

بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی سه اکوتیپ مرغ بومی با جد مشترک و لاین‌های تجاری با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم

Investigation of structure and genetic diversity of three native chicken ecotypes with common ancestor and commercial lines using whole genome sequencing data

الهه رستم‌زاده مهدابی^۱، علی اسمعیلی‌زاده^{۱،۲*}

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری، استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان،
ایران

۲- مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم تحقیقات و فناوری (CISSC) ایران

Rostamzadeh Mahdabi E¹, Esmailizadeh A^{*1,2}

1- Graduated PhD Student, Professor, Department of Animal Science, Faculty of
Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2- Center for international scientific studies and collaboration (CISSC)

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ali_esmaili2@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۳)

چکیده

منابع ژنتیکی مرغ اهلی طیف وسیعی از نژادها و جمعیت‌ها را شامل می‌شود که در اندازه بدن، رنگ پوست، وزن زنده، تولید تخم و گوشت بسیار متنوع هستند. در مطالعه حاضر جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی، تنوع ژنتیکی و همخوانی از داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم، تعداد ۴۵ مرغ از جد مشترک (مرغ جنگلی قرمز)، اکوتیپ‌های بومی و لاین تجاری استفاده شد. میانگین ۹۸ میلیون خوانش کوتاه با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی پردازش و چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی فراخوانی شدند. ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها با کمک نرم‌افزارهای Admixture، SNPhylo و پکیج SNPRelate بررسی شد. نرم‌افزار Plink جهت انجام کنترل کیفیت و محاسبه همخوانی و نرم‌افزار VCFtools جهت برآورد تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد نظر به کار برده شد. نتایج بررسی ساختار ژنتیکی نشان داد که کمترین فاصله ژنتیکی با جد مشترک مربوط به اکوتیپ لاری بود و بیشترین و کمترین سهم SNP مشترک با مرغ جنگلی قرمز به ترتیب مربوط به لاین گوشتی آرین و لاین تخم‌گذار لکه‌ورن بود. همخوانی در لاین‌های تجاری (آرین و لکه‌ورن) تقریباً دو برابر اکوتیپ‌های بومی بود. تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های بومی (به ترتیب لاری، خزک و مرندي) بیشتر از لاین‌های تجاری مشاهده شد. نتایج ما اهمیت استفاده از نشانگرها در کل ژنوم را جهت آگاهی در مورد هموزیگوسیتی بالقوه مضر و جلوگیری از دست دادن تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های بومی را نشان می‌دهد. تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های بومی تنها می‌تواند از طریق برنامه‌های اصلاحی سازمان‌دهی شده حفظ شود.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
لاین تجاری
مرغ بومی
همخوانی

مقدمه

برخی شواهد باستان‌شناسی و مولکولی نشان می‌دهد که جمعیت مرغ اهلی (*Gallus gallus*) از یک جد مشترک با چندین منشا مادری تکامل یافته است (Kanginakudru et al. 2008; Liu et al. 2006; Mwacharo et al. 2011; Nguyen-Phuc and Berres 2012; Sawai et al. 2010; Storey et al. 2018). به‌طوری‌که اکثر مطالعات نشان داده‌اند که مرغ اهلی از مرغ جنگلی قرمز در جنوب و جنوب شرقی آسیا نشأت گرفته است (Osman et al. 2016; Peters et al. 2015; Sawai et al. 2010; Tixier-Boichard et al. 2011). مرغ اهلی در تامین منبع اصلی پروتئین با کیفیت بالا (تولید گوشت و تخم‌مرغ) برای انسان و همچنین به‌عنوان حیوان مدل در مطالعات ژنومی حائز اهمیت می‌باشد (Burt 2007; Stern 2005). مرغ اولین پرنده و اولین حیوان پرورشی بود که ژنوم آن توالی‌یابی شد (Hillier et al. 2004). نسخه فعلی ژنوم مرغ (galGal6) دارای ۳۴ جفت کروموزوم توالی‌یابی شده می‌باشد. از آنجا که برای درک بهتر عملکردها و ساختار ژنوم نیاز به توالی‌یابی کل ژنوم با نمونه‌های زیادی می‌باشد، فناوری توالی‌یابی موازی ایجاد شد که به‌عنوان "توالی‌یابی نسل جدید" (NGS) شناخته می‌شود (Koboldt et al. 2013). NGS به فناوری‌های توالی‌یابی با توان بالا اشاره دارد که می‌توانند همزمان میلیون‌ها یا میلیارد‌ها مولکول DNA را توالی‌یابی کنند. در یک اجرای NGS معمولی، هزاران یا میلیون‌ها توالی همپوشان کوتاه به‌طور هم‌زمان تولید می‌شود. استفاده از اطلاعات کل ژنوم جهت شناخت و حفظ پایه ژنتیکی مرغ‌های بومی از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا نژادهای بومی، تحت یک سیستم کشاورزی پایدار و سازگار با محیط زیست، ارزش اقتصادی، اجتماعی و محیطی را به ویژه برای مردم کشورهای کم‌درآمد فراهم می‌کنند (Leroy et al. 2018). طیور بومی نقش بسیار مهمی در اقتصاد و تغذیه خانواده‌های مناطق روستایی، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه و توسعه نیافته بازی می‌کنند (Wong et al. 2017). هر ساله میلیارد‌ها مرغ برای تأمین تقاضای همیشگی پروتئین حیوانی پرورش می‌یابد، به‌طوری‌که در ایران سرانه‌ی مصرف گوشت مرغ در سال ۲۰۲۱ حدود ۲۵/۵ کیلوگرم بوده است (OECD 2022).

تعداد زیاد فنوتیپ‌های مختلف موجود در مرغ بومی و همچنین سازگاری آن‌ها با محیط‌های مختلف نشان می‌دهد که آن‌ها دارای تنوع ژنتیکی قابل توجهی می‌باشند. بنابراین، آن‌ها ممکن است گنجینه‌ای از اطلاعات مفید برای صفات مهمی باشند که می‌تواند برای تولید در آینده امیدوارکننده باشد (Leroy et al. 2016). اکثر نژادهای بومی کشور از دسته مرغان آسیایی و نژادهای شرقی می‌باشند. تعداد گروه‌های نژادی مرغان بومی ایران دقیقاً مشخص نیست. به‌طور کلی می‌توان آن‌ها را به مرغان عمومی ایران (توده مرغان اصفهان، فارس، یزد، خراسان رضوی، مازندران و...)، مرغ مرنده، گردن لخت، دشتیاری، لاری و خزک دسته‌بندی کرد (Tavakolian 2000). اکوتیپ مرنده از نظر رنگ پرو و بال عموماً سیاه می‌باشد که رنگ پر و بال سیاه با انعکاس سبز رنگ می‌باشد. میزان تخم‌گذاری سالیانه این اکوتیپ ۸۰ عدد در سال می‌باشد. وزن مرغ‌ها در پایان دوره تولید حدود ۱/۸ کیلوگرم و وزن خروس‌ها ۲/۶ کیلوگرم می‌باشد. اکوتیپ لاری از نژادهای سنگین وزن و جنگجو می‌باشد که از نظر رفتار و مورفولوژی نسبت به سایر مرغ‌های بومی ایران متمایز می‌باشد. وزن مرغ‌های بالغ یکساله حدود ۳ تا ۴ کیلوگرم و وزن خروس‌ها ۴ تا ۵ کیلوگرم و حتی بیشتر می‌باشد. تولید تخم‌مرغ سالیانه در این اکوتیپ، بین ۶۰ تا ۸۰ عدد می‌باشد. مرغ‌های خزک دارای تیپ تخم‌گذار می‌باشند، به‌طوری‌که میانگین تخم‌مرغ تولیدی آن‌ها ۱۲۰ عدد در سال می‌باشد. این حیوان دارای جثه کوچک با پاهای کوتاه می‌باشد. وزن بدن در مرغ و خروس نژاد خزک به‌طور میانگین به‌ترتیب ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم می‌باشد (Tavakolian 2000). با توجه به اینکه جمعیت‌های مرغ بومی ایران تاکنون تحت برنامه انتخاب مصنوعی محدودی بوده‌اند، تنوع قابل توجهی در ژنوم آن‌ها مشاهده می‌شود. این منابع ژنی ارزشمند می‌توانند به‌عنوان ذخایر ژنتیکی و سرمایه‌های ملی در برنامه‌های اصلاحی انتخاب ژنومی و تلاقی برای ایجاد مرغ‌های گوشتی و تخم‌گذار با تولید بالا در مناطق روستایی استفاده شوند. بنابراین مطالعه خصوصیات ژنتیکی این اکوتیپ‌ها می‌تواند اطلاعات ما را در مورد این منابع ارزشمند جهت هدف‌گذاری در آینده مفید باشد. هدف از این مطالعه، بررسی ساختار ژنتیکی، همخوانی و تنوع ژنتیکی سه

اکوتیپ مرغ بومی نسبت به جد مشترک و دو لاین تجاری تخم‌گذار و گوشتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

توالی‌یابی کل ژنوم مرغ‌های لاری (۱۰)، خزک (۱۰)، مرندي (۹)، آرین (۱۰) و لگهورن (۱۰) به صورت دو طرفه^۱ رشته‌فوروارد^۲ و ریورس^۳ با استفاده از تکنیک توالی‌یابی نسل بعدی توسط شرکت ایلومینا^۴ Hiseq 2500 در چهارچوب پروژه ژنوم مرغ در سطح جهانی انجام شد (Wang et al. 2020). داده‌های کل ژنوم مرتبط با مرغ جنگلی قرمز (۵) از طریق پایگاه NCBI دانلود شد. کیفیت توالی‌های کوتاه مرتبط با ۱۰۸ فایل توسط نرم‌افزار fastqc مورد بررسی قرار گرفت (Andrews 2010). از نرم‌افزار Trimmomatic برای برش داده‌های fastq ایلومینا با کیفیت پایین و همچنین حذف آداپتورها استفاده شد. به منظور هم‌ردیفی توالی‌های کوتاه با ژنوم مرغ، ابتدا آخرین نسخه ژنوم مرجع مرغ (galGal6) از پایگاه داده Ensemble دانلود شد. به‌منظور فهرست‌بندی^۵ ژنوم مرجع از نرم‌افزار (Burrows-Wheeler BWA (Aligner (Li and Durbin 2009) و الگوریتم bwsw استفاده شد. در مرحله بعد هم‌ردیفی با استفاده از الگوریتم mem انجام شد. فایل‌های خروجی این مرحله با فرمت sam حجم نسبتاً بالایی (در این مطالعه حدود ۲۶ گیگابایت به ازای هر نمونه) داشتند، به‌منظور کاهش حجم فایل‌ها از نرم‌افزار (Li et al. 2009) Samtools جهت تبدیل به فرمت باینری با پسوند bam استفاده شد (حدود ۶ گیگابایت به ازای هر نمونه). توالی‌های کوتاه مضاعف ایجاد شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ابزار Picard حذف شدند. الگوریتم‌های نقشه‌یابی که در مرحله اول هم‌ردیفی داده‌ها با ژنوم مرجع استفاده می‌شوند، دارای خطاهای نقشه‌یابی برای توالی‌های کوتاه در اطراف ایندل‌ها^۶ می‌باشند به همین منظور جهت هم‌ردیفی مجدد اطراف

حذف و اضافه‌های کوتاه از ابزارهای موجود در برنامه GATK (RealignerTargetCreator و indelRealigner) استفاده شد. جهت افزایش دقت برآورد نمره‌های کیفیت بازها، کالیبراسیون مجدد نمره کیفیت باز با استفاده از ابزارهای موجود در برنامه GATK (BaseRecalibrator و PrintReads) انجام شد. در نهایت چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) با استفاده از ابزار UnifiedGenotyper در برنامه GATK از داده‌های کل ژنوم استخراج شدند. فایل ورودی به برنامه شامل ۵۴ فایل با پسوند bam بود. بعد از آنالیز، یک فایل با پسوند VCF به‌دست آمد. برای افزایش کیفیت داده‌ها برای آنالیزهای بعدی، فایل خروجی SNPها، با استفاده از نرم‌افزار Plink، افراد با بیش از ۱۰ درصد ژنوتیپ گمشده (mind 0.1)، SNPهای با فراوانی آلی کمیاب کمتر از ۵ درصد (maf 0.05)، SNPها با ۱۰ درصد ژنوتیپ گمشده و SNPهای با آستانه‌ی P-value کمتر از 10^{-7} (10^{-7}) (--hwe) شناسایی و حذف شدند. با استفاده از نرم‌افزار Samtools درصد هم‌ردیفی با ژنوم مرجع و عمق خوانش‌ها محاسبه شد.

درخت فیلوژنی مبتنی بر روش حداکثر درست‌نمایی با استفاده از نرم‌افزار SNPhylo رسم شد (Lee et al. 2014). جهت بررسی ساختار ژنتیکی بین افراد ۶ جمعیت، تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی با استفاده از بسته SNPRelate در نرم‌افزار R انجام شد (Zheng et al. 2012).

از برنامه ADMIXTURE جهت بررسی ساختار جمعیت و الگوی تنوع ژنتیکی در بین نژادها استفاده شد (Alexander et al. 2009). منبع اجدادی K به تعداد جمعیت‌های مورد استفاده در این مجموعه داده اشاره دارد که در اینجا تعداد جمعیت‌های فرضی جهت آنالیز از k=2 تا k=7 همراه با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ^۷ در نظر گرفته شد.

دنباله‌های متوالی هموزیگوسیتی (ROH) نواحی ممتد کروموزومی هستند که در یک ژنوم دیپلوئید در حالت هموزیگوت ظاهر می‌شوند و آلل‌های یکسانی را در جایگاه‌های متوالی متعددی نشان می‌دهند (Ceballos et al. 2018). جزایر^۸ ROH در همه‌ی

^۱ Paired-End

^۲ Forward

^۳ Reverse

^۴ Illumina

^۵ Indexing

^۶ InDels (Insertion-Deletion)

^۷ Bootstrap

^۸ Islands

شد و در مرحله‌ی بعد با استفاده از بسته VennDiagram در نرم‌افزار R، میزان اشتراک SNP‌های بین مرغ جنگلی قرمز با هریک از اکوتیپ‌ها یا لاین‌ها تصویرسازی شد.

نتایج

کنترل کیفیت داده‌ها و فراخوانی SNP اولین مرحله‌ی آنالیز داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم، مرحله کنترل کیفیت می‌باشد. تعداد ۱۰۸ فایل به‌طور مجزا با استفاده از نرم‌افزار FastQC بررسی شد و به‌جز در موارد محدودی، اکثر فایل‌ها دارای کیفیت عالی بودند. نتایج هم‌ردیفی توالی‌های کوتاه با ژنوم مرجع نشان داد که درصد نقشه‌یابی صحیح با ژنوم مرجع بین ۹۴ تا ۹۸ درصد بود که نشان‌دهنده عملکرد بالای نقشه‌یابی می‌باشد. عمق خوانش در مرغ جنگلی قرمز حدود ۱۹X و در اکوتیپ‌های بومی و لاین‌های تجاری حدود ۷/۵X بود. بیشترین تعداد خوانش مرتبط با مرغ جنگلی قرمز بود (جدول ۲).

نواحی ماکرو و میکرو کروموزوم‌های مرغ مشاهده می‌شوند (Oraziatti 2015). این جزایر در بین افراد مختلف، در فراوانی و طول‌های متفاوتی وجود دارند. در این پژوهش، توزیع طول ROH درون جمعیت‌ها با استفاده از تابع "homozyg" در نرم‌افزار Plink (جدول ۱) در دسته‌های طولی مختلف ۰/۳-۱ (کوتاه) ۱-۱/۵ (متوسط) و ۱/۵ > (بلند) مگا جفت باز بررسی شد. ضرایب هم‌خونی بر اساس نشانگرها با استفاده از نرم‌افزار Plink (HOM) و همچنین روش تعریف شده توسط McQuillan et al. (2008) محاسبه شد (FROH) (۱):

$$F_{ROH} = \frac{L_{ROH}}{L_{auto}} \quad (1)$$

در این رابطه، L_{ROH} مجموع طول ROH‌ها در ژنوم یک فرد و L_{auto} طول کل ژنوم اتوزومی یک فرد که با SNP پوشیده شده است.

تنوع ژنتیکی (Pi) درون هر نژاد/اکوتیپ و مقدار هتروزیگوسیتی با استفاده از نرم‌افزار VCFtools و Plink محاسبه شد (Danecek et al. 2011). جهت شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلوتیدی خاص و مشترک بین نژاد/اکوتیپ از نرم‌افزار VCFtools استفاده

جدول ۱- پارامترهای مورد استفاده برای شناسایی نواحی ROH

توصیف	مقدار	پارامتر
حداکثر تعداد SNP مورد نیاز برای در نظر گرفتن یک ROH	۵۰	homozyg-snp
اندازه‌ی پنجره کشویی ^۱ (kb)	۳۰۰	homozyg-kb
حداکثر تراکم مورد نیاز جهت در نظر گرفتن یک ROH	۵۰	homozyg-density
حداکثر فاصله بین دو SNP برای در نظر گرفتن در ROH مشابه (kb)	۱۰۰۰	homozyg-gap
تعداد SNP موجود در پنجره کشویی	۵۰	homozyg-window-snp
تعداد SNP هتروزیگوس مجاز در یک ROH	۳	homozyg-window-het
تعداد فراخوان‌های گمشده مجاز در یک ROH	۵	homozyg-window-missing
نسبتی از پنجره‌های همپوشان که باید هموزیگوس خوانده شود تا یک SNP معین در یک قطعه هموزیگوس تعریف شود	۰/۰۵	homozyg-window-threshold

جدول ۲- خصوصیات توالی‌های کوتاه پردازش شده مربوط به مرغ جنگلی قرمز (جد مشترک) و مرغ‌های بومی و تجاری

نژاد/اکوتیپ	تعداد	پوشش	درصد نقشه‌یابی	تعداد خوانش
مرغ جنگلی قرمز	۵	۱۸/۹۹	۹۴/۷۱	۱۱۸،۷۲۰،۲۴۵
مردی	۹	۷/۰۵	۹۸/۱۱	۳۳۴،۳۱۷،۶۵
خزک	۱۰	۷/۴۸	۹۷/۹۰	۵۷۱،۱۷۷،۶۶
لاری	۱۰	۷/۳۸	۹۸/۶۶	۴۱۹،۸۳۱،۷۰
آرین	۱۰	۷/۴۱	۹۸/۵۴	۵۳۱،۵۱۸،۶۸
لگهورن	۱۰	۸/۱۲	۹۸/۴۴	۵۸۸،۳۷۷،۷۲

¹ Sliding window

داشت. اکوتیپ لاری با خصوصیات ظاهری مشابه به مرغ جنگلی قرمز کمترین فاصله ژنتیکی را نسبت به جد مشترک نشان داد. نتایج ADMIXTURE برای جمعیت‌های فرضی $K = 2$ تا $K = 7$ در شکل ۱ (ب) ارائه شده است. این نتایج شواهد تأییدکننده بیشتری برای روابط ژنتیکی مرغ‌های بومی با یکدیگر و با لاین‌های تجاری ارائه کرد. خطای تخمینی یا CV^1 برای پیش‌بینی مناسب‌ترین مقدار K (تعداد بهینه جمعیت‌ها در مجموعه داده) استفاده می‌شود. حداقل CV در جمعیت فرضی $K=2$ رخ داد. در $K=2$ تنها لاین لگهون در خوشه جداگانه قرار داشت. در $K=3$ تا $K=7$ مرغ جنگلی قرمز و مرغ مرندی ترکیب ناهمگنی^۲ داشتند.

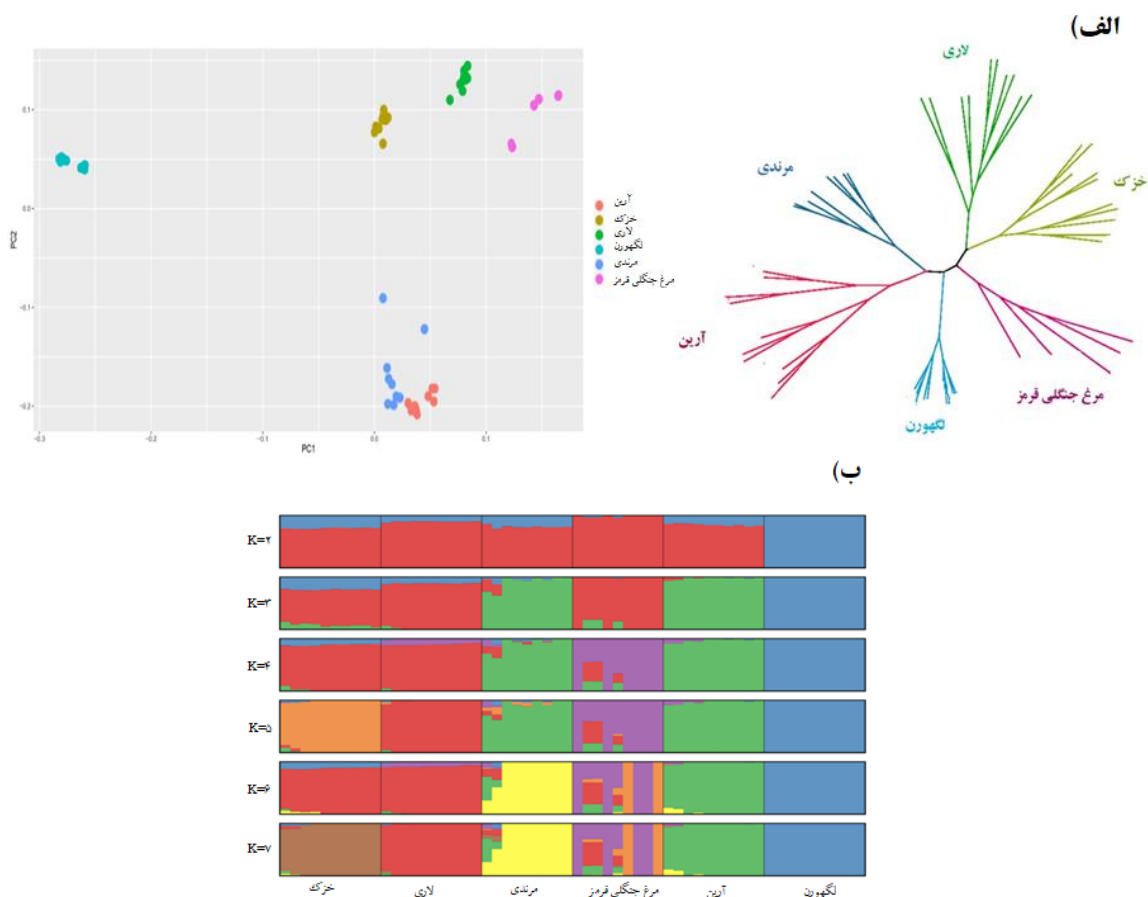
¹ cross validation error (CV-error)

² heterogenous

فراخوانی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی منجر به شناسایی ۱۴,۲۵۱,۸۲۷ SNP در مرغ جنگلی قرمز، ۱۰,۷۶۳,۳۳۵ SNP در اکوتیپ‌های بومی و ۹,۱۱۲,۶۹۰ SNP در لاین‌های تجاری شد.

ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها

با استفاده از حدود ۱۳ میلیون SNP، درخت فیلوژنی براساس روش حداکثر درست‌نمایی ترسیم شد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است هر جمعیت دارای زیر خوشه‌هایی می‌باشد اما آن‌ها از نظر ژنتیکی به خوشه‌های مجزا تفکیک شدند. در تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی، مؤلفه‌های اصلی اول و دوم در محور مختصات موجب تقسیم مجموعه داده به ۶ گروه مجزا شد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بین این جمعیت‌ها می‌باشد. بیشترین فاصله ژنتیکی لاین لگهون با جد مشترک و اکوتیپ‌های بومی



شکل ۱- بررسی روابط فیلوژنتیکی ۵۴ مرغ جنگلی قرمز، بومی و تجاری با استفاده از درخت فیلوژنی و تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA) (الف) و نمودار Admixture برای نژادهای مختلف براساس تعداد متفاوت اجداد فرضی (K) (ب)

ROH با میانگین $111/7$ قطعه به ازای هر حیوان در اکوتیپ لاری، $162/5$ قطعه ROH با میانگین $162/5$ قطعه به ازای هر حیوان در لاین لگهورن، $224/4$ قطعه با میانگین $224/4$ قطعه به ازای هر حیوان در لاین آراین مرندي. در جدول ۳ توزیع نواحی ROH در سراسر ژنوم در مرغ جنگلی قرمز، مرغ‌های بومی و تجاری نشان داده شده است. میانگین اندازه کل قطعات ROH در اکوتیپ مرندي بیشتر لاین لگهورن بود اما میانگین تعداد ROH در لاین لگهورن بیشتر از اکوتیپ مرندي بود. کمترین و بیشترین طول ناحیه ژنومی تحت پوشش ROH به ازای هر حیوان به ترتیب در مرغ جنگلی قرمز و لاین آراین مشاهده شد. طول‌های پیوسته از ژنوتیپ‌های هموزیگوت در همه کروموزوم‌ها به جز در کروموزوم ۱۶ مشاهده شدند.

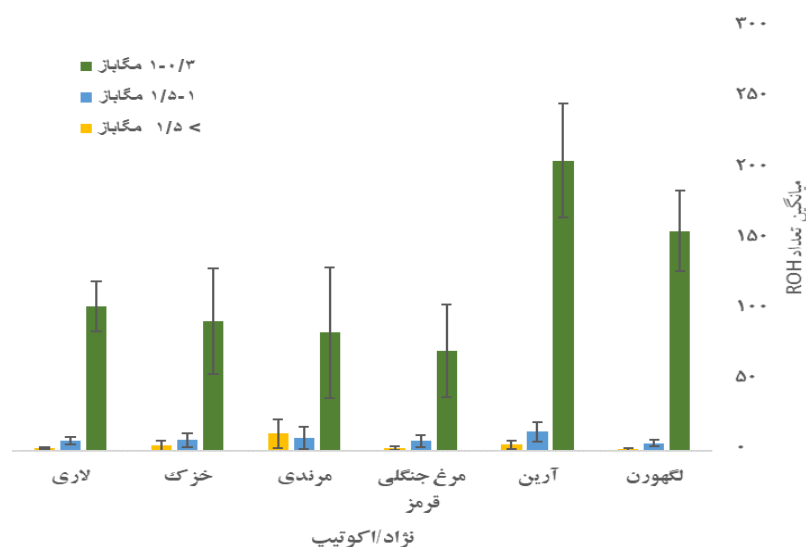
از $k=2$ تا $k=5$ لاین آراین از دو جمعیت تشکیل شده بود اما در $k=6$ و $k=7$ این لاین با جمعیت‌های مرغ جنگلی قرمز و مرندي ترکیب شد. در $K=5$ اکوتیپ خزک در خوشه کاملاً مجزایی قرار گرفت. لازم به ذکر است که در K های فرضی ۴ تا ۷ اکوتیپ لاری کمی با جمعیت‌های مرغ جنگلی قرمز و لاین آراین آمیخته بود.

بررسی توزیع ROH در کل ژنوم

در بررسی دسته‌های طولی قطعات ROH در کل ژنوم، در مجموع 401 قطعه ROH با میانگین $80/2$ قطعه به ازای هر حیوان در مرغ جنگلی قرمز، 948 قطعه ROH با میانگین $105/33$ قطعه به ازای هر حیوان در اکوتیپ مرندي، 1033 قطعه ROH با میانگین $103/3$ قطعه به ازای هر حیوان در اکوتیپ خزک، 1117 قطعه

جدول ۳- توزیع نواحی ROH در سراسر ژنوم در مرغ جنگلی قرمز (جد مشترک)، مرغ‌های بومی و تجاری

نژاد/اکوتیپ	میانگین تعداد ROH	میانگین اندازه کل قطعات ROH (kb)	میانگین طول ROH (kb)
مرغ جنگلی قرمز	$80/2$	$48984/51$	$610/77$
مرندي	$105/33$	$86106/64$	$817/46$
خزک	$103/3$	$63608/01$	$615/76$
لاری	$111/7$	$60666/03$	$543/11$
لگهورن	$162/5$	$80822/4$	$497/67$
آراین	$224/4$	$125004/3$	$557/06$



شکل ۲- توزیع تعداد ROH در دسته‌های طولی مختلف در مرغ جنگلی قرمز (جد مشترک) و مرغ‌های بومی و تجاری

بیشترین تنوع ژنتیکی به ترتیب در مرغ جنگلی قرمز، اکوتیپ‌های بومی و لاین‌های تجاری برآورد شد. در بین اکوتیپ‌ها بیشترین تنوع ژنتیکی متعلق به اکوتیپ لاری، خزک و مرندي مشاهده شد (جدول ۵).

جدول ۵- تنوع ژنتیکی در مرغ جنگلی قرمز (جد مشترک) و مرغ‌های بومی و

نژاد/اکوتیپ	تنوع ژنتیکی (Pi)
مرغ جنگلی قرمز	0.0048 ± 0.0017
لاری	0.004 ± 0.0016
خزک	0.0038 ± 0.0016
مرندي	0.0034 ± 0.0014
لگهورن	0.0029 ± 0.0014
آرین	0.0034 ± 0.0015

نتایج بررسی میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ($\bar{H}_o$) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ($\bar{H}_e$) در جمعیت‌های مختلف در جدول ۶ نشان داده است. در همه جمعیت‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده از مورد انتظار کمتر می‌باشد. کمترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در لاین آرین مشاهده شد. در مواردی که هتروزیگوسیتی مشاهده شده کمتر از حد مورد انتظار باشد، احتمالاً این اختلاف را باید به نیروهایی مانند همخونی نسبت دهیم.

جدول ۶- نرخ هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جمعیت‌های

نژاد/اکوتیپ	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار
مرغ جنگلی قرمز	۰/۲۸	۰/۲۹
لاری	۰/۳۰	۰/۳۳
خزک	۰/۳۱	۰/۳۳
مرندي	۰/۲۹	۰/۳۰
آرین	۰/۲۷	۰/۳۵
لگهورن	۰/۳۵	۰/۳۶

چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی خاص و مشترک اکوتیپ‌های بومی و لاین‌ها تجاری با جد مشترک

در شکل ۴ SNP‌های خاص و مشترک هر اکوتیپ و لاین با مرغ جنگلی قرمز نشان داده شده است. بیشترین سهم SNP مشترک

در بررسی دسته‌های طولی مختلف ROH در سراسر ژنوم، نتایج نشان داد که میانگین پوشش قطعات ROH کوتاه نسبت به ROH بلند در همه‌ی جمعیت‌ها بیشتر بود اما لاین‌های آرین و لگهورن دارای بیشترین تعداد ROH به ازای هر حیوان بودند. کمترین تعداد ROH در همه‌ی دسته‌های طولی مرتبط با مرغ جنگلی قرمز بود. اکوتیپ مرندي نسبت به سایرین دارای تعداد ROH بلندتر از ۱/۵ مگاباز بود که نشان‌دهنده‌ی همخونی اخیر می‌باشد. (شکل ۲).

همخونی و تنوع ژنتیکی

محاسبه ضرایب همخونی با استفاده از دو روش مختلف نشان داد که کمترین ضرایب همخونی به ترتیب متعلق به مرغ جنگلی قرمز، اکوتیپ بومی و لاین‌های تجاری بود (جدول ۴). در بین اکوتیپ‌های بومی مرغان خزک، لاری و مرندي به‌ترتیب دارای کمترین نرخ همخونی بودند (شکل ۳).

جدول ۴- ضرایب همخونی در مرغ جنگلی قرمز (جد مشترک) و مرغ‌های

نژاد/اکوتیپ	تعداد	همخونی (HOM)	همخونی (FROH)
مرغ جنگلی قرمز	۵	۰/۰۱	۰/۰۵
بومی	۲۹	۰/۰۵	۰/۰۷
تجاری	۲۰	۰/۱۲	۰/۱

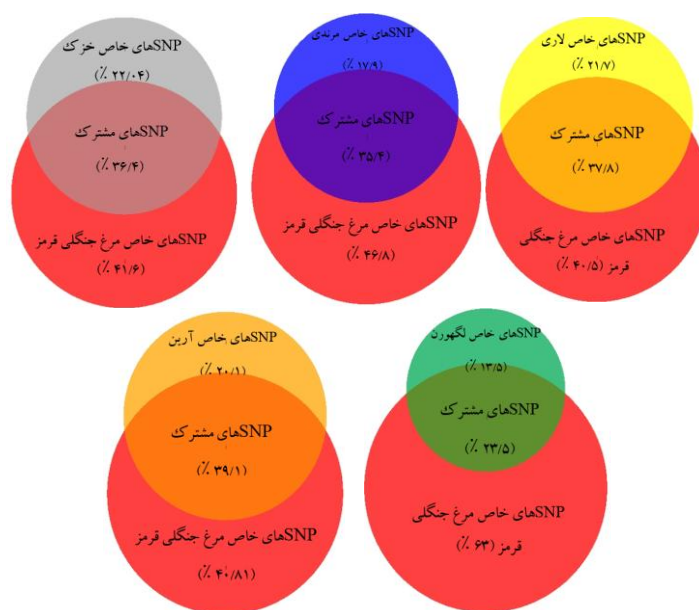


شکل ۳- ضرایب همخونی مبتنی بر FROH در مرغ جنگلی قرمز و مرغ‌های بومی و تجاری

داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌یابی کل ژنوم با پوشش کم، یک ابزار مقرون به صرفه برای تولید مجموعه داده‌ای بسیار بزرگ می‌باشد تا برآورد صحیحی از روابط فیلوژنی بین جمعیت‌ها داشته باشیم (Tiley et al. 2020). در مطالعه حاضر، میانگین پوشش توالی‌ها ۹/۴۵ بود که برای رسم درخت فیلوژنی و بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها مناسب بود. همان‌طور که مشاهده شد همه اکوتیپ‌ها و لاین‌ها از جد مشترک جدا شدند و اکوتیپ‌های بومی نسبت به لاین‌های تجاری ارتباط ژنتیکی نزدیکتری به جد مشترک داشتند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجهی که در مرغان بومی باقی مانده است. در آنالیز ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در همه kهای فرضی، لاین لگهورن با رنگ آبی نمایش داده شد که نشان‌دهنده خلوص ژنتیکی این نژاد می‌باشد که با نتایج PCA مطابق بود. در آنالیز PCA اکوتیپ مرندی و لاین آراین با فاصله کمی نسبت به هم قرار گرفتند که احتمالاً به دلیل تلاقی سویه‌های آراین با مرغ مرندی در مناطق روستایی می‌باشد.

آنالیز توزیع ROH، طول و فراوانی آن در ژنوم می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در مورد تاریخچه جمعیت، همخوانی ژنومی و تنوع ژنتیکی ارائه دهد (Ceballos et al. 2018; Fleming et al. 2016; Mastrangelo et al. 2017). در مطالعه حاضر اندازه قطعات ROH در بین جمعیت‌ها در محدوده ۰/۳ تا ۶/۷ Mb قرار داشت که منعکس کننده شجره‌نامه گذشته آن‌ها می‌باشد. در مطالعه‌ای (Talebi et al. 2020) گزارش دادند که لاین لگهورن دارای تعداد قطعات ROH بیشتری نسبت به جمعیت مورد مطالعه‌شان می‌باشد اما در اینجا لاین آراین دارای بیشترین تعداد قطعه ROH به ازای هر پرنده بود. در مقابل، مرغ جنگلی قرمز و مرغ‌های بومی دارای کمترین تعداد ROH به ازای هر پرنده بودند که با مطالعات گذشته مطابقت داشت (Talebi et al. 2020; Zhang et al. 2020). تنوع بالا در مدیریت واحدهای پرورش کوچک، می‌تواند ناهمگونی بالا در تنوع و پروفایل ROH را در اکوتیپ‌های بومی در مقایسه با لاین‌های تجاری را توضیح دهد. وجود قطعات بیشتری از ROH‌های بلند در اکوتیپ مرندی در مقایسه با سایر اکوتیپ‌ها بیانگر همخوانی اخیر می‌باشد، همچنین وجود قطعات بیشتری از ROH‌های کوتاه در لاین‌های آراین و

با مرغ جنگلی قرمز به ترتیب مربوط به لاین گوشتی آراین، اکوتیپ لاری، خزک و مرندی بود و کمترین مربوط به لاین تخم‌گذار لگهورن می‌باشد. لازم به ذکر است در بررسی SNP‌های خاص و مشترک بین لاین آراین و مرغ مرندی مشاهده شد که حدود ۵۱ درصد SNP‌ها این دو جمعیت مشترک بودند.



شکل ۴- چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی خاص و مشترک اکوتیپ‌های بومی و لاین‌ها تجاری با جد مشترک

بحث

همزمان با تغییرات آب و هوای جهانی، میزان عوامل تنش‌زای محیطی مانند دما، عوامل بیماری‌زا و خشکسالی در حال افزایش می‌باشد که بقا و پایداری تولید دام را محدود می‌کند. تولید مرغ و گسترش آن وابسته به حیوانات قوی می‌باشد که قادر به رویارویی با عوامل استرس‌زا در محیط‌های مختلف باشد. مرغ‌های بومی به دلیل انتخاب طبیعی، نسبت به شرایط سخت محیطی مانند تنش گرمایی، تغذیه فقیر (استفاده از ضایعات کشاورزی، اضافه و دور ریز غذای روستاییان، پسرعلوفه و سبزیجات و بعضی از کرم‌ها و حشرات) و مقاومت به بیماری‌ها سازگار شده‌اند (Elbeltagy et al. 2019; Walugembe et al. 2018). با توجه به اهمیت شناخت و حفظ اکوتیپ‌های بومی، در مطالعه حاضر ساختار ژنتیکی سه اکوتیپ مرغ بومی با جد مشترک و لاین‌های تجاری با استفاده از

لگهورن منعکس کننده همخوانی قدیمی تر است زیرا با گذشت زمان، طول قطعات ROH بلند توسط رویدادهای نوترکیبی شکسته می شود که این قطعات کوتاه اجداد مشترک دورتری را نشان می دهد (Ferenčaković et al. 2013; Howrigan et al. 2011).

تنوع فنوتیپی گسترده مانند رنگ پر و سایر خصوصیات مورفولوژیکی، رفتاری و تولیدی که در مرغ بومی وجود دارد اما در مرغ جنگلی قرمز وجود ندارد، نتیجه اهلی سازی، سازگاری با اکوسیستم های مختلف و انتخاب دقیق انسان برای تولید و یا ارزش های زیبایی شناختی می باشد (Lawal et al. 2018). در بررسی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی خاص و مشترک بین جمعیت ها با جد مشترک، بیشترین سهم SNP مشترک با مرغ جنگلی قرمز مربوط به لاین گوشتی آراین بود که این امر منعکس کننده وجود جایگاه های مشترک مرتبط با رشد و تولید گوشت می باشد. لاین لگهورن دارای کمترین سهم SNP مشترک با جد مشترک بود زیرا این لاین چندین سال به عنوان یک جمعیت بسته در جهت بهبود عملکرد صفات مرتبط با تولید تخم نگهداری می شد و دارای یک مخزن ژنی ویژه می باشد. علاوه بر این میانگین تعداد SNP در هر نژاد/اکوتیپ محاسبه شد، در مقایسه با جد مشترک و اکوتیپ های بومی، لاین لگهورن کمترین تعداد SNP را نسبت به ژنوم مرجع داشت که با مطالعه Ulfah et al. (2016) مطابقت دارد.

در طول قرن بیستم، جمعیت های تجاری به طور تخصصی به سمت تولید گوشت و تخم مرغ پیش رفته اند که این امر همراه با انجام روش های پرورش مدرن براساس تئوری ژنتیک کمی در بهبود بهره وری بسیار موفق بوده است (Havenstein et al. 2003)، با این حال به حداکثر رساندن عملکرد تولیدی با عواقبی مانند کاهش ایمنی و صفات نامطلوب همراه بوده است (van der Most et al. 2011). لاین های تجاری خالص، ۵۰٪ یا حتی مقدار بیشتری از تنوع ژنتیکی (به ویژه آلل های نادر مربوط به مقاومت در برابر بیماری های عفونی) را که در نژادهای اجدادی آنها وجود دارد، از دست داده اند (Muir et al. 2008). به همین جهت حفظ جمعیت مرغ بومی، به عنوان منبع آلل های کمیاب، برای برنامه های اصلاحی طیور ضروری و مورد نیاز می باشد تا تنوع

ژنتیکی در طیور تجاری حفظ شود (Muir et al. 2008). تنوع بسیار کم در لاین های تجاری مانند لگهورن و آراین، ممکن است انعطاف پذیری را برای پاسخ به نیازهای آینده پیش بینی نشده محدود کند. در مطالعه حاضر اکوتیپ های بومی نسبت به لاین های تجاری تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای را نشان دادند، بنابراین لازم است تنوع ژنتیکی در این مرغ ها حفظ شود تا فرصت پاسخگویی به چالش های آینده را داشته باشیم.

در مطالعه ای (Lawal et al. 2018) تنوع ژنتیکی در مرغ جنگلی قرمز را بیشتر از اکوتیپ های بومی برآورد کردند که با مطالعه ما مطابقت دارد. تنوع ژنتیکی برآورد شده در اکوتیپ خزک بیشتر از گزارشات قبلی بود و از طرفی تنوع ژنتیکی مشاهده شده و مورد انتظار در اکوتیپ مرنندی و لاری کمتر از برآوردهای انجام شده در مطالعات گذشته می باشد که احتمالاً به دلیل تفاوت در تعداد نمونه و روش های پردازش خوانش های کوتاه می باشد (Akbari et al. 2021; Bazgir et al. 2021; Rostamzadeh Mahdabi et al. 2020). از طرف دیگر تنوع ژنتیکی در اکوتیپ لاری بیشتر از اکوتیپ خزک برآورد شد که با مطالعه (Rabani 2010) که تنوع ژنتیکی را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی کردند مطابقت داشت. در مقایسه با مطالعه (Zhang et al. 2010) تنوع ژنتیکی مشاهده شده و مورد انتظار در لاین لگهورن بیشتر و مرغ جنگلی قرمز کمتر به دست آمد اما در هر دو مطالعه هتروزیگوسیتی مشاهده شده از مورد انتظار کمتر بود. برای اکوتیپ های بومی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده پایین تر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود که نشان دهنده ی حفاظت کم از تنوع در این اکوتیپ ها در سال های اخیر می باشد.

اقدامات برای حفظ و نگهداری تنوع ژنتیکی در اکوتیپ های بومی باید شامل امکانات جدید استفاده از آنها باشد، اما از نظر ژنتیکی، این گونه اکوتیپ ها باید در برنامه های حفاظتی گنجانده شوند. این برنامه ها شامل حفاظت ژنتیکی در بانک های ژن و حفاظت گله ها می باشد که به درستی مدیریت شوند تا میزان همخوانی را به حداقل برسانند. گله ها باید در تعداد زیاد نگهداری شوند تا از جفت گیری غیر تصادفی و آسیب پذیری در برابر اثرات رانش ژنتیکی جلوگیری شود، در غیر این صورت تعداد کمتر پرندگان در گله ها منجر به کاهش تنوع ژنتیکی در طول زمان می شود.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم تحقیقات و فناوری (CISSC) (به شماره ۴۰۰۱۵۵) انجام شده است.

وابستگی سازمانی

دانشگاه شهید باهنر کرمان و مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم تحقیقات و فناوری.

منابع

- Akbary R, Esmaeelizadeh A, Amiri Ghanatsaman Z, Ayatollahi Mehrjerdi A (2020) Identification of genome diversity in marandi chicken using whole genome sequencing method. *Agricultural Biotechnology Journal* 12:161-76. (In Farsi).
- Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome research* 19:1655-64.
- Andrews S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Bazgir H, Esmaeelizadeh A, Amiri Z, Asadi Fouzi M (2021) Identification of genome diversity in Lari chicken using whole genome sequencing method. *Agricultural Biotechnology Journal* 13:189-204. (In Farsi).
- Burt DW (2007) Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poultry Science* 86:1460-71.
- Ceballos FC, Hazelhurst S, Ramsay M (2018) Assessing runs of Homozygosity: a comparison of SNP Array and whole genome sequence low coverage data. *BMC Genomics* 19:106.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27:2156-8.
- Elbeltagy AR, Bertolini F, Fleming DS, Van Goor A, Ashwell CM, Schmidt CJ, et al. (2019) Natural selection footprints among African chicken breeds and village ecotypes. *Frontiers in Genetics* 10:376.
- Ferenčaković M, Hamzić E, Gredler B, Solberg T, Klemetsdal G, Curik I, et al. (2013) Estimates of autozygosity derived from runs of homozygosity: empirical evidence from selected cattle populations. *Journal Animal Breeding Genetics* 130:286-93.
- Fleming D, Koltjes J, Markey A, Schmidt C, Ashwell C, Rothschild M, et al. (2016) Genomic analysis of Ugandan and Rwandan chicken ecotypes using a 600 k genotyping array. *BMC Genomics* 17:407.
- Havenstein G, Ferket P, Qureshi M (2003) Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* 82:1500-8.
- Hillier L, Miller W, Birney E, Warren W, Hardison R, Ponting C, et al. (2004) International Chicken Genome Sequencing Consortium: Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432:69-716.
- Hillier LaDeana W (2004) International chicken genome sequencing consortium. *Nature* 432:695-716.
- Howrigan DP, Simonson MA, Keller MC (2011) Detecting autozygosity through runs of homozygosity: a comparison of three autozygosity detection algorithms. *BMC Genomics* 12:460.
- Kanginakudru S, Metta M, Jakati R, Nagaraju J (2008) Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. *BMC Evolutionary Biology* 8:174.
- Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER (2013) The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* 155:27-38.
- Lawal RA, Al-Atiyat RM, Aljumaah RS, Silva P, Mwacharo JM, Hanotte O (2018) Whole-genome resequencing of red junglefowl and indigenous village chicken reveal new insights on the genome dynamics of the species. *Frontiers in Genetics* 9:264.
- Lee T-H, Guo H, Wang X, Kim C, Paterson AH (2014) SNPhylo: a pipeline to construct a phylogenetic tree from huge SNP data. *BMC Genomics* 15:162.
- Leroy G, Baumung R, Boettcher P, Besbes B, From T, Hoffmann I (2018) Animal genetic resources diversity and ecosystem services. *Global Food Security* 17:84-91.
- Leroy G, Besbes B, Boettcher P, Hoffmann I, Capitan A, Baumung R (2016) Rare phenotypes in domestic animals: unique resources for multiple applications. *Animal Genetics* 47:141-53.
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754-60.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-9.
- Liu Y, Wu G-S, Yao Y-G, Miao Y-W, Luikart G, Baig M, et al. (2006) Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:12-9.
- Mastrangelo S, Tolone M, Sardina MT, Sottile G, Sutura AM, Di Gerlando R, et al. (2017) Genome-wide scan for runs of homozygosity identifies potential candidate genes associated with local adaptation in Valle del Belice sheep. *Genetics Selection Evolution* 49:84.
- Muir WM, Wong GK-S, Zhang Y, Wang J, Groenen MA, Crooijmans RP, et al. (2008) Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:17312-7.

Mwacharo JM, Bjørnstad G, Mobegi V, Nomura K, Hanada H, Amano T, et al. (2011) Mitochondrial DNA reveals multiple introductions of domestic chicken in East Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58:374-82.

Nguyen- Phuc H, Berres ME (2018) Genetic structure in Red Junglefowl (*Gallus gallus*) populations: Strong spatial patterns in the wild ancestors of domestic chickens in a core distribution range. *Ecology and Evolution* 8:6575-88.

OECD (2022), Meat consumption (indicator). doi: 10.1787/fa290fd0-en (Accessed on 21 March 2022)

Oraziotti J. Islands AND deserts: patterns of runs of homozygosity in chicken breeds: MS Thesis. University of Natural Resources and Life Science, Vienna, Austria; 2015.

Osman SA-M, Yonezawa T, Nishibori M (2016) Origin and genetic diversity of Egyptian native chickens based on complete sequence of mitochondrial DNA D-loop region. *Poultry Science* 95:1248-56.

Peters J, Lebrasseur O, Best J, Miller H, Fothergill T, Dobney K, et al. (2015) Questioning new answers regarding Holocene chicken domestication in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:E2415.

Rabani F (2010) Study of genetic diversity of Khazak and Dashtiari chicken using microsatellite markers. Dissertation for MSc degree in animal breeding , University of Zabol (In Farsi).

Rostamzadeh Mahdabi E, Asadi Fozzi M, Esmailizadeh A, Ayatollahi A, Masoudzadeh H (2021) The study of genetic diversity in Khazak native chicken using whole genome sequencing. *Agricultural Biotechnology Journal* 13:91-106. (In Farsi).

Sawai H, Kim HL, Kuno K, Suzuki S, Gotoh H, Takada M, et al. (2010) The origin and genetic variation of domestic chickens with special reference to junglefowls *Gallus g. gallus* and *G. varius*. *PLoS One* 5:e10639.

Stern CD (2005) The chick: a great model system becomes even greater. *Developmental cell* 8:9-17.

Storey AA, Athens JS, Bryant D, Carson M, Emery K, DeFrance S, et al. (2012) Investigating the global dispersal of chickens in prehistory using ancient mitochondrial DNA signatures. *PloS One* 7:e39171.

Talebi R, Szmatoła T, Mészáros G, Qanbari S (2020) Runs of Homozygosity in Modern Chicken Revealed by Sequence Data. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 10:4615-23.

Tavakolian J (2000) An introduction to genetic resources of native farm animals in Iran. *Animal Science Research Center of Iran* (In Farsi).

Tiley GP, Pandey A, Kimball RT, Braun EL, Burleigh JG (2020) Whole genome phylogeny of *Gallus*: introgression and data-type effects. *Avian Research* 11:1-15.

Tixier-Boichard M, Bed'hom B, Rognon X (2011) Chicken domestication: from archeology to genomics. *Comptes Rendus Biologies* 334:197-204.

Ulfah M, Kawahara-Miki R, Farajallah A, Muladno M, Dorshorst B, Martin A, et al. (2016) Genetic features of red and green junglefowls and relationship with Indonesian native chickens Sumatera and Kedu Hitam. *BMC genomics* 17:1-9.

van der Most PJ, de Jong B, Parmentier HK, Verhulst S (2011) Trade off between growth and immune function: a meta analysis of selection experiments. *Functional Ecology* 25:74-80.

Walugembe M, Bertolini F, Dematawewa CMB, Reis MP, Elbeltagy AR, Schmidt CJ, et al. (2018) Detection of selection signatures among Brazilian, Sri Lankan, and Egyptian chicken populations under different environmental conditions. *Frontiers in Genetics* 9:737.

Wang MS, Thakur M, Peng MS, Jiang Y, Frantz LAF, Li M, et al. (2020). 863 genomes reveal the origin and domestication of chicken. *Cell Research*. 30:693–701.

Wong J, de Bruyn J, Bagnol B, Grieve H, Li M, Pym R, et al. (2017) Small-scale poultry and food security in resource-poor settings: A review. *Global Food Security* 15:43-52.

Zhang J, Nie C, Li X, Ning Z, Chen Y, Jia Y, et al. (2020) Genome-wide population genetic analysis of commercial, indigenous, game, and wild chickens using 600K SNP microarray data. *Frontiers in Genetics* 11:1154.

Zheng X, Levine D, Shen J, Gogarten SM, Laurie C, Weir BS (2012) A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics* 28:3326-8.