دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

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

جعفر پیش جنگ آقاجری[۱]، قدرت اله رحیمی میانجی[۲]، سید حسن حافظیان[۳] و محسن قلی زاده[۴]

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و عضو هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مراغه (نویسنده‌ی مسوول: parsa20012003@yahoo.com)
۲، ۳ و ۴- استاد، دانشیار و استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۲۰

چکیده

در این تحقیق چندشکلی‌های آللی 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، آذربایجان 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 آلل C دو باند ۱۳۸ و ۱۱۹ جفت بازی و برای آلل G سه باند ۱۱۹، ۹۹ و ۳۹ جفت بازی مشاهده شد. در جایگاه ژنی ۶۰۰ جفت بازی IL2، سه ژنوتیپ AA، AB و BB شناسایی و برای آلل A چهار باند ٤٦٥، ٦٤، ٤٠ و ۳۱ جفت بازی و برای آلل B پنج باند ٤٥٤، ٦٤، ٤٠، ۳۱ و ۱۱ جفت بازی مشاهده شد. کل جمعیت‌ها از نظر شاخص تعادل برای دو جایگاه ژنی مورد مطالعه در تعادل هاردی - واینبرگ قرار داشت. شاخص اطلاعات شانون در جایگاه‌های نشانگری TLR4 و IL2 به ترتیب ۰/٥٦ و ۰/٦۹ و همچنین شاخص تثبیت به ترتیب ۰/۰٥- و ۰/۱۰- محاسبه شد. بیشترین مقدار شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جایگاه‌های ژنی TLR4 و IL2 به ترتیب ۰/٥٥ و ۰/٤۰ برآورد شد. با توجه به چندشکلی‌های موجود در جایگاه‌های ژنی مطالعه شده و کاهش هتروزیگوسیتی در این جمعیت‌ها، می‌توان از بروز تلاقی‌های غیر تصادفی جلوگیری کرد. این امر منجر به افزایش هتروزیگوسیتی و در نتیجه مانع از کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها خواهد شد. همچنین با مطالعه‌ی 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

مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراتوری بزرگ از قرن پنج قبل از میلاد تا تقریباً قرن هفت میلادی بود و از هند (دهلی) 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 یافت 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 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 تسریع دهد (۹). نژادهای بومی مرغ‌ها، از ذخایر مهم ژنتیکی به شمار می‌روند 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 متمادی حاصل گردیده است. فشار انتخاب در طی این زمان تحت تأثیر آب و هوا، انگل‌ها و بیماری‌های بومی، تغذیه و دخالت انسان تغییر کرده است؛ بنابراین می‌توان گفت هر نژاد مجموعه منحصر 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).

حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (۲۸،۳۵). از ژن‌های کاندید دخیل در مقاومت به بیماری‌ها می‌توان ژن‌های کد کننده‌ی ایمونوگلبولین‌ها، سیتوکین‌ها، هیستوگلبولین‌ها و گیرنده‌های پاتوژن‌ها را نام برد (۱۶). مهم‌ترین سلول‌های سیستم ایمنی لنفوسیت‌ها هستند که به سلول‌های B و T دسته‌بندی می‌شوند. لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و فیبروبلاست‌ها سبب ترشح اینترفرون‌ها می‌شوند. از دیگر ژن‌های دخیل در مقاومت و یا حساسیت به عفونت‌های پاتوژن‌های مختلف، ژن‌های مجموعه‌ی سازگاری بافتی (MHC)[1]، ژن A1 عضو خانواده‌ی ناقل املاح (SLC11A1)[2]، خانواده‌ی گیرنده‌های شبه Toll (TLR)[3] و اینترلوکین‌ها 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 ۲۴ تا ۲۹ 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).

اینترلوکین‌ها، سایتوکین‌هایی هستند که روابط بین لنفوسیت‌ها و سایر لوکوسیت‌ها را تنظیم می‌کنند. اینترلوکین ۲ نقش فعالی را در فعالیت و تقویت سیستم‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی ایفا می‌کند (۱۱). اینترلوکین ۲ فقط توسط سلول‌های کمکی T نوع یک (Th1) تولید می‌شود و سلول‌های هدف آن لنفوسیت‌های نوع T (CD4 و CD8)، لنفوسیت‌های نوع B، NK[4] و ماکروفاژها می‌باشند. اینترلوکین ۲ باعث تکثیر و تمایز لنفوسیت‌های نوع T که یکی از اجزای اصلی واکنش‌های ایمنی هستند، می‌شود. همچنین روی لنفوسیت‌های نوع B اثر گذاشته و رشد آن‌ها را تقویت کرده و سنتز مقدار محدودی از ایمنوگلوبولین‌ها را نیز موجب می‌شود. اینترلوکین ۲ به واسطه‌ی تأثیر بر سلول‌های کمکی T نوع یک و سلول‌های NK موجب تکثیر آن‌ها شده و تولید سلول‌های LAK[5] را افزایش می‌دهد. اینترلوکین ۲ در تولید اینترفرون گاما و اینترلوکین 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 مبرم به انتخاب به کمک مارکرها بیش از پیش احساس می‌شود. 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[6]، 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 ۲-۱ 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)

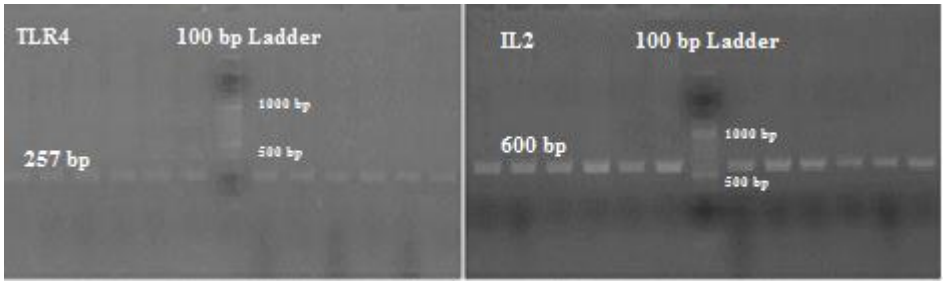
استخراج DNAی ژنومی نمونه‌های خون به روش بهینه شده‌ی نمکی میلر و همکاران (۱۸) انجام شد. برای تکثیر جایگاه‌های ژنی مورد نظر برای هر ژن از یک جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد (جدول ۱).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰ – ۱۰۰ نانوگرم DNAی ژنومی، چهار میکرولیتر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (Taq DNA polymerase، بافر، dNTPs، Red dye و $Mgcl_2$) و 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 واسرشته سازی 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 ۲۰۰ – ۱۰۰ نانوگرم DNAی ژنومی، پنج میکرولیتر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (Taq DNA polymerase، بافر، dNTPs، Red dye و $Mgcl_2$) و ۰/۴ 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

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

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 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).



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)

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 *Sau96I* و *HphI* استفاده شد (جدول ۱). این واکنش‌ها در حجم نهایی ۱۴/۵ میکرولیتر، شامل پنج میکرولیتر محصول PCR، یک میکرولیتر بافر و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم و در نهایت هشت میکرولیتر آب دو بار 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 ژنوتیپی از ژل آگارز چهار درصد و خط‌کش ژنی ۵۰ جفت بازی استفاده شد.

جدول ۱- توالی و دمای اتصال آغازگرها، 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 (۵' → ۳')	محصول PCR (جفت باز)	دمای اتصال آغازگر (ثانیه / درجه‌ی سانتی‌گراد)	آنزیم محدودالاثر
TLR4	AY064697	CCTGGACTTGGACCTCAG GGACTGAAAGCTGCACATC	۲۵۷	۴۸ / ۳۰	*Sau96I* توحیدی و همکاران (۳۰)
IL-2	BQ037061	CCCAGCGTGGACTATGAGAA CATCTTTAGGACTCCGACCCA	۶۰۰	۵۴ / ۳۰	*HphI* ژویو و لامونت (۳۸)

تجزیه و تحلیل ژنتیکی داده‌ها

برای آنالیز ژنتیکی داده‌های دیپلوئیدی 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 ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، متوسط هتروزیگوسیتی، تعادل‌هاردی - واینبرگ، شاخص تثبیت و شاخص اطلاعات شانون و دیگر پارامترهای ژنتیکی استفاده می‌شود.

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

فرمول (۱)

$$H_e = 1 - \frac{1}{m}\sum_{i=1}^{m}\sum_{a=1}^{k} p^2_a$$

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

فرمول (۲)

$$H' = -\sum_i p_i Lnp_i$$

برخلاف هتروزیگوسی، که برای هر تعداد آلل، حد نهایی یک دارد، حداکثر مقدار 'H برابر با Ln(n) است.

برای محاسبه‌ی تفاوت فراوانی آللی بین جمعیت‌ها از شاخص تثبیت یا میزان تمایز بین جمعیتی (F_{ST}) استفاده شد (فرمول ۳). در حقیقت این شاخص نشان‌دهنده‌ی مقدار تغییرات ژنتیکی ساختار جمعیت (افزایش و یا کاهش هتروزیگوسیتی) است (۲۵).

فرمول (۳)

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

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

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

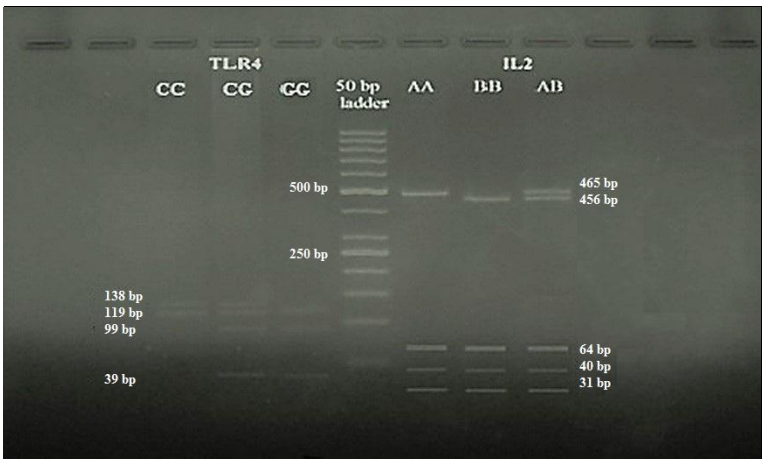
فرمول (۴)

$$\chi 2 = \sum (O_i - E_i)^2 / E_i$$

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 بازی و برای آلل G سه باند ۱۱۹، ۹۹ و ۳۹ جفت بازی مشاهده شد. در جایگاه ژنی IL2 سه نوع ژنوتیپ AA، AB و BB شناسایی شد. آلل A دارای چهار باند ۴۶۵ و ۶۴، ۴۰ و ۳۱ جفت بازی و آلل B دارای پنج باند ۴۵۴، ۶۴، ۴۰، ۳۱ و ۱۱ جفت بازی بودند (شکل ۲).



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: ژنوتیپCC 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: ژنوتیپAA شامل قطعات ۴۶۵، ۶۴، ۴۰ و ۳۱ جفت بازی، ژنوتیپ BB شامل قطعات ۴۵۴، ۶۴، ۴۰، ۳۱ و ۱۱ جفت بازی و ژنوتیپ AB شامل قطعات ۴۶۵، ۴۵۴، ۶۴، ۴۰، ۳۱ و ۱۱ جفت بازی.

Figure 2. Observed genotypic patterns from enzymatic digestion of PCR products on %4 agarose gel (50 bp genetic ladder)
For TLR4 gene: Genotype CC included fragments of 138 and119 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, 31and 11 bp and genotype CG included fragments of 465, 454, 64, 40, 31 and 11 bp.

χ^2 محاسبه شده برای جایگاه ژنی TLR4 در تمامی جمعیت‌ها معنی‌دار نبود اما در جایگاه ژنیIL2، به غیر از جمعیت مرغ بومی مازندران در بقیه‌ی جمعیت‌ها معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). مقادیر χ^2 هیچ کدام از جایگاه‌های ژنی در کل جمعیت‌های مورد مطالعه هم معنی‌دار نبودند (جداول 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 محسوب شوند. در جایگاه ژنی TLR4، فراوانی آلل‌های C و G در کل جمعیت‌های مورد مطالعه به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۷۵ محاسبه شد. بیشترین و کمترین مقدار فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب مربوط به نژادهای مرغ بومی مازندرانی (۰/۵۰) و آذربایجان غربی و مرندی (۰/۳۲) 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 مرندی مثبت و ۰/۰۶ بود (جدول ۲). جایگاه مورد نظر در سطح نمونه برداری شده، دارای چندشکلی بوده و تنوع ژنتیکی در مرغ‌های بومی مازندرانی بیشتر از دیگر جمعیت‌ها بود. افزایش هتروزیگوسیتی مشاهده شده فقط در جمعیت مرغ بومی مرندی مشاهده شد که احتمالاً می‌تواند به دلیل تلاقی تصادفی افراد در داخل جمعیت باشد.

فراوانی آلل‌های A و B ژن IL2 در کل جمعیت‌های مورد مطالعه به ترتیب ۰/۵۱ و ۰/۴۹ برآورد شد. بیشترین و کمترین مقدار فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب در نژادهای مرغ بومی آذربایجان غربی و مرندی (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 هتروزیگوسیتی مشاهده شده فقط در جمعیت مرغ بومی عمومی مشاهده شد که یکی از علت‌های آن آمیزش‌های غیرخویشاوندی در داخل جمعیت ذکر شده می‌تواند باشد.

جدول ۲- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، میانگین هتروزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی TLR4 در هر جمعیت مرغ بومی

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

	آلل و ژنوتیپ	نژاد				کل جمعیت‌ها
		عمومی	آ- غربی	مرندی	مازندرانی	
فراوانی آللی	C	۰/۲۵	۰/۱۶	۰/۲۲	۰/۳۹	۰/۲۵
	G	۰/۷۵	۰/۸۴	۰/۷۸	۰/۶۱	۰/۷۵
فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده (مورد انتظار)	CC	۰/۰۲ (۰/۰۶)	۰ (۰/۰۲)	۰/۰۶ (۰/۰۴)	۰/۱۴ (۰/۱۵)	۰/۰۶ (۰/۰۶)
	CG	۰/۴۶ (۰/۳۸)	۰/۳۲ (۰/۲۸)	۰/۳۲ (۰/۳۵)	۰/۵۰ (۰/۴۸)	۰/۴۰ (۰/۳۸)
	GG	۰/۵۲ (۰/۵۶)	۰/۶۸ (۰/۷۰)	۰/۶۲ (۰/۶۱)	۰/۳۶ (۰/۳۷)	۰/۵۴ (۰/۵۶)
χ^{2}[1]		۲/۳۷^{ns}	۱/۶۸^{ns}	۰/۳۰^{ns}	۰/۰۸^{ns}	۰/۵۰^{ns}
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مشاهده شده		۰/۴۶ (۰/۵۴)	۰/۳۲ (۰/۶۸)	۰/۳۲ (۰/۶۸)	۰/۵۰ (۰/۵۰)	۰/۵۵ (۰/۴۵)
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مورد انتظار		۰/۳۷ (۰/۶۳)	۰/۲۷ (۰/۷۳)	۰/۳۴ (۰/۶۶)	۰/۴۹ (۰/۵۱)	۰/۳۸ (۰/۶۲)
متوسط هتروزیگوسیتی		۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۶
I[2]		۰/۵۶	۰/۴۳	۰/۵۲	۰/۶۶	۰/۵۶
F[3]		-۰/۲۲	-۰/۱۹	۰/۰۶	-۰/۰۵	-۰/۰۵

ns: Non significant (P < 0. 05); 1- Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium; 2- Shannon's Information index; 3- Fixation index

جدول ۳- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، میانگین هتروزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی IL2 در هر جمعیت مرغ بومی

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

	آلل و ژنوتیپ	نژاد				کل جمعیت‌ها
		عمومی	آ- غربی	مرندی	مازندرانی	
فراوانی آللی	A	۰/۴۱	۰/۴۶	۰/۶۰	۰/۵۷	۰/۵۱
	B	۰/۵۹	۰/۵۴	۰/۴۰	۰/۴۳	۰/۴۹
فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده (مورد انتظار)	AA	۰/۲۴ (۰/۱۷)	۰/۱۴ (۰/۲۰)	۰/۲۸ (۰/۳۶)	۰/۲۸ (۰/۳۲)	۰/۲۴ (۰/۲۶)
	AB	۰/۳۴ (۰/۴۸)	۰/۶۴ (۰/۵۱)	۰/۶۴ (۰/۴۸)	۰/۵۸ (۰/۵۰)	۰/۵۵ (۰/۵۰)
	BB	۰/۴۲ (۰/۳۵)	۰/۲۲ (۰/۲۹)	۰/۰۸ (۰/۱۶)	۰/۱۴ (۰/۱۸)	۰/۲۱ (۰/۲۴)
χ^{2}[1]		۴/۷۲*	۳/۸۶*	۵/۲۳*	۱/۴۹^{ns}	۱/۹۱^{ns}
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مشاهده شده		۰/۳۴ (۰/۶۶)	۰/۶۴ (۰/۳۶)	۰/۶۴ (۰/۳۶)	۰/۵۸ (۰/۴۲)	۰/۴۰ (۰/۶۰)
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مورد انتظار		۰/۴۸ (۰/۵۲)	۰/۵۰ (۰/۵۰)	۰/۴۸ (۰/۵۲)	۰/۴۹ (۰/۵۱)	۰/۵۰ (۰/۵۰)
متوسط هتروزیگوسیتی		۰/۴۸	۰/۴۸	۰/۴۸	۰/۴۸	۰/۴۸
I[2]		۰/۶۷	۰/۶۸	۰/۶۷	۰/۶۸	۰/۶۹
F[3]		۰/۲۹	-۰/۲۸	-۰/۳۳	-۰/۱۸	-۰/۱۰

* 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

در ژنوم مرغ، ژن TLR4 بر روی میکروکروموزوم E4/W17 قرار دارد که یک پروتئین ۸۴۹ اسید آمینه‌ای را کد می‌کند (۱۵)، این ژن بعد از تشخیص الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن‌ها از طریق شناسایی لیپوپلی‌ساکاریدهای پاتوژن‌ها، سیستم ایمنی را فعال می‌کند (۱۲). گزارش شده است که پس از آلودگی بدن توسط یک عامل بیماری‌زا، بیان ژن TLR4 افزایش می‌یابد (۲۷).

در مطالعه حاضر، در جایگاه ژنی TLR4، در کل جمعیت‌های مرغ بومی ژنوتیپ هتروزیگوس CG با فراوانی ۰/۴۰ و ژنوتیپ‌های هموزیگوس GG و CC به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۵۴ و ۰/۰۶ مشاهده شد. همچنین فراوانی آلل‌های C و G به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۷۵ محاسبه شد (جدول ۲). این نتایج مطابق مقادیر فراوانی آللی و ژنوتیپی گزارش شده توسط توحیدی و همکاران (۳۰) در جمعیت مرغ بومی مالزیایی بود. همچنین طبق گزارش این محققین جمعیت مورد مطالعه‌ی آن‌ها در تعادل بوده است و این مشابه نتایج تحقیق حاضر است. انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ، نشان‌دهنده‌ی تغییرات در فراوانی آللی در یک جمعیت است. این تغییرات را می‌توان به تعدادی از عوامل مانند رانش ژنتیکی که در جمعیت‌هایی با تعداد افراد کم رخ می‌دهد، دانست (۵). طبق گزارش لویکیو و همکاران (۱۵)، در جایگاه ژنتیکی TLR4، مرغ‌هایی با ژنوتیپ هتروزیگوس، میزان سرزندگی بالایی داشتند. در مطالعه حاضر همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شد، بیشترین فراوانی در این جایگاه ژنی در کل جمعیت‌های مورد مطالعه مربوط به ژنوتیپ هموزیگوس GG است. سر زندگی بالا با ایمنی بالا در ارتباط بوده و احتمالاً به دلیل سازگاری پرنده به محیط‌های پرورشی است که در نهایت منجر به افزایش مقاومت به بیماری در جمعیت مرغ‌های بومی می‌شود.

اینترلوکین‌ها یک گروه مهم از سیتوکین‌ها را تشکیل می‌دهند و نقش مهمی در ایجاد پاسخ‌های ایمنی دارند. IL2 سیتوکین ضد التهابی است که به‌عنوان کاندید در پاسخ ایمنی شناخته شده است (۶،۳۳). ژن IL-2Ry از مجموعه‌ی گیرنده‌های IL2، IL4، IL7، IL9 و IL15 تشکیل شده و در

فعال‌سازی لنفوسیت‌ها فعالیت دارند (۳۹). نقش قابل توجه ژن IL-2Ry در عملکرد سیستم ایمنی فیزیولوژیک باعث شده است که آن‌ها به‌عنوان 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 ۰/۲۴ و ژنوتیپ‌های AB و BB به ترتیب فراوانی‌های ۰/۵۵ و ۰/۲۱ داشتند. فراوانی هموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده به‌ترتیب ۰/۶۰ و ۰/۴۰ 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 هتروزیگوسیتی مشاهده شده بیشتر از گزارش‌هایی است که توسط جایسوال و همکاران (۸) در مرغ‌های بومی کاداکانات (۰/۳۲) و کیومار 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 هتروزیگوسیتی مورد انتظار در دو جایگاه ژنی TLR4 و IL2 به ترتیب ۰/۳۸ و ۰/۵۰ و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده نیز به ترتیب ۰/۵۵ و ۰/۴۰ برآورد شد. بین جمعیت‌ها، در جایگاه ژنی TLR4، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی در مرغ‌های نژادی بومی مازندرانی (۰/۵۰) و در جایگاه ژنی IL2، بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی را نژادهای مرغ بومی آذربایجان غربی و مرندی (۰/۶۴) داشتند (جداول ۲ و ۳). مقدار بالای فراوانی هتروزیگوسیتی در جایگاه ژنی TLR4 در کل جمعیت‌های مورد مطالعه، نشان‌دهنده‌ی تنوع ژنتیکی زیاد برای این جایگاه ژنی است در حالی که در جایگاه ژنی IL2 فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده پایین‌تر بود. هتروزیگوسیتی می‌تواند به عنوان شاخص اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در نظر گرفته شود فلذا 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 اندازه‌ی کم جمعیت مورد مطالعه نیز ارتباط داشته باشد (۳). شاخص تثبیت برای جایگاه‌های ژنی TLR4 و IL2 در کل جمعیت مرغ‌های بومی، به ترتیب ۰/۰۵- و ۰/۱۰- محاسبه شد (جداول ۲ و ۳). شاخص تثبیت همیشه در محدوده‌ی ۱ تا ۱- متغیر است و منفی بودن آن نشانی از کاهش هتروزیگوسیتی و افزایش هموزیگوسیتی یا افزایش هم‌خونی و همچنین انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت‌ها است. مطابق نتایج این تحقیق، برآورد شاخص تثبیت در مرغ‌ها توسط وانهالا و همکاران (۳۲) و زانتی و همکاران (۳۷) در جمعیت مرغ‌ها منفی گزارش شده است.

در تحقیق حاضر، برای جایگاه‌های ژنی TLR4 وIL2 در کل جمعیت‌های مورد مطالعه، شاخص اطلاعات شانون به ترتیب ۰/۵۶ و ۰/۶۹ محاسبه شد (جداول ۲ و ۳). این مقادیر مطابق نتایج گزارش شده توسط توحیدی و همکاران (۲۹) در مرغ‌های بومی مالزیایی است. شاخص اطلاعات شانون برآوردی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها بوده و در یک اکوسیستم غنی از تنوع ژنتیکی، شاخص اطلاعات شانون در محدوده‌ی ۱/۵ تا ۳/۵ قرار دارد (۱۷). در تحقیقی که توسط الآتیات (۱) روی مرغ‌های بومی اردنی انجام گرفت، شاخص اطلاعات شانون در محدوده‌ی از ۰/۴۲ تا ۰/۶۰ 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 مطالعه شده و کاهش هتروزیگوسیتی در جمعیت‌های مورد مطالعه، می‌توان از بروز تلاقی‌های غیر تصادفی در جمعیت‌ها جلوگیری کرد و مانع کم شدن هتروزیگوسیتی و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی شد. همچنین با مطالعه‌ی پاسخ‌های ایمنی مرتبط با این دو جایگاه ژنی می‌توان از این ژن‌ها به‌عنوان نشانگرهای مناسب در برنامه‌های اصلاح نژاد ژنتیکی مرغ‌های بومی برای افزایش مقاومت به بیماری‌ها بهره برد.

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.

منابع

1. Al-Atiyat, R. 2010. Genetic diversity of indigenous chicken ecotypes in Jordan. African Journal of Biotechnology, 9: 7014-7019.
2. Alinaghizadeh, H., M.R. Mohammad Abadi and S. Zakizadeh. 2010. Exon 2 of BMP15 gene polymorphismin Jabal Barez red goat. Journal of Agricultural Biotechnology, 2(1): 69-80 (In Persian).
3. 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.
4. 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.
5. Corander, J., P. Waldmann and M.J. Sillanpää. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. Genetics, 163: 367-374.
6. 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 uivo. The Journal of Experimental Medicine, 190: 9-19.
7. 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).
8. Jaiswal, G., S. Kumar, Y. Prasad and D.P. Singh. 2009. PCR-RFLP analysis of IL-2Rγ and IL-15Rα genes in Kadakanath native chicken. Journal of Applied Animal Research, 36: 239-242.
9. Javanmard, A., M.R. Mohammadabadi, G.E. Zarrigabayi, 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.
10. Keller, L.F. and D.M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. Trends in Ecology & Evolution, 17: 230-241.
11. 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 enteric serovar enteritidis. Journal of Molecular Immunology, 40: 603-610.
12. 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.
13. Kumar, R., S. Kumar, D.P. Singh and P. Gaur. 2007. DNA polymorphism at IL-2Rγ and IL-15Rα genes in Aseel native chicken. Journal of Applied Animal Research, 32: 107-110.
14. Levene, H. 1949. On a matching problem in genetics. The Annals of Mathematical Statistics, 20: 91-94.
15. 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.
16. 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).
17. McDonald, D.G. and J. Dimmick. 2003. The conceptualization and measurement of diversity. Communication Research, 30: 60-79.
18. 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.
19. Moazeni, S., M.R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Shahrbabak, 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.
20. Moazeni, S.M., M.R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Moradi Shahrbabak 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, 70: 3321-3323.
26. 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-β2, 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. Vilkki 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. Ezzatkhah 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 Aghajeri[1], Ghodrat Rahimi Mianji[2], Seyyed Hassan Hafezian[3] and Mohsen Gholizadeh[4]

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
Recived: 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