



Original Research Paper

Differential Expression analysis of microarray data for three migratory and one non-migratory bird as candidates of migratory and non-migratory species

Zahra Mahdavi Nezhad ¹, Hassan Rajabi Maham ^{2*}, Mahdi Ramezani ¹, Ali Sharifi Zarchi ³

¹ Department of Environmental Science, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Animal Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³ Faculty of Computer Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

Key Words

Migration
Bioinformatics
Microarray
Differential gene expression
Gene ontology

Abstract

Introduction: One of the first issues for the management and conservation of birds is to discuss their migration. The migration is a complicated issue that can be considered and studied for various factors. One of these factors is genetic factors, which can be affected by the occurrence of a specific phenotype (migration).

Materials & Methods: In this study, differential expression analysis of microarray data for four species performed, including three migratory species and one non-migratory species in 22 different samples, using downloaded data from the GEO database. At first, the quality control and normalization of downloaded data performed, and then discriminant analyses to observe the differential gene expression between species carried on.

Result: A significant difference was observed between the two groups of migrants and non-immigrants. Also, by applying the genome annotation and finding the names of the genes related to each probe, as well as defining significant criteria, the names of 40 genes with the highest and lowest expression in the Immigrant group compared to non-immigrant, obtained and reported. Then, by gene ontology analysis, it was determined that the genes of migratory and non-migratory birds in particular play which role in each group of biological processes, cellular components, and molecular function.

Conclusion: Finally, according to the results, response to stress and anatomical structure of each group discussed, and five genes involved in migration's catalytic activities were introduced.

* Corresponding Author's email: srmaham@gmail.com

Received: 6 June 2020; Reviewed: 2 August 2020; Revised: 13 September 2020; Accepted: 16 October 2020

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.245913.2332

آنالیز افتراقی داده‌های ریز آرایه برای سه گونه پرنده مهاجر و یک گونه غیر مهاجر به‌عنوان کاندیداهای پرندگان مهاجر و غیر مهاجر

زهرا مهدوی‌نژاد^۱، حسن رجبی‌مهام^{۲*}، مهدی رضائیان^۱، علی شریفی‌زارچی^۳

^۱ گروه علوم محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه علوم و زیست فناوری جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۳ دانشکده مهندسی کامپیوتر، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مهاجرت
بیوانفورماتیک
ریز آرایه
آنالیز افتراقی ژن
هستی‌شناسی ژن

مقدمه: در زمینه مدیریت و حفاظت از پرندگان، یکی از اولین موضوعاتی که مدنظر می‌آید، پرداختن به بحث مهاجرت آن‌ها می‌باشد. مقوله مهاجرت موضوعی بسیار پیچیده است که می‌توان عوامل مختلفی را برای بروز این پدیده بررسی کرد. یکی از این عوامل، عوامل ژنتیکی می‌باشند که با بروز یک رفتار خاص (مهاجرت) می‌توانند اثر خود را نشان دهند.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق آنالیز افتراقی بیان ژن‌ها در داده‌های ریز آرایه برای چهار گونه، شامل سه گونه مهاجر و یک گونه غیر مهاجر در ۲۲ نمونه مختلف با استفاده از داده‌های موجود در پایگاه داده GEO انجام گرفت. طی این بررسی، داده‌های بارگیری شده، بررسی، کنترل کیفیت و نرمال‌سازی شدند و سپس نمودارهایی برای مشاهده تفاوت یا عدم تفاوت در بیان ژن‌های این گونه‌ها ترسیم شد.

نتایج: با استفاده از نمودارهای رسم شده، و هم‌چنین پارامترهای آماری، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مهاجر و غیر مهاجر مشاهده شد ($P < 0.05$). هم‌چنین در ادامه با اعمال تفسیر ژنوم و یافتن اسامی ژن‌های مرتبط با هر پروب، و نیز تعریف معیارهای معنی‌داری، اسامی ۴۰ ژن که از لحاظ معنی‌داری دارای بیش‌ترین و کم‌ترین میزان بیان در گروه مهاجر نسبت به غیر مهاجر بودند، به‌دست آمد و گزارش شد. سپس با انجام آنالیز هستی‌شناسی ژن، مشخص شد که ژن‌های پرندگان مهاجر و غیر مهاجر، در هر گروه از مراحل بیولوژیکی، اجزای سلولی، و عملکرد مولکولی، چه نقشی دارند.

نتیجه‌گیری و بحث: در نهایت، با توجه به نتایج حاصل، در مورد پاسخ به استرس و آناتومی ساختاری هر گروه بحث شد و هم‌چنین پنج ژنی که ممکن است در فعالیت‌های کاتالیزوری مهاجرت نقش داشته باشند، معرفی شدند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: srmaham@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۷ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱۲ مرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۲۳ شهریور ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲۵ مهر ۱۳۹۹

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.245913.2332

مقدمه

یک گونه، حفاظت از گونه‌ها، شناخت بهتر رفتار و عملکرد آن‌ها و عواملی از این دست، کمک کند (Ramos و همکاران، ۲۰۱۷). Holberton (۱۹۹۹) در تحقیقی فرضیه‌ای تحت عنوان فرضیه مدولاسیون مهاجرت (Migration Modulation Hypothesis) را مطرح کرد، که این فرضیه نشان می‌دهد که تغییرات در ترشح کورتیکوسترون هم‌زمان با دوره پروار شدن مرتبط با آمادگی برای مهاجرت، به وجود می‌آید (Holberton، ۱۹۹۹). Rugg و همکاران (۲۰۱۴) طی مطالعه‌ای ۲۵ کاندیدای ژنی مرتبط با مهاجرت را پیشنهاد دادند (Rugg و همکاران، ۲۰۱۴). اما Ramos و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از داده‌های بیان ژن از نوع توالی‌یابی نسل جدید به بررسی ۲۵ کاندیدای ژنی پیشنهاد شده توسط Rugg و همکاران (۲۰۱۴) روی ۷۰ گونه مختلف از پرندگان پرداختند و طی این تحقیق به این نتیجه رسیدند که این ۲۵ کاندیدای ژنی معرفی شده نمی‌توانند تفاوت معنی‌داری را بین پرندگان مهاجر و غیرمهاجر نشان دهند (Ramos و همکاران، ۲۰۱۷). Toews و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که مهاجرت حیوانات نیاز به مجموعه‌ای به هم پیوسته از سازگاری دارد که افراد بتوانند در مسافت‌های طولانی حرکت کنند. شناسایی علل ژنی، هدف اصلی اکولوژی مهاجرت بوده و این تلاش با مقایسه مقیاس ژنوم انجام می‌شود (Toews و همکاران، ۲۰۱۹). در این تحقیق به منظور بررسی عوامل ژنتیکی دخیل در مهاجرت، از داده‌های بیان ژن از نوع ریزآرایه برای بررسی و مقایسه بین چهار گونه مختلف استفاده شده است، و سپس با کمک آنالیزهای بیوانفورماتیک، به تحلیل و بررسی این داده‌ها برای مشاهده شباهت یا تفاوت احتمالی در بیان ژن‌هایی خاص در دو گروه مهاجر و غیرمهاجر و مقایسه و تحلیل نتایج، پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

روش گردآوری و نوع داده‌ها: برای این مطالعه، در ابتدا نیاز بود تا داده‌های ریزآرایه موجود از سایت GEO بارگیری شده و با کمک نرم‌افزارهای آماری و کامپیوتری کمی‌سازی شوند و مورد تجزیه و تحلیل قرار بگیرند. داده‌ها که متعلق به چهار گونه هستند، از مطالعه‌ای با شماره دسترسی GSE33667 از پایگاه داده GEO جستجو و از قسمت فایل‌های تکمیلی این مطالعه، برای آنالیزهای بعدی، انتخاب و بارگیری شدند. داده‌های موجود در این تحقیق که کشور آمریکا جمع‌آوری شده‌اند، از نوع Agilent و تک‌کاناله هستند که در نتیجه با توجه به نوع داده‌ها، در ادامه آنالیزهای مرتبط با این نوع داده در نظر گرفته شد. برای سه تا از گونه‌ها شش نمونه و برای یک گونه‌ی دیگر چهار نمونه موجود بود که همگی دریافت شدند. لازم به ذکر است که هر کدام از نمونه‌ها، حاوی ۴۴۹۷۹ پروب بودند که در

پرندگان گروه عظیمی از مهره‌داران را در سراسر جهان تشکیل می‌دهند، محققان دانشگاه واشنگتن، طی تحقیقی پرندگان را براساس محل زندگی و ساختار ژنتیکی دسته‌بندی کردند و متوجه شدند برخلاف تصور کنونی از وجود ۹ هزار گونه، در جهان حدود ۱۸ هزار گونه پرنده زندگی می‌کنند (Costello و همکاران، ۲۰۱۳). در ایران نیز بیش از ۵۳۲ گونه پرنده مشاهده شده است (سایت پرنده‌نگری در ایران) که شامل گونه‌های بومی و مهاجر می‌باشند. این گونه‌ها در سطح وسیعی از مناطق خشک و بیابانی، سواحل، نواحی جنگلی، جزایر، دریاچه‌ها و تالاب‌های کشور پراکنده‌اند. از بین رفتن تنوع زیستی فرایندی برگشت‌ناپذیر است و از بین رفتن یک گونه همیشگی خواهد بود (رسولی‌نسب و همکاران، ۱۳۹۵). همان‌طور که بسیاری از محققان محیط‌زیست متذکر شده‌اند، شناسایی عناصر تنوع‌زیستی پیش‌شرط لازم برای حفاظت از آن‌ها است. مدیریت و حفاظت گونه‌های مختلف با یکدیگر متفاوت است و اساس مدیریت صحیح نیز داشتن دانش آن است. با تکیه بر دانش جدید و به روز دنیا، می‌توان توان مدیریت و حفاظت را در ایران افزایش داد. در ایران نیز که دارای تنوع گونه‌ای بالا و اطلاعات زیستی اندک و منابع محدود برای حفاظت است (شمس و کابلی، ۱۳۹۷)، با استفاده از این روش‌ها می‌توان در مدت کوتاه و با دقت بیشتر رفتارهای وابسته به ژنتیک را در گونه‌ها بررسی کرده و برنامه‌های مدیریتی خاص هر گونه یا جمعیت را پایه‌گذاری کرد. مهاجرت یکی از جالب‌ترین پدیده‌های رفتاری پرندگان است و این امر از زمان‌های بسیار دور مورد توجه انسان‌ها قرار گرفته است. جمعیت‌های مختلف پرندگان، می‌توانند از جنبه‌های مختلف این رفتار، از جمله تمایل به مهاجرت، زمان مهاجرت، یا انتخاب مسیرهای مهاجرت، با هم متفاوت باشند. علاوه بر این، مطالعات نشان می‌دهند که این رفتار می‌تواند در طی یک دوره تکاملی کوتاه، به سرعت تغییر کند، مهاجرت و رفتار بازگشت به مقیم شدن در یک مکان، مکرراً و به‌طور مستقل در بسیاری از دودمان‌های پرندگان مشاهده شده است. این یافته‌ها، شواهد محکمی برای ماهیت انعطاف‌پذیری مهاجرت در پرندگان و پاسخ سریع آن‌ها به انتخاب طبیعی‌شان می‌دهند (Mueller و همکاران، ۲۰۱۱). کنترل مهاجرت و زمان‌بندی آن جزو خصوصیات ژنتیکی هر گونه است. اگرچه که مهاجرت تاحدودی اساس ژنتیکی دارد، اما درمورد ژن‌های دخیل در آن آگاهی کم‌تری وجود دارد. از این‌رو، شناسایی و معرفی ژن‌های کاندیدا برای این رفتار، می‌تواند در شناخت بیشتر از این پدیده و همچنین علت تکاملی مهاجرت، دلیل انعطاف‌پذیری مهاجرت، این‌که چرا برخی پرندگان مهاجرت می‌کنند و برخی نه، یا انتخاب زمان‌ها و مسیرهای مهاجرتی توسط گونه‌های مختلف یا حتی افراد مختلف

دوازدهم آن‌ها استخراج شده است. هم‌چنین از داده‌های نورون حرکتی نخاعی فوقانی به‌عنوان محدوده کنترل برای تمامی گونه‌ها استفاده شده است. همان‌طور که در جدول ۱ مشخص است، شش فایل نمونه برای سه‌تا از گونه‌ها و چهار فایل برای یک گونه، در سایت موجود بود که تمام ۲۲ فایل بارگیری شدند و در مراحل بعد آنالیزهای آماری روی آن‌ها صورت گرفت.

ادامه به آنالیز آن‌ها پرداخته شد. در مرحله بعد، اسامی گونه‌های موجود در تحقیق انتخاب شده، برای یافتن وضعیت مهاجرت آن‌ها، با مراجعه به سایت IUCN جستجو شدند و از بخش زیستگاه و اکولوژی، قسمت الگوهای حرکتی، وضعیت مهاجرت این گونه‌ها مشخص و ثبت شد. اطلاعات مربوط به گونه‌های مورد بررسی در جدول ۱ قابل مشاهده هستند. تمام گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق جنس نر و بالغ هستند و داده‌های ریزآرایه تمام گونه‌ها از قسمت نورون حرکتی

جدول ۱: مشخصات داده‌های مورد بررسی در این تحقیق

تعداد پروب در هر نمونه	تعداد نمونه‌ها	وضعیت مهاجرت	نام فارسی گونه	نام انگلیسی گونه	نام علمی گونه
۴۴،۹۷۹	۴	مهاجر	مرغ مگس‌خوار	Anna's Hummingbird	<i>Calypte anna</i>
۴۴،۹۷۹	۶	مهاجر	کبوتر آفریقایی	African Collared-dove	<i>Streptopelia roseogrisea</i>
۴۴،۹۷۹	۶	مهاجر	بلدرچین ژاپنی	Japanese Quail	<i>Coturnix japonica</i>
۴۴،۹۷۹	۶	غیرمهاجر	فنج	Timor Zebra Finch	<i>Taeniopygia guttata</i>

مشخص نیستن و آن‌ها بدون نام می‌باشند، که باید این پروب‌های بدون نام حذف شوند که عملیات حذف پروب‌های بدون نام هم در ادامه همین مرحله انجام شد (Obenchain و همکاران، ۲۰۱۴).

مشخص کردن ژن‌های با بیش‌ترین بیان در هر گروه: با تعیین مقدار Log_2FC با دستور subset در R، ۲۰ ژن از ژن‌هایی که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان بیان را داشتند مشخص شدند (Dudoit و Yang، ۲۰۰۳). برای گروه ژن‌های با بیش‌ترین بیان مقدار Log_2FC بزرگتر از $6/04$ ($\text{Log}_2\text{FC} > 6,04$) و برای گروه ژن‌های با کم‌ترین مقدار بیان Log_2FC کمتر از $5/13$ ($\text{Log}_2\text{FC} < -5,13$) قرار داده شد و به این ترتیب ۴۰ ژن مذکور مشخص شدند.

نمودار Heatmap: برای رسم این نمودار ابتدا داده‌ها با شروط معنی‌داری به‌صورت قدرمطلق $\text{Log}_2\text{FC} \geq 5$ و $\text{adj.p.value} < 0,01$ برای adj.p.value و Log_2FC فیلتر شدند و ۱۴۸ ژن معنی‌دار جداسازی شد و نمودار با این اطلاعات رسم شد (Yu و Barter، ۲۰۱۸).

نمودار PCA (Principal Component Analysis): تحلیل مولفه‌های اصلی، نموداری است که برای کاهش ابعاد مجموعه داده‌ها به‌منظور تصویرسازی دوبعدی آن‌ها رسم می‌شود (Gray، ۲۰۱۷). نمودار PCA برای نمونه‌ها با استفاده از پکیج ggplot در R رسم شد (Jach و Grané، ۲۰۱۴).

هستی‌شناسی ژن (Gene Ontology): با ارائه حجم وسیعی از داده‌ها طی تکنیک‌های توالی‌یابی با توان بالا، ارائه یک حاشیه‌نویسی منظم و باکیفیت، از اهمیت دوچندانی برخوردار می‌شود. پروژه هستی‌شناسی ژن، بزرگ‌ترین منبع برای فهرست‌بندی ژن‌ها می‌باشد (Du و همکاران، ۲۰۱۱). در این پروژه از اصطلاحات محدود و مشخصی جهت تشریح مراحل بیولوژیکی (Biological Process)، اجزای سلولی

ابزار و روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌ها: ابتدا داده‌ها براساس نام فایل و مهاجر و غیرمهاجر بودن در یک فایل اکسل مرتب شدند و سپس این جدول با فرمت txt. که فرمت قابل خوانش برای نرم‌افزار R می‌باشد، ذخیره و در نرم‌افزار R ورژن 3.6.0 فراخوانی شدند. سپس کیفیت داده‌ها با رسم نمودارهای Box-Plot و منحنی Density توسط پکیج limma بررسی شدند. با رسم این نمودارها مشخص شد که داده‌ها از کیفیت قابل قبولی برخوردار هستند (Xia و همکاران، ۲۰۰۵). **ویرایش و نرمال‌سازی داده‌ها:** در ادامه داده‌ها با حذف داده‌های بدون بیان و هم‌چنین حذف نویز پس‌زمینه ویرایش شده و سپس با استفاده از دستور normalizeBetweenArrays که متعلق به پکیج limma در R می‌باشد، عملیات نرمال‌سازی داده‌ها انجام شد و داده‌ها نرمال شدند (Mastriani و همکاران، ۲۰۱۸).

آنالیز افتراقی ژن‌ها در بین گونه‌ها: برای بررسی این که آیا تکرارهای نمونه‌ها و الگوی بیان ژن نمونه‌های یک گونه، یا یک گروه خاص، شبیه هم هستند یا نه، درخت خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی با دستور hierclusMicroRna از پکیج AgiMicroRna در نرم‌افزار R رسم شد. این درخت نشان می‌دهد که آیا نمونه‌های مشابه در یک خوشه قرار می‌گیرند یا نه. نمونه‌هایی که در یک خوشه قرار بگیرند، یعنی الگوی بیان ژن‌هایشان شبیه هم می‌باشد (Langfelder و همکاران، ۲۰۰۷).

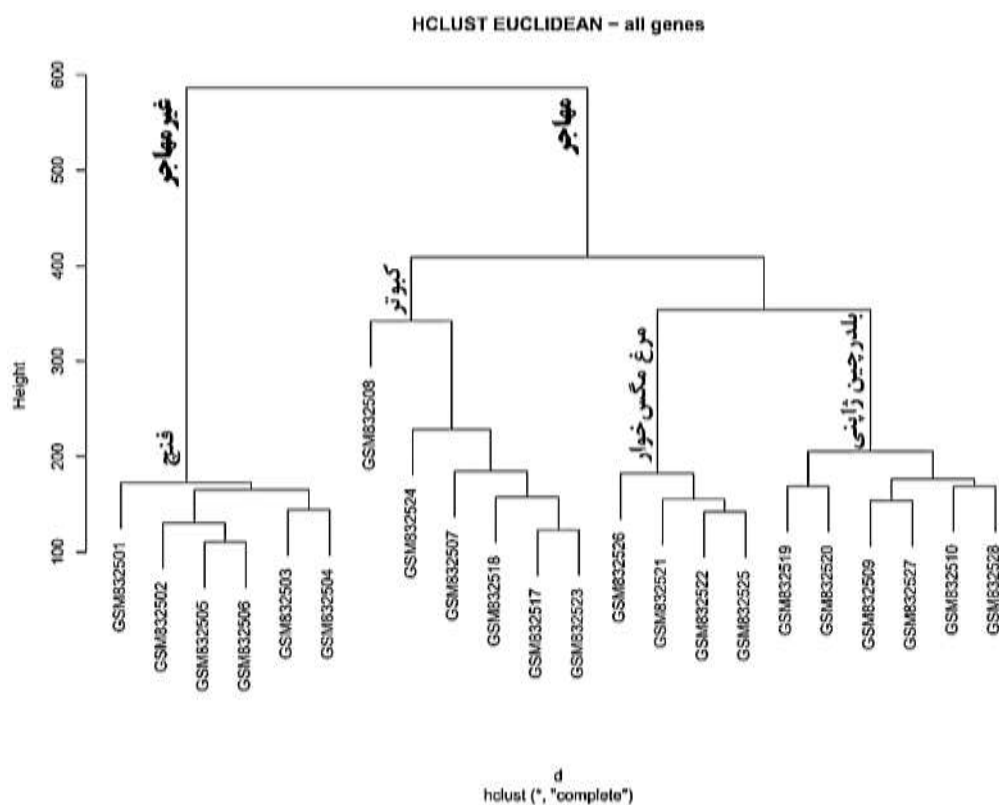
تفسیر ژنوم: در فایل داده‌ها، اسامی ژن‌های مرتبط با هر پروب مشخص نبودند، پس در این مرحله با کمک فایلی که از بخش Platform این تحقیق که در سایت GEO با شماره دسترسی GPL9856 موجود بود، اسامی ژن‌ها به پروب‌ها با دستور cbind در R انجام گرفت. در ادامه مشاهده شد که نام ژن‌های یک‌سری از پروب‌ها

بررسی نتایج هستی‌شناسی ژن: برخی از گروه‌های مشاهده شده در نتایج هستی‌شناسی ژن، که به نظر می‌رسید به مهاجرت مرتبط باشند، به‌طور خاص و دقیق‌تر بررسی شدند.

نتایج

رسم درخت خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی: همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، نمونه‌های هر گونه، کاملاً در یک خوشه کنار هم قرار دارند و گونه‌های مهاجر، شامل کبوتر، مرغ مگس‌خوار و بلدرچین ژاپنی، با گونه‌های مهاجر، فنچ، در خوشه‌های کاملاً جداگانه قرار گرفته‌اند.

(Cellular Component) و عملکرد مولکولی (Molecular Function) ژن‌ها استفاده می‌شود (Huang و همکاران، ۲۰۰۹). در این مطالعه، ابتدا با اعمال سطح معنی‌داری به صورت $\text{Log}_2\text{FC} > 3/5$ و $\text{Log}_2\text{FC} < -$ و با در نظر گرفتن $p.\text{value} < 0.05$ تعداد ۵۹۶ ژن با بیش‌ترین بیان برای گروه مهاجر، و ۶۰۳ ژن با بیش‌ترین بیان برای گروه غیرمهاجر شناسایی شدند. در ادامه با مراجعه به پایگاه داده ShinyGO به آدرس <http://bioinformatics.sdstate.edu/go> فرآیند هستی‌شناسی این ژن‌ها برای گونه مهاجر و غیرمهاجر در هر سه گروه مراحل بیولوژیکی (BP)، اجزای سلولی (CC) و عملکرد مولکولی (MF) انجام شد.



شکل ۱: درخت خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی

همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود، دو گروه مهاجر و غیرمهاجر به‌خوبی در شاخه‌های مجزایی قرار دارند و در بین گروه‌های مهاجر هم تمام سه گونه مهاجر به‌خوبی از یکدیگر تفکیک شده‌اند و نمونه‌های هر گونه، در یک دسته مجزا نسبت به گونه‌های دیگر قرار دارند.

رسم نمودار Heatmap: در بخش عمودی این نمودار اسامی ژن‌ها و در قسمت افقی، اسامی نمونه‌ها که به‌صورت مهاجر و غیرمهاجر نام‌گذاری شده‌اند، مشخص می‌باشد. در این نمودار ژن‌هایی که بیش‌ترین میزان بیان را دارند قرمز رنگ، و آن‌هایی که کم‌ترین میزان بیان را دارند، به رنگ آبی قابل مشاهده هستند (شکل ۲).

مشخص کردن ژن‌های با بیش‌ترین بیان در هر گروه: اسامی ۴۰ ژن با بیش‌ترین و کم‌ترین میزان بیان در گروه مهاجر نسبت به غیرمهاجر مشخص شدند که اسامی این ژن‌ها در جدول ۲ قابل مشاهده می‌باشند.

جدول ۲: در جدول الف اسامی ژن‌هایی که در گروه مهاجر نسبت به غیرمهاجر بیش‌ترین میزان بیان را داشتند، با تعیین سطح معنی‌داری به صورت $\text{Log}_2\text{FC} > 6/04$ و $\text{adj.p.value} < 0/01$ به‌دست آمده‌اند. در جدول ب، اسامی ژن‌هایی که در گروه مهاجر نسبت به غیرمهاجر کم‌ترین میزان بیان را داشتند، با تعیین سطح معنی‌داری به صورت $\text{Log}_2\text{FC} < -5/13$ و $\text{adj.p.value} < 0/01$ نشان داده می‌شود.

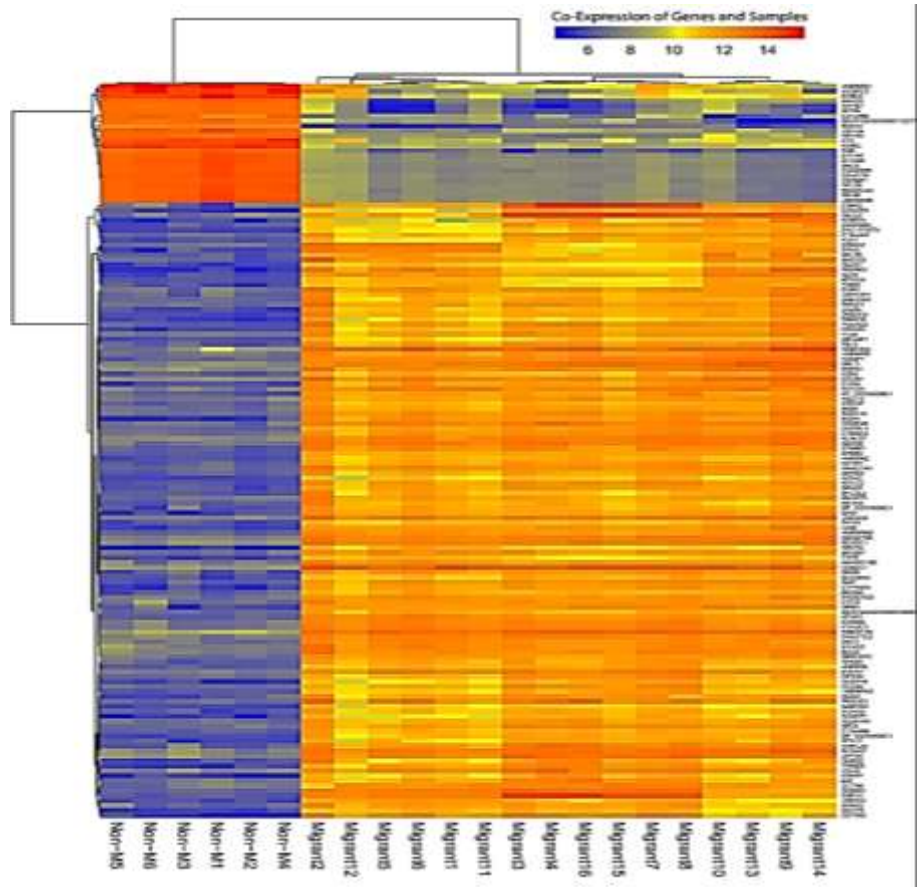
adj.p.val	Log ₂ FC	ژن‌های با بیان کم	adj.p.val	Log ₂ FC	ژن‌های با بیان زیاد
7/51E-10	-6/39	RPGR	12E-19/3	18/7	TNPO1
2/14E-10	-6/31	UBASH3B	05E-91/1	12/7	LOXL2
5/78E-11	-6/22	ALCAM	07E-42/1	61/6	GPBP1
4/26E-10	-6/19	RPL28	08E-61/7	51/6	GMEB1
2/63E-10	-6/17	C6orf174	14E-71/9	46/6	ROMO1
2/64E-10	-6/01	SMARCA4	10E-22/3	45/6	rp138
3/75E-08	-6/01	SACS	05E-68/1	36/6	PM20D1
3/59E-09	-5/99	EIF1AY	18E-54/4	34/6	FUSIP1
3/68E-08	-5/93	KIAA0586	17E-62/1	31/6	STXBP1
4/54E-08	-5/91	HSPBP1	14E-99/2	28/6	PRELID1
4/33E-14	-5/81	MURC	12E-41/1	26/6	KLF9
1/70E-06	-5/76	TUB	13E-71/2	19/6	POLR2D
1/18E-11	-5/52	ANKS3	14E-04/2	19/6	GPN1
1/65E-07	-5/33	MYBPC2	18E-84/2	18/6	KEAP1
1/05E-10	-5/28	VTN	12E-34/1	16/6	MRPL23
1/06E-11	-5/23	ENSTGUG00000014217	18E-96/6	15/6	DDX59
1/03E-06	-5/21	BOLA1	09E-63/1	14/6	NELL2
2/61E-09	-5/17	USH2A	14E-84/2	13/6	KCNC2
8/91E-11	-5/15	C21orf66	13E-27/3	11/6	CTSH
8/05E-11	-5/14	BTBD9	12E-01/3	04/6	CYP46A1

ب

الف

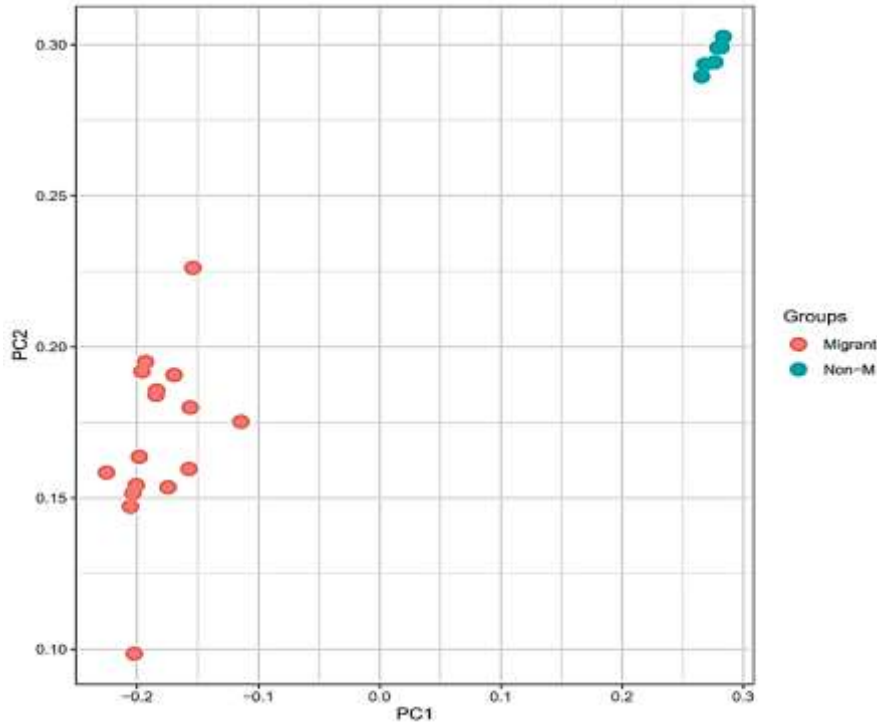
شکل ۲: نمودار Heatmap

در محور عمودی نمودار، اسامی ۱۴۸ ژن که با تعیین سطح معنی‌داری به‌صورت قدرمطلق $\text{Log}_2\text{FC} > 5$ و $\text{adj.p.value} < 0/01$ مشخص شده‌اند، نشان داده می‌شود (مقدار Log_2FC بیانگر لگاریتم در پایه دوی مقدار کاهش یا افزایش بیان یک ژن با توجه به گروه‌بندی مشخص شده می‌باشد، در این تحقیق افزایش یا کاهش بیان در گروه مهاجر نسبت به غیرمهاجر بررسی شده است. و adj.p.value نیز بیانگر میزان معنی‌داری این افزایش یا کاهش بیان است که مقادیر زیر ۰/۰۵ برای این پارامتر به‌عنوان قابل‌قبول و معنی‌دار تلقی می‌شوند). در محور افقی نیز ۲۲ نمونه مورد استفاده در این تحقیق قابل مشاهده است. اسامی نمونه‌ها از نظر مهاجر (Migrant) و غیرمهاجر (Non-M) بودن شماره‌گذاری شده‌اند. رنگ قرمز در این نمودار نشان‌دهنده بیش‌ترین میزان بیان و رنگ آبی نمایانگر کم‌ترین میزان بیان می‌باشد. همانطور که مشاهده می‌شود گروه غیرمهاجر و مهاجر از نظر میزان بیان ژن‌ها به‌خوبی از هم تفکیک شده‌اند و دسته ژن‌های با کم‌ترین و بیش‌ترین میزان بیان برای هر گروه کاملاً قابل تمایز می‌باشد. همچنین در قسمت بالا و سمت چپ نمودار درخت سلسله‌مراتبی وجود دارد که همان‌طور که در قسمت فوقانی این نمودار مشخص است، دو گروه مهاجر و غیرمهاجر از هم تفکیک شده‌اند.



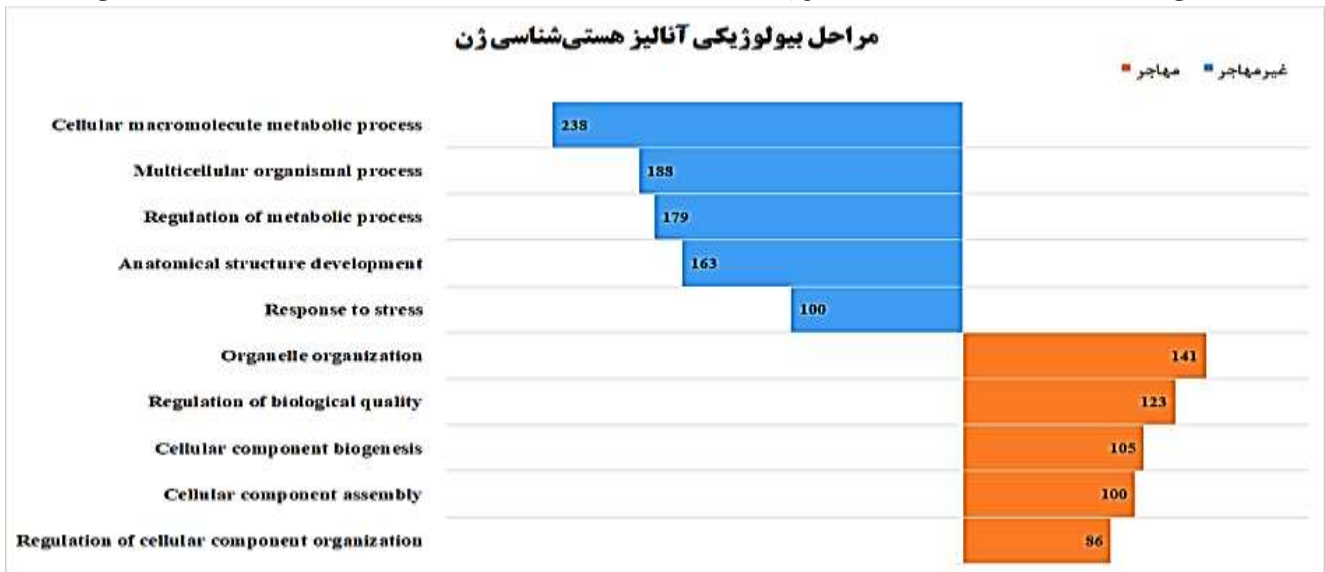
نتایج هستی‌شناسی ژن: هستی‌شناسی ژن برای ۵۹۶ ژن با بیش‌ترین میزان بیان از گروه مهاجر و ۶۰۳ ژن با بیش‌ترین میزان بیان از گروه غیرمهاجر انجام شد و نتایج آن در شکل‌های ۴ و ۵ و ۶ قابل مشاهده هستند.

نتایج بررسی PCA: در نتیجه ترسیم این نمودار مشاهده شد که نمونه‌های دو گروه مهاجر و غیرمهاجر به خوبی از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۳).



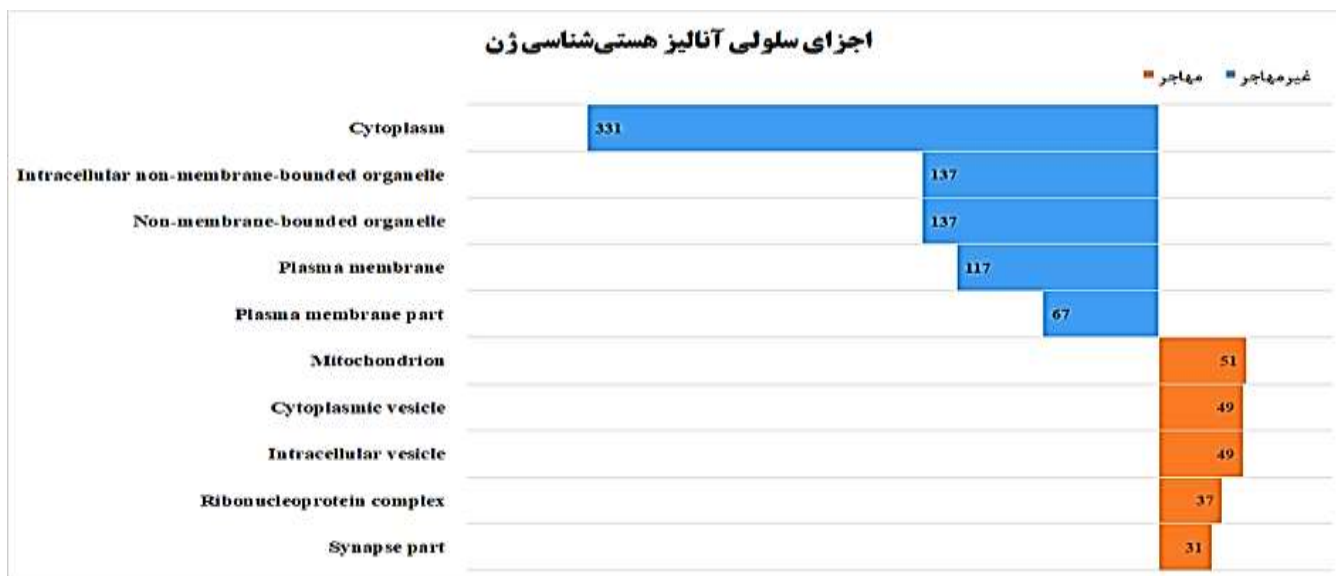
شکل ۳: نمودار PCA

در این نمودار تمام ۲۲ نمونه موجود به صورت نقاطی مشخص می‌باشند. نقاط قرمز رنگ مربوط به نمونه‌های گروه مهاجر (Migrant) و نقاط آبی رنگ مربوط به گروه غیرمهاجر (Non-M) هستند. همان‌طور که نمودار نشان می‌دهد، تفکیک دو گروه مهاجر و غیرمهاجر در مجموع پروب‌های مورد استفاده در این تحقیق، با کاهش ابعاد به صورت دوی بعدی و در نمودار PCA به خوبی قابل مشاهده است.



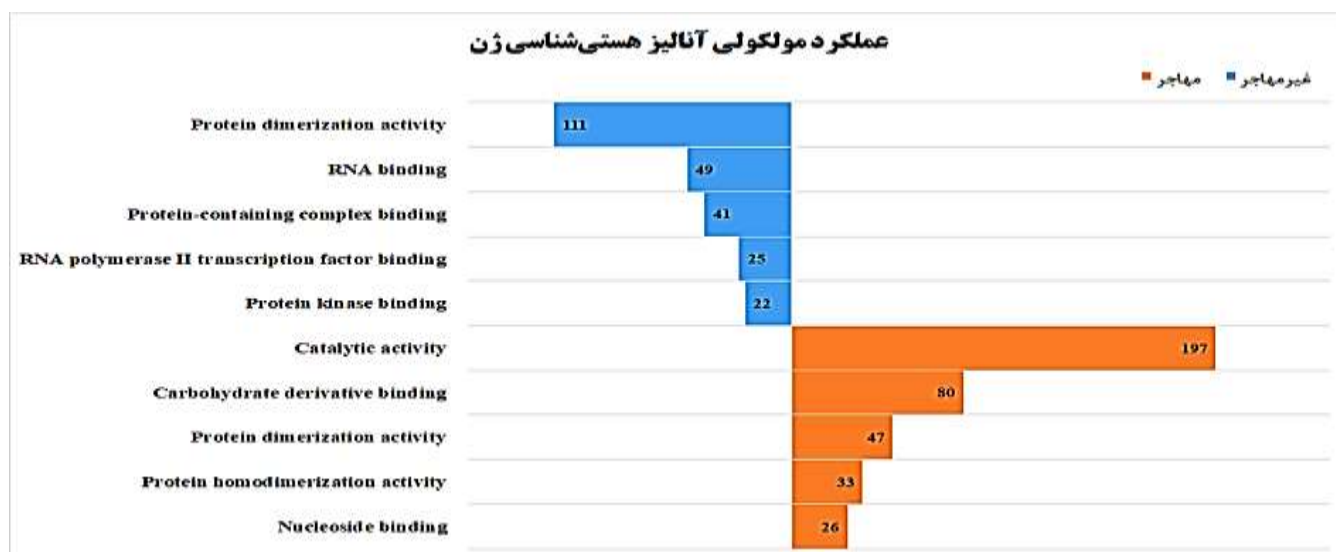
شکل ۴: مراحل بیولوژیکی آنالیز هستی‌شناسی ژن

اعداد روی نمودار بیانگر تعداد ژن‌های موجود در هر گروه می‌باشند. در این نمودار پنج گروه از مراحل بیولوژیکی با بیش‌ترین میزان معنی‌داری (کم‌ترین میزان FDR یا ضریب معنی‌داری) برای ژن‌های هر یک از گروه‌های مهاجر و غیرمهاجر، نمایش داده شده‌اند.



شکل ۵: اجزای سلولی آنالیز هستی‌شناسی ژن

اعداد روی نمودار بیانگر تعداد ژن‌های موجود در هر گروه می‌باشند. در این نمودار پنج گروه از اجزای سلولی با بیش‌ترین میزان معنی‌داری برای ژن‌های هر یک از گروه‌های مهاجر و غیرمهاجر، نمایش داده شده‌اند.



شکل ۶: عملکردهای مولکولی آنالیز هستی‌شناسی ژن

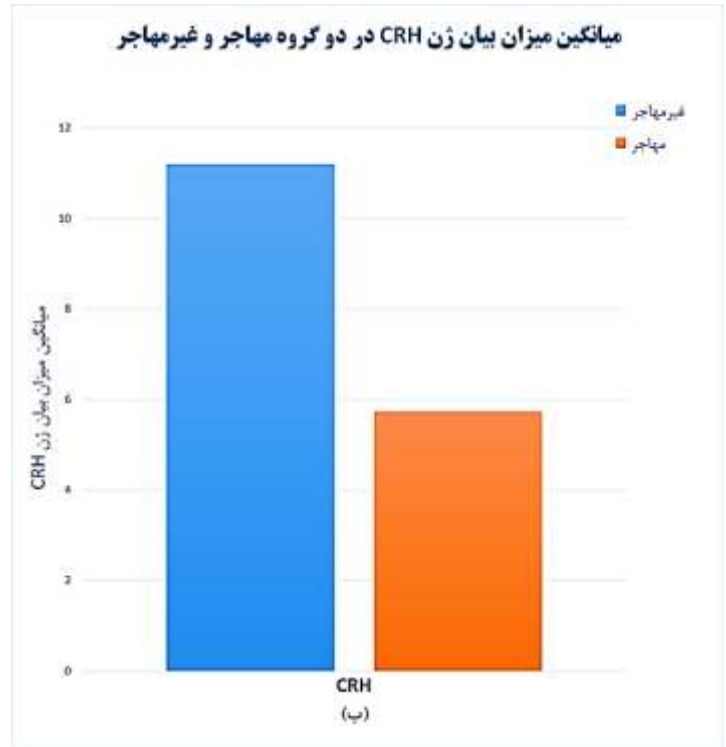
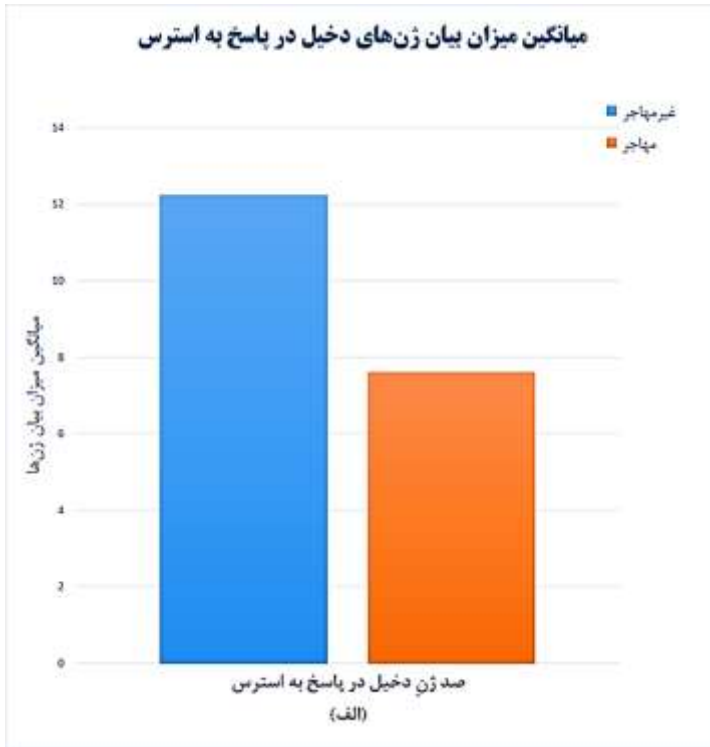
اعداد روی نمودار بیانگر تعداد ژن‌های موجود در هر گروه می‌باشند. در این نمودار پنج گروه از عملکردهای مولکولی با بیش‌ترین میزان معنی‌داری برای ژن‌های هر یک از گروه‌های مهاجر و غیرمهاجر، نمایش داده شده‌اند.

قسمت بحث صحبت خواهد شد. در شکل ۷، قسمت الف، مربوط به مقایسه میانگین میزان بیان $100\pm$ ژنی است که در گروه مهاجر به‌طور معنی‌داری میزان بیان بالاتری داشتند ($\text{adj.p.value} = 3/20 \times 10^{-4}$) و به‌همین دلیل در نتایج هستی‌شناسی، فقط برای گروه غیرمهاجر نتیجه داشتند. قسمت ب این نمودار هم مربوط به ژن CRH، عامل اصلی و اولیه برای شروع استرس مزمن (پاسخ به استرس) می‌باشد. در این نمودار هم میانگین میزان بیان این ژن در دو گروه مهاجر و

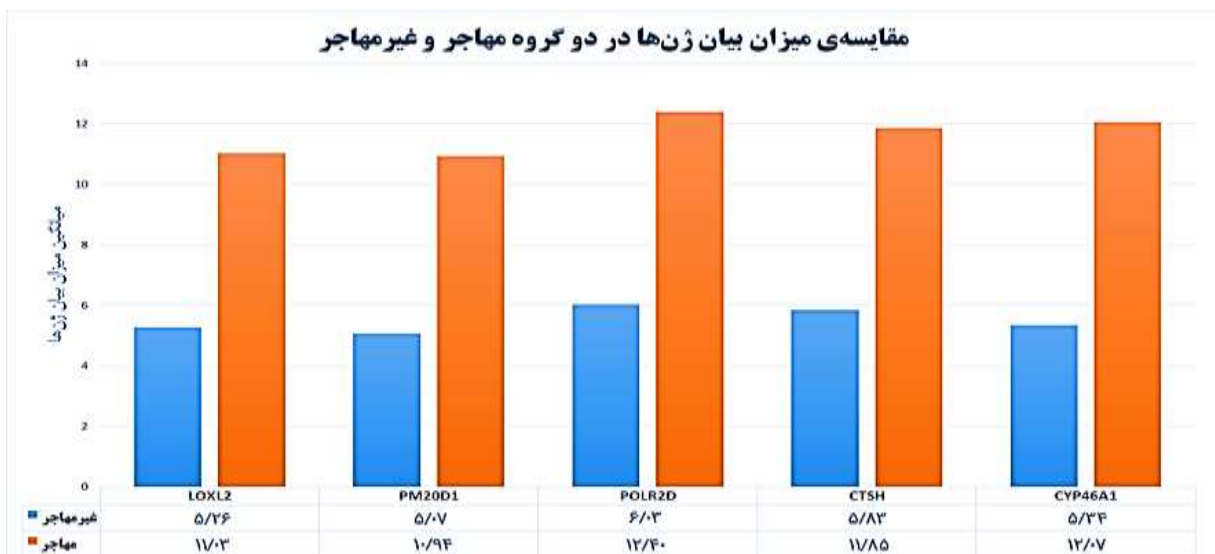
بررسی نتایج هستی‌شناسی ژن: پس از رسم نمودارهای مرتبط با نتایج هستی‌شناسی ژن، به‌طور خاص به‌نظر می‌آمد که سه گروه از آن‌ها می‌توانند به مقوله مهاجرت پرنندگان مرتبط باشند. بنابراین این سه گروه کمی دقیق‌تر بررسی شدند. دو گروه اول مربوط به نتایج فرآیندهای بیولوژیکی هستند که شامل ساختار آناتومی (Anatomical Structure Development) و پاسخ به استرس (Response to Stress) می‌باشند. در مورد ارتباط این دو گروه با مهاجرت در

لیست ۲۰ ژن با بیشترین بیان، مشاهده شد که پنج ژن از این ۲۰ ژن در این گروه قرار دارند. میانگین میزان بیان این پنج ژن در شکل ۸ قابل مشاهده هستند.

غیرمهاجر با هم بررسی شد (adj.p.value=۰/۰۰۱۳). همچنین در قسمت نتایج عملکردهای مولکولی، قسمت فعالیت‌های کاتالیتیک (Catalytic activity) در گروه مهاجر ژن‌هایی با بیان بالا گزارش شد (adj.p.value=۷/۱۸E-۰۶). با مقایسه این ژن‌ها با ژن‌های موجود در



شکل ۷: (الف): صد ژنی که در گروه پاسخ به استرس در نتایج هستی‌شناسی ژن وجود داشتند، از لحاظ میانگین میزان بیان بین دو گروه مهاجر (نارنجی) و غیرمهاجر (آبی) مقایسه شدند. (ب): ژن CRH که در گروه پاسخ به استرس وجود دارد و یکی از مهم‌ترین عوامل برای پاسخ فیزیولوژیکی به استرس مزمن می‌باشد نیز از لحاظ میانگین بیان بین دو گروه مهاجر (نارنجی) و غیرمهاجر (آبی) مقایسه شد. اعداد روی محورهای عمودی بیانگر میانگین میزان بیان هستند که در مقیاس لگاریتمی می‌باشند.



شکل ۸: اسامی پنج ژن با بیشترین میزان بیان در گروه مهاجر نسبت به غیرمهاجر که در دسته فعالیت‌های کاتالیتیک در نتایج آنالیز هستی‌شناسی مشاهده شدند. اعداد ردیف افقی میانگین‌های میزان بیان در هر گروه مهاجر (نارنجی) و غیرمهاجر (آبی) می‌باشند. اعداد ردیف عمودی نیز بیانگر میانگین میزان بیان این ژن‌ها در هر گروه است. مقیاس اعداد در نمودار لگاریتمی می‌باشد.

بحث

هم‌چنین می‌توان گفت اندازه مغز می‌تواند یک نشانگر خوب برای انعطاف‌پذیری رفتاری در پرندگان باشد، به طوری که پرندگان با اندازه مغز بزرگ‌تر می‌توانند انعطاف‌پذیری رفتاری بیشتری داشته باشند، مخصوصاً در زمینه پیدا کردن غذا، می‌توانند نوآوری بیشتری از خود نشان دهند (Lefebvre و همکاران، ۱۹۹۷). از طرف دیگر، در همان تحقیق Singh و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده کردند که اندازه طول استخوان جناغ سینه در گونه مهاجر بزرگ‌تر از غیرمهاجر است. افزایش طول استخوان سینه در پرندگان مهاجر می‌تواند فضای کافی را برای قرارگیری ماهیچه‌های قدرتمند پروازی در تاج استخوان جناغ فراهم کند (Dursun، ۲۰۰۲). ارتفاع تاج استخوان جناغ با قابلیت پرواز در پرندگان ارتباط مستقیم دارد به طوری که پرندگان با قابلیت پرواز قوی، ارتفاع تاج بلندتری دارند (Düzler، ۲۰۰۶). در نتیجه به طور مشخص افزایش ارتفاع استخوان جناغ سینه می‌تواند برای پرواز طولانی به پرندگان مهاجر کمک کند.

در قسمت پروسه بیولوژیکی نتایج هستی‌شناسی، دسته پاسخ به استرس برای گروه غیرمهاجر مشاهده شد. استرس رفتاری است که با عنوان حفظ هموستازی داخلی موجود زنده شناخته می‌شود (Baritaki و همکاران، ۲۰۱۹). عوامل شیمیایی که منجر به پاسخ به استرس می‌شوند، با عنوان کورتیکواستروئیدها (Corticosteroids) شناخته می‌شوند. مثال‌هایی از کورتیکواستروئیدها شامل کورتیکوسترون (Corticosterone)، کورتیزون (Cortisone) و کورتیزول (Cortisol) هستند که کورتیکوسترون هورمون استرس در پرندگان می‌باشد و عملکردی مشابه کورتیزول در انسان دارد (Iyasere و همکاران، ۲۰۱۷). به طور کلی دو نوع عمده از استرس وجود دارد: استرس حاد (acute stress) و استرس مزمن (chronic stress) (Hammen و همکاران، ۲۰۰۹). Baritaki و همکاران (۲۰۱۹) در مورد مکانیسم ترشح این دو نوع استرس به این صورت توضیح داده‌اند که سیستم‌های تنظیمی مانند سیستم عصبی، غدد درون‌ریز و سیستم ایمنی بدن، همگی در پاسخ به استرس نقش دارند ولی پاسخ به استرس مرکزی به طور عمده توسط اجزای خانواده هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (corticotropin releasing hormone یا CRH) که از خانواده نوروپپتیدها هستند، تنظیم می‌شود، و فعالیت آن‌ها در طول محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-فوق کلیه (hypothalamic-pituitary-adrenal یا HPA) می‌باشد. CRH واسطه عصبی اصلی در پاسخ به استرس محور مرکزی HPA است. در حضور محرک‌های استرسی با منشأ درونی یا بیرونی، هیپوتالاموس برای ترشح CRH تحریک می‌شود که این امر باعث افزایش ترشح هورمون آدرنوکورتیکوتروپین (adrenocorticotrophic hormone یا ACTH) از لوب قدامی هیپوفیز می‌شود. سپس ACTH قشر غدد فوق کلیه را تحریک می‌کند تا گلوکوکورتیکوئیدها (glucocorticoids)

اطلاعات بیان ژن‌های گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق، در یک پایگاه داده ثبت شده و گروه‌بندی خاصی برای آن‌ها صورت نگرفته است. با جستجو در مورد گونه‌ها، مشخص شد که می‌توان آن‌ها را به دو گروه مهاجر و غیرمهاجر تقسیم کرد و با بررسی بیان ژن‌های آن‌ها، تفاوت معنی‌داری را بین دو گروه مهاجر و غیرمهاجر مشخص نمود. که با توجه به نتایج به دست آمده از رسم درخت خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی و هم‌چنین رسم نمودارهای Heatmap و PCA، مشاهده شد که دو گروه مهاجر و غیرمهاجر به وضوح از نظر وضعیت بیان ژن‌ها با یکدیگر قابل تمایز هستند. هم‌چنین تحلیل‌های آماری با در نظر گرفتن شروط معنی‌داری به صورت قدرمطلق $\text{Log}_2\text{FC} \geq 5$ و $\text{adj.p.value} < 0.01$ برای مقادیر Log_2FC و adj.p.value نشان داد این تمایز و تفاوت مشاهده شده، از لحاظ آماری نیز معنی‌دار است. در نتیجه می‌توان بیان کرد که تفاوت ژنتیکی معنی‌داری مرتبط با مهاجرت بین پرندگان مهاجر و غیرمهاجر در داده‌های بیان ژن آن‌ها وجود دارد. هم‌چنین با تفسیر ژنوم و یافتن اسامی ژن‌های هر پروب، استخراج اسامی ژن‌هایی که در دو گروه مهاجر و غیرمهاجر، بیش‌ترین میزان بیان را داشته‌اند، محقق شد و این امر به صورت گزارش اسامی ۲۰ ژنی که بیش‌ترین میزان بیان را داشتند، صورت گرفت. و در نهایت با انجام آنالیز هستی‌شناسی ژن، ابتدا با در نظر گرفتن شرط معنی‌داری به صورت $\text{Log}_2\text{FC} > 3/5$ و $\text{Log}_2\text{FC} < -2$ و $\text{p.value} < 0.05$ تعداد ۵۹۶ ژن از گروه مهاجر و ۶۰۳ ژن از گروه غیرمهاجر جداسازی شدند و سپس مشخص شد که ژن‌های پرندگان مهاجر و غیرمهاجر به طور خاص، در هر گروه از مراحل بیولوژیکی، اجزای سلولی و عملکرد مولکولی، چه نقشی دارند.

با توجه به مشاهده گزینه توسعه ساختار آناتومی در نتایج بخش فرآیندهای بیولوژیکی هستی‌شناسی ژن، می‌توان فرضیه تفاوت ساختمان اسکلتی در پرندگان مهاجر و غیرمهاجر را تایید کرد. مطالعه Singh و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که تغییرات معنی‌داری در سایز استخوان‌های دو گروه پرند مهاجر و غیرمهاجر وجود دارد که برخی استخوان‌ها در گروه مهاجر و برخی در گروه غیرمهاجر بزرگ‌تر بودند. به عنوان مثال در این تحقیق سایز جمجمه در پرندگان غیرمهاجر کمی بزرگ‌تر از مهاجر بود که این امر می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که سایز مغز نیز در این پرندگان بزرگ‌تر است و در نتیجه می‌تواند هوش و ذکاوت بیشتری برای تطابق خودشان با شرایط محیطی و سازگاری و رقابت نشان دهند. در تحقیق دیگری Sol و همکاران (۲۰۰۵) نیز به این نتیجه رسیدند که به طور نسبی گونه‌های پرندگان مهاجر اندازه مغز کوچک‌تری نسبت به پرندگان غیرمهاجر دارند.

و همکاران (۱۹۹۶) فرضیه مدولاسیون مهاجرت (Migration Modulation Hypothesis یا MMH) را پیشنهاد دادند. این فرضیه بیان می‌کند پرنده‌گانی که در موقعیت مهاجرت قرار می‌گیرند، ممکن است: (۱) افزایش سطوح پایه کورتیکوسترون را به‌منظور تسهیل فرآیند چاق شدن و ذخیره چربی مرتبط با آمادگی برای مهاجرت نشان دهند (استرس حاد)، و چون سطوح پایه ممکن است پیش از آن زمان هم بالا رفته باشد، (۲) کاهش کورتیکوسترون برای پاسخ به استرس را نشان می‌دهند (به‌عنوان مثال، به این صورت که جلوی افزایش بیش‌تر کورتیکوسترون در پاسخ به استرس حاد گرفته می‌شود)، و این امر، مکانیزی است که ماهیچه‌های اسکلتی برای پروازهای طولانی مدت در طول مهاجرت به آن نیاز دارند تا از ریسک تخریب شدن توسط فعالیت‌های کاتابولیکی ناشی از افزایش سطوح کورتیکوسترون (استرس مزمن) در امان بمانند (Holberton, ۱۹۹۹). همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، در قسمت فرآیندهای بیولوژیکی، از نتایج هستی‌شناسی این تحقیق، مشاهده شد که گروه ژن‌های مرتبط با پاسخ به استرس و به‌طور خاص ژن CRH که در این گروه قرار داشت، میزان بیان‌شان به‌طور معنی‌داری در گروه غیرمهاجر بالاتر از مهاجرها می‌باشند. این یافته در راستای تحقیقات مذکور، این موضوع را تأیید می‌کند که احتمالاً پرنده‌گان مهاجر، ژن‌هایی که مرتبط با ترشح هورمون‌های مسیر استرس مزمن می‌باشند را به‌میزان کم‌تری نسبت به غیرمهاجرها بیان می‌کند تا بتوانند برای آماده شدن برای مهاجرت و هم‌چنین در حین انجام مهاجرت، عملکرد مناسبی داشته باشند. هم‌چنین در بخش عملکرد مولکولی از نتایج هستی‌شناسی، در گروه مهاجر، دسته‌ای با عنوان فعالیت‌های کاتالیتیک مشاهده می‌شود. با بررسی ژن‌های موجود در این دسته و مقایسه آن‌ها با اسامی ۲۰ ژنی که در گروه مهاجر بیش‌ترین میزان بیان را داشتند، مشخص شد که پنج ژن از این ۲۰ ژن، در این دسته قرار دارند. این پنج ژن شامل LOXL2 و PM20D1 و CTSH و POLR2D و CYP46A1 می‌باشند که احتمالاً این ژن‌ها با فعالیت‌های کاتالیزوری خاصی که دارند، در تنظیم و ترشح هورمون‌های مرتبط با مهاجرت موثر می‌باشند.

به‌طور کلی، می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که تفاوت‌های بیان ژن در پرنده‌گان مهاجر و غیرمهاجر می‌توانند باعث تفاوت‌های فیزیولوژیکی، هورمونی، پروسه‌های سلولی، عملکرد مولکولی و حتی تفاوت در ساختارهای آناتومی آن‌ها بشوند. این‌گونه تفاوت‌ها در مجموع برای سازگاری‌های رفتاری هر گروه و تطابق آن‌ها با شرایط، می‌تواند باعث پایداری و عملکرد بهتر آن‌ها با توجه به شیوه خاص زندگی هر گروه بشود. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود به‌منظور استفاده موثرتر از تکنولوژی جدید برای تحقق هدف حفاظت در کشورمان، از

یا GCs) که کلاس اصلی کورتیکواستروئیدها هستند را ترشح کند. هیپوتالاموس و هیپوفیز در شرایط استرس مزمن، به واکنش بیش از حد محور HPA پاسخ می‌دهند. علاوه بر پاسخ مرکزی به استرس توسط محور HPA، محرک‌های استرس‌زا هم‌چنین می‌توانند به فعال سازی بخش مرکزی غدد فوق کلیه برای آزادسازی کاتکول‌آمین‌ها (catecholamines، شامل آدرنالین و نورآدرنالین) از طریق تحریک شاخه سمپاتییک (sympathetic branch یا SNS) از سیستم عصبی خودمختار (autonomous nervous system یا ANS) که با عنوان محور نخاعی سمپاتوآدرنو (sympatho-adrenomedullary یا SAM) شناخته می‌شوند، به روشی مستقل از HPA، عمل کنند. به‌طور کلی این امر موردقبول است که هورمون‌های ترشح‌شده از بخش مرکزی غدد فوق کلیه، به‌طور عمده واسطه پاسخ به استرس‌های کوتاه مدت یا حاد می‌باشند، درحالی‌که سیگنال‌های هورمونی مشتق‌شده از قشر فوق کلیه، بیش‌تر پاسخ به استرس‌های طولانی مدت یا مزمن را کنترل می‌کنند. هم‌چنین Bu و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیق خود به این مورد اذعان داشتند که وقتی حیوانات تحت استرس مزمن قرار می‌گیرند، محور HPA برای حفظ هموستازی بدن فعال می‌شود. در ادامه هورمون آزاد کننده کورتیکوتروپین (CRH) از هیپوتالاموس آزاد شده که این هورمون نقش کلیدی را ایفا می‌کند و به‌عنوان میانجی اصلی در این پروسه شناخته می‌شود. مطالعات زیادی روی پرنده‌گان آزاد، تغییراتی را در ترشح کورتیکوسترون در طول مهاجرت نشان داده است (به‌صورت افزایش سطوح پایه و کاهش کورتیکوسترون در پاسخ به استرس) (Holberton, ۱۹۹۹). Romero و همکاران (۱۹۹۷) در تحقیق خود پیشنهاد دادند که پرنده‌گان مهاجر سطح بالاتری از کورتیکوسترون پایه را نشان می‌دهند که این می‌تواند مرتبط با توسعه یا حفظ موقعیت مهاجرت باشد. وقتی پرنده‌گان برای مهاجرت آماده می‌شوند، سطوح هورمون کورتیکوسترون شروع به افزایش می‌کند (Holberton و همکاران، ۱۹۹۶). که پیشنهاد می‌شود این امر به‌دلیل تجهیز کردن ذخایر انرژی برای برآورد تقاضاهای افزایش‌یافته مهاجرت به‌منظور افزایش چربی بدن برای پرواز شدن و آمادگی برای مهاجرت، می‌باشد (Landys و همکاران، ۲۰۰۶). درحالی‌که پاسخ به استرس کوتاه مدت (حاد) که موجب ترشح بیش‌تر کورتیکوسترون از سطح پایه آن می‌شود، ممکن است برای عبور از آشفتگی به افراد کمک کند، درمقابل سطوح بالای این هورمون به‌صورت مزمن، می‌تواند آسیب‌زننده باشد (Holberton, ۱۹۹۹). در استرس مزمن، ارتقای سطح کورتیکوسترون از طریق گلوکوکورتیکوئید، می‌تواند از عضله اسکلتی برای تامین انرژی موردنیاز بدن استفاده کند و در نتیجه بافت عضله اسکلتی را به‌طور جدی از بین ببرد (Dallman و همکاران، ۱۹۹۳). در توضیح تغییرات نمایه کورتیکوسترون در هنگام مهاجرت، Holberton

cDNA Microarray Data. New York, NY: Springer New York. pp: 73-101.

10. **Dursun, N.; Düzler, A.; Bozkurt, E.Ü. and Özgel, Ö., 2002.** Macroanatomical investigations on sternum in bald ibis (*Geronticus eremita*). Indian Vet. Journal. Vol. 79, No. 2, pp: 160-165.
11. **Düzler, A., 2006.** Morphometric Analysis of the Sternum in Avian Species. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. Vol. 30, No. 3, pp: 311-314.
12. **Grané, A. and Jach, A., 2014.** Applications of principal component analysis (PCA) in food science and technology. Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology. pp: 55-86.
13. **Gray, V., 2017.** Principal Component Analysis: Methods, Applications and Technology. Nova Science Publishers, Incorporated.
14. **Hammen, C.; Kim, E.Y.; Eberhart, N.K. and Brennan, P.A., 2009.** Chronic and acute stress and the prediction of major depression in women. Vol. 26, No. 8, pp: 718-723.
15. **Holberton, R.L., 1999.** Changes in Patterns of Corticosterone Secretion Concurrent with Migratory Fattening in a Neotropical Migratory Bird. General and Comparative Endocrinology. Vol. 116, No. 1, pp: 49-58.
16. **Holberton, R.L.; Parrish, J.D. and Wingfield, J.C., 1996.** Modulation of the Adrenocortical Stress Response in Neotropical Migrants during Autumn Migration. The Auk. Vol. 113, No. 3, pp: 558-564.
17. **Huang, D.W.; Sherman, B.T. and Lempicki, R.A., 2009.** Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols. Vol. 4, No. 1, pp: 44-57.
18. **Iyasere, O.S.; Beard, A.P.; Guy, J.H. and Bateson, M., 2017.** Elevated levels of the stress hormone, corticosterone, cause 'pessimistic' judgment bias in broiler chickens. Scientific reports. Vol. 7, No. 1, pp: 1-12.
19. **Landys, M.M.; Ramenofsky, M. and Wingfield, J.C., 2006.** Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. General and Comparative Endocrinology. Vol. 148, No. 2, pp: 132-149.
20. **Langfelder, P.; Zhang, B. and Horvath, S., 2007.** Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R. Bioinformatics. Vol. 24, No. 5, pp: 719-720.
21. **Lefebvre, L.; Whittle, P.; Lascaris, E. and Finkelstein, A., 1997.** Feeding innovations and forebrain size in birds. Animal Behaviour. Vol. 53, No. 3, pp: 549-560.
22. **Lugo Ramos, J.S.; Delmore, K.E. and Liedvogel, M., 2017.** Candidate genes for migration do not distinguish migratory and non-migratory birds. Journal of Comparative Physiology A. Vol. 203, No. 6, pp: 383-397.
23. **Mastriani, E.; Zhai, R. and Zhu, S., 2018.** Microarray-Based MicroRNA Expression Data Analysis with

نمونه‌هایی که در ایران وجود دارند و به شرایط جغرافیایی و اکولوژیک این سرزمین سازگاری یافته‌اند، نمونه‌گیری صورت گرفته و بررسی‌های بعدی انجام شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از خانم دکتر لیلا کیان‌مهر و خانم مهندس نهال میرزایی جهت راهنمایی و حمایت در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

۱. رسولی‌نسب، ف.؛ جباریان امیری، ب.؛ کابلی، م. و دانه‌کار، ا.، ۱۳۹۵. بررسی نقاط قوت و ضعف مطالعات حیات وحش در گزارش‌های ارزیابی اثرات محیط زیستی کشور. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۸، شماره ۴، صفحات ۵۹ تا ۶۸.
۲. شمس‌اسفندآباد، ب. و کابلی، م.، ۱۳۹۷. توسعه شبکه مناطق حفاظتی با به‌کارگیری رویکرد برنامه‌ریزی سیستماتیک در ایران. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۱۰، شماره ۴، صفحات ۱۴۷ تا ۱۶۲.
3. **Baritaki, S.; de Bree, E.; Chatzaki, E. and Pothoulakis, C., 2019.** Chronic Stress, Inflammation, and Colon Cancer: A CRH System-Driven Molecular Crosstalk. Journal of Clinical Medicine. Vol. 8, No. 10, pp: 1-26.
4. **Barter, R.L. and Yu, B., 2018.** Superheat: An R Package for Creating Beautiful and Extendable Heatmaps for Visualizing Complex Data. Journal of Computational and Graphical Statistics, Vol. 27, No. 4, pp: 910-922.
5. **Bu, G.; Fan, J.; Yang, M.; Lv, C.; Lin, Y.; Li, J. and Wang, Y., 2019.** Identification of a Novel Functional Corticotropin-Releasing Hormone (CRH2) in Chickens and Its Roles in Stimulating Pituitary TSH β Expression and ACTH Secretion. Front Endocrinol (Lausanne). Vol. 10, No. 595, pp: 1-12.
6. **Costello, M.J.; May, R.M. and Stork, N.E., 2013.** Can We Name Earth's Species Before They Go Extinct? Science. Vol. 339, No. 6118, pp: 413-416.
7. **Dallman, M.F.; Strack, A.M.; Akana, S.F.; Bradbury, M.J.; Hanson, E.S.; Scribner, K.A. and Smith, M., 1993.** Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. Front Neuroendocrinol. Vol. 14, No. 4, pp: 303-347.
8. **Du Plessis, L.; Skunca, N. and Dessimoz, C., 2011.** The what, where, how and why of gene ontology--a primer for bioinformaticians. Briefings in Bioinformatics. Vol. 12, No. 6, pp: 723-735.
9. **Dudoit, S. and Yang, J.Y.H., 2003.** Bioconductor R Packages for Exploratory Analysis and Normalization of

- Bioconductor. New York, NY: Springer New York. pp: 127-138.
24. **Mueller, J.C.; Pulido, F. and Kempenaers, B., 2011.** Identification of a gene associated with avian migratory behaviour. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Vol. 278, No. 1719, pp: 2848-2856.
 25. **Obenchain, V.; Lawrence, M.; Carey, V.; Gogarten, S.; Shannon, P. and Morgan, M., 2014.** VariantAnnotation : a Bioconductor package for exploration and annotation of genetic variants. *Bioinformatics*. Vol. 30, No. 14, pp: 2076-2078.
 26. **Romero, L.M.; Ramenofsky, M. and Wingfield, J.C., 1997.** Season and migration alters the corticosterone response to capture and handling in an Arctic migrant, the white crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Comparative biochemistry and physiology, Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology*. Vol. 116, No. 2, pp: 171-177.
 27. **Ruegg, K.C.; Anderson, E.C.; Paxton, K.L.; Apkenas, V.; Lao, S.; Siegel, R.B. and Smith, T.B., 2014.** Mapping migration in a songbird using high-resolution genetic markers. *Mol Ecol*. Vol. 23, No. 23, pp: 5726-5739.
 28. **Singh, N.S.; Bamon, I.; Dixit, A.S. and Sougrakpam, R., 2015.** Structural variations and their adaptive significances in the bones of some migratory and resident birds. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. Vol. 70, pp: 33-40.
 29. **Sol, D.; Lefebvre, L. and Rodríguez-Teijeiro, J.D., 2005.** Brain size, innovative propensity and migratory behaviour in temperate Palaearctic birds. *Proceedings. Biological sciences*. Vol. 272, No.1571, pp: 1433-1441.
 30. **Toews, D.P.L.; Taylor, S.A.; Streby, H.M.; Kramer, G.R. and Lovette, I.J., 2019.** Selection on VPS13A linked to migration in a songbird. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 116, No. 37, pp: 18272-18274.
 31. **Xia, X.; McClelland, M. and Wang, Y., 2005.** WebArray: an online platform for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics*. Vol. 6, No. 1.