

## Research Paper

# Identification of Single-Nucleotide Polymorphisms in *B3GAT2*, *CPQ*, and *HPSE* Genes in the Liver Tissue of Arian Broilers with Ascites using RNA-seq Data

Somayeh Hassnvand<sup>1</sup>, Ayoub Farhadi<sup>2</sup>, Elham Yonesi<sup>3</sup>, Ghodrat Rahimimianji<sup>4</sup> and Karim Hasan Pur<sup>5</sup>

1- Ph.D. Student of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran

2- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran, (Corresponding author: ayoubfarhadibo@gmail.com)

3- Ph.D. of Agricultural Biotechnology, Tabaristan Genetics and Biotechnology Research Institute, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran

4- Professor, Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Sari, Iran

5- Associate Professor, Department of Animal Science, Tabriz University, Tabriz, Iran

Received: 28 February, 2024

Accepted: 28 June, 2024

### Extended Abstract

**Background:** Broiler chickens are one of the important and strategic sources in the meat supply of Iran. The main origin of this vital industry is the line chicken, benefiting only a few countries. Iran is one of the countries with a broiler line called Arian. However, this line has not been able to satisfy customers due to some problems, including the high death rate due to the ascites syndrome, a key factor of mortality and losses in the poultry industry. Therefore, it seems necessary to pay attention to a sustainable solution to reduce this disease in the broiler farms of Iran. This syndrome involves different tissues, and an important tissue is the liver, which plays the main role in regulating metabolism in the whole body. The sustainable solution to reduce this syndrome in broiler farms is to create lines resistant to the ascites syndrome through breeding. The present study aimed to identify single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *CPQ*, *B3GAT2*, and *HPSE* genes in the liver tissue of Arian broiler chickens with ascites syndrome using RNA-seq data.

**Methods:** This research was conducted in two phases, including the first phase (ascites induction) and the second phase (normal rearing conditions). In the first phase, 817 one-day-old chicks from 71 paternal stepfamilies from the B Arian line, which were sexed and numbered on the first day, were obtained from the Arian line chickens located in the Babolkanar farms in Mazandaran province and were reared at the Khalat Pushan Poultry Breeding Station at Tabriz University. The birds that showed signs of ascites were classified as susceptible to ascites, and the rest of the birds were classified as healthy. Total RNA from the liver tissue was extracted from 32 birds, including 16 healthy (8 males and 8 females) and 16 diseased (8 males and 8 females) birds individually. An equal amount of RNA from four birds was merged with each other to obtain a total of eight merged samples, four samples from each of healthy and ascites-affected birds. The quantity and quality of the extracted RNA were measured by a UV-1800/SHIMMADZU nanodrop and 1.5% agarose gel. Then, the extracted RNA was treated and purified by DNase. The samples were sequenced using Illumina sequencing technology. The quality of the reads was controlled using FASTQC software, and the reads were aligned using STAR software. After aligning the sequences against the reference genome, the tools provided in two software packages, Picard tools, and GATK, were used to identify the variants in each sample.

**Results:** All the quality control indicators of FASTQC software showed the appropriate quality of the studied data. After quality control, the RNA-seq data of the liver tissue were mapped on the reference genome. About 90% of the reads were mapped on the reference genome, which indicates the high quality of the sequenced data alignment compared to the reference genome. Based on previous reports, the *CPQ* gene was considered an important gene related to ascites in this study. To fully understand the importance of this gene in disease-related phenotypes, the gene network, and protein interaction with other proteins, the protein network of this gene was drawn based on STRING. The ontology (GO) of 49 genes related to each other based on the string was performed in DAVID software. According to our observation, *CPQ*, *HPSE*, and *B3GAT2* genes are involved in important biological pathways related to ascites disease. Then, the genes related



to *CPQ*, *B3GAT2*, and *HPSE* genes, which were also related to ascites and contained SNPs in the samples with ascites, were selected and studied in this step. In this study, eight and three SNPs were detected in the *CPQ* gene in the samples with ascites and healthy samples, respectively, which were identified and reported for the first time in this study. The *CPQ* gene is the most prominent ascites candidate gene identified to date, which can be used in marker-assisted selection to increase ascites resistance in breeding programs. Moreover, four and one SNPs were detected in *HPSE* and *B3GAT2* genes in ascites samples, respectively. However, no polymorphism was found for these genes in healthy samples. Heparanase (HPSE) is an endoglycosidase that catalyzes the cleavage of side chains of heparan sulfate proteoglycans. Therefore, it plays a role in the regeneration of extracellular matrix and basement membranes, as well as the release of various molecules related to heparan sulfate as growth factors, cytokines, and enzymes.

**Conclusion:** The polymorphisms identified in this research can be used to select ascites-resistant lines of broiler chickens in breeding programs by further investigating and confirming their effects on ascites.

**Keywords:** RNA-seq, Ascites, Marker-assisted selection, Broiler, Single-nucleotide polymorphism

**How to Cite This Article:** Hassnvand, S., Farhadi, A., Yonesi, E., Rahimimianji, Gh., & Hasanpour, K. (2024). Identification of Single-Nucleotide Polymorphisms in *B3GAT2*, *CPQ*, and *HPSE* Genes in the Liver Tissue of Arian Broilers with Ascites using RNA-seq Data. *Res Anim Prod*, 15(3), 10-19. DOI: [10.61186/rap.15.3.10](https://doi.org/10.61186/rap.15.3.10)



## مقاله پژوهشی

شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های *HPSE* و *CPQ*، *B3GAT2* در بافت کبد جوجه‌های گوشتی نژاد آرین مبتلا به آسیت با استفاده از داده‌های RNA-seqسمیه حسونود<sup>۱</sup>، ایوب فرهادی<sup>۲، ID</sup>، الهام یونسی<sup>۳</sup>، قدرت رحیمی میانجی<sup>۴</sup> و کریم حسن‌پور<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران  
 ۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، (نویسنده مسوول: ayoubfarhadi60@gmail.com)  
 ۳- دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده ژنتیک و ریست فناوری طبرستان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران  
 ۴- استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران  
 ۵- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۸

صفحه: ۱۰ تا ۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۹

## چکیده مبسوط

**مقدمه و هدف:** جوجه‌های گوشتی یکی از منابع مهم و استراتژیک در تأمین گوشت کشور به‌شمار می‌روند. مبدأ اصلی این صنعت حیاتی مرغ لاین است که تنها چند کشور از آن بهره‌مند هستند. ایران یکی از کشورهایی است که دارای لاین مرغ گوشتی است که آرین نام دارد. اما این لاین به‌دلیل بروز برخی مشکلات از جمله بالا بودن نرخ مرگ و میر به‌علت سندرم آسیت نتوانسته در جلب رضایت مشتری موفق باشد. سندرم آسیت یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر و ضرر و زیان در صنعت طیور به‌شمار می‌رود. بنابراین، توجه به یک راه‌حل پایدار در کاهش این بیماری در مزارع پرورش جوجه‌های گوشتی کشور ضروری به‌نظر می‌رسد. این سندرم بافت‌های مختلفی را درگیر می‌کند، یکی از بافت‌های مهم کبد است که نقش اصلی را در تنظیم متابولیسم در کل بدن ایفا می‌کند. راه‌حل پایدار در کاهش این سندرم در مزارع جوجه‌های گوشتی ایجاد لاین‌های مقاوم به سندرم آسیت از طریق اصلاح نژاد می‌باشد. هدف از این مطالعه شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی ژن‌های *CPQ*، *B3GAT2* و *HPSE* در بافت کبد جوجه‌های گوشتی آرین مبتلا به سندرم آسیت با استفاده از داده‌های RNA-seq بوده است.

**مواد و روش‌ها:** این پژوهش در دو فاز شامل فاز اول (القاء آسیت) و فاز دوم (شرایط پرورش نرمال) انجام شد. در فاز اول ۸۱۷ قطعه جوجه یک‌روزه از ۷۱ خانواده ناتنی پدري از خط B آرین که در روز اول تعیین جنسیت و شماره‌زنی شده بودند، از مرغ لاین آرین واقع در مزارع بابل‌کنار استان مازندران تهیه و در ایستگاه پرورش طیور خلعت پوشان دانشگاه تبریز پرورش داده شدند. پرنده‌گانی که علائم آسیت را نشان دادند در دسته حساس به آسیت و بقیه پرنده‌گان در گروه سالم طبقه‌بندی شدند. استخراج RNA کل از تعداد ۳۲ پرنده شامل ۱۶ پرنده سالم (۸ پرنده نر و ۸ پرنده ماده) و ۱۶ پرنده بیمار (۸ پرنده نر و ۸ پرنده ماده) به‌صورت انفرادی از بافت کبد انجام شد. مقدار مساوی از RNA ۴ پرنده با یکدیگر ادغام شده و در مجموع ۸ نمونه ادغام شده به‌دست آمد که ۴ نمونه مربوط به پرنده‌گان سالم و ۴ نمونه دیگر مربوط به پرنده‌گان آسیتی بود. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت RNA استخراج شده توسط نانودراپ مدل UV-1800/SHIMMADZU و ژل آگارز ۱/۵ درصد سنجیده شد. سپس RNA استخراج شده توسط DNase تیمار و خالص‌سازی گردید. تعیین توالی نمونه‌ها با استفاده از فن‌آوری توالی‌یابی ایلومینا انجام گرفت. کنترل کیفیت خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastQC انجام و هم‌ردیفی خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار STAR انجام گرفت. بعد از هم‌ترازی توالی‌ها با ژنوم مرجع از ابزارهای فراهم شده در دو مجموعه نرم‌افزاری Picard tools و gatk به‌منظور شناسایی واریانت‌های موجود در هر نمونه استفاده شد.

**یافته‌ها:** تمامی شاخص‌های کنترل کیفیت نرم‌افزار FASTQC نشان دهنده کیفیت مناسب داده‌های مورد مطالعه بود. پس از کنترل کیفیت، داده‌های RNA-seq بافت کبد روی ژنوم مرجع مکان‌یابی شدند. حدود ۹۰ درصد از خوانش‌ها روی ژنوم مرجع مکان‌یابی شدند که این میزان نشان دهنده کیفیت بالای هم‌ردیفی داده‌های توالی‌یابی شده نسبت به ژنوم مرجع است. براساس یافته‌های پیشین، در این مطالعه ژن *CPQ* به‌عنوان ژن مهم و مرتبط با آسیت در نظر گرفته شد. برای درک کامل اهمیت این ژن در فنوتیپ‌های مرتبط با بیماری، درک شبکه ژنی و برهم‌کنش پروتئین با پروتئین‌های شبکه پروتئینی این ژن براساس STRING ترسیم گردید. هستی‌شناسی (GO) ۴۹ ژن که براساس string با هم در ارتباط بودند، در نرم‌افزار DAVID انجام شد و مشخص شد که ژن‌های *HPSE*، *CPQ* و *B3GAT2* در مسیرهای بیولوژیکی مهمی که با بیماری آسیت مرتبط است، نقش دارند. از بین ژن‌های مرتبط با ژن *CPQ* دو ژن *B3GAT2* و *HPSE* که با آسیت نیز مرتبط بودند و دارای SNP در نمونه‌های مبتلا به آسیت بودند انتخاب گردید و مورد مطالعه قرار گرفتند. سپس ژن‌های مرتبط با ژن *CPQ* دو ژن *B3GAT2* و *HPSE* که با آسیت نیز مرتبط بودند و دارای SNP در نمونه‌های مبتلا به آسیت بودند انتخاب گردید و مورد مطالعه قرار گرفتند. در این پژوهش در ژن *CPQ* در نمونه‌های مبتلا به آسیت تعداد ۸ و در نمونه‌های سالم تعداد ۳ چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی شناسایی شد که برای اولین‌بار در این پژوهش شناسایی و گزارش شده‌اند. ژن *CPQ* برجسته‌ترین ژن کاندید آسیت است که تا به‌امروز شناسایی شده است، که می‌تواند در فرایند انتخاب به‌کمک نشانگر برای افزایش مقاومت به آسیت در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین در ژن‌های *HPSE* و *B3GAT2* در نمونه‌های مبتلا به آسیت به‌ترتیب تعداد ۴ و ۱ چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی شناسایی شد. اما برای این ژن‌ها در نمونه‌های سالم چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی یافت نشد. هپاراناز (HPSE) یک اندوگلیکوزیداز است که برش زنجیره‌های جانبی پروتئوگلیکان‌های هیپاران سولفات را کاتالیز می‌کند. بنابراین در بازسازی ماتریکس خارج سلولی و غشاهای پایه و همچنین آزادسازی مولکول‌های مختلف مرتبط با هیپاران سولفات به‌عنوان فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و آنزیم‌ها نقش دارد. **نتیجه‌گیری:** از چندشکلی‌های شناسایی شده در این پژوهش با بررسی بیشتر و تأیید تأثیر آن‌ها بر آسیت می‌توان برای انتخاب لاین‌های جوجه‌های گوشتی مقاوم به سندرم آسیت در برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آسیت، انتخاب به‌کمک نشانگر، جوجه گوشتی، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، RNA-seq

## مقدمه

در شرایط غیرعادی مانند هوای سرد، ارتفاع زیاد محیط و هیپوکسی به‌وجود می‌آید (Hyatt & Smith, 1954). در سال ۱۹۸۵ از مناطق شمال آمریکا گزارش‌هایی مربوط به آسیت ارائه شد. بلافاصله پس از آن، این بیماری به‌عنوان مشکلی در

سندرم فشار خون ریوی در طیور مدرن نتیجه منفی انتخاب ژنتیکی فشرده برای وزن بالا است. این سندرم در دهه ۱۹۵۰ به‌عنوان یک مشکل جدی شناخته شد که در جوجه‌های گوشتی

می‌شود و پس از آن گشاد شدن بطن راست و بالا رفتن فشار خون ریه تبدیل به یک علت برجسته‌ای از بیماری و مرگ در جوجه‌های گوشتی می‌شود (Fathi & Haydari, 2016). در یک مطالعه مشاهده شد که شیوع بالای آسیت در جوجه‌های گوشتی با رشد بالا اتفاق می‌افتد (De Greef *et al.*, 2001). ژنتیک مولکولی اهمیت ویژه و خاصی در انتخاب و اصلاح نژاد دام‌ها دارد، زیرا با استفاده از آن می‌توان انتخاب دقیق‌تری داشت و باعث پاسخ به انتخاب سریع‌تر می‌شود. انتخاب براساس نشانگرهای ژنتیکی یکی از راهکارهای مؤثر در اصلاح نژاد است که منجر به افزایش تولید می‌شود (Mohammadifar *et al.*, 2014). اصلاح نژاد و ایجاد سویه‌های مقاوم به آسیت به‌عنوان راهکار بلندمدت درمان آسیت در نظر گرفته می‌شود (Hasanzadeh, 2010). در طی این سال‌ها حوزه ژنتیک مولکولی پیشرفت‌های زیادی داشته است و بسته‌های نشانگری مختلف با تراکم بالا برای مرغ توسعه یافته است. همچنین کاهش قیمت روزافزون آنها استفاده از این بسته‌های نشانگری برای اصلاح نژاد طیور در مقیاس وسیع را فراهم کرده است. علاوه بر این هزینه‌های توالی‌یابی در حال کاهش است که این امکان را فراهم می‌آورد که مطالعات گسترده‌ای روی صفاتی مانند آسیت در سطح نوکلئوتیدی فراهم شود (Faraji *et al.*, 2019). در دانشگاه آرکانزاس آمریکا فعالیت‌های ویژه‌ای برای ژن مؤثر در بروز آسیت انجام شده است و در طی پژوهشی دو لاین حساس و مقاوم به آسیت ایجاد کردند. در گزارشی محققین این دانشگاه مشاهده کردند که در نسل ۱۴ در لاین مقاوم ۷ درصد و در لاین حساس ۹۸ درصد به آسیت مبتلا شده‌اند (Wideman *et al.*, 2013). وراثت‌پذیری آسیت نسبتاً بالاست و بین ۰/۲۲ تا ۰/۴۱ گزارش شده است که نشان می‌دهد مقاومت به آسیت از نظر ژنتیکی می‌تواند افزایش پیدا کند (Lubritz *et al.*, 1995; Moghadam *et al.*, 2001; Pavlidis *et al.*, 2007). همچنین گروهی از محققین برنامه اصلاح نژاد برای توسعه جوجه‌های گوشتی مقاوم به آسیت براساس SNP ارائه کرده‌اند که موفقیت‌آمیز بوده است (Lee *et al.*, 2022). یکی از مزایای عمده نشانگرهای مولکولی، تشخیص جایگاه صفات کمی مرتبط با بیماری‌های مختلف است. تشخیص انواع SNP، InDel و SSR گام مهمی در درک رابطه بین ژنوتیپ و فنوتیپ است (Metzker, 2010). تشخیص SNP توسط توالی‌یابی RNA برای حیوانات اهلی روشی مناسب است، زیرا توالی‌یابی کل ژنوم گران است و ابزار توالی‌یابی اگزوم در دسترس نیست. این SNP‌هایی که در مناطق بیان شده شناسایی می‌شوند می‌توانند برای توصیف عملکرد پروتئین و مطالعه ژن‌های مورد استفاده توسط تجزیه و تحلیل بیان اختصاصی آلل در بافت هدف استفاده شوند (Jehlet *et al.*, 2021).

در مطالعه‌ای با روش توالی‌یابی جهش فقدان عملکرد p.R12X در ژن *SLC37A2* در نژاد گاو هلشتاین ایران شناسایی کردند و بیان کردند که این جهش نقش مهمی در سقط جنین در گاو دارد و از این نتایج می‌توان برای بهبود این عارضه استفاده کرد (Hoseini, 2020). همچنین در پژوهشی دیگر فقدان عملکرد p.Q579X در ژن *APAF1* در گاو

طیور نگهداری شده در مناطق مرتفع مطرح شده و به‌همین دلیل در ابتدا این بیماری به‌عنوان بیماری مناطق مرتفع شناخته می‌شد. اما امروزه این بیماری در مناطق کم‌ارتفاع نیز دیده می‌شود. در بعضی موارد تلفات آسیت بیش از ۳۰ درصد گزارش شده است (Wideman *et al.*, 2013). بدین لحاظ زیان‌های اقتصادی حاصله بسیار شدید می‌باشد. حیاتی‌ترین صنعت در کشور بعد از نفت صنعت طیور است، از سوی دیگر، مرغ در تأمین منبع اصلی پروتئین با کیفیت بالا (تولید گوشت و تخم مرغ) برای انسان و همچنین به‌عنوان حیوان نمونه در مطالعات ژنومی اهمیت دارد (Khabiri *et al.*, 2023; Shahdadnejad *et al.*, 2016). هر ساله میلیاردها جوجه برای تأمین نیاز دائمی پروتئین حیوانی پرورش می‌یابد (Mohammadifar & Mohammadabadi, 2018). شاهرگ این صنعت حیاتی مرغ لاین است که فقط چند کشور از آن بهره‌دارند. ایران یکی از کشورهای است که دارای لاین اصلاح شده مرغ گوشتی است که آسیت نام دارد. اما این لاین به دلیل مشکلات متعدد از جمله بالا بودن نرخ مرگ‌ومیر آن به علت بروز آسیت نتوانسته در جلب رضایت مشتری موفق باشد. میزان بروز آسیت در این سویه به ۱۰ درصد می‌رسد (Azizian *et al.*, 2013). در حالی که مرگ‌ومیر در سویه‌های دیگر به دلیل بروز آسیت کمتر از ۸ درصد است (Dominguez- Avila *et al.*, 2013). اکثر محققین معتقدند که آسیت با فاکتورهای ژنتیکی، محیطی، مدیریت و تغذیه مرتبط است (Hasanpur *et al.*, 2016; Julian *et al.*, 1989; Kalmar *et al.*, 2013). تشریح و فیزیولوژی سیستم تنفسی در ابتلا جوجه‌های گوشتی به سندرم آسیت نقش مهمی دارد. اصلاح نژاد طیور برای افزایش بازده اقتصادی، باعث انتخاب نژادهایی شده است که رشد سریع دارند، در اثر این انتخاب وزن زنده و حجم سینه به‌طور پیوسته افزایش پیدا کرده است اما در مقابل حجم قلب و ریه افزایش نیافته است و باعث ایجاد سویه‌های گوشتی شده است که مستعد بروز نارسایی‌های فیزیولوژیکی و بیماری‌های متابولیکی مانند سندرم آسیت هستند (Druyan *et al.*, 2011; Cahaner, 2007; Hassanpour *et al.*, 2011). مطالعات تأیید کرده‌اند که سرعت رشد، درجه حرارت پایین و رژیم غذایی با انرژی بالا، نیاز به اکسیژن را افزایش می‌دهند و در پاسخ به افزایش نیاز به اکسیژن، سیستم عصبی مرکزی قلب را تحریک به فعالیت بیشتر نموده و بطن راست خون بیشتری به سمت ریه‌ها پمپ می‌کند. در واکنش به افزایش فعالیت بطن راست قلب، توده عضلانی بطن راست قلب بزرگ شده (هایپرتروفی) و این تغییر موجب ضعف کارکرد دریاچه سه‌لختی بین دهلیز و بطن راست می‌شود. لذا هنگام انقباض بطن راست جهت ارسال خون به سرخرگ‌های ریوی، این دریاچه به‌خوبی بسته نمی‌شود و مقداری خون از طریق بطن و دهلیز راست به بزرگ سیاهرگ خلفی پس زده می‌شود و سبب بالا رفتن فشار خون در سیاهرگ‌های کبد می‌شود. همین عامل منجر به آسیب سلول‌های کبدی و سپس آب‌آوردگی کبد و تجمع مایعات در حفره شکمی شده و باعث بروز آسیت می‌شود (De Greef *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2001). همچنین گزارش شده که آسیت باعث نارسایی دریاچه قلب و ضعف بطن راست قلب

جنسیت و شماره‌زنی شده بودند، از مرغ لاین آرین واقع در مزارع بابل کنار استان مازندران (ایران) تهیه و در ایستگاه پرورش طیور خلعت پوشان دانشگاه تبریز (ایران) پرورش داده شدند. در این پژوهش برای القاء سندرم آسیب از تنش سرمایی به‌همراه جیره با سطح انرژی بالا و همچنین سطح ارتفاع بالا استفاده شد و همچنین جهت القاء از ایجاد کوران هوا و سرد نگه‌داشتن سالن در مرحله پرورش همراه با القاء استفاده شد. در روزهای اول و دوم دمای سالن پرورش ۳۴ درجه سانتی‌گراد بود دمای روزانه تا روز ۲۱ پرورش روزانه ۱ درجه کاهش می‌یافت که در روز ۲۱ دوره دمای سالن به ۲۴ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت، و تا پایان دوره پرورش دمای سالن در ۲۴ درجه حفظ شد. سایر پروتکل‌های مدیریتی اعم از واکسیناسیون، تیمارهای غذایی (جیره غذایی به‌صورت آردی و بر پایه ذرت و سویا) در تمام طول دوره پرورش به‌صورت استاندارد دنبال شد. بعد از اتمام فاز همراه با القای آسیب (فاز اولیه پرورش) سالن پرورش برای اجرای فاز نرمال (جوجه‌های پرورش یافته در فاز استاندارد) جهت پرورش ۸۲۹ جوجه از همان خانواده‌های پرورش یافته در فاز آزمایشی (تحت تنش سرمایی) آماده شد. طول دوره پرورشی در هر دو فاز پرورشی ۴۹ روز بود (Malekshahdehi et al., 2017).

پرنده‌گانی که علائم آسیب را نشان دادند در دسته حساس به آسیب و بقیه پرنده‌گان در گروه سالم طبقه‌بندی شدند. جهت بررسی‌های بافتی و آزمایشات متعاقباً جهت فرآیند استخراج DNA و RNA نمونه‌های بافت کبد پرنده‌های شناسایی شده در گروه‌های حساس و مقاوم (که در حین پروسه پرورش مشخص شدند) در روز ۳۹ دوره پرورش نمونه‌گیری‌ها انجام شد. نمونه‌ها ابتدا در ازت مایع قرار داده شدند و سپس تا زمان استخراج DNA و RNA در یخچال و در دمای ۸۰- نگه‌داری شدند.

استخراج RNA کل از تعداد ۳۲ پرنده ۱۶ پرنده سالم (۸ پرنده نر و ۸ پرنده ماده) و ۱۶ پرنده بیمار (۸ پرنده نر و ۸ پرنده ماده) به‌صورت انفرادی از بافت کبد انجام شد. مقدار مساوی از RNA ۴ پرنده با یکدیگر ادغام شده و در مجموع ۸ نمونه ادغام شده به‌دست آمد که ۴ نمونه مربوط به پرنده‌گان سالم و ۴ نمونه دیگر مربوط به پرنده‌گان آسیبی بود. پس از استخراج RNA، کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، توسط نانودراپ مدل UV-1800/SHIMMADZU و ژل آگارز یک و نیم‌درصد سنجیده شد. سپس RNA استخراج شده توسط DNase تیمار و خالص‌سازی گردید. تعیین توالی نمونه‌ها با استفاده از فن‌آوری توالی‌یابی ایلومینا انجام گرفت.

کنترل کیفیت خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastQC (Andrews, 2010) انجام شد. سپس خوانش‌های با کیفیت مناسب در برابر ژنوم مرجع Gallus gallus Gallus\_gallus.bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b.107 (gtf) با استفاده از الاینر STAR (Dobin et al., 2013)، (<https://anaconda.org/bioconda/star>) هم‌ردیف و مکان‌یابی شدند. بعد از هم‌ترازی توالی‌ها با ژنوم مرجع از ابزارهای فراهم شده در دو مجموعه نرم‌افزاری picardtools (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) و GATK به‌منظور

هلشتاین با روش توالی‌یابی برای بهبود سقط خودبه‌خودی در گاو هلشتاین شناسایی کردند (Enayat, 2021). در یک مطالعه گزارش شده که ژن CPQ اولین نشانگر اثبات شده در جوجه‌های گوشتی برای مقاومت نسبت به آسیب است (Dey et al., 2018). در پرورش مدرن جوجه‌های گوشتی، رشد سریع، عملکرد بالا و راندمان غذایی بالا اهمیت دارد. فشار این انتخاب‌ها باعث دگرگون شدن تنظیم ژن‌های کلیدی در مسیرهایی شده است که در متابولیسم نقش دارند به‌گونه‌ای که به رشد و کارایی بیشتر کمک کنند. ویرایش RNA رایج‌ترین تغییرات پس از رونویسی است که به تنوع رونوشت کمک می‌کند. این تغییرات شامل اصلاح نوکلئوتیدهای خاص در توالی RNA، بدون تغییر DNA الگوی آن است (Shafiei et al., 2018). فراخوانی واریانت‌ها با استفاده از داده‌های RNA-Seq کاربردهای متعددی دارد، اعتبارسنجی واریانت‌های شناسایی شده با توالی‌یابی ژنوم را امکان‌پذیر می‌کند. همچنین تغییرات بالقوه پس از رونویسی برای تنظیم ژن را آشکار می‌کند و امکان شناسایی واریانت‌های شناسایی نشده‌ی قبلی که ممکن است از نظر عملکردی مهم باشند را فراهم می‌کند، که به‌دست آوردن آنها با توالی‌یابی DNA با هزینه کمتر دشوار است (Adetunji et al., 2019).

با توجه به اینکه جوجه‌های گوشتی یک منبع مهم تأمین گوشت در کشور به‌شمار می‌روند و همچنین با توجه به ضرر و زیان وارد شده از سندرم آسیب به صنعت مرغ گوشتی کشور، توجه به یک راه‌حل پایدار در کاهش این بیماری در مزارع پرورش جوجه‌های گوشتی کشور ضروری است. یک راه‌حل پایدار در این مورد می‌تواند شناسایی واریانت‌های ژنتیکی مقاوم به آسیب و استفاده از آنها در انتخاب والدین نسل آینده باشد. بنابراین طراحی یک خط والدین مقاوم به آسیب، براساس شناسایی نشانگرهای مولکولی می‌تواند مسیر جدیدی برای مقابله با بحران PHS در سراسر جهان باشد. در این مطالعه ما از توالی‌یابی RNA برای شناسایی SNP‌های مشاهده شده در ژن‌های مرتبط با آسیب استفاده کردیم. در این مطالعه به بررسی واریانت‌های مرتبط با ژن‌هایی که در بروز سندرم آسیب در جوجه‌های گوشتی نقش مهمی دارند پرداخته شد. تحقیقات متعدد وراثت‌پذیری بالای آسیب را تخمین زده‌اند این نشان دهنده اهمیت بخش ژنتیکی آسیب است که نقش کلیدی در آسیب دارند، بروز آسیب در جوجه‌های گوشتی مدرن را می‌توان با انتخاب ژنتیکی مؤثر کاهش داد، بنابراین ضروری است که تحقیقاتی در مورد اساس ژنتیکی آسیب انجام گیرد (Druyan & Cahaner, 2007; Lahav et al., 2006; Pavlidis et al., 2007).

### مواد و روش‌ها

این پژوهش در دو فاز شامل فاز اول (القاء آسیب) و فاز دوم (شرایط پرورش نرمال) انجام گرفت. سپس از صفات اوزان هفتگی (در هر دو فاز پرورشی)، ثبت رکورد برخی پارامترهای خونی، متابولیسمی و برخی از فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی در پرنده‌های آسیبی و سالم و نمونه‌برداری از بافت کبد، جوجه‌های سالم و آسیبی انجام شد. در فاز اول ۸۱۷ قطعه جوجه یک روزه از ۷۱ خانواده نانتی پدیری از خط B آرین که در روز اول تعیین



اطلاعات ژنومی ژن‌های موردنظر از پایگاه داده Ensemble (<http://asia.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>) استخراج گردید. سپس به منظور معرفی جهش‌های اختصاصی در هر دو گروه سالم و مبتلا به آسیت، جهش‌های مشاهده شده در هر یک از ژن‌ها به تفکیک گروه‌های آزمایشی گزارش گردید.

### نتایج و بحث

دوازده شاخص کنترل کیفیت نرم‌افزار FASTQC نشان دهنده کیفیت مناسب داده‌های مورمطالعه به‌ازای هر باز و خوانش صحیح همی آن‌ها براساس میزان باز N به‌ازای هر توالی بود. داده‌های RNA-seq بافت کبد بر روی ژنوم مرجع مکان‌یابی شدند که حدود ۹۰ درصد از خوانش‌ها روی ژنوم مرجع مکان‌یابی شدند که این میزان نشان دهنده کیفیت بالایی هم‌ردیفی داده‌های توالی‌یابی شده نسبت به ژنوم مرجع است (جدول ۱).

شناسایی واریانت‌های موجود در هر نمونه استفاده شد. واریانت‌های شناسایی شده شامل SNPها و Indelها بود. سپس با مقایسه فایل‌های مربوط به SNPهای نمونه‌های سالم و بیمار به‌وسیله‌ی ابزار bcftools جهش‌های اختصاصی هر یک از گروه‌های سالم و بیمار شناسایی و در مراحل بعدی مطالعه استفاده شدند. به‌منظور تفسیر چندشکلی‌های شناسایی شده و انتساب ژن به هر جایگاه شناسایی شده از برنامه SnpEff استفاده شد. در این پژوهش ابتدا واریانت‌ها در همه نمونه‌های سالم و بیمار شناسایی گردید. سپس براساس مطالعه گزارش‌های پیشین (Almansaf, 2022; Cheng *et al.*, 2021; Dey *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2021; Hossain & Akter, 2022; Liu *et al.*, 2017). ژن CPQ به‌عنوان ژن مهم و مرتبط با آسیت انتخاب گردید و شبکه برهم‌کنش پروتئینی این ژن با ژن‌های دیگر با استفاده از پایگاه داده String ترسیم شد و در نهایت SNPهایی که در این پژوهش شناسایی و در این ژن‌ها مشاهده گردید گزارش شد. در ادامه

جدول ۱- خلاصه اطلاعات آماری خوانش‌های مکان‌یابی شده روی ژنوم مرجع

Table 1. Summary of statistical information of mapped reads on the reference genome

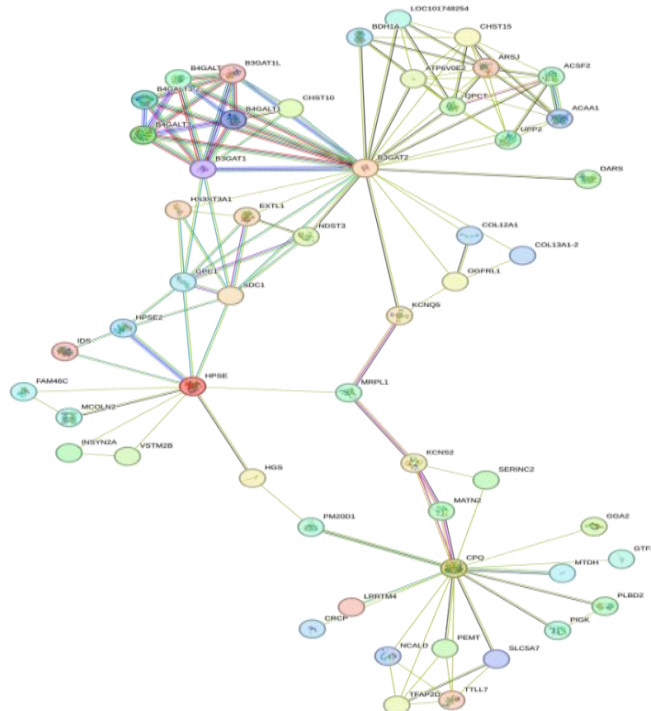
Sample نمونه	Avg. input reads میانگین خوانش‌های خام	Input length طول هر خوانش خام	Avg uniquely mapped reads میانگین خوانش‌های هم‌ردیف شده صحیح	% uniquely mapped reads خوانش‌های هم‌ردیف شده صحیح %
He	19107852۲	274	17115730	89.50
As	19557918	274	17853944	91.23

He مربوط به نمونه‌های سالم و As مربوط به نمونه‌های مبتلا به آسیت است.

He is related to healthy samples and As corresponds to samples with ascit

ترسیم گردید. از بین ژن‌های مرتبط با ژن CPQ دو ژن *B3GAT2* و *HPSE* که با آسیت نیز مرتبط بودند و دارای SNP در نمونه‌های مبتلا به آسیت بودند انتخاب گردید و مورد مطالعه قرار گرفتند. این ارتباط در شکل ۱ نشان داده شده است.

در این مطالعه ژن CPQ به‌عنوان ژن مهم و مرتبط با آسیت در نظر گرفته شد. برای درک کامل اهمیت ژن در فنوتیپ‌های مرتبط با بیماری، درک شبکه ژنی و برهم‌کنش پروتئین با پروتئین‌های دیگر ضروری است. بنابراین شبکه پروتئینی این ژن براساس STRING



شکل ۱- تجزیه و تحلیل شبکه‌ای ژن‌های مرتبط با ژن CPQ براساس STRING  
Figure 1. network analysis of genes related to CPQ gene based on STRING

ارتباط این SNP ها با آسیب می‌توان برای انتخاب جوجه‌های گوشتی مقاوم به سندرم آسیب استفاده کرد (جدول ۲). همچنین در ژن‌های *HPSE* و *B3GAT2* به ترتیب ۴ و ۱، SNP فقط در جوجه‌های گوشتی مبتلا به آسیب شناسایی شد اما در جوجه‌های گوشتی سالم SNP مربوط به این ژن‌ها یافت نشد (جدول ۲).

در ژن *CPQ* تعداد ۱۱، SNP شناسایی شد، از این تعداد SNP شناسایی شده، تعداد ۸، SNP فقط در نمونه‌های کبد جوجه‌های گوشتی لاین آرین مبتلا به آسیب مشاهده شد و از این تعداد ۳، SNP فقط در جوجه‌های گوشتی سالم مشاهده شد. این SNP ها تاکنون گزارش نشده‌اند و برای اولین بار در این پژوهش شناسایی و گزارش شده‌اند، با بررسی بیشتر و تأیید

جدول ۲- چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در ژن‌های *CPQ*، *HPSE* و *B3GAT2*

Table2. Single nucleotide polymorphisms identified in *CPQ*, *HPSE* and *B3GAT2* genes

نمونه‌های سالم Healthy samples		نمونه‌های مبتلا به آسیب Samples with ascites		
موقعیت SNP SNP position	نوع آلل Allele type	موقعیت SNP SNP position	نوع آلل Allele type	نام SNP SNP name
126894074	T/G	126900581	C/T	-
126915014	C/G	126901357	T/G	-
126976606	C/G	126901383	G/C	-
-	-	126901407	G/A	-
-	-	126901653	G/A	-
-	-	126901667	G/A	-
-	-	126901685	G/A	-
-	-	126901795	C/A	-
-	-	46019700	T/A	Rs314355765
-	-	46020793	T/C	Rs733053270
-	-	46021350	G/C	Rs741116515
-	-	46021374	T/C	Rs317581125
-	-	82243879	A/G	Rs732196677

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد پروتئین *CPQ* در آزادسازی تیروکسین نقش دارد، بنابراین، بیان بیش از حد ژن می‌تواند به افزایش تولید تیروکسین و تری‌یدوتیرونین در طول نیاز به اکسیژن کمک کند و در نتیجه با افزایش مقاومت در برابر آسیب به پرندگان اجازه می‌دهد تا با نرخ متابولیسم بالاتر کنار بیایند. ژن *CPQ* برجسته‌ترین ژن کاندید آسیب است که تا به امروز شناسایی شده است که می‌تواند در انتخاب به کمک نشانگر برای افزایش مقاومت به آسیب استفاده شود (Dey et al., 2018).

ژن *B3GAT2* روی کروموزوم شماره ۳ قرار دارد و دارای ۲ ترانسکریپت است که پروتئین *Glycosyltransferase* را کد می‌کند. گلیکوزیل ترانسفرازها آنزیم‌هایی هستند که پیوندهای گلیکوزیدی طبیعی را ایجاد می‌کنند (Williams & Thorson, 2009). گلیکوزید هیدرولازها در مجرای روده و بزاق نیز یافت می‌شوند که در آنجا کربوهیدرات‌های پیچیده مانند لاکتوز، نشاسته، ساکارز و ترهالوز را تجزیه می‌کنند (Henrissat & Davies, 1997). نتیجه انتقال گلیکوزیل می‌تواند کربوهیدرات، گلیکوزید، الیگوساکارید یا پلی‌ساکارید باشد. *B3GAT2* در درجه اول در نورون و بافت‌ها بیان می‌شود و در مراحل اولیه سنتز پروتئوگلیکان نقش دارد (Imiya et al., 2002).

ژن *HPSE* در کروموزوم شماره ۴ قرار دارد، دارای ۱۲ اگزون و ۴ ترانسکریپت است. این ژن پروتئین *Glycosidehydrolase* را کد می‌کند. این پروتئین در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی در پردازش گلیکوپروتئین‌ها و در لیزوزوم به عنوان آنزیم‌های دخیل در تخریب ساختارهای

در مطالعه‌ای برای شناسایی ژن‌های مرتبط با آسیب ۶۴ ژن شناسایی شد که دارای SNP های متفاوتی بودند. یکی از این ژن‌ها، ژن *CPQ* بود. همچنین یافته‌های این پژوهش ممکن است با زمینه ژنتیکی فشار خون ریوی در انسان مرتبط باشد (Parveen et al., 2020). در مطالعات ژنومی ارتباط ژن *CPQ* با فشار خون ریوی در انسان تأیید شده است. همچنین با اطلاعاتی که از ارتباط ژن *CPQ* با آسیب در جوجه‌های گوشتی وجود دارد می‌تواند برای درمان فشار خون بالا در انسان مفید باشد. همچنین میزان بیان ژن روی پرندگان سالم در سن ۶ هفتگی روی بافت‌های قلب، ریه و کبد متمرکز شد، زیرا این بافت‌ها بیشتر تحت تأثیر آسیب قرار می‌گیرند و مشاهده شد که سطح بیان ژن *CPQ* به طور قابل ملاحظه‌ای در کبد پرندگان نر افزایش یافته است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که *CPQ* یک عامل تعیین کننده مهم در سندرم فشار خون ریوی است که منجر به آسیب در جوجه‌های گوشتی می‌شود (Dey et al., 2018). رشد سریع جوجه‌های گوشتی باعث افزایش سرعت متابولیسم می‌شود که منجر به افزایش ترشح تیروکسین می‌شود که در کبد و کلیه به تری‌یدوتیرونین تبدیل می‌شود (Luger et al., 2001)، افزایش تری‌یدوتیرونین با افزایش مصرف اکسیژن همبستگی مثبت دارد. در دمای پایین، زمانی که افزایش اکسیژن مورد نیاز است، غلظت تری‌یدوتیرونین در پلاسما افزایش می‌یابد. در این مطالعه بیان کردند که غلظت تیروکسین و تری‌یدوتیرونین پلاسما در پرندگان سالم به طور قابل توجهی بالاتر از پرندگان مبتلا به آسیب بود. این نشان می‌دهد که پرندگان حساس قادر به تولید تیروکسین پلاسما با سرعت کافی در طول مدت افزایش تقاضای اکسیژن نیستند.

دانشگاه آرکانزاس انجام گرفت جوجه‌ها با LPS (لیپولی ساکاریدهای اجزای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی هستند که باعث التهاب و بیماری در حیوانات می‌شوند) تیمار شدند و ۲۴ ساعت پس از تزریق، خون آن‌ها جمع‌آوری شد. نتایج این پژوهش نشان داد که سطوح پلاسمایی HPSE به‌طور قابل توجهی در جوجه‌های تیمار شده با LPS تغییر کرده است. در این مطالعه بیان کردند که افزایش HPSE در گروه LPS می‌تواند به تخریب سولفات هیپران مرتبط با بازسازی ماتریکس خارج سلولی در طول التهاب مرتبط باشد (Packialakshmi *et al.*, 2016).

هستی‌شناسی (GO) ۴۹ ژن که براساس string با هم در ارتباط بودند، در نرم‌افزار DAVID انجام شد (جدول ۳) و مشخص شد که ژن‌های CPQ، HPSE، و B3GAT2 در مسیرهای بیولوژیکی مهمی که با بیماری آسیت مرتبط است از جمله مسیر Mannose\_type\_glycan\_biosynthesis که در متابولیسم و بیوسنتز گلیکان‌ها نقش دارد (Stoyloff)، تجزیه و تحلیل مسیر GO نشان داد که این ژن‌ها در مسیرهای Manqanese، Transferase، Signal-anchor، و Inteqral component of membrane به‌طور متفونی در توسعه آسیت نقش دارند.

کربوهیدراتی نقش دارد. گلیکوزید هیدرولازها در مجرای روده و بزاق نیز یافت می‌شوند که در آن‌جا کربوهیدرات‌های پیچیده لاکتوز، نشاسته، ساکارز و ترهالوز را تجزیه می‌کنند (Henrissat & Davies, 1997). هیپاراناز (HPSE) یک اندوگلیکوزیداز است که برش زنجیره‌های جانبی پروتئوگلیکان‌های هیپران سولفات را کاتالیز می‌کند. بنابراین در بازسازی ماتریکس خارج سلولی و غشاهای پایه و همچنین آزادسازی مولکول‌های مختلف مرتبط با هیپران سولفات به‌عنوان فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و آنزیم‌ها نقش دارد (V Kumar *et al.*, 2015). از زمانی که HPSE در اواخر دهه ۱۹۸۰ شناسایی شد، چندین مطالعه تجربی نشان داده‌اند که بیان بیش از حد آن در افزایش رشد تومور، رگ‌زایی و التهاب مؤثر بوده است. ثابت شده است که هیپاراناز پیشرفت سرطان را با آزادسازی بسیاری از مولکول‌های مرتبط با هیپران سولفات مانند فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و آنزیم‌ها افزایش می‌دهد (Vlodavsky *et al.*, 2018). HPSE بسیار حفاظت شده است و توالی‌های مشابهی را در بین گونه‌های مختلف مانند انسان، موش، گاو، مرغ، نرم‌تنان، ماهی و گورخر دارد. این یک پروتئین چندمنظوره است که دارای عملکردهای آنزیمی و همچنین غیرآنزیمی است که در فرآیندهای اصلی پاتولوژیک انسان شرکت می‌کند (Pisano *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای که در

جدول ۳- بررسی مسیرهای ژن آنتولوژی برای ژن‌های مرتبط با ژن CPQ

Table 3. Significant of gene ontology pathwayS for genes related to CPQ gene

دسته Category	نام مسیر بیولوژیکی Term	تعداد Count	P_value
KEGG PATHWAY	Mannose_type_glycan_biosynthesis	7	8.0E-10
UP_KW_LIGAND	Manqanese	6	1.2E-5
UP_KW_DOMAIND	Signal-anchor	7	2.7E-5
UP_KW_MOLECULAR_FUNCTION	Transferase	14	2.3E-4
GOTERM_CC_DIRECT	Integral component of membrane	14	1.9E-3

نشان‌دهنده تنوع زیاد در لاین آرین است. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که جهش‌های جابه‌جایی بیشتر از جهش‌های معکوس است.

نتایج انوتیشن چندشکلی‌های شناسایی شده در جدول ۴ نشان داده شده است. در این مطالعه تعداد جهش‌های هتروزایگوت بیشتر از تعداد جهش‌های هموزایگوت بود که این

جدول ۴- تعداد چندریختی‌های تک نوکلئیدی هموزایگوس و هتروزایگوس و شمار جهش‌های جابه‌جایی و معکوس در نمونه‌های سالم و بیمار به تفکیک هر ژن

Table 4. The number of hemorrhagic and heterozygous single nucleotide polymorphisms and the number of transposition and inversion mutations in healthy and diseased samples separately for each gene

TS/TV	تعداد جهش‌های معکوس Number of transversion mutations	تعداد جهش‌های جابه‌جایی Number of transition mutations	تعداد SNP هموزایگوس Number of homozygous SNPs	تعداد SNP هتروزایگوس Number of heterozygous SNP	نام نمونه Sample Name
1.66	3	5	0	8	CPQAs
0	3	0	1	2	CPQHe
1	2	2	0	4	HPSEAs
0	0	1	0	1	B3GAT2

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه SNP‌های مرتبط با ژن‌های مهم و مرتبط با آسیت مورد بررسی قرار گرفت، یافته‌های پژوهش حاضر SNP‌های جدیدی شناسایی شد که تاکنون گزارش نشده بود بنابراین بررسی‌های بیشتر برای چگونگی تأثیر این ژن‌ها و SNP‌های شناسایی شده ضروری می‌باشد.

کالینز و جاکز (Collins & Jukes, 1994) در مطالعه‌ای بیان کردند که تعداد چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی که توسط جهش‌های جابه‌جایی به‌وجود می‌آید دو برابر تعداد جهش‌هایی است که توسط جهش‌های معکوس ایجاد شده‌اند. نسبت جهش‌های جابه‌جایی به جهش‌های معکوس، یک شاخص مفید برای نشان دادن میزان خطای مثبت در شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی است (McKenna *et al.*, 2010).

### References

Adetunji, M. O., Lamont, S. J., Abasht, B., & Schmidt, C. J. (2019). Variant analysis pipeline for accurate detection of genomic variants from transcriptome sequencing data. *PLoS one*, 14(9), e0216838.



- Almansaf, D. (2022). *Identification of Genomic, Proteomic, and Metabolomic Signatures Associated with Pulmonary Hypertension Syndrome in Broilers* (Doctoral dissertation, University of Arkansas).
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online. Retrieved May, 17, 2018.
- Azizian, M., Rahimi, S., Kamali, M. A., Karimi, T. M., & Zobdeh, M. R. (2013). Comparison of the susceptibility of six male broiler hybrids to ascites by using hematological and pathological parameters. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(3), 517-525.
- Cheng, S., Liu, X., Liu, P., Li, G., Guo, X., Hu, G., Li, L., Wu, C., Xu, Z., & Zhou, Q. (2021). Dysregulated expression of mRNA and SNP in pulmonary artery remodeling in ascites syndrome in broilers. *Poultry science*, 100(3), 100877.
- Collins, D. W., & Jukes, T. H. (1994). Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics*, 20(3), 386-396.
- De Greef, K., Janss, L., Vereijken, A., Pit, R., & Gerritsen, C. (2001). Disease-induced variability of genetic correlations: Ascites in broilers as a case study. *Journal of Animal Science*, 79(7), 1723-1733.
- Dey, S., Parveen, A., Tarrant, K. J., Licknack, T., Kong, B. C., Anthony, N. B., & Rhoads, D. D. (2018). Whole genome resequencing identifies the CPQ gene as a determinant of ascites syndrome in broilers. *PloS one*, 13(1), e0189544.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.
- Dominguez-Avila, N., Ruiz-Castañeda, G., González-Ramírez, J., Fernandez-Jaramillo, N., Escoto, J., Sánchez-Muñoz, F., Marquez-Velasco, R., Bojalil, R., Espinosa-Cervantes, R., & Sánchez, F. (2013). Over, and underexpression of endothelin 1 and TGF-beta family ligands and receptors in lung tissue of broilers with pulmonary hypertension. *BioMed Research International*, 2013.
- Druyan, S., & Cahaner, A. (2007). Segregation among test-cross progeny suggests that two complementary dominant genes explain the difference between ascites-resistant and ascites-susceptible broiler lines. *Poultry Science*, 86(11), 2295-2300.
- Enayat, K., Farhadi, A., & Rahimi Mianji, Gh (2021). Detection of Lack of Function Mutation of p.Q879X Affecting Abortion in APAF1 Gene in Holstein Cattle. *Res Anim Prod*, 12, 146-156. [In Persian]
- Faraji, M., Karimi Dehkordi, S., Zamiani Moghadam, A. K., Ahmadipour, B., & Khajali, F. (2019). Combined effects of guanidinoacetic acid, coenzyme Q10 and taurine on growth performance, gene expression and ascites mortality in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(1), 162-169.
- Fathi, M., & Haydari, M. (2016). Effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on performance, mortality and some blood parameters related to ascites in broiler chickens. *Animal Production Research*, 5(1).
- Guo, F., Liu, P., Guo, X., Li, G., Cheng, S., Zou, Z., Hou, X., Latigo, V., Li, L., & Hu, G. (2021). Bioinformatics Analysis of JAZF1 Gene in Broilers with Ascites Syndrome. *Pakistan Veterinary Journal*, 41(1), 19-24.
- Hasanpur, K., Nassiri, M., Hosseini Salekdeh, G., Vaez Torshizi, R., Pakdel, A., Kermanshahi, H., & Naghous, M. (2016). The suitability of some blood gas and biochemical parameters as diagnostic tools or early indicators of ascites syndrome in broiler sire lines. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(3), 456-463.
- Hasanzadeh, M. (2010). Endogenous and environmental factors interactions that contribute to the development of ascites in broiler chickens: a review. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 4(2), 117-126. doi: 10.22059/ijvm.2010.21365 [In Persian]
- Hassanpour, H., Momtaz, H., Shahgholian, L., Bagheri, R., Sarfaraz, S., & Heydaripour, B. (2011). Gene expression of endothelin-1 and its receptors in the heart of broiler chickens with T3-induced pulmonary hypertension. *Research in Veterinary Science*, 91(3), 370-375.
- Henrissat, B., & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5), 637-644.
- Hoseini, Z. S., Farhadi, A., Gholizadeh, M., & Rahimi-Mianji, Gh. (2020). Detection of Lack of Function Mutation of P. R12X in SLC37A2 Locus in Montbeliarde and Holstein Cattle. *Research on Animal Production*, 11(29), 135-142. [In Persian]
- Hossain, M. E., & Akter, N. (2022). Further insights into the prevention of pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broiler: a 65-year review. *World's Poultry Science Journal*, 78(3), 641-688.
- Hyatt, R. E., & Smith, J. R. (1954). The mechanism of ascites: a physiologic appraisal. *The American journal of medicine*, 16(3), 434-448.
- Imiya, K., Ishizaki, T., Seiki, T., Saito, F., Inazawa, J., Oka, S., & Kawasaki, T. (2002). cDNA cloning, genomic structure and chromosomal mapping of the mouse glucuronyltransferase-S involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Gene*, 296(1-2), 29-36.
- Jehl, F., Degalez, F., Bernard, M., Lecerf, F., Lagoutte, L., Désert, C., Coulée, M., Bouchez, O., Leroux, S., & Abasht, B. (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.

- Julian, R. J., McMillan, I., & Quinton, M. (1989). The effect of cold and dietary energy on right ventricular hypertrophy, right ventricular failure and ascites in meat-type chickens. *Avian Pathology*, 18(4), 675-684.
- Kalmar, I. D., Vanrompay, D., & Janssens, G. P. (2013). Broiler ascites syndrome: Collateral damage from efficient feed to meat conversion. *The Veterinary Journal*, 197(2), 169-174.
- Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, S. E. (2023). Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII. 1.1) isolated in Iran. *Veterinary Research Forum*, 14(4), 221-228.
- Lahav, T., Atzmon, G., Blum, S., Ben-Ari, G., Weigend, S., Cahaner, A., Lavi, U., & Hillel, J. (2006). Marker-assisted selection based on a multi-trait economic index in chicken: experimental results and simulation. *Animal Genetics*, 37(5), 482-488.
- Lee, K. P., Anthony, N. B., Orlowski, S. K., & Rhoads, D. D. (2022). SNP-based breeding for broiler resistance to ascites and evaluation of correlated production traits. *Hereditas*, 159(1), 1-15.
- Liu, P., Yang, F., Zhuang, Y., Xiao, Q., Cao, H., Zhang, C., Wang, T., Lin, H., Guo, X., & Hu, G. (2017). Dysregulated expression of microRNAs and mRNAs in pulmonary artery remodeling in ascites syndrome in broiler chickens. *Oncotarget*, 8(2), 1993-2007.
- Lubritz, D., Smith, J., & McPherson, B. (1995). Heritability of ascites and the ratio of right to total ventricle weight in broiler breeder male lines. *Poultry Science*, 74(7), 1237-1241.
- Luger, D., Shinder, D., Rzepakovsky, V., Rusal, M., & Yahav, S. (2001). Association between weight gain, blood parameters, and thyroid hormones and the development of ascites syndrome in broiler chickens. *Poultry Science*, 80(7), 965-971.
- Malekshahdehi, S., Hafezian, S.H., Rahimi Mianji, Gh., Hasanpour, k. (2017). Differential gene expression analysis and identification of genes related to ascites syndrome in broiler chickens under cold stress condition. Ph.D. Thesis. [In Persian]
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., & Daly, M. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297-1303.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31-46.
- Moghadam, H., McMillan, I., Chambers, J. R., & Julian, R. (2001). Estimation of genetic parameters for ascites syndrome in broiler chickens. *Poultry Science*, 80(7), 844-848.
- Mohammadi Far, A., Faqih Imani, S. A., Mohammad Abadi, M. R., & 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(4), 125-136. [In Persian]
- Mohammadifar, A., & Mohammadabadi, M. (2018). Melanocortin-3 receptor (mc3r) gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. *Malaysian Applied Biology*, 47(3), 85-90.
- Packialakshmi, B., Liyanage, R., Lay Jr, J. O., Makkar, S. K., & Rath, N. C. (2016). Proteomic changes in chicken plasma induced by Salmonella typhimurium lipopolysaccharides. *Proteomics Insights*, 7, PRI. S31609.
- Parveen, A., Jackson, C. D., Dey, S., Tarrant, K., Anthony, N., & Rhoads, D. D. (2020). Identification and validation of quantitative trait loci for ascites syndrome in broiler chickens using whole genome resequencing. *BMC Genetics*, 21, 1-10.
- Pavlidis, H., Balog, J., Stamps, L., Hughes Jr, J., Huff, W., & Anthony, N. (2007). Divergent selection for ascites incidence in chickens. *Poultry Science*, 86(12), 2517-2529.
- Pisano, C., Vlodavsky, I., Ilan, N., & Zunino, F. (2014). The potential of heparanase as a therapeutic target in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 89(1), 12-19.
- Shafiei, H., Bakhtiarizadeh, M. R., & Salehi, A. (2018). Large-scale RNA editing profiling in different adult chicken tissues. *BioRxiv*, 319871.
- Shahdadnejad, N., Mohammadabadi, M., & Shamsadini, M. (2016). Typing of clostridium perfringens isolated from broiler chickens using multiplex PCR. *Genetics in the 3rd Millennium*, 14(4), 4368-4374.
- Shi, S., Shen, Y., Zhao, Z., Hou, Z., Yang, Y., Zhou, H., Zou, J., & Guo, Y. (2014). Integrative analysis of transcriptomic and metabolomic profiling of ascites syndrome in broiler chickens induced by low temperature. *Molecular BioSystems*, 10(11), 2984-2993.
- Stoyloff, J. Petri Net Representation and Analysis of Mannose Type O-Glycan Biosynthesis. *Acta Morphologica et Anthropologica*, 25, 1-2.
- V Kumar, A., K Katakam, S., Urbanowitz, A.-K., & Gotte, M. (2015). Heparan sulphate as a regulator of leukocyte recruitment in inflammation. *Current Protein and Peptide Science*, 16(1), 77-86.
- Vlodavsky, I., Gross-Cohen, M., Weissmann, M., Ilan, N., & Sanderson, R. D. (2018). Opposing functions of heparanase-1 and heparanase-2 in cancer progression. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(1), 18-31.
- Wideman, R., Rhoads, D., Erf, G., & Anthony, N. (2013). Pulmonary arterial hypertension (ascites syndrome) in broilers: a review. *Poultry Science*, 92(1), 64-83.
- Williams, G. J., & Thorson, J. S. (2009). Natural product glycosyltransferases: properties and applications. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*, 76, 55.