



تنوع ژنتیکی جایگاه‌های TLR4 و IL2 در سیستم ایمنی در چند نژاد مرغ بومی ایران

جعفر پیش جنگ آقاجری^۱، قدرت الله رحیمی میانجی^۲، سید حسن حافظیان^۳ و محسن قلیزاده^۴

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و اساتید مجاز (پژوهش‌های مسؤول: parsa20012003@yahoo.com)

۲، ۳ و ۴- استاد، دانشیار و استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۲۰

چکیده

در این تحقیق چندشکلی‌های آلی در ژن‌های کاندید TLR4 و IL2 دخیل در سیستم ایمنی برخی از نژادهای مرغ بومی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بررسی شد. ۲۰۰ قطعه مرغ شامل نژادهای مرغ بومی عمومی، آفریبایجان غربی، مرندی و مازندرانی انتخاب شدند. برای شناسایی جهش در ژن‌های TLR4 و IL2 به ترتیب از آنزیم‌های *Sau96I* و *HphI* استفاده شد. برای جایگاه ژنی ۲۵۷ جفت بازی TLR4، بعد از هضم آنزیمی سه ژنوتیپ CC، CG و GG شناسایی و برای آل C دو باند ۱۳۸ و ۱۱۹ جفت بازی ۶۰۰ جفت بازی IL2 دو باند ۹۹ و ۳۹۲ سه ژنوتیپ AA، AB و BB شناسایی و برای آل A چهار باند ۴۶۵، ۴۰، ۶۴، ۴۰ و ۳۱ جفت بازی و برای آل B پنج باند ۴۵۴، ۴۰، ۶۴، ۴۰ و ۱۱ جفت بازی مشاهده شد. کل جمعیت‌ها از نظر شاخص تعادل برای دو جایگاه ژنی مورد مطالعه در تعادل هارדי - واینبرگ قرار داشت. شاخص اطلاعات شانون در جایگاه‌های نشانگری TLR4 و IL2 به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۰۶ و همچنین شاخص تشیبت به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۰۰ - محاسبه شد. بیشترین مقدار شاخص هتروزیگوستی مشاهده شده برای جایگاه‌های ژنی TLR4 و IL2 به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۰۴ برآورد شد. با توجه به چندشکلی‌های موجود در جایگاه‌های ژنی مطالعه شده و کافشن هتروزیگوستیتی در این جمعیت‌ها، می‌توان از بروز تلاقي‌های غیرتصادفی جلوگیری کرد. این امر منجر به افزایش هتروزیگوستی و در نتیجه مانع از کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها خواهد شد. همچنین با مطالعه پاسخ‌های ایمنی مرتبط با این دو جایگاه ژنی می‌توان از این جایگاه به عنوان نشانگرهای مناسب در برنامه‌های اصلاح نژاد مرغ‌های بومی برای افزایش مقاومت به بیماری‌ها بهره برد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، ژن‌های TLR4 و IL2، مرغ بومی، PCR-RFLP

با روش‌های آماری به دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است آن‌ها را رد کند (۲). به علاوه، استفاده از ژنتیک مولکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید مهم تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (۲۴). استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به طور چشمگیر پیشرفت ژنتیکی را تسربیع دهد (۹). نژادهای بومی مرغ‌ها، از ذخایر مهم ژنتیکی به شمار می‌رond و از این نظر از سرمایه‌های ژنتیکی ملی به حساب می‌آیند. استفاده از طیور بومی که جمعیت مولد ژنتیکی پایه محسوب می‌شوند، در برنامه‌های اصلاح نژادی طیور کشور و شناخت دقیق و کسب اطلاعات بیشتر در مورد آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد (۲۶) و همچنین مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (۲۲).

هر نژاد یا سویه‌ی حاصل فرآیندهای جهش، رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری مجزایی است که طی قرون متتمادی حاصل گردیده است. فشار انتخاب در طی این زمان تحت تاثیر آب و هوای انگل‌ها و بیماری‌های بومی، تغذیه و دخالت انسان تغییر کرده است؛ بنابراین می‌توان گفت هر نژاد مجموعه متحصر به فردی از ژن‌ها است که مخزن ژنی آن نژاد را می‌سازند. لذا تنوع درون نژادی حاکی از پتانسیل آن جمعیت برای بازسازی و نجات آن از خطر انقراض خواهد بود و مطالعه آن در اولویت مطالعات ژنتیکی حفاظت است (۷).

مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراتوری بزرگ از قرن پنجم قبل از میلاد تا تقریباً قرن هفت میلادی بود و از هند (دلهی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود. در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد.

حفاری‌های باستان شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (۲۱). بر اساس تحقیقات انجام شده استخوان‌های یافته شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند، دو کشف در تپه یحیی (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ سال قبل از میلاد و ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد بود (۲۱). از طرفی، در حوزه ژنتیک و اصلاح اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهم‌تر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد.

روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید زیرا با توجه به اطلاعات زیاد حاصل از نتایج تجزیه و تحلیل رکوردها

اگر چه مطالعات مولکولی متعددی روی طیور در ایران انجام شده است (۱۹، ۲۰، ۲۳، ۳۶)، اما تاکنون چندشکلی ژن‌های کاندید TLR4 و IL2 گزارش نشده است، لذا در این پژوهش چندشکلی‌های آللی در ژن‌های کاندید TLR4 و IL2 دخیل در سیستم ایمنی در برخی از نژادهای مرغ بومی موجود در ایران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌های خون

برای این پژوهش ۲۰۰ قطعه مرغ از برخی جمعیت‌های بومی مختلف ایران شامل مرغ‌های بومی عمومی، مرندی، مازندرانی و آذربایجان غربی (۵۰ قطعه به ازای هر جمعیت) از مرکز پرورش مرغ بومی موسسه‌ی تحقیقات علوم دامی کشور، مرکز پرورش مرغ بومی امور دام جهاد کشاورزی استان آذربایجان غربی انتخاب شدند. از هر مرغ ۱-۲ میلی‌لیتر خون از ورید زیر بال جمع‌آوری و به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون انتقال داده شدند. نمونه‌های خون بعد از شماره‌گذاری با حفظ شرایط زنجیره‌ی سرد به آزمایشگاه منتقل و در دمای -۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA ژنومی نگهداری شدند.

استخراج DNA‌ی ژنومی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

استخراج DNA‌ی ژنومی نمونه‌های خون به روش بهینه شده نمکی میلر و همکاران (۱۸) انجام شد. برای تکثیر جایگاه‌های ژنی مورد نظر برای هر ژن از یک جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد (جدول ۱).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰۰ - ۲۰۰ نانوگرم DNA‌ی ژنومی، چهار میکرولیتر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (Taq, بافر، dNTPs و Red dye, dNTPs)، ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول برای تکثیر منطقه‌ای از اگزون شماره‌ی دو به اندازه‌ی ۲۵۷ جفت باز از ژن TLR4، انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دمای واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۴۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

تکثیر قطعه‌ی مورد نظر از ژن IL-2 با استفاده از واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰۰ - ۲۰۰ نانوگرم DNA‌ی ژنومی، پنج میکرولیتر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (Taq, بافر، dNTPs و ۰/۴ MgCl₂) و ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ ایون‌گلوبولین‌ها را نیز موجب می‌شود. میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول انجام گرفت. برای این جایگاه ژنی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با دمای واسرشته سازی اولیه ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۰ چرخه شامل واسرشته

حفظه ای 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 (۲۸، ۳۵). از ژن‌های کاندید دخیل در مقاومت به بیماری‌ها می‌توان ژن‌های کد کننده ایمونوگلوبولین‌ها، سیتوکین‌ها، هیستوگلوبولین‌ها و گیرنده‌های پاتوزن‌ها را نام برد (۱۶). مهم‌ترین سلول‌های سیستم ایمنی لنفوسيت‌ها هستند که به سلول‌های B و T دسته‌بندی می‌شوند. لنفوسيت‌ها، ماکروفاژ‌ها و فيبروبلاست‌ها سبب تراش اينترفرون‌ها می‌شوند. از ديگر ژن‌های دخیل در مقاومت و يا حساسیت به عفونت‌های پاتوزن‌های مختلف، ژن‌های مجموعه‌ی سازگاری بافتی (MHC)، ژن A1 عضو خانواده‌ی ناقل املاح (SLC11A1)، خانواده‌ی گیرنده‌های شبه Toll (TLR) و اينترلوكین‌ها می‌باشند (۳۱).

ژن TLR جزو خانواده‌ی بزرگ حفاظت شده‌ی DNA ژنومی است و نقش حیاتی در سیستم ایمنی ذاتی دارد و این عمل از طریق شناسایی الگوهای مولکولی در ارتباط با عوامل عفونت‌زا، ترکیبات ضد ویروسی و RNA تک رشته‌ای ایجاد شده و باعث ایجاد پاسخ ایمنی در مقابل ویروس‌ها از جمله ویروس آنفلوانزا می‌شود. پروتئین‌های گیرنده و پیامرسان کد شده توسط این ژن در ایمنی ذاتی نقش داشته و به نام گیرنده‌های شبه Toll (TLRs) شناخته می‌شوند. گیرنده‌های شبه Toll جزو پروتئین‌های غشایی بوده که دارای یک دومن ساختمانی خارج سلولی با توالی تکراری ۲۹ تا ۲۴ اسید آمینه‌ای می‌باشند. این توالی‌های غنی از لوسین، LRRs نام دارند. ژن TLR طیور شامل چندین جایگاه ژنی است و این ژن‌ها در بسیاری از شاخه‌های جانوری مورد بررسی قرار گرفته و ژنوم بسیاری از گونه‌های مهره‌داران بین ۱۰ الی ۱۳ TLR مختلف را در بر می‌گیرد و جهش نقطه‌ای در این ژن باعث ایجاد تنوع در میان افراد جمعیت می‌شود (۴).

اینترلوكین‌ها، سایتوکین‌های ایمنی هستند که روابط بین لنفوسيت‌ها و سایر لوکوسیت‌ها را تنظیم می‌کنند. اینترلوكین ۲ نقش فعالی را در فعالیت و تقویت سیستم‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی ایفا می‌کند (۱۱). اینترلوكین ۲ فقط توسط سلول‌های کمکی T نوع یک (Th1) تولید می‌شود و سلول‌های هدف آن لنفوسيت‌های نوع T (CD4 و CD8)، لنفوسيت‌های نوع NK و ماکروفاژ‌ها می‌باشند. اینترلوكین ۲ باعث تکثیر و تمایز لنفوسيت‌های نوع T که یکی از اجزای اصلی واکنش‌های ایمنی هستند، می‌شود. همچین روى لنفوسيت‌های نوع B اثر گذاشته و رشد آن‌ها را تقویت کرده و سنتز مقدار محدودی از ایمونوگلوبولین‌ها را نیز موجب می‌شود. اینترلوكین ۲ به واسطه‌ی تأثیر بر سلول‌های کمکی T نوع یک و سلول‌های NK موجب تکثیر آن‌ها شده و تولید سلول‌های LAK را افزایش می‌دهد. اینترلوكین ۲ در تولید اینترفرون گاما و اینترلوكین ۱۵ نقش القایی ایفا می‌کند (۳۹) و در طیور اثر مستقیمی بر فعالیت هتروفیل‌ها دارد (۱۱).

با توجه به پیشرفت‌های صورت گرفته در تکنیک‌های ژنتیک مولکولی و اهمیت آن‌ها در برنامه‌های اصلاح نژاد، نیاز میرم به انتخاب به کمک مارکرها بیش از پیش احساس می‌شود.

1- Major Histocompatibility Complex

2- Solute Carrier family11 member A1 gene

3- Toll like Receptor gene

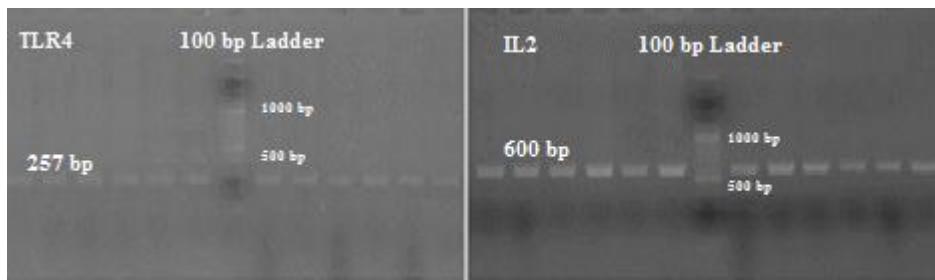
4- Natural Killer cells

5- Lymphokin Activated Killer (cells)

6- این گروه شامل توده‌های ژنتیکی مرغ‌های بومی کشور است که در تمام نقاط مختلف پراکنده‌اند

خطکش ژنی ۱۰۰ جفت بازی روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شدند و صحت تکثیر قطعات مورد نظر بدون حضور باندهای غیر اختصاصی و محصولات ناخواسته تأیید شد (شکل ۱).

سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه انجام شد. قطعات تکثیر یافته برای هر دو ژن در حضور



شکل ۱- مشاهده‌ی محصولات PCR برای جایگاههای ژنی مورد مطالعه در چند نژاد مرغ بومی روی ژل آگارز دو درصد (با خطکش ژنی ۱۰۰ جفت باز)

Figure 1. Observation of PCR products for studied loci in some indigenous chicken breeds on %2 agarose gel (100 bp genetic ladder)

میکرولیتر آنزیم و در نهایت هشت میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام گرفت. واکنش‌های هضم آنزیمی برای دو جایگاه ژنی در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. بعد از هضم آنزیمی محصولات PCR، برای مشاهده‌ی باندها و تعیین الگوهای ژنتیکی از ژل آگارز چهار درصد و خطکش ژنی ۵۰ جفت بازی استفاده شد.

در پژوهش حاضر از تکنیک PCR-RFLP جهت تعیین چندشکلی جایگاههای ژنی مورد نظر استفاده شد و در این راستا برای هضم آنزیمی محصولات PCR از آنزیم‌های محدود‌الاثر اختصاصی HphI و Sau96I استفاده شد (جدول ۱). این واکنش‌ها در حجم نهایی ۱۴/۵ میکرولیتر، شامل پنج میکرولیتر محصول PCR، یک میکرولیتر بافر و ۰/۵

جدول ۱- توالی و دمای اتصال آغازگرهای اندازه‌ی محصولات PCR و آنزیم‌های محدود‌الاثر برای هضم DNA
Table 1. Sequence and annealing temperature of primers, the size of PCR products and restriction enzymes for DNA digestion

ژن	شماره‌ی دسترسی	آغازگر (۳' → ۵')	PCR	محصول (جفت باز)	دماهی اتصال آغازگر (ثانیه / درجه‌ی سانتی‌گراد)	آنزیم محدود‌الاثر
TLR4	AY064697	CCTGGACTTGGACCTCAG GGACTGAAAGCTGCACATC	۲۵۷	۴۸ / ۳۰	Sau96I توحیدی و همکاران (۳۰)	
IL-2	BQ037061	CCCAAGCGTGGACTATGAGAA CATCTTTAGGACTCCGACCCA	۶۰۰	۵۴ / ۳۰	HphI ژوپی و لامونت (۳۸)	

تجزیه و تحلیل ژنتیکی داده‌ها

برای آنالیز ژنتیکی داده‌های دیپلوبیدی حاصل از هضم آنزیمی در جمعیت‌های مرغ بومی، از نرم‌افزار POPGENE نسخه‌ی ۱/۳۲ (۳۴) استفاده شد. از این نرم‌افزار، برای برآورد فراوانی‌های آللی و ژنتیکی، هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار، متوسط هتروزیگوتی، تعادل هاردی - واینبرگ، شاخص تثبیت و شاخص اطلاعات شانون و دیگر پارامترهای ژنتیکی استفاده می‌شود.

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس مقدار هتروزیگوتی مورد انتظار از فرمول شماره‌ی ۱ (۲۵) و شاخص اطلاعات شانون از فرمول شماره‌ی ۲ (۳۳) محاسبه شد.

$$H_s = 1 - \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \sum_{s=1}^k p_i^s, \quad \text{فرمول (۱)}$$

در فرمول ذکر شده $P^2 a$ نشان‌دهنده‌ی فراوانی a این از k آلل و m تعداد جایگاه ژنی است.

$$H' = - \sum_i p_i Lnp_i \quad \text{فرمول (۲)}$$

برخلاف هتروزیگوتی، که برای هر تعداد آلل، حد نهایی یک دارد، حداکثر مقدار H' برابر با $\ln(n)$ است. برای محاسبه‌ی تفاوت فراوانی آللی بین جمیعت‌ها از شاخص تثبیت یا میزان تمایز بین جمیعتی (F_{ST}) استفاده شد (فرمول ۳). در حقیقت این شاخص نشان‌دهنده‌ی مقدار تغییرات ژنتیکی ساختار جمیعت (افزایش و یا کاهش هتروزیگوتی) است (۲۵).

$$F_{ST} = \frac{\sigma_S^2}{\sigma_T^2} = \frac{\sigma_S^2}{\bar{p}(1-\bar{p})} \quad \text{فرمول (۳)}$$

در این فرمول \bar{p} متوسط فراوانی یک آلل در کل جمیعت‌ها، δ_s^2 تفاوت فراوانی‌های آللی در بین جمیعت‌ها و δ_T^2 تفاوت فراوانی‌های آللی در کل جمیعت‌ها است.

برای مقایسه‌ی فراوانی آللی و ژنتیکی در بین جمیعت‌ها و آزمون تعادل هاردی - واینبرگ از مربع کای (فرمول ۴) استفاده شد (۱۴).

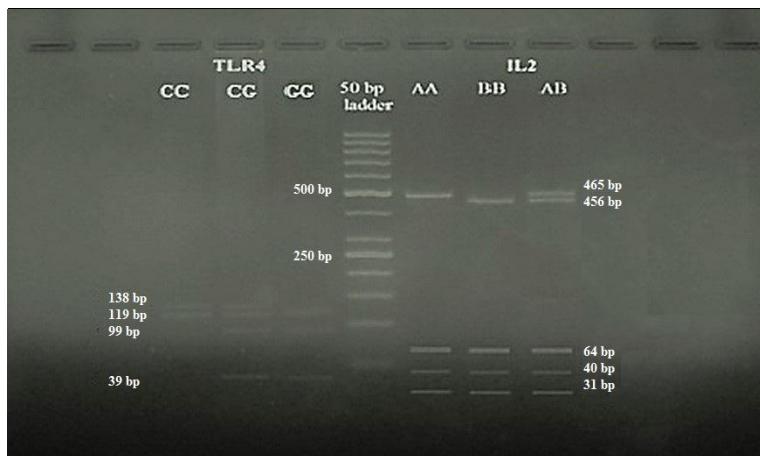
$$\chi^2 = \sum (O_i - E_i)^2 / E_i \quad \text{فرمول (۴)}$$

بازی و برای آلل G سه باند ۱۱۹، ۹۹ و ۳۹ جفت بازی مشاهده شد. در جایگاه ژنی IL2 سه نوع ژنوتیپ AB، AA و BB شناسایی شد. آلل A دارای چهار باند ۴۶۵ و ۴۰ و ۴۰ و ۳۱ جفت بازی و آلل B دارای پنج باند ۴۵۴، ۴۰ و ۴۰ و ۳۱ و ۱۱ جفت بازی بودند (شکل ۲).

در فرمول فوق O_i فراوانی‌های مشاهده شده و E_i فراوانی‌های مورد انتظار هستند.

نتایج و بحث

برای جایگاه ژنی TLR4، سه نوع ژنوتیپ CC، CG و GG شناسایی شد. برای آلل C دو باند ۱۳۸ و ۱۱۹ جفت



شکل ۲- الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده حاصل از هضمی آنزیمی محصولات PCR روی ژل آگارز چهار درصد (با خط کش ژنی ۵۰ جفت باز) در جایگاه ژنی TLR4: ژنوتیپ CC شامل قطعات ۱۳۸ و ۱۱۹ جفت بازی، ژنوتیپ GG شامل قطعات ۱۱۹، ۹۹ و ۳۹ جفت بازی و ژنوتیپ CG شامل قطعات ۱۳۸، ۱۱۹، ۹۹ و ۳۹ جفت بازی.

در جایگاه ژنی IL2: ژنوتیپ AA شامل قطعات ۴۵۴، ۴۰ و ۳۱ و ۱۱ جفت بازی، ژنوتیپ BB شامل قطعات ۴۵۴، ۴۰، ۴۰ و ۳۱ و ۱۱ جفت بازی و ژنوتیپ AB شامل قطعات ۴۶۵، ۶۴، ۴۰ و ۳۱ و ۱۱ جفت بازی.

Figure 2. Observed genotypic patterns from enzymatic digestion of PCR products on 1% agarose gel (50 bp genetic ladder)

For TLR4 gene: Genotype CC included fragments of 138 and 119 bp, genotype GG included fragments of 119, 99 and 39 bp and genotype CG included fragments of 138, 119, 99 and 39 bp.

For IL2 gene: Genotype AA included fragments of 465, 64, 40 and 31 bp, genotype BB included fragments of 454, 64, 40, 31 and 11 bp and genotype CG included fragments of 465, 454, 64, 40, 31 and 11 bp.

ژنتیکی در مرغ‌های بومی مازندرانی بیشتر از دیگر جمعیت‌ها بود. افزایش هتروژی‌گوسیتی مشاهده شده فقط در جمعیت مرغ بومی مازندرانی مشاهده شد که احتمالاً می‌تواند به دلیل تلاقی تصادفی افراد در داخل جمعیت باشد. فراوانی آلل‌های A و B زن IL2 در کل جمعیت‌های مورد مطالعه به ترتیب ۰/۵۱ و ۰/۴۹ براورد شد. بیشترین و کمترین مقدار فراوانی هتروژی‌گوسیتی مشاهده شده به ترتیب در نژادهای مرغ بومی آذربایجان غربی و مرندي (۰/۶۴) و عمومی (۰/۳۴) مشاهده شد. برای این جایگاه ژنی، میانگین شاخص اطلاعات شانون در کل جمعیت ۰/۶۹ و شاخص تثبیت در بین جمعیت‌های مورد مطالعه فقط برای نژادی مرغ بومی عمومی مثبت و ۰/۲۹ محاسبه شد (جدول ۳). این جایگاه نیز دارای چندشکلی بوده و تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بومی آذربایجان غربی و مازندرانی بیشتر از دیگر جمعیت‌های مورد مطالعه است. افزایش هتروژی‌گوسیتی مشاهده شده شده فقط در جمعیت مرغ بومی عمومی مشاهده شد که یکی از علت‌های آن آمیزش‌های غیرخویشاوندی در داخل جمعیت ذکر شده می‌تواند باشد.

χ^2 محاسبه شده برای جایگاه ژنی TLR4 در تمامی جمعیت‌ها معنی‌دار نبود اما در جایگاه ژنی IL2، به غیر از جمعیت مرغ بومی مازندران در بقیه‌ی جمعیت‌ها معنی‌دار بود ($p < 0/05$). مقادیر χ^2 هیچ کدام از جایگاه‌های ژنی در کل جمعیت‌های مورد مطالعه هم معنی‌دار نبودند (جدول ۲ و ۳). مهاجرت‌های متعدد، آمیزش‌های غیر تصادفی، رانش ژنتیکی، انتخاب و جهش در جمعیت‌های کوچک که اثر چشم‌گیری دارند، می‌توانند علت معنی‌داری χ^2 و یا عدم تعادل جمعیت‌های مورد مطالعه محاسبه شوند. در جایگاه ژنی TLR4، فراوانی آلل‌های C و G در کل جمعیت‌های مورد مطالعه به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۲۵ محاسبه شد. بیشترین و کمترین مقدار فراوانی هتروژی‌گوسیتی مشاهده شده به ترتیب مربوط به نژادهای مرغ بومی مازندرانی (۰/۵۰) و آذربایجان غربی و مرندي (۰/۲۲) بود. میانگین شاخص اطلاعات شانون برای این جایگاه ژنی در کل جمعیت‌های مورد مطالعه ۰/۵۶ و شاخص تثبیت در بین جمعیت‌های مورد مطالعه فقط برای مرغ بومی مرندي مثبت و ۰/۰۶ بود (جدول ۲). جایگاه ژنی نظر در سطح نمونه برداری شده، دارای چندشکلی بوده و تنوع

جدول ۲- فراوانی های آللي و ژنوتیپي، ميانگين هتروزىگوسىتى و هتروزىگوسىتى مشاهده شده و مورد انتظار برای جايگاه ژنى TLR4 در هر جمیعت مرغ بومي

Table 2. Allelic and genotypic frequencies, mean heterozygosity, observed and expected heterozygosities for TLR4 gene in each indigenous chicken population

كل جمیعتها	نژاد					آل و ژنوتیپ
	مازندراني	مرندی	آ-غربي	عمومي	آل و ژنوتیپ	
.۰/۲۵	.۰/۳۹	.۰/۲۲	.۰/۱۶	.۰/۲۵	C	فراوانی آللي
.۰/۷۵	.۰/۶۱	.۰/۷۸	.۰/۸۴	.۰/۷۵	G	
.۰/۰۶ (.۰/۰۶)	.۰/۱۴ (.۰/۱۵)	.۰/۰۶ (.۰/۰۴)	.۰ (.۰/۰۲)	.۰/۰۲ (.۰/۰۶)	CC	فراوانی ژنوتیپي مشاهده شده
.۰/۴۰ (.۰/۰۸)	.۰/۵۰ (.۰/۴۸)	.۰/۳۲ (.۰/۳۵)	.۰/۲۲ (.۰/۲۸)	.۰/۴۶ (.۰/۳۸)	CG	(مورد انتظار)
.۰/۵۴ (.۰/۵۶)	.۰/۳۶ (.۰/۳۷)	.۰/۶۲ (.۰/۶۱)	.۰/۶۸ (.۰/۷۰)	.۰/۵۲ (.۰/۵۶)	GG	
.۰/۰۵ ^{ns}	.۰/۰۸ ^{ns}	.۰/۳۰ ^{ns}	.۱/۶۸ ^{ns}	.۲/۲۷ ^{ns}	χ^2	
.۰/۰۵ (.۰/۴۵)	.۰/۵۰ (.۰/۵۰)	.۰/۳۲ (.۰/۶۸)	.۰/۳۲ (.۰/۶۸)	.۰/۴۶ (.۰/۵۴)	فراوانی هتروزىگوسىتى (هموزىگوسىتى) مشاهده شده	
.۰/۳۸ (.۰/۶۲)	.۰/۴۹ (.۰/۵۱)	.۰/۳۴ (.۰/۶۶)	.۰/۲۷ (.۰/۷۳)	.۰/۳۷ (.۰/۶۳)	فراوانی هتروزىگوسىتى (هموزىگوسىتى) مورد انتظار	
.۰/۳۶	.۰/۳۶	.۰/۳۶	.۰/۳۶	.۰/۳۶	متوسط هتروزىگوسىتى	
.۰/۵۶	.۰/۶۶	.۰/۵۲	.۰/۴۳	.۰/۵۶	I	
.۰/۰۵	.۰/۰۵	.۰/۰۶	.۰/۰۹	.۰/۰۲	F	

ns: Non significant ($P < 0.05$); 1- Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium; 2- Shannon's Information index; 3- Fixation index

جدول ۳- فراوانی های آللي و ژنوتیپي، ميانگين هتروزىگوسىتى و هتروزىگوسىتى مشاهده شده و مورد انتظار برای جايگاه ژنى IL2 در هر جمیعت مرغ بومي

Table 3. Allelic and genotypic frequencies, mean heterozygosity, observed and expected heterozygosities for IL2 gene in each indigenous chicken population

كل جمیعتها	نژاد					آل و ژنوتیپ
	مازندراني	مرندی	آ-غربي	عمومي	آل و ژنوتیپ	
.۰/۵۱	.۰/۵۷	.۰/۶۰	.۰/۴۶	.۰/۴۱	A	فراوانی آللي
.۰/۴۹	.۰/۴۳	.۰/۴۰	.۰/۵۴	.۰/۵۹	B	
.۰/۲۴ (.۰/۲۶)	.۰/۲۸ (.۰/۳۲)	.۰/۲۸ (.۰/۳۶)	.۰/۱۴ (.۰/۲۰)	.۰/۲۴ (.۰/۱۷)	AA	فراوانی ژنوتیپي مشاهده شده
.۰/۵۵ (.۰/۵۰)	.۰/۵۸ (.۰/۵۰)	.۰/۶۴ (.۰/۴۸)	.۰/۶۴ (.۰/۵۱)	.۰/۳۴ (.۰/۴۸)	AB	(مورد انتظار)
.۰/۲۱ (.۰/۲۴)	.۰/۱۴ (.۰/۱۸)	.۰/۰۸ (.۰/۱۶)	.۰/۲۲ (.۰/۲۹)	.۰/۴۲ (.۰/۳۵)	BB	
.۱/۹۱ ^{ns}	.۱/۱۹ ^{ns}	.۵/۲۳*	.۳/۸۶*	.۴/۷۲*	χ^2	
.۰/۴۰ (.۰/۶۰)	.۰/۵۸ (.۰/۴۲)	.۰/۶۴ (.۰/۳۶)	.۰/۶۴ (.۰/۳۶)	.۰/۳۴ (.۰/۶۶)	فراوانی هتروزىگوسىتى (هموزىگوسىتى) مشاهده شده	
.۰/۵۰ (.۰/۵۰)	.۰/۴۹ (.۰/۵۱)	.۰/۴۸ (.۰/۵۲)	.۰/۵۰ (.۰/۵۰)	.۰/۴۸ (.۰/۵۲)	فراوانی هتروزىگوسىتى (هموزىگوسىتى) مورد انتظار	
.۰/۴۸	.۰/۴۸	.۰/۴۸	.۰/۴۸	.۰/۴۸	متوسط هتروزىگوسىتى	
.۰/۶۹	.۰/۶۸	.۰/۶۷	.۰/۶۸	.۰/۶۷	I	
.۰/۱۰	.۰/۰۸	.۰/۰۳۳	.۰/۰۲۸	.۰/۰۲۹	F	

* Significant ($P < 0.05$); ns: Non significant ($P < 0.05$); 1- Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium; 2- Shannon's Information index; 3- Fixation index

نشان دهنده تغييرات در فراوانی آللي در يك جمیعت است.

اين تغييرات را ميتوان به تعداد افراد كم رخدانش ژنوتیپي كه در جمیعت هاي با تعداد افراد كم رخدانش دانست (۵). طبق گزارش لوبيکو و همكاران (۱۵)، در جايگاه ژنوتیپي TLR4، مرغ هاي با ژنوتیپ هتروزىگوس، ميزان سرزندگي بالايي داشتند. در مطالعه حاضر همان طور كه در جدول ۲ نشان داده شد، ييشترین فراوانی در اين جايگاه ژنى در كل جمیعت هاي مورد مطالعه مربوط به ژنوتیپ هموزىگوس GG است. سر زندگي بالا با ايمني بالا در ارتباط بوده و احتمالاً به دليل سازگاري پرنده به محيط هاي پرورشي است كه در نهايتي منجر به افزایش مقاومت به بيماري در

جماعت مرغ هاي بومي مي شود.

ايترولوكين هاي يك گروه مهم از سيتوکين ها را تشکيل مي دهند و نقش مهمي در ايجاد پاسخ هاي ايمني دارند. IL2 سيتوکين ضد التهابي است كه به عنوان کانديد در پاسخ ايمني شناخته شده است (۳،۳۳). ژن IL-2Ry از مجموعه گيرنده هاي IL2، IL4، IL7، IL9 و IL15 تشکيل شده و در

در ژنوم مرغ، ژن TLR4 بر روی ميكروكروموزوم E4/W17 قرار دارد كه يك پروتين ۸۴۹ اسييد آمينويه اري را كد مي كند (۱۵)، اين ژن بعد از تشخيص الگوهای مولکولي مرتبط با پاتوژن ها از طريق شناسابي ليوبولپي ساكاريد هاي پاتوژن ها، سيسitem ايمني را فعال مي كند (۱۲). گزارش شده است كه پس از آلودگي بدن توسيط يك عامل بيماري زا، بيان ژن TLR4 افزایش مي يابد (۲۷).

در مطالعه حاضر، در جايگاه ژنى TLR4، در كل جمیعت هاي مرغ بومي ژنوتیپ هتروزىگوس CG با فراوانی .۰/۰ و ژنوتیپ هاي هموزىگوس GG و CC به ترتيب با فراوانی هاي .۰/۵۴ و .۰/۰۶ مشاهده شد. همچنان فراوانی آلل هاي C و G به ترتيب .۰/۲۵ و .۰/۷۵ و محسنه شد (جدول ۲). اين نتائج مطابق مقدار بيشتر فراوانی آللي و ژنوتیپي گزارش شده توسيط توحيدی و همكاران (۳۰) در جمیعت مرغ بومي مالريابي بود. همچنان طبق گزارش اين محققين جمیعت مورد مطالعه اي آن ها در تعادل بوده است و اين مشابه نتائج تحقيق حاضر است. انحراف از تعادل هاردی - واينبرگ،

بومی، به ترتیب $0/05$ و $0/0$ - محاسبه شد (جدول ۲ و ۳). شاخص تثبیت همیشه در محدوده‌ی ۱ تا ۱- متغیر است و منفی بودن آن نشانی از کاهش هتروزیگوستی و افزایش هموزیگوستی یا افزایش هم‌خونی و همچنین انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت‌ها است. مطابق نتایج این تحقیق، برآورده ساخته تثبیت در مرغ‌ها توسط وانهلا و همکاران (۳۲) و زانتی و همکاران (۳۷) در جمعیت مرغ‌ها منفی گزارش شده است.

در تحقیق حاضر، برای جایگاه‌های ژنی TLR4 و IL2 در کل جمعیت‌های مورد مطالعه، شاخص اطلاعات شانون به ترتیب $0/56$ و $0/69$ محاسبه شد (جدول ۲ و ۳). این مقادیر مطابق نتایج گزارش شده توسط توحیدی و همکاران (۲۹) در مرغ‌های بومی مالزیایی است. شاخص اطلاعات شانون برآورده از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها بوده و در یک اکوستیسم غنی از تنوع ژنتیکی، شاخص اطلاعات شانون در محدوده‌ی $1/5$ تا $3/5$ قرار دارد (۱۷). در تحقیقی که توسط الآیات (۱) روی مرغ‌های بومی اردنه‌ی انجام گرفت، شاخص اطلاعات شانون در محدوده‌ی از $0/42$ تا $0/60$ گزارش شد.

برای ایجاد مقاومت در مقابل بیماری‌ها در جمعیت‌های مختلف مرغ بومی، نیاز به اطلاعات کافی در مورد چندشکلی ژن‌های کاندید دخیل در مقاومت یا حساسیت در برابر بیماری‌ها دارد. با توجه به چندشکلی‌های موجود در دو جایگاه ژنی TLR4 و IL2، میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده نیز به ترتیب $0/28$ و $0/50$ و میانگین هتروزیگوستی در جایگاه ژنی TLR4، بیشترین مقدار هتروزیگوستی در مرغ‌های تزادی بومی مازندرانی ($0/50$) و در جایگاه ژنی IL2، بیشترین مقدار هتروزیگوستی را نژادهای مرغ بومی آذربایجان غربی و مرندی ($0/64$) داشتند (جدول ۲ و ۳). مقدار بالای فراوانی هتروزیگوستی در جایگاه ژنی TLR4 کل جمعیت‌های مورد مطالعه، نشان‌دهنده‌ی تنوع ژنتیکی زیاد برای این جایگاه ژنی است در حالی که در جایگاه ژنی IL2 فراوانی هتروزیگوستی مشاهده شده پایین‌تر بود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با همکاری موسسه‌ی تحقیقات علوم دامی کشور، معاونت امور دام جهاد کشاورزی استان آذربایجان غربی و با مساعدت و همکاری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مراغه انجام گرفت. از همکاری بی‌دریغ همه‌ی همکاران و عزیزان مراکز یاد شده کمال تشکر و سپاس‌گزاری را داریم.

فعال‌سازی لنفوستیت‌ها فعالیت دارند (۳۹). نقش قابل توجه ژن IL-2Ry در عملکرد سیستم ایمنی فیزیولوژیک باعث شده است که آن‌ها به عنوان نشانگرهای ایده‌آل برای شناسایی چندشکلی‌های DNA به حساب آیند (۸).

در جایگاه ژنی IL2، در کل جمعیت‌های مرغ‌های بومی مورد مطالعه، ژنوتیپ AA دارای فراوانی $0/24$ و ژنوتیپ‌های AB و BB به ترتیب فراوانی‌های $0/05$ و $0/21$ داشتند. فراوانی هموزیگوستی و هتروزیگوستی مشاهده شده به ترتیب $0/60$ و $0/40$ بود (جدول ۳). مطالعه حاضر الگوی مشابهی را که قبلاً توسط ژویو و لامونت (۳۸) در مرغ‌های نژادهای لگهورن و فایومی، جایسوال و همکاران (۸) در مرغ‌های بومی کاداکانات و کیومار و همکاران (۱۳) در مرغ‌های بومی آسیل ارائه داده بودند، نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر، فراوانی هتروزیگوستی مشاهده شده بیشتر از گزارش‌هایی است که توسط جایسوال و همکاران (۸) در مرغ‌های بومی کاداکانات و همکاران (۱۳) در مرغ‌های بومی آسیل (۰/۳۶) ارائه شد که این تفاوت را می‌توان احتمالاً به دلیل تفاوت در ساختار جمعیت مورد مطالعه نسبت داد.

در کل جمعیت‌های مرغ‌های بومی، میانگین هتروزیگوستی مورد انتظار در دو جایگاه ژنی TLR4 و IL2 به ترتیب $0/28$ و $0/50$ و میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده نیز به ترتیب $0/55$ و $0/40$ برآورد شد. بین جمعیت‌ها، در جایگاه ژنی TLR4، بیشترین مقدار هتروزیگوستی در مرغ‌های تزادی بومی مازندرانی ($0/50$) و در جایگاه ژنی IL2، بیشترین مقدار هتروزیگوستی را نژادهای مرغ بومی آذربایجان غربی و مرندی ($0/64$) داشتند (جدول ۲ و ۳). کل جمعیت‌های مورد مطالعه، نشان‌دهنده‌ی تنوع ژنتیکی زیاد برای این جایگاه ژنی است در حالی که در جایگاه ژنی IL2 فراوانی هتروزیگوستی مشاهده شده پایین‌تر بود. هتروزیگوستی می‌تواند به عنوان شخص اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در نظر گرفته شود فلذاً پایین بودن این شاخص می‌تواند بیانگر هم‌خونی بیشتر افراد و در نتیجه و سازگاری کم مرغ‌ها باشد (۱۰). لازم به ذکر است که تنوع ژنتیکی پایین می‌تواند به عواملی مثل اندازه کم جمعیت مورد مطالعه نیز ارتباط داشته باشد (۳). شاخص تثبیت برای جایگاه‌های ژنی TLR4 و IL2 در کل جمعیت مرغ‌های

منابع

- Al-Atiyat, R. 2010. Genetic diversity of indigenous chicken ecotypes in Jordan. *African Journal of Biotechnology*, 9: 7014-7019.
- Alinaghizadeh, H., M.R. Mohammad Abadi and S. Zakizadeh. 2010. Exon 2 of BMP15 gene polymorphisms in Jabal Barez red goat. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2(1): 69-80 (In Persian).
- Allendorf, F.W. and R.F. Leary. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*, pp: 57-76.
- Bulumulla, P.B.A.I.K., P. Silva and H. Jianlin. 2011. Genetic diversity at toll like receptor 7 (TLR7) genes of Sri Lankan indigenous chicken and Ceylon jungle fowl (*Gallus lafayetti*). *Tropical Agricultural Research*, 22(4): 367-373.
- Corander, J., P. Waldmann and M.J. Sillanpää. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163: 367-374.
- Estess, P., A. Nandi, M. Mohamadzadeh and M.H. Siegelman. 1999. Interleukin 15 induces endothelial hyaluronan expression in vitro and promotes activated T cell extravasations through a CD44-dependent pathway in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 190: 9-19.
- Hemati, B., M.H. Banabazi, S. Shahkarami, E. Mohandesan and P. Burger. 2017. Genetic diversity within Bactrian camel population of Ardebil province. *Research on Animal Production*, 8(16): 192-197 (In Persian).
- Jaiswal, G., S. Kumar, Y. Prasad and D.P. Singh. 2009. PCR-RFLP analysis of IL-2R γ and IL-15R α genes in Kadakanath native chicken. *Journal of Applied Animal Research*, 36: 239-242.
- Javanmard, A., M.R. Mohammadabadi, G.E. Zarrigabai, A.A. Gharahedaghi, M.R. Nassiry, A. Javadmansh and N. Asadzadeh. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian Bos Taurus). *Russian Journal of Genetics*, 44 (4): 495-497.
- Keller, L.F. and D.M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 17: 230-241.
- Kogut, M., L. Rothwell and P. Kaiser. 2003. Priming by recombinant chicken interleukin-2 induces selective expression of IL-8 and IL-18 mRNA in chicken heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized and nonopsonized *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. *Journal of Molecular Immunology*, 40: 603-610.
- Köllisch, G., B.N. Kalali, V. Voelcker, R. Wallich, H. Behrendt, J. Ring, S. Bauer, T. Jakob, M. Mempel and M. Ollert. 2005. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*, 114: 531-541.
- Kumar, R., S. Kumar, D.P. Singh and P. Gaur. 2007. DNA polymorphism at IL-2R γ and IL-15R α genes in Aseel native chicken. *Journal of Applied Animal Research*, 32: 107-110.
- Levene, H. 1949. On a matching problem in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics*, 20: 91-94.
- Leveque, G., V. Forgetta, S. Morroll, A.L. Smith, N. Bumstead, P. Barrow, J. Loredo-Osti, K. Morgan and D. Malo. 2003. Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. *Infection and Immunity*, 71: 1116-1124.
- Maghsoudi, S.M. and A. Pakdel. 2008. Review of effective genetical methods to induce disease resistance in farm animals. Proceedings of the 1th National conference of the livestock and poultry industry, 1-6 pp., Gorgan, Iran. (In Persian).
- McDonald, D.G. and J. Dimmick. 2003. The conceptualization and measurement of diversity. *Communication Research*, 30: 60-79.
- Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3): 12-15.
- Moazeni, S., M.R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Shahrabak, A. Koshkoieh and F. Bordbar .2016a. Association between UCP gene polymorphisms and growth, breeding value of growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *Open Journal of Animal Sciences*, 6(1): 1-8.
- Moazeni, S.M., M.R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Moradi Shahrabak and A.K. Esmailizadeh. 2016b. 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.
- Mohammadabadi, M.R., M. Nikbakhti, H.R. Mirzaee, A. Shandi, D.A. Saghi, M.N. Romanov and I.G Moiseyeva. 2010. Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian journal of genetics*, 46(4): 505-509.
- Mohammadi, A., M.R. Nassiry, J. Mosafer, M.R. Mohammadabadi and G.E. Sulimova. 2009. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian journal of genetics*, 45(2): 198-202.
- Mohammadifar, A. and M.R. Mohammadabadi. 2011. Application of microsatellite markers for a study of Kermani sheep genome. *Iranian journal of Animal Science*, 42(4): 337-344.
- Mousavizadeh, A., M.R. Mohammadabadi, A. Torabi, M.R. Nassiry, H. Ghiasi and A.K. Esmailizadeh. 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology*, 7(1): 51-53.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3321-3323.
- Nikoubin Borujeni, M., N. Pirany and F. Rafiei Boroujeni. 2016. Analysis of genetic diversity in Fars native chicken based on partial mitochondrial DNA D-loop region sequences. *Research on Animal Production*, 7(14): 180-185 (In Persian).

27. Ramasamy, K.T., M.R. Reddy and S. Murugesan. 2011. Toll-like receptor mRNA expression, iNOS gene polymorphism and serum nitric oxide levels in indigenous chickens. *Veterinary Research Communications*, 35: 321-327.
28. Shojaei, M., M.R. Mohammadabadi, M. Asadi Fozi, O. Dayani, A. Khezri and M. Akhondi. 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2: 67-73.
29. Tohidi, R., I.B. Idris, J.M. Panandam and M. Hair-Bejo. 2013. Analysis of genetic variation of inducible nitric oxide synthase and natural resistance-associated macrophage protein 1 loci in Malaysian native chickens. *African Journal of Biotechnology*, 10: 1285-1289.
30. Tohidi, R., I.B. Idris, J.M. Panandam and M.H. Hair-Bejo. 2012. The effects of polymorphisms in IL-2, IFN- γ , TGF- β 2, IgL, TLR-4, MD-2, and iNOS genes on resistance to *Salmonella E.* in indigenous chickens. *Avian Pathology*, 41: 605-612.
31. Thomas, N. and S. Joseph. 2012. Role of SLC11A1 gene in disease resistance. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28(1): 99-106.
32. Vanhala, T., M. Tuiskula-Haavisto, K. Elo, J. Vilki and A. Maki-Tanila. 1998. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science*, 77: 783-790.
33. Weir, B.S. 1990. Genetic data analysis: Methods for discrete population genetic data. 1rd edn, Sinauer Assoc., Sunderland, MA, USA, 377 pp.
34. Yeh, F.C., Y. Rongcal and T. Boyle. 2000. POPGENE 1.32: A free program for the analysis of genetic variation among and within populations using co-dominant and dominant markers. Department of Renewable Resources, University of Alberta, Alberta, Canada.
35. Zamani, P., M. Akhondi, M.R. Mohammadabadi, A.A. Saki, A. Ershadi, M.H. Banabazi and A.R. Abdolmohammadi. 2013. Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10: 1812-1817.
36. Zandi, E., M.R. Mohammadabadi, M. Ezzatkah and A.K. Esmailizadeh. 2014. Typing of toxigenic isolates of clostridium perfringens by multiplex PCR in ostrich. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4: 509-514.
37. Zanetti, E., C. Dalvit, M. De Marchi, R. Dal Zotto and M. Cassandro. 2007. Genetic characterization of Italian chicken breeds using a panel of twenty microsatellite markers. *Poljoprivreda*, 13(1): 197-200.
38. Zhou, H. and S.J. Lamont. 2003. Association of six candidate genes with antibody response kinetics in hens. *Poultry Science*, 82: 1118-1126.
39. Zhou, H., A. Buitenhuis, S. Weigend and S. Lamont. 2001. Candidate gene promoter polymorphisms and antibody response kinetics in chickens: interferon- γ , interleukin-2 and immunoglobulin light chain. *Poultry Science*, 80: 1679-1689.

Genetic Diversity of TLR4 and IL2 Loci Involved In Immune System in Some Iranian Indigenous Chicken Breeds

Jafar Pish Jang Aghajeri¹, Ghodrat Rahimi Mianji², Seyyed Hassan Hafezian³ and Mohsen Gholizadeh⁴

1- Ph.D. Student of Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University and Department of Animal Science, Islamic Azad University, Maragheh branch
(Corresponding Author, Email: parsa20012003@yahoo.com)

2, 3 and 4- Professor, Associated Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Received: November 28, 2017

Accepted: January 10, 2018

Abstract

In this study, allelic polymorphism in candidate genes of TLR4 and IL2 involved in the immune system in four Iranian indigenous chickens were examined using PCR-RFLP technique. A total of 200 birds including common, West Azerbaijan, Marandi, Mazandarani indigenous chicken breeds were selected. For detection of mutation in TLR4 (257 bp) and IL2 (600 bp) genes the PCR products were digested by *Sau96I* and *HphI* restriction enzymes, respectively. Two alleles of C (138 and 119 bp) and G (119, 99 and 39 bp) and three genotypes of CC, CG and GG were identified in TLR4 marker site. Following the enzymatic digestion of the IL2 gene, two alleles of A (465, 64, 40 and 31bp) and B (454, 64, 40, 31 and 11 bp) and three genotypes of AA, AB and BB were identified. The whole populations was in Hardy-Weinberg equilibrium for TLR4 and IL2 marker sites. The calculated Shannon information index and fixation index values for TLR4 and IL2 marker sites was estimated to be (0.56 and 0.69) and (-0.05 and -0.10), respectively. The highest observed heterozygosity value for TLR4 and IL2 loci was estimated to be (0.55 and 0.40), respectively. Regarding to the existence of polymorphism in the studied loci and reduction of heterozygosity in these populations, the occurrence of non-random crosses can be prevented. This leads to an increase in heterozygosity and thus prevents the loss of genetic diversity in the populations would be. In the populations also, by studying the immune responses associated with these two loci, these sites can be used as suitable markers in breeding programs for increase of resistance to diseases in indigenous chickens.

Keywords: Indigenous chicken, Polymorphism, TLR4 and IL2 genes, PCR-RFLP