مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۱، ۱۰۷-۱۰۱

Journal of Veterinary Research. 70,1:101-107, 2015

Original Article

بررسی تفکیک ژنی مجتمع عمده پذیرش بافتی با استفاده از نشانگر ریزماهواره LEI0258 در طیور بومی و تجاری

عاطفه اسماعیل نژاد[۱] غلامرضا نیکبخت[۲*] ندا خازنی اسکوئی[۲] فرهاد امینی[۳]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران

۲) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

۳) گروه بهداشت و تغذیه دام و طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۲۵ آذر ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۱ بهمن ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC) در طیور با حساست یا مقاومت نسبت به بیماریها، صفات تولیدی و تولیدمثلی در ارتباط بوده و تشخیص تنوع آن در جمعیت‌های در حال اصلاح نژاد می‌تواند به انتخاب افراد مقاوم به بیماری و تهیه واکسن‌های مؤثر کمک نماید. تعیین هاپلوتیپ‌های MHC با کمک ریزماهواره LEI0258 امکان پذیر است. **هدف:** هدف از مطالعه حاضر بررسی پلی‌مرفیسم MHC در دو جمعیت طیور بومی خراسان رضوی و طیور تجاری لگهورن با استفاده از ریزماهواره LEI۰۲۵۸ و همچنین بررسی نحوه تفکیک و وراثت آن در این جمعیت‌ها است. **روش کار:** تعداد ۳۳۵ نمونه مربوط به دو جمعیت بومی خراسان و تجاری لگهورن، شامل دو جمعیت والدین (P) و جوجه‌ها (F1) مورد آزمایش قرار گرفت. به منظور تعیین ژنوتیپ‌های MHC از ریزماهواره LEI0258 استفاده شد. بررسی نحوه وراثت آلل‌ها از والدین به فرزندان و تعادل هاردی-وینبرگ، با کمک آزمون مربع کای و نسبت درست‌نمایی صورت گرفت. **نتایج:** در جمعیت طیور بومی خراسان ۲۰ آلل ریزماهواره LEI0258 شناسایی شد که آلل ۳۲۱ bp بیشترین (۲۲/۸۸٪) و آلل ۱۸۲ bp کمترین (۰/۱۶٪) فراوانی را داشتند. در جمعیت طیور تجاری سه آلل از این نشانگر شناسایی شد که بیشترین فراوانی در آلل ۲۶۱ bp (۵۰٪) و کمترین فراوانی در آلل ۴۸۷ bp (۶٪) دیده شد. در بررسی نحوه وراثت آلل‌ها از والدین به فرزندان و تعادل هاردی-وینبرگ، در جمعیت طیور بومی خراسان تفاوت معنی‌داری بین دو جمعیت والدین و جوجه‌ها مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این مطالعه بیانگر تنوع ژنتیکی بالای طیور بومی در مقایسه با طیور تجاری است. در جمعیت طیور بومی برتری برای انتخاب آللی خاص وجود نداشته و چنانچه فراوانی آللی در جمعیت جوجه‌ها بالاتر است، به دلیل بالا بودن فراوانی آن آلل در جمعیت والدین بوده که گامت‌های آنها، خزانه ژنی جمعیت را می‌سازند.

واژه‌های کلیدی: تفکیک ژنی، طیور بومی، مجتمع عمده پذیرش بافتی، ریزماهواره LEI0258

مقدمه

مجتمع عمده پذیرش بافتی (MHC) اولین بار در دهه ۱۹۳۰ و در طی مطالعه واکنش‌های رد پیوند شناسایی شد. پیشرفت در علوم بیولوژی سلولی و ایمونولوژی در دهه‌های ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ مشخص کرد که MHC خوشه‌ای از ژن‌ها است که در گونه‌های مختلف وجود دارد و مولکول‌هایی وابسته به ایمنی را رمزمی‌کند. این مولکول‌ها مسئول عرضه آنتی‌ژن‌های داخل و خارج سلولی در سطح سلول‌ها هستند و در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و مقاومت به بیماریها دخالت دارند (۱۰،۲۰).

خوشه ژنی MHC در طیور (کمپلکس B) شامل ۳ کلاس I (B-F) و II (B-L) و IV (B-G) بوده و به ابرخانواده ایمونوگلوبولین‌ها تعلق دارد. این مجموعه در میکروکروموزوم ۱۶ طیور به شکلی بسیار متراکم واقع شده است و تنها ژن‌های ضروری را دارا است. ژن‌های MHC در طیور با مقاومت یا حساسیت نسبت به برخی پاتوژن‌ها از جمله ویروس بیماری مارک، ویروس سارکومای روس، ویروس لکوز پرندگان، کوکسیدیا و باکتری‌هایی از قبیل سالمونلا و استافیلوکوکوس در ارتباط هستند. علاوه بر این بسیاری از خصوصیات دیگر غیر وابسته به سیستم ایمنی از جمله صفات تولیدی، وزن بدن، میزان جوجه درآوری و باروری نیز در برخی گونه‌های حیوانی از جمله طیور، توسط خوشه ژنی MHC کنترل می‌شود. بنابر این ژن‌های MHC به عنوان یک نشانگر با ارزش برای تحلیل‌های متمرکز در طیور، جهت انتخاب جمعیت‌های مقاوم به بیماریها با ویژگی‌های پرورشی مؤثر مورد توجه قرار گرفته است (۴،۶،۱۱،۱۴،۱۶).

مطالعه تفکیک ژن‌ها، روشی برای آزمون قانون اول مندل یا همان قانون جدایی (تفکیک) است. با استفاده از این روش می‌توان نحوه وراثت یک صفت از والدین به فرزندان و تطابق آن با قوانین مندلی را سنجید. از این روش می‌توان به عنوان یک روش آماری جهت بررسی تأثیر یک ژن خاص در وراثت یک فنوتیپ به یک فرد بهره برد. امروزه با گسترش صنعت طیور و تلاش‌های روز افزون جهت بهبود شرایط پرورشی نیاز به تهیه اطلاعات شجره‌نامه‌ای محسوس است. از آنجا که اکثر صفات مهم اقتصادی از جمله مقاومت در برابر بیماریها، صفات تولیدی و تولیدمثلی تحت تأثیر خوشه ژنی MHC هستند، در برنامه‌های اصلاح نژادی تعیین ژنوتیپ‌ها و بررسی نحوه تفکیک و وراثت این مجموعه به منظور

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۵۷-۰۲۱، نمابر: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱ Email: nikbakht@ut.ac.ir

دست یابی به دودمان های مقاوم به بیماریها و همچنین صفات تولیدی بهبود یافته، لازم به نظر می رسد (۱،۶،۱۵).

به طور معمول MHC طیور توسط روش های سرولوژی و با استفاده از آنتی سرم های اختصاصی MHC کلاس I (B-F) و کلاس IV (B-G) شناسایی می شود. اما روش های تایپینگ سرولوژی به دلیل بروز واکنش های متقاطع، ظهور هاپلوتیپ های جدید، کیفی یا توصیفی بودن تفسیر واکنش های سرولوژی و حضور آنتی ژن های پلی مرفیک غیر MHC با محدودیت هایی همراه هستند. با توسعه علم بیولوژی ملکولی، روش های زیادی برای تعیین هاپلوتیپ های MHC ابداع شده است. از جمله این روش ها می توان به تعیین توالی DNA، الکتروفورز ۲ بعدی، ساترن بلاتینگ، PCR-RFLP، PCR-SSCP و SNP اشاره کرد. البته روش های مذکور برای تعداد نمونه زیاد کارایی لازم را نداشته و چندان مقرون به صرفه نیستند (۵،۷،۸،۹،۱۴).

ریزماهواره LEI0258 در ناحیه خوشه ژنی MHC قرار دارد و استفاده از آن به عنوان یک نشانگر ژنتیکی برای تعیین هاپلوتیپ های MHC طیور، اولین بار توسط Fulton و همکاران در سال ۲۰۰۶ صورت گرفت. ریزماهواره LEI0258 یک ریزماهواره تترانوکلئوتیدی با یک هسته چهار جفت بازی n (TTTC) است که از نظر فیزیکی در ناحیه جایگاه ژنی B خوشه ژنی MHC و بین ژن های BF و BG واقع شده است. به دلیل وجود رابطه عدم تعادل پیوستگی و ارتباط معنی داری که بین آلل های ریزماهواره LEI0258 و هاپلوتیپ های MHC موجود است، تنوع در این نشانگر شاهدی بر تنوع MHC در جمعیت بوده و می تواند اطلاعات غیرمستقیمی را در خصوص توزیع آلل های B-F در جمعیت فراهم کند (۳،۷،۱۲).

هدف از مطالعه حاضر بررسی پلی مرفیسم MHC در دو جمعیت طیور بومی خراسان و طیور تجاری لگهورن و همچنین بررسی نحوه تفکیک و وراثت این خوشه ژنی در این دو جمعیت بوده است. این جمعیت ها تحت برنامه های اصلاح نژادی به منظور تولید گوشت و تخم مرغ هستند. با توجه به نقش عمده MHC در کنترل بیماریها و صفات تولیدی در طیور، تشخیص پلی مرفیسم آن در جمعیت های در حال اصلاح نژاد می تواند جهت انتخاب افراد مقاوم به بیماری و تهیه واکسن های مؤثر به کار رود.

مواد و روش کار

نمونه گیری و استخراج DNA ژنومی: در مطالعه حاضر تعداد ۳۳۵ نمونه مربوط به دو جمعیت طیور بومی خراسان و تجاری لگهورن مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه های طیور بومی از مرکز اصلاح نژاد و پشتیبانی مرغ بومی خراسان واقع در استان خراسان رضوی تهیه گردید و شامل ۳۱۵ نمونه خون (۱۲۷ نمونه مربوط به جوجه ها (F1) و ۱۸۸ نمونه مربوط به والدین آنها (P)) بود. نمونه های مربوط به طیور صنعتی از مرکز پرورش طیور تخم گذار مرغک تهران تهیه شد و شامل ۱۰ نمونه خون مربوط به والد ماده (P) و ۱۰ نمونه تخم مرغ بارور (F1) این مرغ ها بود. نمونه های خون تا زمان استخراج DNA در لوله های حاوی EDTA و در دمای ^{o}۲۰- نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی با کمک کیت استخراج DNA ژنومی (BIONEER, South Korea) و بر اساس پروتکل سازنده کیت انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب بوسیله روش های اسپکتوفتومتری و ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

افزوده سازی ریزماهواره LEI0258 و ژنوتایپینگ MHC: بررسی آلل های ریزماهواره LEI0258 به کمک روشی که Fulton و همکاران در سال ۲۰۰۶ ارائه کردند، صورت پذیرفت. بر این اساس واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ µL شامل ۲۰ng، DNA ژنومی، ۱۰ Pg از هر کدام از پرایمرهای LEI0258، ۱/۵mmol، MgCl2 و یک واحد آنزیم تک پلیمراز (Fermentas, Germany) انجام شد. چرخه های دمایی شامل یک مرحله واسرشتگی اولیه؛ ^{o}C۹۴ به مدت ۱ دقیقه، ۳۵ چرخه سه مرحله ای، شامل مرحله واسرشته سازی؛ ^{o}C۹۲ به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال؛ ^{o}C ۵۷ به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله بسط؛ ^{o}C۷۲ به مدت ۴۵ ثانیه و در انتها یک مرحله بسط انتهایی؛ ^{o}C۷۲ به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه بود. پرایمرهای LEI0258 به صورت 5-CACGCAGCAGAACTTGGTAAGG-3 برای پرایمر رفت و 5-AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC-3 برای پرایمر برگشت طبق گزارش McConnell و همکاران (به شماره دسترسی Z83781 بانک ژن) در PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

در نهایت ۵µL از محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۴٪ (در بافر TBE1X) با اختلاف پتانسیل ۶۰V و ۴۵mA به مدت ۳ ساعت الکتروفورز شده و با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد. برای تفکیک دقیق تر آلل های نزدیک به هم، الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ تکرار شد. سرانجام اندازه هر کدام از محصولات PCR (آلل های ریزماهواره LEI0258) توسط نرم افزار Photocapture نسخه ۹۹/۰۳ و بر اساس جفت باز تعیین گردید.

آنالیز ژنتیک جمعیت: آلل های ریزماهواره LEI0258 بر اساس اندازه شناسایی شدند. تعداد و فراوانی آلل ها و ژنوتیپ ها، فراوانی مورد مشاهده و مورد انتظار هر یک از آلل ها، میزان هتروزیگوسیتی مورد مشاهده و مورد انتظار و همچنین آزمون تعادل هاردی-وینبرگ (HWE) در هر جمعیت و بین دو نسل والدین (P) و نتاج (F1) با کمک آزمون مربع کای و نرم افزار POPGENE نسخه ۱/۳۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت ها توسط دو پارامتر تعداد آلل (Na) و میزان هتروزیگوسیتی (He) و بر اساس فرمول ارائه شده توسط Nei و همکاران در سال ۱۹۹۷ تعیین شد. به منظور مشاهده تأثیر جنسیت بر وراثت MHC نیز فراوانی مورد مشاهده و مورد انتظار آلل ها و ژنوتیپ ها در بین دو جنس نر و ماده در جمعیت طیور بومی خراسان مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱. فراوانی آلل‌های ریزماهواره LEI0258 در دو جمعیت طیور خراسان و لگهورن.

	آلل LEI0258 (bp)	درصد فراوانی در والدین (P)	درصد فراوانی در جوجه‌ها (F1)
طیور بومی خراسان	۱۸۲	۰/۲۷	۰
	۱۹۴	۱/۸۹	۲/۰۳
	۲۰۵	۱۰/۵۴	۱۰/۹۷
	۲۲۳	۳/۷۸	۳/۶۵
	۲۳۰	۱/۶۲	۰/۴۰
	۲۴۷	۴/۳۲	۳/۶۵
	۲۶۱	۵/۴۰	۴/۸۷
	۲۷۳	۰/۲۷	۰/۸۱
	۲۹۵	۴/۳۲	۴/۸۷
	۳۰۹	۱۰	۱۱/۷۸
	۳۲۱	۲۲/۱۶	۲۳/۹۸
	۳۴۵	۲/۷۰۲	۲/۴۳
	۳۵۷	۳/۵۱	۴/۸۷
	۳۶۷	۱۶/۷۵	۱۵/۴۴
	۳۸۱	۱/۰۸	۱/۶۲
	۳۹۳	۳/۲۴	۱/۲۱
	۴۰۵	۱/۰۸	۱/۲۱
	۴۲۰	۱/۳۵	۱/۶۲
	۴۴۳	۴/۳۲	۴/۰۶
	۴۷۴	۱/۳۵	۰/۴۰
طیور تجاری لگهورن	۲۶۱	۳۰	۷۰
	۳۵۷	۵۰	۲۰
	۴۸۷	۲۰	۱۰

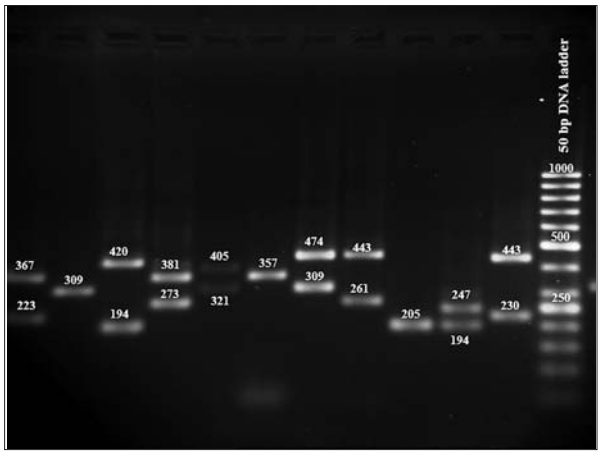
نتایج

در بررسی پلی‌مرفیسم MHC در ۳۳۵ نمونه مربوط به دو جمعیت طیور بومی و تجاری، در مجموع ۲۱ آلل از ریزماهواره LEI0258 شناسایی شد (تصویر ۱). در جمعیت طیور بومی خراسان (جوجه‌ها و والدین) مجموع ۲۰ آلل متنوع (از ۱۸۲ تا ۴۷۴ جفت باز) مشاهده شد، که بیشترین فراوانی متعلق به آلل ۳۲۱ bp (۲۲/۸۸٪) و کمترین فراوانی مربوط به آلل ۱۸۲ bp (۰/۱۶٪) بود که به ترتیب مربوط به هاپلوتیپ‌های B74 و B4 از MHC هستند. آلل ۲۳۰ در مطالعات گذشته در دنیا گزارش نشده و اولین بار در این جمعیت دیده شد. با توجه به "هم بارز بودن" آلل‌های ریزماهواره از مجموع این ۲۰ آلل در این جمعیت تعداد ۸۶ ژنوتیپ (۱۲ ژنوتیپ هوموزیگوت و ۷۴ ژنوتیپ هتروزیگوت) مشاهده شد. در جمعیت والدین (P) ۲۰ آلل از ریزماهواره LEI0258 شناسایی شده که آلل ۳۲۱bp بیشترین فراوانی (۲۲/۱۶٪) و آلل‌های ۱۸۲bp و ۲۷۳ bp کمترین فراوانی (۰/۲۷٪) را دارا بودند. در جمعیت جوجه‌ها (F1) نیز ۱۹ آلل از این ریزماهواره مشاهده شد که آلل ۳۲۱ بیشترین فراوانی (۲۳/۹۸٪) و آلل‌های ۲۳۰ و ۴۷۴ کمترین فراوانی (۰/۴٪) را داشتند (جدول ۱). در بررسی نحوه وراثت آلل‌ها از والدین به فرزندان و برقراری تعادل هاردی وینبرگ در این جمعیت با استفاده از آزمون مربع کای، تفاوت معنی‌داری بین دو جمعیت والدین و جوجه‌ها مشاهده نشد و در مجموع جمعیت بومی خراسان در تعادل قرار داشت (تصویر ۲). لازم به ذکر است در خصوص جمعیت طیور بومی خراسان نتایج آزمون نسبت درست‌نمایی عدم انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ را نشان داد. در مورد ارتباط آلل‌های LEI0258 و به‌دنبال آن هاپلوتیپ‌های MHC با جنس نیز به مقایسه توزیع احتمالی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مشاهده شده و مورد انتظار در دو جنس نر و ماده پرداخته شد، که ۲۰ آلل در جنس ماده و ۱۸ آلل در جنس نر مشاهده شد. در محاسبه آزمون مربع کای، از نظر تعداد و فراوانی آلل‌های ریزماهواره LEI0258 تفاوت معنی‌داری بین دو جمعیت نر و ماده مشاهده نشد و این موضوع نشان می‌دهد که آلل‌های ریزماهواره به‌طور مستقل از جنس و فقط بواسطه فراوانی آنها در جمعیت به ارث می‌رسند (تصویر ۳).

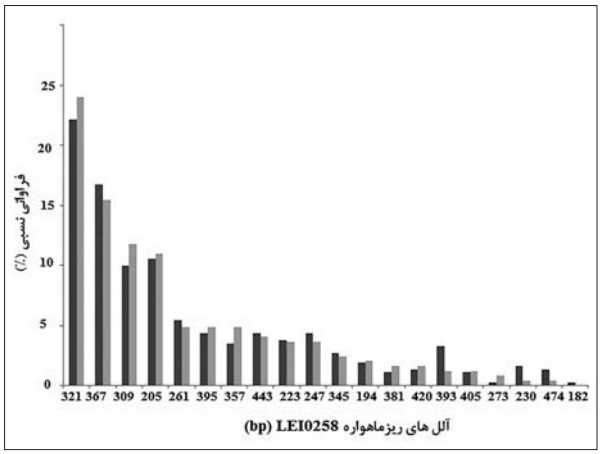
در طیور تجاری لگهورن در مجموع ۳ آلل ریزماهواره LEI0258 شناسایی شد که ۲ آلل آن با آلل‌های مشاهده شده در جمعیت طیور بومی مشترک بوده و آلل ۴۸۷ bp تنها در جمعیت تجاری دیده شد. آلل ۲۶۱ bp بیشترین فراوانی (۵۰٪) و آلل ۴۸۷ bp کمترین فراوانی (۶٪) را در این جمعیت نشان داد. این آلل نیز مربوط به هاپلوتیپ B12 است. از مجموع ۳ آلل موجود در جمعیت لگهورن، ۴ ژنوتیپ (۱ ژنوتیپ هوموزیگوت و ۳ ژنوتیپ هتروزیگوت) شناسایی شد. در جمعیت والدهای ماده آلل ۳۵۷ bp (۵۰٪) و در جمعیت جوجه‌ها آلل ۲۶۱ bp (۷۰٪) بیشترین فراوانی و در هر دو جمعیت آلل ۴۸۷ bp (۲۰٪ در والدین و ۱۰٪ در جوجه‌ها) کمترین فراوانی را داشت (جدول ۱). آزمون مربع کای برقراری تعادل هاردی-وینبرگ را تأیید نکرده و تفاوت معنی‌داری میان جمعیت مولدهای ماده و فرزندان مشاهده شد ($p<0/05$) (تصویر ۴).

بحث

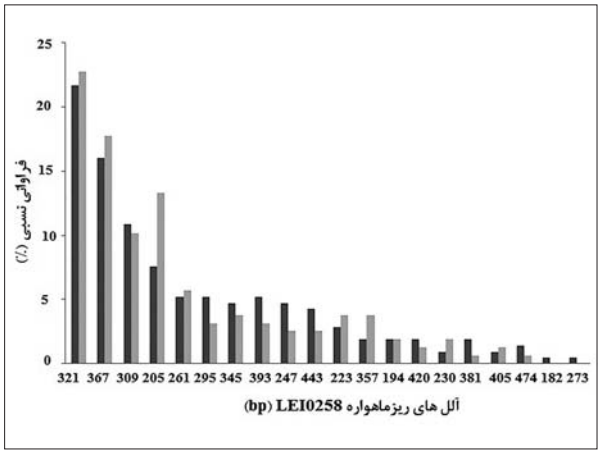
ریزماهواره LEI0258 در میکروکروموزوم ۱۶ طیور قرار گرفته است و با آلل‌های MHC در عدم تعادل پیوستگی می‌باشد. میزان پلی‌مرفیسم و تنوع آللی در ژنوتیپ‌های این ریزماهواره می‌تواند شاهدی بر تنوع در هاپلوتیپ‌های خوشه ژنی MHC باشد. بر همین اساس در مطالعه حاضر به بررسی میزان پراکندگی و نحوه تفکیک و به ارث رسیدن آلل‌های ریزماهواره LEI0258 در دو جمعیت طیور بومی و تجاری پرداخته شد که در جمعیت بومی ۲۰ آلل و در جمعیت تجاری تنها ۳ آلل شناسایی شد. نتایج بیانگر تنوع ژنتیکی بالاتر طیور بومی در مقایسه با طیور تجاری است. در مطالعات مشابهی که بر روی طیور بومی برزیل، ویتنام و تانزانیا انجام گرفته است نیز به ترتیب ۱۵، ۱۹ و ۲۳ آلل از این ریزماهواره گزارش شده که تأیید کننده پلی‌مرفیسم بالای MHC در طیور بومی است (۱۲،۱۳،۱۸). در مقابل در مطالعات جداگانه‌ای که بر روی طیور تجاری (از جمله لگهورن سفید) در دنیا انجام شده است تنها ۳ تا ۵ آلل برای این ریزماهواره گزارش شده و نکته جالب توجه این است که در تمامی این مطالعات آلل‌های bp ۲۶۱ و bp ۳۵۷ گزارش شده و در مطالعه حاضر نیز این دو آلل در جمعیت تجاری وجود دارند و می‌تواند نشان‌دهنده خاستگاه مشترک ژنتیکی این



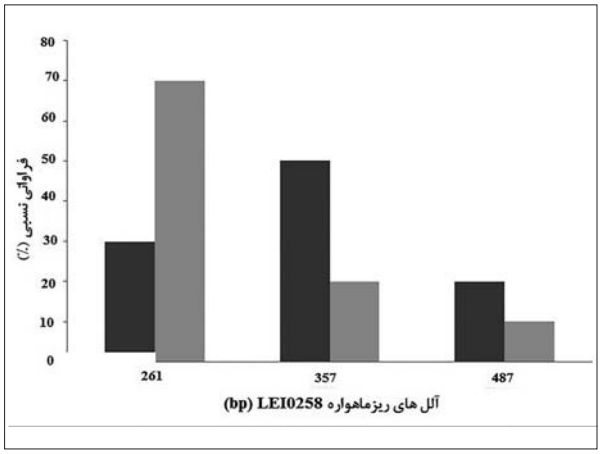
تصویر ۱. آلل‌های ریزماهواره LEI0258 در دو جمعیت طیور خراسان و لگهورن.



تصویر ۲. فراوانی نسبی آلل‌های ریزماهواره LEI0258 در جمعیت طیور خراسان.
والدین ■ جوجه‌ها ■



تصویر ۳. فراوانی نسبی آلل‌های ریزماهواره LEI0258 به تفکیک جنسیت در جمعیت طیور خراسان. جنس ماده ■ جنس نر ■



تصویر ۴. فراوانی نسبی آلل‌های ریزماهواره LEI0258 در جمعیت طیور لگهورن.
والدین ■ جوجه‌ها ■

جمعیت‌ها باشد (۲،۳،۱۶،۱۷).

با توجه به اینکه طیور بومی اغلب در شرایط آزاد نگهداری می‌شوند و مانند طیور تجاری تحت کنترل شدید برنامه‌های مدیریتی اصلاح نژاد نیستند، با پاتوژن‌های متعددی مواجه شده و شیوع بیماریها در آنها بیشتر است و در نتیجه انتظار می‌رود تنوع MHC در آنها در طی چند نسل افزایش یابد. افزایش تنوع MHC به آنها این امکان را می‌دهد که به پاتوژن‌های محیطی بیشتری پاسخ داده و بخت زنده‌مانی بیشتری داشته باشند. از این منظر طیور تجاری اغلب در شرایط بهداشتی و پرورشی دقیق، به منظور بهبود صفات تولیدی قرار داشته و در این بهگزینی مقاومت در برابر بیماریها انتخاب دوم است (۹،۱۳،۱۸).

علاوه بر اهمیت ریزماهواره LEI0258 در تعیین ژنوتیپ‌های MHC، تعدادی از آلل‌های این ریزماهواره با برخی متغیرهای تولید و سلامت از جمله وزن بدن، پاسخ آنتی‌بادی علیه واکسن نیوکاسل، انگل‌های سیستم گوارش و سندرم فلجی حاد در ارتباطند (۲،۱۳،۱۶،۱۸). در مطالعه‌ای که توسط Lwelamira و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی دو جمعیت از طیور تانزانیا انجام شد، ارتباط معنی‌داری بین آلل ۲۰۵ bp این ریزماهواره و تولید آنتی‌بادی علیه واکسن نیوکاسل و آلل ۳۰۷ bp این ریزماهواره و وزن بدن گزارش شد. آلل ۲۰۵ bp در جمعیت بومی خراسان نیز با فراوانی نسبتا بالا (۱۰/۷۱٪) وجود دارد و می‌تواند شاهدی بر مقاومت بالای این جمعیت باشد (۱۳).

وجود تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت طیور بومی خراسان نشان می‌دهد که در این جمعیت فراوانی‌ها در طی نسل‌های والدین و جوجه‌ها تغییری نکرده و چنانچه فراوانی یک آلل در جمعیت جوجه‌ها بالاتر است، به دلیل بالا بودن فراوانی آن آلل در جمعیت والدینی بوده که گامت‌های آنها خزانه ژنی جمعیت را می‌سازند. انحراف از تعادل در جمعیت تجاری ممکن است به علت کوچک بودن جمعیت مورد مطالعه باشد. با توجه به آنچه در رابطه با شرایط تعادل هاردی-وینبرگ وجود دارد، جمعیت باید به میزان کافی بزرگ بوده و آمیزش‌ها تصادفی انجام شوند. اما آنچه که در حقیقت در این جمعیت تجاری وجود داشت، یک جمعیت آماری کوچک با آمیزش‌هایی غیر تصادفی است. نکته جالب توجه پلی‌مرفیسم پایین تر

طیور تجاری در مقایسه با طیور بومی است، به‌طوری که در مطالعاتی که بر روی تعداد نمونه بالا (حدود ۲۰۰ نمونه) از جمعیت لگهورن انجام شده نیز تنها ۲ تا ۴ آلل از این ریزماهواره گزارش شده است (۲،۱۶،۱۹).

در تحقیق حاضر از ریزماهواره LEI0258 به منظور تایپینگ MHC در دو جمعیت طیور بومی و تجاری استفاده شد. این ریزماهواره به دلیل داشتن آلل های زیاد و همچنین دامنه وسیعی که اندازه آلل های آن دارد به عنوان یک نشانگر DNA جهت تحقیقات ایمنی‌شناسی و ژنتیکی قابل استفاده است. استفاده از این نشانگر برای طیور بومی ایران می تواند اطلاعات ارزشمندی در رابطه با تنوع و فراوانی آلل های MHC موجود در ذخایر ژنتیکی کشور به‌دست دهد و امکان مقایسه آن با سایر جمعیت‌های جهان را برای ما فراهم سازد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مرکز اصلاح نژاد و پشتیبانی مرغ بومی خراسان رضوی و آقایان مهندس شوریده و مهندس طوسی که در نمونه‌گیری و انجام این تحقیق ما را یاری رساندند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. این تحقیق با حمایت اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه تهران برای طرح به شماره پرونده (۷۵۰۲۰۱۵/۶/۲۳) به انجام رسیده است.

References

1. Amini, F. (2012) Genetics. (1st ed.) Persian Translation, Jahad Daneshgahi Publishing. Tehran, Iran.
2. Bader, S.R., Kothlow, S., Trapp, S., Schwarz, S.C., Philipp, H.C., Weigend, S., Sharifi, A.R., Preisinger, R., Schmahl, W., Kaspers, B., Matiasek, K. (2010) Acute paretic syndrome in juvenile White Leghorn chickens resembles late stages of acute inflammatory demyelinating polyneuropathies in humans. J Neuroinflammation. 7: 1-20.
3. Chazara, O., Juul-Madsen, H.R., Chang, C.S., Tixier-Boichard, M., Bed'hom, B. (2011) Correlation in chicken between the marker LEI0258 alleles and major histocompatibility complex sequences. BMC Proc. 5(Suppl 4): 1-5.
4. Davison, T.T.F., Kaspers, B., Schat, K.A. (2008) Avian Immunology. (1st ed.) Elsevier Ltd. London, UK.
5. 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: 1609-1617.
6. Ewald, S.J., Ye, X., Avendano, S., McLeod, S., Lamont, S.J., Dekkers, J.C. (2007) Associations of BF2 alleles with antibody titres and production traits in commercial pure line broiler chickens. Anim Genet. 38: 174-176.
7. Fulton, J.E., Juul-Madsen, H.R., Ashwell, C.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.
8. 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: 1832-1841.
9. Izadi, F., Ritland, C., Cheng, K.M. (2011) Genetic diversity of the major histocompatibility complex region in commercial and noncommercial chicken flocks using the LEI0258 microsatellite marker. Poult Sci. 90: 2711-2717.
10. Kaufman, J., Milne, S., Gobel, T.W., Walker, B.A., Jacob, J.P., Auffray, C., Zoorob, R., Beck, S. (1999) The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. Nature. 401: 923-925.
11. Lakshmanan, N., Gavora, J.S., Lamont, S.J. (1997) Major histocompatibility complex class II DNA polymorphisms in chicken strains selected for Marek's disease resistance and egg production or for egg production alone. Poult Sci. 76: 1517-1523.
12. Lima-Rosa, C.A.D.V., Canal, C.W., Fallavena, P.R.V, Freitas, L.B.D., Salzano, F.M. (2005) LEI0258 microsatellite variability and its relationship to B-F haplotypes in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. Genet Mol Biol. 28: 386-389.
13. 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.
14. Miller, M.M., Bacon, L.D., Hala, K., Hunt, H.D.,

Ewald, S.J., Kaufman, J., Zoorob, R., Briles, W.E. (2004) 2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. Immunogenetics. 56: 261-279.

15. Muir, W.M., Aggrey, S.E. (2003) Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology. (1st ed.) CABI Publishing, UK.
16. Owen, J.P., Delany, M.E., Mullens, B.A. (2008) MHC haplotype involvement in avian resistance to an ectoparasite. Immunogenetics. 60: 621-631.
17. Petersen, A., Chadfield, M.S., Christensen, J.P., Christensen, H., Bisgaard, M. (2008) Characterization of small-colony variants of *Enterococcus faecalis* isolated from chickens with amyloid arthropathy. J Clin Microbiol. 46: 2686-2691.
18. Schou, T.W., Permin, A., Juul-Madsen, H.R., Sorensen, P., Labouriau, R., Nguyen, T.L., Fink, M., Pham, S.L. (2007) Gastrointestinal helminths in indigenous and exotic chickens in Vietnam: association of the intensity of infection with the major histocompatibility complex. Parasitology. 134: 561-573.
19. Suzuki, K., Matsumoto, T., Kobayashi, E., Uenishi, H., Churkina, I., Plastow, G., Yamashita, H., Hamasima, N., Mitsuhashi, T. (2010) Genotypes of chicken major histocompatibility complex B locus associated with regression of Rous sarcoma virus J-strain tumors. Poult Sci. 89: 651-657.
20. Tizard, I.R. (2008) Veterinary Immunology. (8th ed.) Saunders Elsevier Ltd. New York, USA.

Allelic segregation of major histocompatibility complex using LEI0258 microsatellite marker in indigenous and commercial chickens

Esmailnejad, A.[1], Nikbakht, Gh.[2*], Khazeni Oskoui, N.[2], Amini, F.[3]

[1]*Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz-Iran*

[2]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Department of Animal and Poultry Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 16 December 2014, Accepted 21 January 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Major histocompatibility complex (MHC) in chicken has profound influence on resistance/susceptibility to disease, and production and reproduction traits. Microsatellite marker LEI0258 is a genetic indicator for MHC haplotypes. Recognizing diversity of MHC haplotypes in selectively bred populations will be helpful for selecting population resistant to disease and development of effective vaccines. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study was to evaluate polymorphism at MHC in two populations of Khorasan indigenous chickens and commercial Leghorn breed using microsatellite marker LEI0258 and to investigate its segregation and heredity. **METHODS:** A total of 335 blood samples from Khorasan Razavi indigenous chickens and commercial Leghorn population including parents (P) and offspring (F1), were analyzed. The MHC genotypes were determined using LEI0258 microsatellite. The study of allele heredity from P to F1 and Hardy-Weinberg equilibrium were conducted using Chi-square and Likelihood Ratio tests. **RESULTS:** In Khorasan indigenous chickens 20 different alleles were identified for LEI0258 microsatellite. The allele 321 bp had the highest (22.88%) and the allele 182 bp had the lowest (0.16%) frequency. In the commercial population (Leghorn breed) 3 alleles were found for this marker of which the allele 261 bp had the highest (50%) and alleles 487 bp had the lowest (6 %) frequency. In allele heredity analysis and Hardy-Weinberg equilibrium of Khorasan population, no significant differences were observed between P and F1 progenies. **CONCLUSIONS:** These results indicate a higher genetic variation in indigenous chickens compared to commercial breed. There was no preference for a particular allele in indigenous chickens. The higher frequency of some alleles in F1 population is due to the high frequency of the same alleles in parent population which their gametes make the population gene pool.

Key words: allelic segregation, indigenous chicken, major histocompatibility complex, microsatellite LEI0258

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. LEI0258 microsatellite allele in Khorasan and Leghorn chickens.

Figure 2. LEI0258 microsatellite allele frequency in Khorasan chicken.

Figure 3. LEI0258 microsatellite allele frequency according to sex in Khorasan chicken.

Figure 4. LEI0258 microsatellite allele frequency in Leghorn chicken.

Table 1. LEI0258 microsatellite allele frequency in Khorasan and Leghorn chickens.

***Corresponding author's email: nikbakht@ut.ac.ir, Tel: 021-61117057, Fax: 021-66427517**