



## Study of Single Nucleotide Polymorphisms of Major Histocompatibility Complex Region Related to the Immune System in Commercial Broiler and Layer Chickens

Jafar Pish Jang Aghajeri<sup>1</sup>, Ghodrat Rahimi Mianji<sup>2</sup>, Seyyed Hassan Hafezian<sup>2</sup>, Mohsen Gholizadeh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

<sup>2</sup>Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

doi [10.22059/jvr.2018.260014.2810](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.260014.2810)

J Vet Res, 74(4), 584-592

### Abstract

**BACKGROUND:** Chicken major histocompatibility complex region (MHC) is important in the productive traits, immune responses, resistance to infectious diseases and phylogenetic relationships.

**OBJECTIVES:** This study was investigated for single nucleotide polymorphisms of MHC region related to the immune system in commercial broiler and layer chickens.

**METHODS:** One hundred blood samples were taken from commercial broiler and layer chickens and genomic DNA was extracted by salting out method. The allelic polymorphisms were investigated in B-L, B-F and B-G loci using PCR-RFLP and *MspI* enzyme.

**RESULTS:** For two commercial broiler and laying populations, in the 374 bp locus of B-L, only BB genotype was detected but in the 1048 bp locus of B-F, two genotypes of CG and GG were identified in broiler chickens. The C allele contained four bands of 515, 410, 75 and 47 bp, and the G allele with five bands of 410, 302, 213, 75 and 47 bp. In B-G (401 bp) locus, three genotypes of MM, MN and NN and two alleles of M with one band (401 bp) and N with two bands (350 and 51 bp) were identified. In total populations, the Shannon information index was calculated to be 0.45 and 0.73 in markers loci of B-F and B-G, and the fixation index values were -0.20 and 0.34, respectively. The highest observed heterozygosity index for B-F and B-G loci was 0.34 and 0.23, respectively.

**CONCLUSIONS:** Considering the confirmation of the presence of polymorphism in two loci of the B-F (in commercial broiler population) and B-G (in commercial broiler and layer populations), these sites can be used as genetic marker in breeding programs to increase resistance to diseases.

**Keywords:** Commercial chicken, Immune system, MHC, PCR-RFLP, Polymorphism

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: [parsa20012003@yahoo.com](mailto:parsa20012003@yahoo.com) Tel/Fax: 041-37454506, 37454504

#### How to cite this article:

Pish Jang Aghajeri, J., Rahimi Mianji, Gh., Hafezian, S.H., Gholizadeh, M. (2019). Study of Single Nucleotide Polymorphisms of Major Histocompatibility Complex Region Related to the Immune System in Commercial Broiler and Layer Chickens. J Vet Res, 74(4), 584-592. <https://10.22059/jvr.2018.260014.2810>

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Sequence of primers, the size of PCR products and restriction enzymes for fragments digestion.

**Table 2.** Allelic and genotypic frequencies and observed and expected heterozygosity for B-L locus in studied commercial chicken populations.

**Table 3.** Allelic and genotypic frequencies and observed and expected heterozygosity for B-F locus in studied commercial chicken populations.

**Table 4.** Allelic and genotypic frequencies and observed and expected heterozygosity for B-G locus in studied commercial chicken populations.

**Figure 1.** Observation of PCR products for B-L locus on 2 percent agarose gel with 100 bp molecular weight marker.

**Figure 2.** Observation of PCR products for B-F locus on 2 percent agarose gel with 100 bp molecular weight marker.

**Figure 3.** Observation of PCR products for B-G locus on 2 percent agarose gel with 100 bp molecular weight marker.

**Figure 4.** Observed genotypic patterns from enzymatic digestion of PCR products for studied loci on 4 percent agarose gel with 50 bp molecular weight marker.



## مطالعه چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی ناحیه مجتمع عمده پذیرش بافتی مرتبط به

## سیستم ایمنی در مرغ‌های تجاری گوشتی و تخم‌گذار

جعفر پیش‌جنگ آقاجری<sup>۱</sup>، قدرت رحیمی میانجی<sup>۲</sup>، سید حسن حافظیان<sup>۲</sup>، محسن قلی‌زاده<sup>۲</sup><sup>۱</sup>گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران  
<sup>۲</sup>گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایرانdoi: [10.22059/jvr.2018.260014.2810](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.260014.2810)

تاریخ دریافت: ۱۵ مرداد ماه ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۱۰ مهر ماه ۱۳۹۸ تاریخ انتشار آنلاین: ۰۱ آذرماه ۱۳۹۸

## چکیده

**زمینه مطالعه:** ناحیه مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC) مرغ‌ها در صفات تولیدی، پاسخ‌های ایمنی، مقاومت به بیماری‌های عفونی و روابط فیلوژنتیکی، دارای اهمیت زیادی است.

**هدف:** این تحقیق به منظور بررسی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی ناحیه ژنی MHC مرتبط به سیستم ایمنی در مرغ‌های تجاری گوشتی و تخم‌گذار انجام گرفت. **روش کار:** در این تحقیق یک‌صد نمونه خون از مرغ‌های تجاری گوشتی و تخم‌گذار اخذ و DNA ژنومی به روش شستشوی نمکی استخراج شد. چندشکلی‌های آلی در جایگاه‌های ژنی B-L، B-F، B-G با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و آنزیم *Msp I* بررسی شد.

**نتایج:** برای دو جمعیت تجاری گوشتی و تخم‌گذار برای جایگاه تکثیری ۳۷۴ جفت بازی B-L، تنها ژنوتیپ BB اما در جایگاه ژنی ۱۰۴۸ جفت بازی B-F، دو ژنوتیپ CG و GG فقط در مرغ‌های تجاری گوشتی شناسایی شد. در این جایگاه ژنی آلل C شامل باندهای ۵۱۵، ۴۱۰، ۷۵ و ۴۷ جفت بازی و آلل G دارای باندهای ۴۱۰، ۳۰۲، ۲۱۳، ۷۵ و ۴۷ جفت بازی بودند. در جایگاه ژنی ۴۰۱ جفت بازی B-G، سه ژنوتیپ MM، MN و NN و دو آلل M شامل یک باند ۴۰۱ جفت بازی و آلل N دارای دو باند ۳۵۰ و ۵۱ جفت بازی مورد شناسایی قرار گرفت. در کل جمعیت‌ها، شاخص اطلاعات شانون در دو جایگاه ژنی B-F و B-G به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۷۳ و شاخص تثبیت به ترتیب ۰/۲۰- و ۰/۳۴ محاسبه شد. بیشترین مقدار شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جایگاه‌های ژنی B-F و B-G به ترتیب ۰/۳۴ و ۰/۲۳ برآورد شد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به تأیید وجود چندشکلی در دو جایگاه ژنی B-F (در جمعیت مرغ تجاری گوشتی) و B-G (در جمعیت‌های مرغ‌های تجاری گوشتی و تخم‌گذار)، می‌توان از این جایگاه‌ها به عنوان نشانگر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی جهت افزایش مقاومت به بیماری‌ها استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** چندشکلی، سیستم ایمنی، مجتمع عمده پذیرش بافتی، مرغ تجاری، PCR-RFLP

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

**نویسنده مسئول:** جعفر پیش‌جنگ آقاجری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران  
پست الکترونیکی: [parsa20012003@yahoo.com](mailto:parsa20012003@yahoo.com)

## مقدمه

و این امر برای صنعت پرورش مرغ خنثی‌جودی به شمار می‌رود (۱۱، ۲۸). اخیراً در برنامه‌های اصلاح نژاد مرغ‌ها تولید لاین‌های مقاوم به بیماری‌ها، پاسخ‌دهی بهتر به واکسن‌ها و صفات تولیدی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است و تشخیص مقاومت ژنتیکی به بیماری‌ها با اهداف کنترل و پیشگیری، یک اصل کاربردی در اصلاح نژاد است (۳، ۱۶، ۲۹، ۳۳).

یکی از واسطه‌های اصلی در برقراری ارتباط بین سلول‌های ایمنی و پروتئین‌های غشاء، مولکول‌های وراثتی از جمله مجتمع عمده پذیرش

صنعت پرورش مرغ به دلیل صرفه اقتصادی اهمیت زیادی دارد و بیماری‌های مختلف می‌توانند اثرات نامطلوب زیادی روی صنعت پرورش مرغ یک کشور داشته باشند. امروزه اصلاح نژاد طیور باید جهت افزایش مقاومت ژنتیکی در برابر بیماری‌ها باشد و نتیجه‌ی این عمل استفاده اندک از داروها خواهد بود (۸، ۱۴). امروزه انتخاب لاین‌های تجاری با رشد و تولید بیشتر و ضریب تبدیل کمتر باعث کاهش تنوع ژنتیکی، اختلالات فیزیولوژیک و ضعف کلی در دستگاه ایمنی شده است (۱۳). کاهش تنوع ژنتیکی منجر به ایجاد جمعیت‌هایی با توان مقابله‌ی کم در مقابل بیماری‌های جدید می‌شود

### مواد و روش کار

در این پژوهش یک‌صد نمونه خون (هر جمعیت به تعداد ۵۰ عدد) از دو جمعیت مرغ‌های تجاری گوشتی (راس) و تخم‌گذار (شیور) موجود در مزارع پرورشی منطقه‌ی آذربایجان شرقی به اندازه ۱ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ بالی اخذ گردید. نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون در مجاورت یخ به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه منتقل و تا زمان شروع استخراج DNA ژنومی و آزمایش‌های بعدی، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی نمونه‌های خون با استفاده از روش شستشوی نمکی (۱۹) انجام گرفت. کمیت DNAهای ژنومی استخراج شده به روش طیف سنجی و با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ و کیفیت DNA ژنومی با الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد تعیین شد. جهت تکثیر هر جایگاه ژنی از یک جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد (جدول ۱). اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده، از سرویس BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در سایت NCBI بررسی شد.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰ – ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۴ میکرولیتر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (ساخت شرکت AMPLIQON) و ۰/۶ dNTPs، Red dye و MgCl<sub>2</sub> (ساخت شرکت BIONEER) با غلظت ۱۰ پیکومول برای تکثیر منطقه‌ای به اندازه ۳۷۴ جفت باز از اگزون شماره دو جایگاه ژنی B-L، انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دمای واسرشته سازی اولیه ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی ثانویه در دمای ۹۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هشت دقیقه انجام گرفت.

تکثیر منطقه‌ای به اندازه ۱۰۴۸ جفت باز از اگزون شماره دو تا اگزون شماره چهار جایگاه ژنی B-F، با استفاده از واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰ – ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۷ میکرولیتر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (ساخت شرکت AMPLIQON) و ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (ساخت شرکت BIONEER) با غلظت ۱۰ پیکومول انجام گرفت. برای این جایگاه ژنی واکنش زنجیره‌ای

بافتی (MHC) است (۴،۱۰،۱۷). مهم‌ترین و مؤثرترین ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت نسبت به بیماری‌ها در این ناحیه ژنی قرار دارند (۲۷). MHC در مرغ (مجموعه B) به طول ۹۲ کیلوباز به شکلی بسیار متراکم روی میکروکروموزوم شماره ۱۶ قرار دارد (۱۸) و طول آن ۲۰ برابر کوچک‌تر از ناحیه‌ی ژنی MHC پستانداران بوده و شامل سه کلاس I، II و IV) که به ترتیب با نام‌های BL، BF، BG معروف است. مولکول‌های کلاس I و II تنوع بالایی داشته و مسئول عرضه آنتی‌ژن‌های داخلی و خارجی به لنفوسیت‌های T هستند (۴،۱۸). ژن‌های ناحیه‌ی ژنی MHC با مقاومت یا حساسیت به برخی از بیماری‌های خود ایمن، ویروسی، باکتریایی و انگلی در ارتباط بوده و همچنین بسیاری از خصوصیات دیگر غیر وابسته به سیستم ایمنی نیز، مثل میزان تولید در مرغ‌ها، توسط ناحیه ژنی MHC کنترل می‌شوند. ژن‌های ناحیه‌ی ژنی MHC در مرغ‌ها، جهت انتخاب لاین‌های مقاوم به بیماری‌ها با پاسخ‌دهی بهتر به واکسن‌ها و انتخاب ویژگی‌های پرورشی مؤثر مثل تولید تخم‌مرغ، وزن بدن، میزان جوجه درآوری و باروری مورد توجه قرار می‌گیرند (۶).

به دلیل نقش کلیدی ژن‌های ناحیه‌ی ژنی MHC مرغ‌ها در پاسخ‌های ایمنی، ارتباط با بیماری‌های عفونی و تنوع آن‌ها در ارتباط با تکامل، در دو دهه اخیر مطالعات زیادی روی ژن‌های یاد شده انجام شده است (۲۲). جهت بررسی چندشکلی ناحیه‌ی ژنی MHC تاکنون روش‌های متعددی مثل الکتروفورز ۲ بعدی، ساترن بلاتینگ، PCR-RFLP، PCR-SSCP، AFLP، PASA، SNP، STS و Microsatellite مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۵،۷،۹،۱۲،۲۳،۳۵). اگر چه در ایران مطالعات مولکولی با تکنیک‌های متعدد روی مرغ‌ها انجام شده است (۱،۶،۲۰،۲۱،۲۵،۲۸،۳۴) اما تاکنون ناحیه مجتمع عمده‌ی پذیرش بافتی در مرغ‌های بومی یا تجاری در حد انتظار مورد بررسی قرار نگرفته است، لذا به دلیل عدم مطالعه‌ی وجود چندشکلی‌های احتمالی ناحیه ژنی MHC مرغ‌های تجاری موجود در ایران با تکنیک PCR-RFLP، تحقیق حاضر به بررسی چندشکلی‌های آللی در کلاس‌های I، II و IV ناحیه مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC) در مرغ‌های تجاری گوشتی و تخم‌گذار موجود در ایران پرداخته است. با توجه به نقش اساسی ناحیه ژنی MHC در کنترل بیماری‌های مختلف و صفات تولیدی مرغ‌ها، شناسایی چندشکلی‌های ناحیه‌ی ژنی یاد شده در جمعیت‌های مورد مطالعه می‌تواند جهت ایجاد مقاومت به بیماری و یا تهیه واکسن‌های مؤثر به کار رود.

زنجیره‌ای پلیمرز با دمای واسرشته سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت چهار دقیقه انجام شد. قطعات تکثیر شده برای هر جایگاه ژنی در حضور نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (ساخت شرکت Thermo Scientific) روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند و صحت تکثیر قطعات مورد نظر بدون حضور باندهای غیراختصاصی و محصولات ناخواسته تأیید شد (تصویرهای ۱، ۲، ۳).

در پژوهش حاضر از تکنیک PCR-RFLP جهت تعیین چند-شکلی جایگاه‌های ژنی مورد نظر و برای هضم آنزیمی محصولات PCR از آنزیم برشی اختصاصی Msp I (ساخت شرکت

پلیمرز با دمای واسرشته سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۶۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد.

همچنین تکثیر منطقه‌ای به اندازه ۴۰۱ جفت باز از اینترون شماره یک و اگزون شماره دو از جایگاه ژنی B-G با استفاده از واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰ - ۱۰۰ نانوگرم dDNA ژنومی، ۷ میکرولیتر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (Taq DNA polymerase، بافر، dNTPs، Red dye و MgCl<sub>2</sub>) (ساخت شرکت AMPLIQON) و ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (ساخت شرکت BiONEER) با غلظت ۱۰ پیکومول انجام گرفت. برای این جایگاه ژنی واکنش

جدول ۱. توالی آغازگرها، اندازه‌ی محصولات PCR و آنزیم‌های برشی برای هضم قطعات ژنی.

جایگاه ژنی	آغازگر	اندازه جایگاه ژنی (جفت باز)	آنزیم برشی
(B-L)	F: 5'-CAGCGTTCCTTCTTCTGCGGT-3' R: 5'-TCACCTTGGGCTCCACTGCG-3'	۳۷۴	Msp I Xu و همکاران (۲۰۰۷)
(B-F)	F: 5'-GCAGAGCTCCATAACCCTGCG-3' R: 5'-GGTGTGGTACGTGCCGTCGCC-3'	۱۰۴۸	Msp I Lima-Rosa (۲۰۰۴)
(B-G)	F: 5'-TGTCTCTTCTTACCTCCACC-3' R: 5'-GCAGTTCTGTTCTCCCTTCAT-3'	۴۰۱	Msp I Xu و همکاران (۲۰۰۵)

جدول ۲. فراوانی‌های آلی، ژنوتیپی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی B-L در جمعیت‌های مرغ‌های تجاری مورد مطالعه.

کل جمعیت‌ها	مرغ تجاری		آل و ژنوتیپ	فراوانی آلی
	گوشتی	تخم‌گذار		
۰	۰	۰	A	فراوانی آلی
۱	۱	۱	B	
-	-	-	AA	
-	-	-	AB	
-	-	-	BB	
-	-	-	کای اسکور <sup>۱</sup>	
(۱)۰	(۱)۰	(۱)۰	فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مشاهده شده	
(۱)۰	(۱)۰	(۱)۰	فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مورد انتظار	
۰	۰	۰	شاخص اطلاعات شانون	
-	-	-	شاخص تثبیت	

1- Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium.

جدول ۳. فراوانی‌های آلی، ژنوتیپی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی B-F در جمعیت‌های مرغ‌های تجاری مورد مطالعه.

کل جمعیت‌ها	مرغ تجاری		آل و ژنوتیپ	
	گوشتی	تخم‌گذار		
۰/۱۷	۰/۳۴	۰	C	فراوانی آلی
۰/۸۳	۰/۶۶	۱	G	
(۰/۰۲)۰	(۰/۱۱)۰	-	CC	
(۰/۲۹)۰/۳۴	(۰/۴۵)۰/۶۸	-	CG	فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده (مورد انتظار)
(۰/۶۹)۰/۶۶	(۰/۴۴)۰/۳۲	-	GG	
۴/۰۵*	۱۲/۸۱*	-		کای اسکور <sup>۱</sup>
(۰/۶۶)۰/۳۴	(۰/۳۲)۰/۶۸	(۱)۰		فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مشاهده شده
(۰/۷۲)۰/۲۸	(۰/۵۵)۰/۴۵	(۱)۰		فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مورد انتظار
۰/۴۵	۰/۶۴	۰		شاخص اطلاعات شانون
-۰/۲۰	-۰/۵۱	-		شاخص تثبیت

\* Significant ( $P < 0.05$ ). 1- Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium.

جدول ۴. فراوانی‌های آلی، ژنوتیپی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی B-G در جمعیت‌های مرغ‌های تجاری مورد مطالعه.

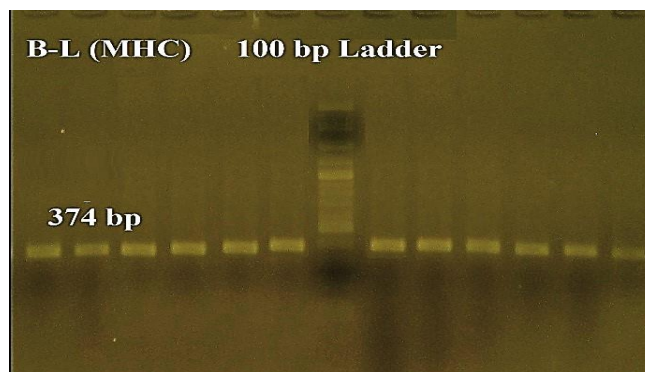
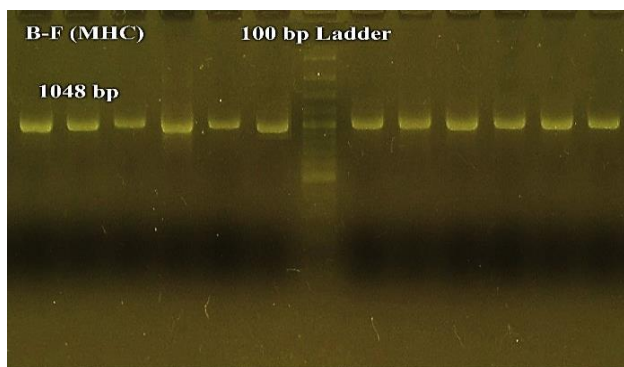
کل جمعیت‌ها	مرغ تجاری		آل و ژنوتیپ	
	گوشتی	تخم‌گذار		
۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۲	M	فراوانی آلی
۰/۷۷	۰/۷۷	۰/۷۸	N	
(۰/۰۴)۰/۱۱	(۰/۰۵)۰	(۰/۰۴)۰/۲۲	MM	فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده (مورد انتظار)
(۰/۳۵)۰/۲۳	(۰/۳۶)۰/۴۶	(۰/۳۵)۰	MN	
(۰/۶۱)۰/۶۶	(۰/۵۹)۰/۵۴	(۰/۶۱)۰/۷۸	NN	
۱۲/۰۴*	۴/۲۳*	۵۲*		کای اسکور <sup>۱</sup>
(۰/۷۷)۰/۲۳	(۰/۵۴)۰/۴۶	(۱)۰		فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مشاهده شده
(۰/۶۵)۰/۳۵	(۰/۶۵)۰/۳۵	(۰/۶۵)۰/۳۵		فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مورد انتظار
۰/۷۳	۰/۵۳	۰/۵۲		شاخص اطلاعات شانون
۰/۳۴	-۰/۲۹	۱		شاخص تثبیت

\* Significant ( $P < 0.05$ ). 1- Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium.

### نتایج

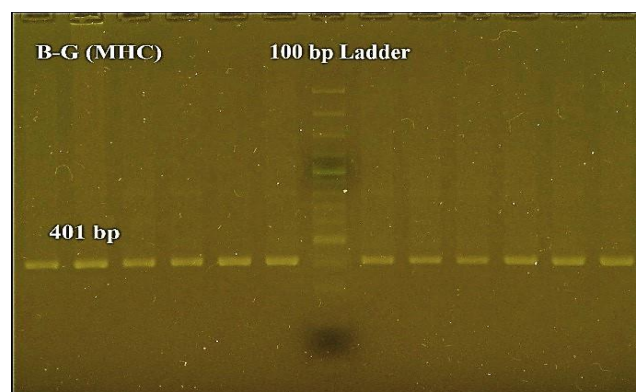
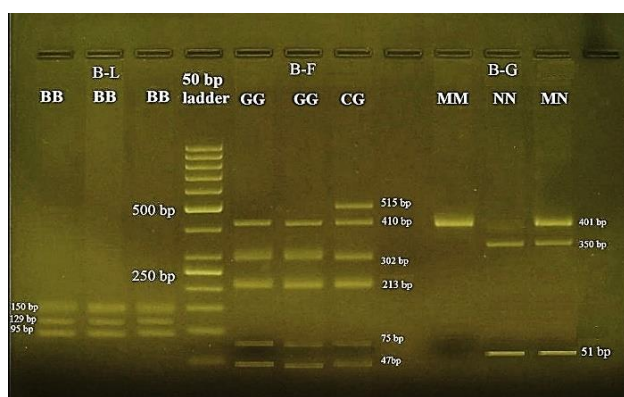
بعد از هضم آنزیمی قطعه ژنی B-L، فقط سه باند ۱۵۰، ۱۲۹ و ۹۵ جفت بازی و در نتیجه یک ژنوتیپ (BB) در تمامی نمونه‌ها شناسایی شد. در قطعه ژنی B-F بعد از هضم آنزیمی دو نوع ژنوتیپ CG و GG در نمونه‌های مورد مطالعه شناسایی شد. آلل C شامل باندهای ۵۱۵، ۴۱۰، ۷۵ و ۴۷ جفت بازی و آلل G دارای باندهای ۴۱۰، ۳۰۲، ۲۱۳، ۷۵ و ۴۷ جفت بازی بودند. همچنین بعد از هضم آنزیمی قطعه ژنی B-G سه ژنوتیپ MM، MN و NN شناسایی شد که آلل M دارای یک باند ۴۰۱ جفت بازی و آلل N دارای دو باند

(Scientific) استفاده شد (جدول ۱). این واکنش‌ها در حجم نهایی ۱۵/۵ میکرولیتر، شامل ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۱ میکرولیتر بافر و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم و در نهایت ۹ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام گرفت. واکنش‌های هضم آنزیمی برای سه 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 ۴ درصد و نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت بازی (ساخت شرکت Thermo Scientific) استفاده شد.



تصویر ۲. مشاهده محصولات PCR برای جایگاه ژنی B-F روی ژل آگارز ۲ درصد با نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز.

تصویر ۱. مشاهده محصولات PCR برای جایگاه ژنی B-L روی ژل آگارز ۲ درصد با نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز.



تصویر ۴. الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده حاصل از هضمی آنزیمی محصولات PCR برای هر یک از جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه روی ژل آگارز ۴ درصد با نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت باز.

تصویر ۳. مشاهده محصولات PCR برای جایگاه ژنی B-G روی ژل آگارز ۲ درصد با نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز.

Taq I و Msp I، مورد بررسی قرار داده و الگوهای برشی حاصل در همه‌ی نمونه‌ها یک‌شکل بودند (۳۰). در ضمن نتایج تحقیق ما با بررسی‌های انجام شده توسط Oh و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Xu و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطابقت نشان نداد. Oh و همکاران در سال ۲۰۰۵ این جایگاه ژنی را در مرغ‌های کره‌ای به طول‌های ۴۲۷ و ۶۵۱ جفت باز تکثیر و با آنزیم برشی Hea III برش داده و برای هر منطقه مورد مطالعه سه نوع ژنوتیپ شناسایی کرده بودند (۲۴). Xu و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز در مرغ‌های چینی روی چندشکلی این جایگاه ژنی با استفاده از تکنیک SSCP-PCR مطالعه‌ای را انجام داده بودند و در نتیجه ۳۱ آلل مختلف را در بین جمعیت‌های مرغ‌های چینی مشخص کرده بودند (۳۲). تفاوت در نتایج مشاهده شده احتمالاً می‌تواند به دلیل استفاده از آنزیم‌های برشی متفاوت، تفاوت در نوع سویه‌های مرغ‌های تجاری و تفاوت در تکنیک مورد استفاده باشد.

۳۵۰ و ۵۱ جفت بازی بودند (تصویر ۴). برای آنالیز ژنتیکی داده‌های حاصل از هضم آنزیمی در جمعیت‌های مورد مطالعه از نرم‌افزار POPGENE نسخه‌ی ۱/۳۲ جهت برآورد فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص تعادل هاردی - واینبرگ، شاخص تثبیت، شاخص اطلاعات شانون و دیگر پارامترهای ژنتیکی استفاده شد.

### بحث

در تحقیق حاضر در مجموع یک‌صد نمونه‌ی مرغ‌های تجاری گوشتی و تخم‌گذار برای سه جایگاه ژنی تعیین ژنوتیپ شدند. جایگاه ژنی B-L یک‌شکل بوده و در دو جمعیت یاد شده فقط آلل B شناسایی شد (جدول ۲) که با مطالعه صورت گرفته توسط Kumar و Sivaraman در سال ۲۰۰۵ مطابقت داشت. آن‌ها چندشکلی جایگاه ژنی B-L (به طول ۲۶۷ جفت باز) را در دو نوع لاین مرغ‌های گوشتی با استفاده از سه نوع آنزیم برشی Hae III،

فراوانی‌های ۰/۶۲۷۶ و ۰/۳۷۲۴ و فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب ۰/۸۱۳۸ و ۰/۱۸۶۲ محاسبه و با استفاده از آنزیم Tas I سه نوع ژنوتیپ مختلف AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۰۹۶۲، ۰/۴۶۴۷ و ۰/۴۳۹۱ مشاهده و فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب ۰/۳۲۸۵ و ۰/۶۷۱۵ برآورد کرده بودند (۳۱). Ri - Fu و همکاران در سال ۲۰۰۶ با تکنیک متفاوت مطالعه‌ای جهت بررسی چندشکلی ژنتیکی اگزون شماره دو منطقه ژنی B-G در هشت نژاد مختلف از مرغ‌های چینی انجام داده بودند و در نتیجه ۳۱ آلل جدید را مورد شناسایی قرار داده بودند (۲۶). تفاوت در فراوانی ژنی و ژنوتیپی می‌تواند به دلیل تکنیک مورد استفاده و همچنین منشأ متفاوت جغرافیایی این جمعیت‌ها یا سطوح مختلف انتخاب باشد. انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ، نشان دهنده تغییر فراوانی‌های آللی در یک جمعیت است. این تغییر را می‌توان به تعدادی از عوامل از جمله رانش ژنتیکی که در جمعیت‌هایی با تعداد افراد کم رخ می‌دهد، نسبت داد.

در نتایج به دست آمده از این تحقیق، در کل جمعیت‌ها، شاخص اطلاعات شانون در دو جایگاه ژنی B-F و B-G به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۷۳ و شاخص تثبیت به ترتیب ۰/۲۰- و ۰/۳۴ محاسبه شد. بیشترین مقدار شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جایگاه‌های ژنی B-F و B-G به ترتیب برابر با ۰/۳۴ و ۰/۲۳ برآورد شد. برآورد شاخص تثبیت منفی در مرغ‌های تجاری مورد مطالعه می‌تواند به دلیل شدت انتخاب بالا و عدم تلاقی تصادفی در این جمعیت‌ها باشد. 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 باشد. شاخص اطلاعات شانون برآوردی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها است. در کل جمعیت‌های مرغ‌های تجاری مورد مطالعه در این تحقیق، جایگاه ژنی B-G دارای تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی (۰/۷۳) بود (جدول ۳، ۴).

اصولاً می‌توان از چندشکلی‌های مشاهده شده در جایگاه‌های ژنی مرتبط به سیستم ایمنی برای مطالعات پاسخ ایمنی ژنوتیپ‌های مشاهده شده جهت بهبود پاسخ عملکرد ایمنی در مرغ‌های تجاری بهره برد. با توجه به مشاهدات این تحقیق مبنی بر وجود چندشکلی در دو جایگاه ژنی B-F (جمعیت مرغ‌های تجاری گوشتی) و B-G (جمعیت‌های مرغ‌های تجاری گوشتی و تخم‌گذار)، می‌توان از این جایگاه‌ها به عنوان نشانگر در استراتژی‌های اصلاح نژادی جهت افزایش مقاومت به بیماری‌ها استفاده کرد.

در جایگاه ژنی B-F فراوانی آلل‌های C و G به ترتیب در جمعیت تجاری گوشتی ۰/۳۴ و ۰/۶۶ اما در جمعیت مرغ‌های تجاری تخم‌گذار فقط آلل G مشاهده شد و در نتیجه همه نمونه‌ها برای این جایگاه یک‌شکل بود. در جمعیت مرغ‌های تجاری گوشتی فراوانی هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده در این جایگاه ژنی به ترتیب برابر ۰/۶۸ و ۰/۳۲ محاسبه شد.  $\chi^2$  محاسبه شده در این جایگاه ژنی برای جمعیت تجاری گوشتی معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) فلذا این جمعیت در تعادل هاردی - واینبرگ قرار نداشت (جدول ۳). این نتایج با تحقیق انجام شده توسط Lima-Rosa و همکاران در سال ۲۰۰۴ مطابقت داشت. آن‌ها با تکنیک متفاوت روی مرغ برزیلی تخم‌آبی برای تعیین تغییرات توالی ۱۰۴۸ جفت بازی جایگاه ژنی یاد شده انجام داده و ۲۳ توالی را شناسایی به طوری که ده تا از توالی‌ها به عنوان توالی جدید گزارش شده بود (۱۵). نتایج مرتبط به وفور آللی و ژنوتیپی در تحقیق ما با نتایج مطالعه Barjesteh و Nikbakht Brujeni در سال ۲۰۰۹ که روی جمعیت مرغ مادر و هیبریدهای تجاری گوشتی آرین انجام گرفته بود، مطابقت نداشت. آن‌ها تنوع ژنتیکی جایگاه ژنی یاد شده را استفاده از تکنیک PCR-SSCP در ۶۵ نمونه DNA شامل ۲۵ نمونه متعلق به جمعیت مادر و ۴۰ نمونه از مرغ‌های تجاری گوشتی آرین را مورد بررسی قرار داده و در هر دو جمعیت هفت الگوی مختلف مشخص کرده که دو الگو در دو جمعیت مشابه و پنج الگوی دیگر به عنوان الگوی جدید شناسایی شده بودند (۲۲). تکنیک‌های متفاوت و همچنین سوبه‌های متفاوت مورد استفاده در این تحقیقات، احتمالاً می‌تواند دلیل تفاوت در نتایج به دست آمده باشد.

در جایگاه ژنی B-G بیشترین مقدار فراوانی آلل‌های M و N به ترتیب مربوط به مرغ‌های تجاری گوشتی (۰/۲۳) و تخم‌گذار (۰/۷۸) بود. در کل جمعیت‌ها، میانگین فراوانی آلل‌های M و N به ترتیب ۰/۲۳ و ۰/۷۷ و همچنین میانگین فراوانی‌های ژنوتیپ‌های مشاهده شده MM، MN و NN به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۲۳ و ۰/۶۶ برآورد شد.  $\chi^2$  محاسبه شده در این جایگاه ژنی برای جمعیت‌های تجاری گوشتی و تخم‌گذار معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) و جمعیت‌های ذکر شده در تعادل هاردی - واینبرگ قرار نداشتند (جدول ۴). این نتایج با نتایج تحقیق Xu و همکاران در سال ۲۰۰۵ مطابقت داشته اما با نتایج تحقیق Ri - Fu و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطابقتی نداشت. Xu و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از دو نوع آنزیم برشی جایگاه ژنی یاد شده به طول ۴۰۱ جفت باز را در هشت نژاد مختلف از مرغ‌های بومی و هیبرید گوشتی برش داده بودند. با استفاده از آنزیم Msp I دو ژنوتیپ AA و AB به ترتیب با

پژوهش و فناوری و مدیر محترم آزمایشگاه‌ها و کارگاه‌های این واحد دانشگاهی اعلام می‌داریم.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

### سپاسگزاری

این پژوهش با همکاری و مساعدت دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مراغه انجام گرفت. لذا مراتب تشکر و سپاسگزاری را از معاون محترم

### References

- Basiri, R., Pish Jang, J., Ghorbani, A. (2015). Genetic diversity in the mitochondrial DNA of the Iranian common native and exotic chicken breeds. *J Biodivers Environ Sci*, 7 (1), 537-542.
- Boonyanuwat, K., Thummabuttra, S., Sookmanee, N., Vatchavalkhu, V., Siripholvat, V. (2006). Influences of major histocompatibility complex class I haplotypes on avian influenza virus disease traits in Thai indigenous chickens. *Anim Sci J*, 77, 285-289. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00350.x>
- Bumstead, N. (1998). Genetic resistance to avian viruses. *Rev Sci Tech*, 17, 249-255. <https://doi.org/10.20506/rst.17.1.1082> PMID: 9638814
- Dietert, R.R. (1987). The major histocompatibility complex as a communication gene complex. *Poult Sci*, 66, 774-775. <https://doi.org/10.3382/ps.0660774> PMID: 3628160
- Emara, M.G., Kim, H., Zhu, J., Lapierre, R.R., Lakshmanan, N., Lillehojt, H.S. (2002). Genetic diversity at the major histocompatibility complex (B) and microsatellite loci in three commercial broiler pure lines. *Poult Sci*, 81, 1609-17. <https://doi.org/10.1093/ps/81.11.1609> PMID: 12455584
- Esmailnejad, A., Nikbakht, G., Khazeni Oskoui, N., Amini, F. (2015). Allelic segregation of major histocompatibility complex using LEI0258 microsatellite marker in indigenous and commercial chickens. *J Vet Res*, 70(1), 101-107. <https://doi.org/10.22059/jvr.2015.52978>
- Fulton, J.E., Juul - Madsen, H.R., Ashwell, A.M., McCarron, A.M., Arthur, J.A., O'Sullivan, N.P., Taylor Jr, R.L. (2006). Molecular genotype identification of the Gallus gallus major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, 58, 407-421. <https://doi.org/10.1007/s00251-006-0119-0> PMID: 16738938
- Gibson, J.P., Bishop, S.C. (2005). Use of molecular markers to enhance resistance of livestock to disease. *Rev Sci Tech*, 24 (1), 343-353. PMID: 16110901
- Goto, R.M., Afanassieff, M., Ha, J., Iglesias, G.M., Ewald, S.J., Briles, W.E., Miller, M.M. (2002). Single - strand conformation polymorphism (SSCP) assays for major histocompatibility complex B genotyping in chickens. *Poult Sci*, 81, 1832-41. <https://doi.org/10.1093/ps/81.12.1832> PMID: 12512574
- Hawken, R.J., Beattie, C.W., Schook, L.B. (1998). Resolving the genetics of resistance to infectious diseases. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 17, 17-25. <https://doi.org/10.20506/rst.17.1.1098> PMID: 9638798
- Hoffmann, I. (2009). The global plan of action for animal genetic resources and the conservation of poultry genetic resources. *Worlds Poult Sci J*, 65, 286-297. <https://doi.org/10.1017/S0043933909000245>
- Iglesias, G.M., Soria, L.A., Goto, R.M., Jar, A.M., Miquel, M.C., Lopez, O.J., Miller, M.M. (2003). Genotypic variability at the major histocompatibility complex (B and Rfp-Y) in Camperos broiler chickens. *Anim Genet*, 34, 88-95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.00944.x> PMID: 12648091
- Javanrouh Aliabad, A., Seyedabadi, H., Taheri Dezfuli, B. (2011). Association of insulin-like growth factor-I gene with body composition traits in Iranian commercial broiler lines. *World Appl Sci J*, 14, 71-76.
- Jovanovic, S., Savic, M., Zivkovic, D. (2009). Genetic variation in disease resistance among farm animals. *Biotechnol Anim Husb*, 25 (5-6), 339-347. <https://doi.org/10.2298/BAH0906339J>
- Lima-Rosa, C.A.V., Canal, C.W., Streck, A.F., Freitas, L.B., Delgado-Canedo, A., Bonatto, S.L., Salzano, F.M. (2004). B-F DNA sequence variability in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. *Anim Genet*, 35, 278-284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01160.x>
- Lwelamira, J., Kifaro, G.C., Gwakisa, P.S., Msoffe, P.L.M. (2008). Association of LEI0258 microsatellite alleles with antibody response against Newcastle disease virus vaccine and body weight in two Tanzania chicken ecotypes. *Afr J Biotechnol*, 7, 714-720. <https://doi.org/10.5897/AJB07.579>
- Malo, D., Skamene, E. (1994). Genetic control of host resistance to infection. *Trends Genet*, 10, 365-371. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2395-2399.2004> PMID: 7985241
- Miller, M.M., Bacon, L.D., Hala, K., Hunt, H.D., Ewald, S.J., Kaufman, J., Zoorob, R., Briles, W.E. (2004). Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. *Immunogenetics*, 56, 261-279. <https://doi.org/10.1007/s00251-004-0682-1> PMID: 15257423
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16 (3), 12-15. [https://doi.org/10.3161/1733-5329\(2006\)8\[277:TICTCD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3161/1733-5329(2006)8[277:TICTCD]2.0.CO;2) PMID: 3344216
- Moazeni, S., Mohammadabadi, M.R., Sadeghi, M., Shahrababak, H., Koshkoieh, A., Bordbar, F. (2016a). Association between UCP gene polymorphisms and growth, breeding value of growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *Open J Anim Sci*, 6 (1), 1-8. <https://doi.org/10.4236/ojas.2016.61001>
- Moazeni, S.M., Mohammadabadi, M.R., Sadeghi, M., Moradi Shahrababak, H., Esmailzadeh, A.K. (2016b). Association of the melanocortin - 3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *J*



- Livest Sci Technol, 4 (2), 51-56. <https://doi.org/10.22103/jlst.2016.1513>
22. Nikbakht Brujeni, G., Barjesteh, N. (2009). A study of the genotypic variability at the MHC (B-F) in Arian broiler chickens by PCR - SSCP. *J Vet Res*, 64 (1), 63-67.
  23. Nishibori, M., Nakaki, S., Tsudzuki, M., Yamamoto, Y. (2000). Utility of three restriction fragment length polymorphism probes for genotyping of the chicken major histocompatibility complex class IV region. *Poult Sci*, 79, 305-11. <https://doi.org/10.1093/ps/79.3.305> PMID: 10735194
  24. Oh, J.D., Park, M.H., Kong, H.S., Lee, H.K., Jeon, G.J., Yeon, S.H., Sang, B.D., Choi, C.H., Cho, B.W. (2005). Characteristics and improving breed of economic traits of Korea native chicken. *Korean J Poult Sci*, 32 (1, 3), 29-34.
  25. Pish Jang, J., Rahimi, G., Hafezian, H., Gholizadeh, M. (2018). Identification of mutation in two candidate genes with resistance potential against avian influenza and salmonellosis in some Iranian indigenous and commercial chicken strains. *Vet Res Biol Prod*, 31 (2), 42-50. <https://doi.org/10.22092/vj.2017.116264.1382>
  26. Ri - Fu, X., Kui., L., Guo - Hong, C., Yang - Zong, Q., Yu - Bo, Z., Li, L., Bin, F., Bang, L. (2006). Genetic polymorphism within exon 2 of MHC B-G gene in nine Chinese indigenous chicken breeds. *Acta Zool Sin*, 52 (1), 160-169.
  27. Schou, T.W., Labouriau, R., Permin, A., Christensen, J.P., Sorensen, P., Cu, H.P., Nguyen, V.K., Juul - Medsen, H.R. (2010). MHC haplotype and susceptibility to experimental infections (*Salmonella* Enteritidis, *Pasteurella multocida* or *Ascaridia galli*) in a commercial and an indigenous chicken breed. *Vet Immunol Immunopathol*, 135, 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.030> PMID: 19945754
  28. Shahdadnejad, N., Mohammadabadi, M.R., Shamsadini, M. (2016). Typing of *clostridium perfringens* isolated from broiler chickens using multiplex PCR. *Genet 3rd Millen*, 14, 4368-4374.
  29. Sheldon, B.L. (2000). Research and development in 2000: Directions and priorities for the world's poultry science community. *Poult Sci*, 78, 147-158. <https://doi.org/10.1093/ps/79.2.147>
  30. Sivaraman, G.K., Kumar, S. (2005). PCR-RFLP chicken in BL-βII region of MHC of divergent broiler lines based on immunocompetence Index. *J Appl Anim Res*, 28, 81-84. <https://doi.org/10.1080/09712119.2005.9706796>
  31. Xu, R.F., Li, K., Chen, G.H., Qiang, B.Y.Z., Mo, D.L., Fan, B., Li, C.C., Yu, M., Zhu, M.J., Xiong, T.A., Liu, B. (2005). Investigation of PCR-RFLPs within Major Histocompatibility Complex B-G genes using two restriction enzymes in eight breeds of Chinese indigenous chickens. *Asian-Australas J Anim Sci*, 18 (7), 942-948. <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.942>
  32. Xu, R.F., Li, K., Chen, G., Xu, H., Qiang, B., Li, Ch., Liu, B. (2007). Characterization of genetic polymorphism of novel MHC B-LBII alleles in Chinese Indigenous chickens. *J Genet Genomics*, 34 (2), 109-118. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(07\)60012-5](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(07)60012-5) PMID: 17469783
  33. Yonash, N., Heller, E.D., Hillel, J., Cahaner, A. (2000). Detection of RFLP markers associated with antibody response in meat-type chickens: haplotype/genotype, single-band, and multiband analyses of RFLP in the major histocompatibility complex. *J Hered*, 91, 24-30. <https://doi.org/10.1093/jhered/91.1.24> PMID: 10739120
  34. Zandi, E., Mohammadabadi, M.R., Ezzatkah, M., Esmailzadeh, A.K. (2014). Typing of toxigenic isolates of *clostridium perfringens* by multiplex PCR in ostrich. *Iranian J App Anim Sci*, 4(4), 795-801.
  35. Zhou, H., Lamont, S.J. (1999). Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. *Anim Genet*, 30, 256-264. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.1999.00505.x> PMID: 10467700