

Research Paper

Associations of Polymorphisms in PDK4 and THRSP Genes with Growth-Related Traits in a Commercial Broiler Line

Ramin Nematzadeh¹, Sadegh Alijani², Karim Hasanpur³, Shayan Zargarian¹, and Arash Javanmard⁴

1- M. Sc. in Animal Genetics and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran,

2- Professor in Animal Genetics and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- Associate Professor in Animal Genetics and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, (Corresponding author: karimhasanpur@yahoo.com)

4- Associate Professor in Animal Genetics and Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 03 February, 2025

Revised: 17 April, 2025

Accepted: 19 May, 2025

Extended Abstract

Background: Growth rate is among the most economically important traits in broiler chickens that varies according to the bird's genetic potential while being modulated by non-genetic factors. Ascites syndrome is a metabolic–genetic disorder in broilers whose occurrence is associated with genetic susceptibility and environmental conditions, including feeding strategy and husbandry practices. Historically, its prevalence has shown a direct relationship with increasing altitude above sea level; however, ascites is now observed at low altitudes as well, which is attributed to metabolic constraints rather than hypobaric hypoxia alone. The syndrome is seen predominantly in male broilers. Based on the frequently stated view that faster growth can be accompanied by increased physiological strain, it has been hypothesized that some gene variants implicated in ascites susceptibility might also align with—or even enhance—growth-related traits. The present study aimed to evaluate the association between polymorphisms in two ascites-related candidate genes, PDK4 and THRSP, and weekly body weight as well as growth rate traits in a commercial broiler line.

Methods: The research was conducted in three phases: bioinformatics, farm, and laboratory. In the bioinformatics phase, RNA-seq data were used to identify variants in six genes (CPT1A, GPR182, MEF2A, FABP4, PDK4, and THRSP). A downstream RFLP marker-design step was then implemented to prioritize loci amenable to genotyping with a low-cost restriction enzyme, thereby improving feasibility for population-level screening. Ultimately, one biallelic T/C variant from PDK4 and one biallelic A/G variant from THRSP were selected for empirical evaluation; both loci were genotyped using *ScaI*. In the farm phase, the study population comprised 823 birds (381 males and 442 females) from 23 sire half-sib families. Body weight was recorded weekly from day 1 through day 42. Growth rate was computed over three intervals: 1–21, 21–42, and 1–42 days of age. Ascitic birds were identified using external characteristics commonly adopted in field settings, including feather ruffling, wing drooping, and the presence of a watery abdominal effusion. Records from 114 chicks partitioned into four groups were used for genotype–phenotype association analyses: healthy males ($n = 44$), ascitic males ($n = 11$), healthy females ($n = 55$), and ascitic females ($n = 4$). Statistical analyses employed the UNIVARIATE and GLM procedures in SAS. Sex, health status, and genotype were modeled as fixed effects. Post-hoc pairwise comparisons were conducted with Tukey's test to control for multiple testing across genotype classes and sex–health strata.

Results: Across the six genes surveyed, 75 SNPs were identified, 57 of which were determined to be suitable for genotyping by RFLP using an appropriate restriction enzyme. Following additional filtering for assaying robustness and expected informativeness, one variant from PDK4 and one from THRSP were advanced to laboratory validation and association testing. Both loci displayed sufficient genotypic variability for meaningful analysis. At the PDK4 locus, the frequencies of CC, TC, and TT genotypes were 0.105, 0.658, and 0.237, respectively. At the THRSP locus, the frequencies of AA, AG, and GG genotypes were 0.185, 0.500, and 0.315, respectively. As expected from biological dimorphism in broilers, males exhibited higher body weights and growth rates than females at most ages. In parallel, ascitic birds—particularly toward



the end of the growing period—showed reduced growth and weight gain compared to healthy counterparts, reflecting the physiological burden of the syndrome. Despite these consistent population-level trends, no genotype at either locus produced statistically significant differences ($P > 0.05$) in weekly body weight traits or in growth rates across 1–21, 21–42, and 1–42 days. Model estimates did suggest small, non-significant patterns: for PDK4, mean values for CC were marginally higher than those for TC/TT at certain time points; for THRSP, AA tended to show modestly higher phenotypic values than AG/GG. However, effect sizes were below conventional thresholds for statistical reliability and did not survive multiple-comparison control. These findings are consistent with recent perspectives arguing that reduced cardiopulmonary efficiency, rather than growth rate per se, is the proximate driver of ascites in fast-growing birds. In other words, a simple, direct correlation between alleles that support rapid growth and alleles that predispose to ascites is unlikely to be universal, at least for the two loci examined here.

Conclusion: Taken together, the results indicate that the selected polymorphisms in PDK4 and THRSP are not significantly associated with growth-related traits and weekly body weight in this population. A conservative interpretation is that genetic susceptibility to ascites is not necessarily mediated by the same variants that promote faster growth. Rapid growth, by itself, does not equate to a “genotype predisposed to ascites”; rather, ascites risk appears to be contingent on a mismatch between oxygen-delivery capacity and the metabolic demands imposed by growth and husbandry conditions. In conclusion, the present data provide no evidence of a direct genetic link between rapid growth and ascites susceptibility at the level of the two tested genes. Thus, breeding programs can continue to focus on improving growth and efficiency without a direct, locus-specific increase in ascites risk from these variants—provided that physiological monitoring and environmental management are maintained to balance oxygen demand with tissue capacity.

Keywords: Genotype frequency, Growth-related traits, RNA-seq, SNP variant

How to Cite This Article: Nematzadeh, R., Alijani, S., Hasanpur, K., Zargarian, SH., & Javanmard, A. (2025). Associations of Polymorphisms in PDK4 and THRSP Genes with Growth-Related Traits in a Commercial Broiler Line. *Res Anim Prod*, 16(3), 45-53. DOI: 10.61882/rap.2025.1415

مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط چندشکلی در ژن‌های PDK4 و THRSP با صفات مرتبط با رشد در یک لاین تجاری مرغ گوشتی

رامین نعمت‌زاده^۱، صادق علیجانی^۲، کریم حسن‌پور^۳، شایان زرگریان^۱ و آرش جوانمرد^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، (نویسنده مسوول: karimhasanpur@yahoo.com)

۴- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۹

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵

صفحه ۴۵ تا ۵۳

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: نرخ رشد از مهم‌ترین صفات اقتصادی در جوجه‌های گوشتی به‌شمار می‌رود که با پتانسیل ژنتیکی پرند و تحت تاثیر عوامل غیر ژنتیکی تغییر می‌کند. از سوی دیگر، سندرم آسیت یک اختلال متابولیکی-ژنتیکی در مرغ‌های گوشتی است که بروز آن با استعداد ژنتیکی پرند و شرایط محیطی از جمله تغذیه و شرایط پرورش ارتباط دارد و شیوع آن با افزایش ارتفاع محل پرورش از سطح دریاهای آزاد رابطه مستقیم داشت؛ اما امروزه در ارتفاعات پایین نیز دیده می‌شود که به دلیل مشکلات متابولیکی است. این سندرم غالباً در پرندگان گوشتی نر رخ می‌دهد و تصور بر این است که وقوع آسیت با سرعت رشد پرند در ارتباط است و سبب شکل‌گیری این فرضیه شده است که احتمالاً برخی واریانت‌های ژنی دخیل در بروز آسیت، با صفات رشد نیز هم‌راستا باشند. هدف این مطالعه، ارزیابی ارتباط چندشکلی دو ژن کاندید مرتبط با سندرم آسیت، یعنی PDK4 و THRSP، با صفات وزن بدن هفتگی و نرخ رشد در یک لاین تجاری مرغ گوشتی بود.

مواد و روش‌ها: تحقیق حاضر در سه فاز آنالیز بیوانفورماتیکی، مزرعه‌ای و آزمایشگاهی انجام شد. در فاز اول برای شناسایی واریانت‌ها در شش ژن CPT1A, MEF2A, GPR182, FABP4, PDK4, THRSP از داده‌های RNA-seq استفاده شد و سپس جهت‌یابی برای طراحی نشانگرهای RFLP انجام گرفت تا جایگاه‌هایی انتخاب شوند که با یک آنزیم برشی ارزان قیمت قابل تعیین ژنوتایپ باشند. در نهایت، یک واریانت دوالی T/C از PDK4 و یک واریانت دوالی A/G از THRSP برای ارزیابی جمعیتی برگزیده شدند و ژنوتایپ‌گیری هر دو با آنزیم Scal انجام گرفت. در فاز مزرعه‌ای، جمعیت مطالعه شامل ۸۲۳ قطعه (۳۸۱ نر، ۴۴۲ ماده) از ۲۳ خانواده نانتی پدري بود که تمامی رکوردهای وزن بدن از روز ۱ تا ۴۲ به‌صورت هفتگی برداشت شدند. نرخ رشد در بازه‌های ۱ الی ۲۱، ۲۱ الی ۴۲ و ۴۲ الی ۴۲ روزگی محاسبه گردید. پرند‌های آسیتی با بررسی مشخصات ظاهری، ژولیدگی پرها، افتادگی بال‌ها و تجمع مایع آبکی در شکم شناسایی شدند. برای آزمون ارتباط ژنوتیپ با فنوتیپ، بین ژنوتیپ‌ها در دو ژن مذکور و فنوتیپ‌ها از رکوردهای تعداد ۱۱۴ قطعه جوجه متعلق به چهار گروه نر سالم (۴۴ قطعه)، نر بیمار (۱۱ قطعه)، ماده سالم (۵۵ قطعه) و ماده بیمار (۴ قطعه) استفاده شد. برای آنالیز آماری داده‌ها، رویه‌های univariate و GLM استفاده و در SAS اجرا شدند. جنسیت، وضعیت سلامت و ژنوتیپ به عنوان عوامل ثابت در مدل وارد شدند و میانگین‌ها با آزمون توکی مقایسه شدند.

یافته‌ها: تعداد ۷۵ SNP در شش ژن مورد مطالعه شناسایی شدند که تعداد ۵۷ تا از آن‌ها با استفاده از آنزیم برشی و روش RFLP قابل تعیین ژنوتیپ بودند. بعد از بررسی‌های دقیق‌تر، یک واریانت از ژن PDK4 و یک واریانت از ژن THRSP جهت آنالیز آزمایشگاهی مورد انتخاب قرار گرفتند. در هر دو ژن، تنوع ژنوتیپی مناسبی برای تحلیل مشاهده شد. در جایگاه PDK4، فراوانی ژنوتیپ‌های CC، TC، TT به ترتیب ۰/۱۸۵، ۰/۶۵۸، ۰/۲۳۷ و در THRSP فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AG، GG به ترتیب ۰/۱۸۵، ۰/۵، ۰/۳۱۵ به‌دست آمد. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، تفاوت‌های ثابت زیستی در جمعیت نیز مشاهده شدند: نرها در بیشتر ایستگاه‌های سنی وزن و نرخ رشد بالاتری از ماده‌ها داشتند، و پرندگان آسیتی، به‌خصوص در اواخر دوره، کاهش رشد و وزن‌گیری نسبت به سالم‌ها نشان دادند. با این حال، هیچ‌یک از ژنوتیپ‌ها در دو ژن مورد بررسی، در هیچ‌یک از صفات وزن بدن هفتگی و نرخ رشد تفاوت معنی‌دار آماری ایجاد نکردند ($P > 0.05$). الگوهای برآوردی نشان دادند که در PDK4، اگرچه میانگین برخی ایستگاه‌ها برای CC اندکی بالاتر از TC/TT بود، اندازه اثر به آستانه معنی‌داری نرسید. در THRSP نیز گرایش خفیف‌تری فنوتیپی در AA نسبت به AG/GG مشاهده شد ولی از نظر آماری قابل اتکا نبود. این یافته‌ها با گزارش‌های اخیر مبنی بر این که کاهش کارایی دستگاه قلبی-ریوی و نه سرعت رشد به‌تنهایی عامل کلیدی بروز آسیت است، هم‌خوانی دارند و تأییدی می‌کنند که همبستگی ساده و مستقیم میان آل‌های مرتبط با رشد و آل‌های مستعدکننده آسیت قابل تعمیم نیست.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که چندشکلی‌های منتخب در ژن‌های PDK4 و THRSP با صفات رشد و وزن بدن در این جمعیت ارتباط معنی‌داری ندارند. به‌نظر می‌رسد که می‌توان نتیجه گرفت که آل‌هایی که در ژن‌های مرتبط با رشد باعث رشد سریع‌تر پرند می‌شوند، همان آل‌های مستعدکننده پرند برای وقوع سندرم آسیت نیستند. به‌طور کلی، داده‌های حاضر هیچ شواهدی به ارتباط مستقیم ژنتیکی میان رشد سریع و استعداد بروز آسیت در سطح دو ژن PDK4 و THRSP ارائه نمی‌کنند و به این ترتیب، راهبردهای انتخاب ژنتیکی می‌تواند با تمرکز بر بهبود رشد و کارایی، بدون ترس از افزایش مستقیم ریسک آسیت از ناحیه این دو ژن مشخص، مشروط بر رعایت پایش فیزیولوژیک و مدیریت محیطی برای حفظ تعادل نیاز اکسیژن با ظرفیت بافتی، ادامه یابند. با این که ارتباط ژنتیکی مستقیم بین سندرم آسیت و صفات رشد در مطالعه حاضر مشاهده نشد، مطالعه ژن‌های دیگر با استفاده از نشانگرهای SNP یا RFLP قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی: صفات مرتبط با رشد، فراوانی ژنوتیپی، واریانت SNP، RNA-seq

مقدمه

آسیت یک بیماری متابولیکی-ژنتیکی است که حساسیت به آن در جوجه‌های گوشتی در کنترل عوامل ژنتیکی است ولی شیوع آن تحت شرایط تغذیه غنی یا شرایط پرورشی نامناسب افزایش می‌یابد. این بیماری اولین بار در پوله‌های بوقلمون در ایالت

اصلاح نژاد دام علم تثبیت ژن‌های مؤثر بر تولید اقتصادی دام است. اصلاح نژاد، با انتخاب افراد ممتاز و تعیین سیستم آمیزش مناسب، افراد مطلوب‌تر نسل بعد را ایجاد می‌کند. سندرم

مصرف گلوکز را کاهش و متابولیسم چربی را در بلندمدت افزایش می‌دهد (Spriet *et al.*, 2004). بیان ژن PDK4 در گروه مبتلا به آسیت بیشتر از گروه سالم گزارش شده است و با قند خون بالاتر و کاهش چربی شکم در گروه مبتلا به آسیت همراه است (Daneshyar *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). هیپوکسی (کمبود اکسیژن) به‌طور مستقیم با پروموتور ژن PDK4 در ارتباط است و بیان PDK4 را از طریق گیرنده‌های استروژنی ERRc افزایش می‌دهد. همچنین PDK4 در کبد جنین فعالیت کمپلکس پپروات دهیدروژناز را در چرخه کربس مهار می‌کند. بنابراین، کاهش بیان PDK4 موجب افزایش تولید استیل-کوآ در میتوکندری و در نتیجه باعث افزایش لیپوژنز می‌شود (Cogburn *et al.*, 2004). ژن THRSP عمدتاً در بافت‌های لیپوژنیک مانند کبد و چربی بیان قابل‌ملاحظه‌ای دارد و گلوکز، کربوهیدرات، اسیدهای چرب اشباع نشده و انسولین می‌توانند رونویسی آن را تحت تأثیر قرار دهند (Liaw & Towle, 1984). ژن THRSP در ژنوم مرغ در نزدیکی QTL‌های مرتبط با صفات پوست و چربی شکمی قرار دارد (Cogburn *et al.*, 2003).

در سال‌های اخیر، ارتباط ژنتیکی مستقیم بین وقوع سندروم آسیت با رشد سریع پرنده مورد تردید قرار گرفته است و عده‌ای از محققین بر این باور هستند که ژن‌هایی که باعث افزایش رشد می‌شوند به احتمال زیاد باعث افزایش سندروم آسیت نمی‌گردند (Druyan *et al.*, 2007; Druyan *et al.*, 2008). قبلاً در جمعیت حاضر، ارتباط بین وقوع آسیت و رشد سریع پرنده با رویکرد مطالعات ژنتیک کمی مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط ژنتیکی مستقیمی بین رشد سریع پرنده و وقوع آسیت مشاهده نشد (Karami *et al.*, 2021). در مطالعه حاضر نیز تلاش بر این بود ارتباط ژنتیکی بین صفات رشد و سندروم آسیت با رویکرد ژنتیک مولکولی مورد بررسی قرار گیرد تا ارتباط ژن‌های مرتبط با آسیت با صفات مرتبط با رشد نیز مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌های مزرعه‌ای، بیوانفورماتیکی و ژنتیک مولکولی در تحقیق حاضر به‌ترتیب در مزرعه آموزشی و تحقیقاتی خلعت‌پوشان (تبریز، ایران)، آزمایشگاه داده‌کاوی و آزمایشگاه اصلاح دام کاربردی دانشگاه تبریز (ایران) انجام شد. برای شناسایی ژن‌های مهم مرتبط با سندرم آسیت از نتایج تحقیق حسن‌پور و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد (Hasanpur *et al.*, 2015). ژن‌های معنی‌دار مهم مرتبط با سندروم آسیت شناخته‌شده در آن مطالعه مورد بررسی مجدد قرار گرفتند تا مهم‌ترین ژن‌ها از بین آن‌ها انتخاب شوند. به این ترتیب، تعداد شش ژن GPR182, MEF2A, CPT1A, FABP4, PDK4 و THRSP انتخاب شدند. برای شناسایی SNP‌ها در شش ژن مذکور، توالی‌های نوکلئوتیدی آن‌ها از پایگاه داده Ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>) تهیه شدند. برای ایندکس کردن توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌ها و تغییر فرمت آن‌ها به‌منظور مکان‌یابی خوانش‌ها از نرم‌افزارهای Samtools (Li *et al.*, 2009) و Bowtie (Langmead, 2010) استفاده

آیوا آمریکا در سال ۱۹۴۶ گزارش شد که شیوع آن با افزایش ارتفاع محل پرورش از سطح دریاهای آزاد رابطه مستقیم داشت. در ابتدا، این بیماری به نام بیماری ارتفاع نیز مشهور شد ولی امروزه در ارتفاعات پایین نیز دیده می‌شود (Currie, 1999) که به‌دلیل مشکلات متابولیکی است و در برخی موارد تا ۳۰ درصد از کل تلفات را نیز شامل می‌شود. سندرم آسیت در پرندگان گوشتی نر بیشتر اتفاق می‌افتد و به‌دلیل عدم بروز آن در جوجه‌های تخم‌گذار، تصور عموم بر این است که وقوع آسیت هر چه باشد با سرعت رشد پرنده در ارتباط است. البته باید توجه داشت که در جمعیت‌های مرغ گوشتی، وقوع سندروم آسیت به‌طور مستقیم و صرفاً با رشد سریع ارتباط ندارد، بلکه فقط در پرندگانی که رشد سریع با پتانسیل تامین اکسیژن توسط سیستم قلبی-عروقی-تنفسی تناسب ندارد، بروز می‌کند. بدیهی است که این عدم تناسب، فارغ از میزان رشد، در همه پرندگان محتمل است (Druyan *et al.*, 2007).

اخیراً در مطالعه‌ای در سطح کل ترنسکرپتوم مرغ، تعداد بالغ بر ۱۲۵ ژن مرتبط با سندرم آسیت شناسایی شد (Hasanpur, *et al.*, 2015). مطالعه اجمالی آن ژن‌ها نشان داد که برخی از آن‌ها بین پرندگان سالم و بیمار تفاوت بیان بسیار معنی‌دارتری داشتند و با وقوع سندرم آسیت در انسان یا بروز بیماری‌های قلبی-عروقی در ارتباط بودند.

ایران یکی از معدود کشورهای دارای تکنولوژی مرغ لاین اصلاح شده مرغ گوشتی است که علاوه بر تسهیل امکان خودکفایی در تولید جوجه یک‌روزه گوشتی، از لحاظ حفظ امنیت غذایی کشور نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. در حوزه ژنتیک و اصلاح نژاد، آگاهی از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها ممکن است کمک بزرگی برای پیش‌برد برنامه‌های اصلاح نژادی و حفظ ذخایر ژنتیکی باشد (Gholamhoseinzadeh Gooki, 2007; Rohallah *et al.*, 2018). استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در این زمینه بهترین گزینه است زیرا با توجه به اطلاعاتی که به‌دست می‌دهد می‌تواند نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل رکوردهای فنوتیپی را تأیید و تکمیل نماید (Alinaghizadeh *et al.*, 2010; Mohammadifar & Mohammadabadi, 2018). به‌علاوه، استفاده از ژنتیک مولکولی فواید زیادی دارد که یکی از آن‌ها تعیین ژنوتیپ افراد برای یک جایگاه خاص است (Askari *et al.*, 2008; Bahador *et al.*, 2016). همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به‌طور مهبجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (Mohamadipoor, 2021; Saadatabadi *et al.*, 2021). مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی نیز برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (Moazeni *et al.*, 2016; Mohammadifar, 2018; Mohammadabadi &). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Askari *et al.*, 2009; Shahdadnejad, 2016).

ژن PDK4 متابولیسم اسیدهای چرب را از طریق فسفریلاسیون پپروات دهیدروژناز کیناز تنظیم می‌کند. پپروات،

شد و خوانش‌های دوطرفه ۱۰۰ بازی با نرم‌افزار Tophat (Trapnell *et al.*, 2009) بر روی آن‌ها مکان‌یابی شد. خوانش‌ها به داده‌های RNA-seq با شماره دسترسی GSE122745 در پایگاه داده NCBI تعلق داشتند. در ادامه، شناسایی واریانت‌ها با استفاده از نرم‌افزار GATK (McKenna *et al.*, 2010) انجام گرفت. بعد از شناسایی SNP که عمدتاً دوالی بودند، اثر آنزیم‌های برشی بر هر دو آل مورد بررسی قرار گرفت تا به این ترتیب جایگاه‌هایی که امکان تعیین ژنوتیپ آن‌ها توسط آنزیم‌های برشی میسر باشد، شناسایی گردند. برای این کار از نرم‌افزار تحت وب (https://www.restrictionmapper.org) استفاده شد و در نهایت ژن‌های PDK4 و THRSP برای بررسی در سطح جمعیت و ارتباط‌سنجی با صفات مرتبط با رشد انتخاب شدند. ژن PDK4 در مرغ روی کروموزوم ۲ در موقعیت

جدول ۱- توالی و دمای اتصال پرایمرها، اندازه جایگاه ژنی تکثیرشده و آنزیم برشی در ژن‌های PDK4 و THRSP

Table 1. Sequences and annealing temperatures of the primers, size of PCR products, and corresponding restriction enzymes in the PDK4 and THRSP genes

Gene	Primer sequence (5' → 3')	Length (bp)	TM	Restriction enzyme
PDK4	TAAGTCCCTCCCAACCCAA(F) CCCCTCAAACCTACCAAGCA(R)	615	60	ScaI
THRSP	GCAGAGGGATAGCAGAGCAG(F) CCCCTCAAACCTACCAAGCA(R)	334	63	ScaI

Length: Size of the PCR product (base pair)
TM: Primer melting temperature

هر کیلوگرم و ۱۸ درصد پروتئین) تغذیه شدند و واکسیناسیون طبق کاتالوگ پرورش مربوطه انجام گرفت. رکوردهای وزن بدن به‌صورت هفتگی از وزن یک‌روزگی تا ۴۲ روزگی اندازه‌گیری شدند و نرخ رشد در بازه‌های بین ۱ تا ۲۱ روزگی، ۲۱ تا ۴۲ روزگی و ۱ تا ۴۲ روزگی برای هر پرنده به‌طور مجزا برآورد گردید. به این ترتیب، ۱۰ صفت مرتبط با رشد شامل وزن بدن در فواصل هفتگی از ۱ تا ۴۲ روزگی و نرخ رشد در سه بازه مذکور، به‌عنوان فنوتیپ جهت ارتباط‌سنجی باژنوتیپ‌های دو ژن PDK4 و THRSP مورد استفاده قرار گرفتند. رکوردهای فنوتیپی و ژنوتیپی ۱۱۴ پرنده به‌منظور ارتباط‌سنجی استفاده شدند. آماره‌های توصیفی رکوردهای فنوتیپی مورد استفاده در جدول ۲ گزارش شده‌اند.

پرورش و رکوردبرداری از صفات مرتبط با رشد

تعداد ۸۲۳ قطعه جوجه (۳۸۱ قطعه جوجه نر و ۴۴۲ قطعه جوجه ماده) مشتمل بر ۲۳ خانواده ناتنی پدری از یکی از خطوط پدری یک لاین تجاری مرغ گوشتی برای تحقیق حاضر استفاده شدند. شماره بال در زمان جوجه‌کشی بر روی همه آن‌ها نصب شد. جوجه‌ها بر روی بستر پرورش داده‌شدند و برنامه نوری به‌صورت ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی اعمال شد. خوراک و آب به‌صورت آزاد در اختیار پرندگان قرار گرفت. پرنده‌ها از ۱۴-۰ روزگی با جیره آغازین (۲۹۰۰ کیلوکالری انرژی متابولیسمی در هر کیلوگرم و ۲۰/۵ درصد پروتئین)، از ۲۸-۱۴ روزگی با جیره رشد (۳۰۷۵ کیلوکالری انرژی متابولیسمی در هر کیلوگرم و ۲۰ درصد پروتئین) و ۴۵-۲۸ روزگی با جیره پایانی (۳۱۲۰ کیلوکالری انرژی متابولیسمی در

جدول ۲- آماره‌های توصیفی رکوردهای فنوتیپی مورد استفاده در آنالیز ارتباط‌سنجی

Table 2. Descriptive statistics of the phenotypic data used in the association analysis

	bw1 ^s	bw7	bw14	bw21	bw28	bw35	bw42	GR1-21	GR21-42	GR1-42
N	114	114	113	114	114	114	113	114	113	113
Min	35	85	125	288	675	1100	1525	12.6	52.6	36.1
Max	55	172	402	786	1350	2090	2905	36.8	103.0	69.6
Average	45.6	127.7	276.8	555.2	992.7	1569.6	2178.0	25.5	77.3	52.0
STD	3.9	20.2	56.0	92.8	148.2	212.0	279.5	4.6	10.9	6.8
CV%	8.7	15.8	20.2	16.7	14.9	13.5	12.8	18.0	14.1	13.1

^s bw1-bw42 are the body weight traits at the specified day and GR1-21, GR21-42, and GR1-42 are the growth rate traits from 1 to 21 days, 21 to 42 days, and 1 to 42 days of age, respectively. The units of the body weight and growth rate traits are gram and gram/day, respectively.

پرنده کاهش یابد و رشد آن، به‌ویژه در پرنده‌های مبتلاشده، با افت مواجه گردد. واضح است که تحت این شرایط پرنده‌ها نمی‌توانند همه پتانسیل ژنتیکی خود را برای صفات رشد و وزن بدن نشان دهند و رکوردهای وزن بدن و نرخ رشد آن‌ها تحت تنش آسیب‌زا اربیب خواهند بود. به‌دلیل این‌که هدف اصلی مطالعه حاضر ارتباط‌سنجی ژنوتیپ‌های دو ژن PDK4 و

شناسایی پرندگان حساس

برای القای سندروم آسیب معمولاً از قفس‌های هایپوباریک، تیمارهای سرمایی، هورمون‌های محرک تیروئید و آب شور و یا ترکیبی از آن‌ها استفاده می‌گردد. تحت هر کدام از شرایط مذکور، رشد پرنده به‌طور قابل ملاحظه‌ای تحت تاثیر قرار می‌گیرد زیرا تنش اعمال‌شده باعث می‌شود مصرف خوراک

برای هضم محصول PCR ژن‌های PDK4 و THRSP، برای هر تیوب ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *ScaI*، ۱ میکرولیتر بافر هضم، ۱ میکرولیتر بافر BSA و ۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر اضافه شد. حجم نهایی ۱۱/۳ میکرولیتر بود. نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه و در نهایت با ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز گردیدند. آنزیم *ScaI* پالیندروم AGTACT را در محصول PCR ۶۱۵ جفت‌بازی PDK4 و ۳۳۴ جفت‌بازی THRSP هضم می‌کند. محصولات هضم‌شده با آنزیم *ScaI* در کنار ساینز مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی و محصول PCR هضم نشده بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد به مدت ۱ ساعت و با ولتاژ ۵ ولت به‌ازای هر سانتی‌متر فاصله دو الکتروود منفی و مثبت، بارگذاری و الکتروفورز شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از رویه univariate نرم‌افزار SAS بررسی شد و بعد از حصول اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، از رویه GLM برای ارتباط‌سنجی صفات مرتبط با رشد با ژنوتیپ‌های مختلف در هر دو ژن استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات، از آزمون توکی استفاده شد. مدل آماری مزبور عبارت بود از:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{Sex}_i + \text{HS}_j + G_k + e_{ijkl}$$

که در آن Y_{ijkl} مقدار عددی هر فنوتیپ، μ میانگین کل، Sex_i اثر جنسیت، HS_j نشان‌دهنده وضعیت سلامت پرند، G_k اثر هر ژنوتیپ و e_{ijkl} خطای آزمایش هستند.

نتایج و بحث

شناسایی واریانت‌های تکنوکلوئیدی و نشانگر RFLP
تعداد ۷۵ SNP در ژن‌های CPT1A، GPR182، MEF2A، FABP4، PDK4 و THRSP شناسایی شدند که تعداد ۵۷ تا از آن‌ها با استفاده از آنزیم برشی و روش RFLP قابل تعیین ژنوتیپ بودند. بعد از بررسی‌های دقیق‌تر، به‌منظور انتخاب جایگاه‌هایی که به‌راحتی با PCR تکثیر شوند و با یک آنزیم برشی قابل تعیین ژنوتیپ باشند، یک واریانت از ژن PDK4 و یک واریانت دیگر از ژن THRSP جهت آنالیز آزمایشگاهی و اعمال در سطح جمعیت مورد انتخاب قرار گرفتند. موقعیت‌های واریانت‌های مورد بررسی در روی دو ژن PDK4 و THRSP در جدول ۳ نشان داده شده‌اند.

محصولات تکثیری در کنار ساینز مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی (Ladder 100 bp) روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری و الکتروفورز شدند. از مقایسه محل قرارگیری همه باندهای تولیدشده در تمام نمونه‌ها با ساینز مارکر، طول همه قطعات تکثیرشده در مقابل ۶۱۵ جفت باز برای ژن PDK4 برآورد شد و برای ژن THRSP قطعات تکثیرشده با اندازه ۳۳۴ جفت‌بازی تأیید شد. همان‌طور که در شکل ۱ (بالا) مشخص است، برای ژن PDK4 سه الگوی باندی مختلف که هر کدام مربوط به یک ژنوتیپ بودند مشاهده شد. ژنوتیپ CC با دو باند به‌طول‌های ۴۸۶ و ۱۲۹، ژنوتیپ هتروزیگوت TC با سه باند به‌طول‌های ۶۱۵، ۴۸۶ و ۱۲۹ و ژنوتیپ هموزیگوت برش‌نیافته TT با تک باند با طول ۶۱۵ مشاهده شدند. به‌طور مشابه، برای

THRSP با صفات مرتبط با رشد و وزن بدن بود، لذا از القای سندروم آسیت خودداری شد تا رکوردهای ناریب وزن بدن و نرخ رشد به‌دست آیند. با این‌حال، پرند‌های آسیتی با بررسی مشخصات ظاهری، ژولیدگی پرها، افتادگی بال‌ها، رنگ‌پریدگی تاج که به رنگ آبی متمایل است و تورم ناحیه شکمی که همراه با تجمع مایع آبیکی است، شناسایی شدند. به‌دلیل عدم اعمال تنش آسیت‌زا، تقریباً همه پرند‌های آسیتی تا قبل از کشتار زنده ماندند و آسیتی بودن آن‌ها بعد از کشتار با مشاهده مایع سروزی تجمع‌یافته در محوطه شکمی یا کیسه قلب (هیدروپریکاردیوم) و گشادشدگی بطن‌های قلب (به‌ویژه بطن راست) تأیید شد.

استخراج DNA و واکنش PCR

از نمونه خون تعداد ۱۱۴ قطعه مرغ برای بخش آزمایش ژنتیک مولکولی استفاده شد. بر اساس وضعیت سلامت و جنسیت، پرند‌ها به چهار گروه سالم نر (تعداد ۴۴ قطعه)، مبتلا به آسیت نر (تعداد ۱۱ قطعه)، سالم ماده (تعداد ۵۵ قطعه) و مبتلا به آسیت ماده (تعداد ۴ قطعه) تعلق داشتند. DNA با روش کلروفرم-ایزوامیل الکل استخراج شد. برای تعیین درصد خلوص DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. نسبت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به‌طور متوسط ۱/۸۵ بود که در محدوده ۱/۸-۲ قرارداشتند و میزان متوسط غلظت DNA در نمونه‌های استخراج شده برابر ۳۲۰ نانوگرم در میکرولیتر بود که نشان‌دهنده قابل قبول بودن روش استخراج از لحاظ خلوص و غلظت بود. پس از الکتروفورز نمونه‌های استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، نمونه‌های دارای باندهای کاملاً شفاف و روشن، فاقد شکستگی و بدون کشیدگی به‌عنوان نمونه‌های با کیفیت مناسب برای ادامه آزمایش مورد استفاده قرارگرفتند.

برای انجام PCR از کیت Tag2xMasterMixRed 1.5 mM MgCl2 استفاده شد. کیت مزبور حاوی ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2، ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs و ۰/۰۵ واحد در میکرولیتر Ampliqon Tag DNA Polymeras بود. واکنش PCR در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری انجام گرفت. حجم نهایی مخلوط واکنش در هر میکروتیوب ۳۰ میکرولیتر بود. به‌ترتیب ۲/۵، ۱۵ و ۲ میکرولیتر از DNA الگو، Master Mix2x و از هرکدام از پرایمرها به تیوب‌ها اضافه شدند و با افزودن ۸/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر حجم نهایی مخلوط واکنش در هر میکروتیوب به ۳۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس تیوب‌ها به دستگاه ترموسایکلر (بایورد T100) منتقل شدند. برنامه حرارتی برای ژن PDK4، ۳۴ چرخه شامل دمای واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه به مدت ۸ دقیقه، دمای واسرشتگی ثانویه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۶۱ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۸ دقیقه بود. برای ژن THRSP، برنامه حرارتی شامل ۳۴ چرخه با ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت اولیه، ۹۵ درجه به مدت ۵۵ ثانیه برای واسرشت ثانویه، ۶۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه برای اتصال پرایمر، ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه برای طویل شدن و ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه برای طویل شدن نهایی در نظر گرفته شد.

تعیین ژنوتیپ پرندگان با استفاده از روش RFLP

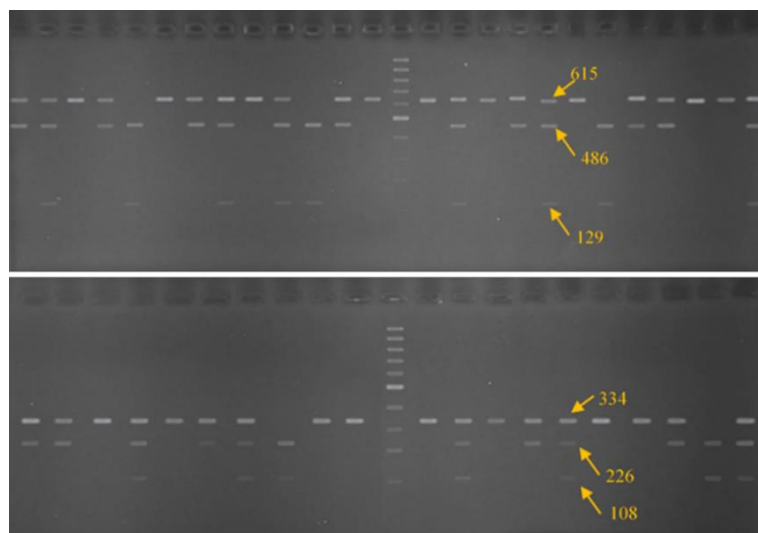
ژن THRSP نیز سه الگوی بانندی مشاهده شدند. الگوی دو بانندی به طول‌های ۲۲۶ و ۱۰۸ جفت‌باز مربوط به ژنوتیپ AA، الگوی سه بانندی به طول ۳۳۴، ۲۲۶ و ۱۰۸ جفت‌باز برای

ژنوتیپ AG و الگوی تک بانندی به طول ۳۳۴ جفت‌باز برای ژنوتیپ GG به‌وضوح در شکل ۱ (پایین) قابل مشاهده هستند.

جدول ۳- موقعیت و توالی برشی هریک از واریانت‌ها

Table 3. The position and cutting sequence of each of the variants

Gene	SNP	Position	Sequence	Cutting site	Cutting type
PDK4	T/C	6829	AAAAGCGATCCAAGAAAGTACTGAATGTTTGGATTGGTGAC	AGTACT	Blunt
THRSP	A/G	39	AGGAGTGGGGCCATGGAGCAGTACTTCTCGGCCACGCAGA	AGTACT	Blunt



شکل ۱- الگوی بانندی ژنوتیپ‌های مختلف ژن PDK4 (بالا) و THRSP (پایین) بعد از هضم آنزیمی

Figure 1. Band patterns of different PDK4 (top) and THRSP (bottom) genotypes after enzymatic digestion

جدول ۴- فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی ژن‌های PDK4 و THRSP

Table 4. Allelic and genotypic frequencies of PDK and THRSP genes

Gene	Genotype	N	Genotype frequency	Allele	Allele frequency
PDK	CC	12	0.105	C	0.435
	TC	75	0.658	T	0.565
	TT	27	0.237	-	-
	Total	114	1	-	1
THRSP	AA	21	0.185	A	0.434
	AG	57	0.5	G	0.566
	GG	36	0.315	-	-
	Total	114	1	-	1

متفاوت اندام‌های درونی از جمله ریه و قلب مرتبط دانسته شده است (Hasanpur et al., 2016). در ژن PDK4 نیز ژنوتیپ CC نسبت به ژنوتیپ‌های TC و TT وزن و نرخ رشد بهتری داشت اما معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). در کل، به‌نظر می‌رسد که پرندگان ژنوتیپ‌های مختلف ژن PDK4، الگوی رشد مشابهی داشتند. واریانت مذکور بر روی نوکلئوتید شماره ۶۸۲۹ ژن PDK4 قرار داشت و به‌غیر از آن ۲۸ واریانت دیگر نیز روی ژن مذکور وجود داشت. به‌دلیل عدم مشاهده ارتباط معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های مختلف آن، توصیه می‌شود که واریانت دیگر ژن PDK4 نیز مورد بررسی قرار گیرد. در ژن THRSP پرندگان مرتبط با ژنوتیپ AA نسبت به ژنوتیپ‌های AG و GG وزن‌گیری بیشتری داشتند، اما این تفاوت به اندازه کافی بزرگ نبود تا از نظر آماری معنی‌دار باشد ($P > 0.05$). در اینجا نیز بین سه ژنوتیپ مختلف ژن THRSP در هیچ‌کدام از مراحل رشد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

با توجه به جدول ۴، در نمونه‌های مورد بررسی در هر دو ژن اکثر افراد جمعیت را ژنوتیپ هتروزیگوت تشکیل می‌دادند. فراوانی آلی نشان می‌دهد که در ژن PDK4 فراوانی ال T نسبت به ال C و در ژن THRSP فراوانی ال G نسبت به ال A بیشتر هستند. نتایج مربوط به ارتباط‌سنجی صفات مرتبط با رشد با ژنوتیپ‌های مختلف ژن‌های PDK4 و THRSP به‌همراه سایر متغیرهای جنسیت و وضعیت سلامت پرند در جداول ۵ و ۶ گزارش شده‌اند. نتایج نشان دادند که نرها بیشتر از ماده‌ها افزایش وزن دارند ولی پرند‌های آسیتی هم در ابتدا و هم در کل دوره پرورش، رشد کمتری نسبت به پرند‌های سالم داشته‌اند. به‌خصوص در اواخر دوره پرورش، پرند‌های مبتلا به آسیت از رشد افتاده و وزن‌گیری یا نرخ رشد کمتری نسبت به پرند‌های سالم داشتند. عدم رشد سریع‌تر پرند‌های حساس به آسیت در مطالعات اخیر نیز مشاهده شده است (Hasanpur et al., 2015; Nematzadeh et al., 2022) و عامل ایجادکننده تفاوت بین پرند‌های سالم و آسیتی به رشد

جدول ۵- مقایسه میانگین حداقل مربعات صفات وزن بدن و نرخ رشد بین جنس‌های نر و ماده، سالم و آسیتی و ژنوتیپ‌های مختلف ژن PDK4
Table 5. Least square mean comparisons of body weight and growth rate traits between males and females, ascitic and healthy birds, and the different genotypes of the PDK4 gene

	bw1 ^s	bw7	bw14	bw21	bw28	bw35	bw42	GR1-21	GR21-42	GR1-42
Male	45.6	127	279	562	1022a	1592a	2153a	25.8	75.8a	51.4a
Female	46.3	129	276	537	932b	1419b	1872b	24.5	63.5b	44.5b
Healthy	46.2	130	282	556	984	1559	2186a	25.5	77.7a	52.2a
Ascitic	46.4	128	274	539	962	1452	1843b	24.6	62.1b	43.8b
CC	48.1	134	285	556	984	1522	2062	25.4	71.7	49.1
TC	45.4	125	269	545	979	1519	2027	25.0	70.6	48.3
TT	45.3	129	279	542	956	1476	1955	24.8	67.3	46.6

^s bw1-bw42 are the body weight traits at the specified day, and GR1-21, GR21-42, and GR1-42 are the growth rate traits from 1 to 21 days, 21 to 42 days, and 1 to 42 days of age, respectively. The units of the body weight and growth rate traits are gram and gram/day, respectively.
a, b, c Least square means within the same column and within the same factor with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

جدول ۶- مقایسه میانگین حداقل مربعات صفات وزن بدن و نرخ رشد بین جنس‌های نر و ماده، سالم و آسیتی و ژنوتیپ‌های مختلف ژن THRSP
Table 6. Least square mean comparisons of body weight and growth rate traits between males and females, ascitic and healthy birds, and the different genotypes of the THRSP gene

	bw1 ^s	bw7	bw14	bw21	bw28	bw35	bw42	GR1-21	GR21-42	GR1-42
Male	46.1	129	280	561	1019a	1593a	2158a	25.8	76.1a	51.5a
Female	46.5	130	275	534	927b	1417b	1871b	24.4	63.6b	44.5b
Healthy	45.8	129	281	558	989	1561	2186a	25.6	77.6a	52.2a
Ascitic	46.1	128	274	541	965	1450	1840b	24.7	61.8b	43.7b
AA	46.8	130	291	569	1001	1524	2028	26.1	69.5	48.3
AG	45.4	125	268	545	978	1528	2027	25.0	70.6	48.3
GG	45.7	130	274	535	953	1465	1983	24.5	68.9	47.3

^s bw1-bw42 are the body weight traits at the specified day, and GR1-21, GR21-42, and GR1-42 are the growth rate traits from 1 to 21 days, 21 to 42 days, and 1 to 42 days of age, respectively. The units of the body weight and growth rate traits are gram and gram/day, respectively.
a, b, c Least square means within the same column and within the same factor with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

رشد ارتباط معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). با این‌که عدم ارتباط ژنتیکی مستقیم بین سندرم آسیت و صفات رشد در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد، مطالعه واریانت‌های دیگر ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای SNP یا RFLP قابل توصیه است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بیوانفورماتیکی این تحقیق موجب شناسایی ۷۵ واریانت از ژن‌های CPT1A، GPR182، MEF2A، PDK4، FABP4 و THRSP شدند. علی‌رغم ارتباط ژن‌های مذکور با سندرم آسیت، مطالعه در سطح جمعیت نشان داد که چندشکلی در دو ژن PDH4 و THRSP با صفات مرتبط با

References

- Alinaghizadeh, R., Mohammadabadi, M., & Zakizadeh, S. (2010). Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, 2(1), 69-80.
- Askari, N., Baghizadeh, A., & Mohammadabadi, M. (2008). Analysis of the genetic structure of Iranian indigenous Raeni cashmere goat populations using microsatellite markers. *Biotechnol*, 2(3), 1-4.
- Askari, N., Mohammadabadi, M., Beygi Nassiry, M., Baghizadeh, A., & Fayazi, J. (2009). Study of genetic diversity of Raeini Cashmere goat based on microsatellite markers. *Journal of Agricultural Science*, 18(4), 155-161.
- Bahador, Y., Mohammadabadi, M., Khezri, A., Asadi, M., & Medhati, L. (2016). Study of genetic diversity in honey bee populations in Kerman province using ISSR markers. *Research on Animal Production (Scientific and Research)*, 7(13), 192-186.
- Cogburn, L., Wang, X., Carre, W., Rejto, L., Aggrey, S., Duclos, M., Simon, J., & Porter, T. (2004). Functional genomics in chickens: development of integrated-systems microarrays for transcriptional profiling and discovery of regulatory pathways. *Comparative and Functional Genomics*, 5(3), 253-261.
- Cogburn, L., Wang, X., Carré, W., Rejto, L., Porter, T., Aggrey, S., & Simon, J. (2003). Systems-wide chicken DNA microarrays, gene expression profiling, and discovery of functional genes. *Poultry Science*, 82(6), 939-951.
- Currie, R. J. (1999). Ascites in poultry: recent investigations. *Avian pathology*, 28(4), 313-326.
- Daneshyar, M., Kermanshahi, H., & Golian, A. (2009). Changes of biochemical parameters and enzyme activities in broiler chickens with cold-induced ascites. *Poultry Science*, 88(1), 106-110. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00170>
- Druryan, S., Ben-David, A., & Cahaner, A. (2007). Development of ascites-resistant and ascites-susceptible broiler lines. *Poultry Science*, 86(5), 811-822.

- Druyan, S., Hadad, Y., & Cahaner, A. (2008). Growth rate of ascites-resistant versus ascites-susceptible broilers in commercial and experimental lines. *Poultry Science*, 87(5), 904-91.
- Gholamhoseinzadeh Gooki, F., Mohammadabadi, M., & Asadi Fozzi, M. (2018). Polymorphism of the growth hormone gene and its effect on production and reproduction traits in goat. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 8(4), 653-659.
- 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.
- Hasanpur, K., Nassiry, M., Hosseini Salekdeh, G., Vaez Torshizi, R., Pakdel, A., & Kermanshahi, H. (2015). Association between early growth-related traits and ascites induced in broiler sire lines by saline drinking water or cool temperatures. *European Poultry Science/Archiv für Geflügelkunde*, 79, (99).
- Hasanpur, K., Nassiry, M., Salekdeh, G. H., Torshizi, R. V., Pakdel, A., & Kermanshahi, H. (2015). Influence of ascites syndrome on growth pattern of chickens reared at normal or cold ambient temperature. *Annals of Animal Science*, 15(2), 373-385.
- Karami, M., Hasanpur, K., Fayazi, J., Javanmard, A., & Varnaseri, H. (2021). The effect of successful phenotypic selection against ascites syndrome on different traits in a commercial broiler line. *Animal Production*, 23(4), 501-514.
- Langmead, B. (2010). Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current Protocols in Bioinformatics*, 32(1), 1-24.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & Subgroup, G. P. D .P. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Liaw, C. W., & Towle, H. C. (1984). Characterization of a thyroid hormone-responsive gene from rat. *Journal of Biological Chemistry*, 259(11), 7253-7260.
- 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, 1297-1303.
- Moazeni, S., Mohammadabadi, M., Sadeghi, M., Moradi Shahrababak, H., & Esmailizadeh, A. (2016). Association of the melanocortin-3 (MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 4(2), 51-56.
- Mohamadipoor Saadatabadi, L., Mohammadabadi, M., Amiri Ghanatsaman, Z., Babenko, O., Stavetska, R., Kalashnik, O., Kucher, D., Kochuk-Yashchenko, O., & Asadollahpour Nanaei, H. (2021). Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in Iranian sheep breeds. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1-9.
- 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.
- Nematzadeh, R., Alijani, S., Hasanpur, K., Olyayee, M., & Shodja, J. (2022). Comparison of different mathematical functions for fitting growth curves of ascitic and healthy broiler chickens. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 69(3), 289-295.
- Rohallah, A., Mohammadreza, M. A., & Shahin, M. B. (2007). Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (*Bos indicus*) using PCR-RFLP. *pakistan Journal of Biological sciences*, 10(23), 4291-4294.
- Rychlik, W. (2007). OLIGO 7 primer analysis software. *PCR Primer Design*, 35-59.
- 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.
- Spriet, L. L., Tunstall, R. J., Watt, M. J., Mehan, K. A., Hargreaves, M., & Cameron-Smith, D. (2004). Pyruvate dehydrogenase activation and kinase expression in human skeletal muscle during fasting. *Journal of Applied Physiology*, 96(6), 2082-2087.
- Trapnell, C., Pachter, L., & Salzberg, S. L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25(9), 1105-1111.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B .C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115-e115.
- Wang, Y., Guo, Y., Ning, D., Peng, Y., Yang, Y., & Liu, D. (2013). Analysis of liver transcriptome in broilers with ascites and regulation by L-carnitine. *The Journal of Poultry Science*, 50(2), 126-137.