammadabadi MR and Shamsadini M, 2016. Typing of *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens using multiplex PCR. *Genetics Third Millennium*. 14 (4): 4368-4374.
- Tingting L, Suyu W, Rimao W, Xueya Z, Dahai Z and Yong Z, 2012, Identification of long non-protein coding RNAs in chicken skeletal muscle using next generation sequencing, *Genomics* 99(5): 292-298.
- Wang Y, Guo Y, Ning D, Peng Y, Cai H, Tan J, Yang Y and Liu D, 2012. Changes of hepatic biochemical parameters and proteomics in broilers with cold-induced ascites. *Journal of animal science and biotechnology*, 3(1), 41-49.
- Xu C, Yang M, Tian J, Wang X and Li Z, (2011) MALAT-1, a long non-coding RNA and its important 3'end functional motif in colorectal cancer metastasis. *International Journal of Oncology* 39(1): 169-75. doi: 10.3892/ijo.2011.1007.
- Yang Y, Gao M, Wu Z and Guo Y. 2010. Genistein attenuates low temperature induced pulmonary hypertension in broiler chicks by modulating endothelial function. *European Journal of Pharmacology* 649: 242-248.
- Zhai B, Zhao Y, Fan SH, Yuan P, Li H, Li SH, Li Y, Zhang Y, Huang H, Li H, Kangand H and Li G, 2021. Differentially expressed lncRNAs related to the development of abdominal fat in Gushi chickens and their interaction regulatory network. *Livestock Genomics*. 12: 1-12 <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.802857>.