تحقیقات تولیدات دامی

سال هشتم/شماره اول/بهار ۱۳۹۸ (۷۶-۶۷)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

**مقاله پژوهشی**

# شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در جایگاه‌های ژنی IgL و IFNɣ در برخی از مرغ‌های بومی

**جعفر پیش جنگ آقاجری[۱و۲]، قدرت‌اله رحیمی میانجی[۳]، سید حسن حافظیان[۴*]، محسن قلی‌زاده[۵]**

۱- دانش آموخته مقطع دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مراغه، مراغه

۳- استاد، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- دانشیار، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۵- استادیار، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۱/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۰۳)

## چکیده

مقاومت ژنتیکی به بیماری‌ها در مرغ‌ها اهمیت زیادی دارد. تعیین تنوع ژنتیکی سیستم ایمنی مرغ‌ها یکی از گزینه‌های اصلی جهت بررسی تفاوت‌ها در مقاومت به بیماری‌ها به شمار می‌آید. در این تحقیق، ۲۰۰ نمونه خون از توده‌های مرغ‌های بومی عمومی، آذربایجان غربی، مرندی و مازندرانی اخذ و DNA ژنومی به روش شستشوی نمکی استخراج شد. چندشکلی‌های آللی در جایگاه‌های ژنی IgL و IFNɣ دخیل در سیستم ایمنی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و آنزیم‌های *Sau96I* و *Tsp509I* بررسی شد. بعد از هضم آنزیمی، برای جایگاه نشانگری IgL (۳۵۴ جفت بازی)، سه نوع ژنوتیپ AA، AB و BB و دو آلل A (با دو نوار ۱۷۳ و ۱۶۱ جفت بازی و دو نوار ۱۰ جفت بازی) و آلل B (با سه نوار ۱۶۱، ۱۰۳، ۷۰ و دو نوار ۱۰ جفت بازی) و برای جایگاه نشانگری IFNɣ (۱۲۹ جفت بازی)، سه نوع ژنوتیپ CC، CG و GG و دو آلل C (با یک نوار ۱۲۹ جفت بازی) و آلل G (با دو نوار ۹۰ و ۳۹ جفت بازی) شناسایی شد. کل توده‌ها از نظر شاخص تعادل برای دو جایگاه ژنی در تعادل هاردی- واینبرگ قرار نداشتند. شاخص اطلاعات شانون در جایگاه‌های نشانگری IgL و IFNɣ (به ترتیب ۰/۶۷ و ۰/۶۹)، شاخص تثبیت (به ترتیب ۰/۲۴- و ۰/۱۸-) و بیشترین مقدار شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده (به ترتیب ۰/۶۱ و ۰/۵۹) برآورد شد. با توجه به وجود چندشکلی در دو جایگاه ژنی مورد مطالعه، می‌توان در برنامه‌های انتخاب برای افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها از این ژن‌های کاندیدا بهره برد.

**واژه‌های کلیدی:** چندشکلی، ژن‌های IgL و IFNɣ، مرغ بومی، PCR-RFLP

* نویسندهٔ مسئول: hassanhafezian@yahoo.com

doi: 10.22124/ar.2019.10115.1301

**مقدمه**

اطلاع از ساختار ژنتیکی توده‌های مرغ‌های بومی می‌تواند کمک بزرگی در برنامه‌ریزی 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 (علی‌نقی‌زاده و همکاران، ۱۳۸۹). بعلاوه، از مزیت‌های استفاده از ژنتیک مولکولی می‌توان به تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه ژنی خاص (Mousavizadeh *et al*., 2009) و تسریع در پیشرفت ژنتیکی (Javanmard *et al*., 2008) اشاره کرد. مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (Mohammadi *et al*., 2009). در این راستا، شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی اهمیت زیادی دارد (Shojaei *et al*., 2010; Zamani *et al*., 2013).

ایجاد مقاومت ژنتیکی در برابر بیماری‌ها در مرغ‌ها جهت بهبود تولید و استفاده کم از آنتی‌بیوتیک‌ها اهمیت بسزایی دارد. تعیین و یا شناسایی تنوع ژنتیکی سیستم ایمنی بدن یکی از گزینه‌های اصلی جهت بررسی تفاوت‌ها در مقاومت به بیماری‌ها با منشأ عفونی به شمار می‌آید (Crawford, 1990; Hawken *et al*., 1998). سلول‌های دخیل در سیستم ایمنی پروتئین‌هایی به نام سایتوکین‌ها را ترشح می‌کنند که به وسیله ایجاد واکنش‌های بین‌سلولی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی مؤثر هستند (Reen *et al*., 2013). سایتوکین‌های مرغی هنوز به طور دقیق چه از نظر ساختاری و چه عملکردی مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. سایتوکین‌ها با دارا بودن پتانسیل عظیمی در کنترل بیماری‌های واگیردار و همچنین به عنوان یک نیروی کمکی با فعال کردن سیستم ایمنی به طور اختصاصی، واکسن را در ارائه یک دفاع مؤثر یاری می‌کنند (Akdis *et al*., 2011). اینترفرون گاما (IFNγ) یکی از سایتوکین‌های مهمی است که پاسخ ایمنی اولیه و ایمنی سلولی را کنترل و سبب تقویت و یا فعال شدن سلول‌های دخیل در سیستم ایمنی می‌شود (Zhou *et al*., 2001). ایمونوگلوبولین‌ها از جمله IgL پروتئین‌های تخصصی و اصلی آنتی‌ژنی بوده و می‌توانند با پپتیدهای آنتی‌ژنی پیوند برقرار کرده و باعث از بین رفتن عوامل بیماری‌زا شوند (Roitt, 1993).

در تحقیقی، اثرات چندشکلی جایگاه‌های ژنی IFNγ و IgL را روی مقاومت به سالمونلا در ۲۰۰ قطعه از دو نژاد مرغ بومی مالزی مورد بررسی قرار دادند (Tohidi *et al*., 2012). جایگاه ژنی IgL با طول ۳۵۴ جفت باز را بعد از تکثیر با استفاده از آنزیم برشی *Sau96I* مورد هضم قرار دادند. در نتایج این تحقیق برای این جایگاه ژنی، دو آلل A و G به ترتیب با فراوانی ۰/۲۰ و ۰/۸۰ و همچنین سه ژنوتیپ AA، AG و GG به ترتیب با فراوانی ۰/۰۵، ۰/۳۰ و ۰/۶۵ شناسایی شد. همچنین این محققین، جایگاه ژنی IFNγ به طول ۶۷۰ جفت باز را بعد از تکثیر به وسیله آنزیم برشی *Tsp509I* برش دادند که برای این جایگاه ژنی دو آلل A و G به ترتیب با فراوانی ۰/۵۵ و ۰/۴۵ و همچنین سه ژنوتیپ AA، AG و GG به ترتیب دارای فراوانی ۰/۳۲، ۰/۴۶ و ۰/۲۲ مشاهده شده بود. به طور جداگانه مطالعه‌ای تحت عنوان بررسی چندشکلی جایگاه ژنی IgL روی پاسخ به آنتی‌بادی در مرغ‌های نژادهای لگهورن و فایومی انجام شد (Zhou *et al*., 2001; Malek and Lamont, 2003). در این تحقیق، منطقه‌ای به طول ۳۵۴ جفت باز را تکثیر و با آنزیم برشی *Sau96I* برش دادند. در نتایج این تحقیق‌ها، وجود نوار ۱۶۱ جفت بازی و دو نوار ۱۰ جفت بازی در دو نژاد یاد شده مشترک بوده و به غیر از این قطعه‌ها، در نژاد لگهورن یک نوار اضافی به طول ۱۷۳ جفت باز و در نژاد فایومی نیز دو نوار اضافی دیگر به طول‌های ۱۰۳ و ۷۰ جفت باز مشاهده شده بود.

در پژوهشی، همبستگی چندشکلی‌های مربوط به جایگاه ژنی IFNγ به طول ۱۲۹ جفت باز را روی پاسخ به آلودگی سالمونلایی در مرغ‌های بومی هلندی (دو گروه) و هیبرید تجاری گوشتی (سه گروه) مطالعه نمودند (Kramer *et al*., 2003). در این مطالعه بعد از آلودگی میکروبی، نمونه‌های DNA جایگاه ژنی مورد نظر را تکثیر و با استفاده از آنزیم *Tsp509I* برش دادند. طبق بررسی‌های صورت گرفته، سه نوع ژنوتیپ شناسایی شد که فراوانی متفاوتی را در بافت‌های مختلف از جمله کبد، سکوم و طحال نشان دادند. در مرغ‌های بومی هلندی فقط ژنوتیپ GG شناسایی شد و از تعداد کل مرغ‌ها فقط شش مرغ دارای ژنوتیپ AA بودند. همچنین با استفاده از آنزیم برشی *Tsp509I* چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی جایگاه ژنی IFNγ به طول ۶۷۰ جفت بازی در مرغ‌های مولد بومی مازندرانی مورد بررسی قرار داده شد (قاسمیان و همکاران، ۱۳۹۱). در این تحقیق، از نمونه‌های DNA استخراج شده جایگاه ژنی مورد نظر تکثیر و با استفاده از آنزیم یاد شده، نمونه‌های تکثیر یافته را برش دادند. در نتایج این تحقیق، دو آلل A و G به ترتیب با فراوانی ۰/۵۳ و

۰/۴۷ و همچنین سه ژنوتیپ AA، AG و GG به ترتیب با فراوانی ۰/۳۱، ۰/۴۴ و ۰/۲۵ شناسایی شده بود.

اگر چه مطالعات مولکولی متعددی روی مرغ‌ها در ایران انجام شده است (پیش جنگ و همکاران، ۱۳۹۷; Basiri *et al.*, 2015; Moazeni *et al.*, 2016a; Moazeni *et al.*, 2016b; Zandi *et al.*, 2014; Mohammadifar *et al.*, 2011)، اما تاکنون چندشکلی‌های ژن‌های کاندیدای IgL و IFNγ کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است، لذا در این پژوهش چندشکلی‌های آللی دو جایگاه ژنی IgL و IFNγ دخیل در سیستم ایمنی در برخی از نژادهای مرغ بومی موجود در ایران مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

*انتخاب و جمع آوری نمونه‌های خون:* در این تحقیق، نمونه‌های خون از توده‌های مرغ‌های بومی مرندی، مازندرانی و عمومی (شامل توده‌های ژنتیکی مرغ‌های بومی است که در تمام نقاط مختلف کشور مشاهده شده و پراکنده‌اند) موجود در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور و همچنین از توده مرغ بومی آذربایجان غربی موجود در امور دام جهاد کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی (هر جمعیت به تعداد ۵۰ عدد) (شکل ۱) به اندازه ۲-۱ میلی‌لیتر اخذ شد. نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد.

*استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون و انجام واکنش PCR:* پس از یخ‌گشایی نمونه‌های خون و رسیدن به دمای محیط، استخراج DNA ژنومی با روش شستشوی نمکی (Miller *et al.*, 1988) انجام شد. کمیت DNAهای ژنومی استخراج شده به روش طیف‌سنجی و با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ و کیفیت آن‌ها با الکتروفورز روی ژل آگارز دو درصد تعیین شد. جهت تکثیر قطعات ژنی مورد نظر برای هر جایگاه ژنی از یک جفت آغازگر اختصاصی استفاده شد (جدول ۱). اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده، با استفاده از سرویس BLAST (Basice Local Alignment Search Tool) در سایت NCBI بررسی شد.

Fig. 1. Hens and roosters of studied indigenous breeds

شکل ۱- مرغ و خروس‌های نژادهای بومی مورد مطالعه

جدول ۱ – توالی و دمای اتصال آغازگرها، اندازه محصولات PCR برای هر یک از جایگاه‌های ژنی و آنزیم‌های برشی
Table 1. Sequence and annealing temperature of primers, the size of PCR products for each loci and restriction enzymes

| Locus | Size of locus | Annealing temperature | Primer | Restriction enzyme |
|---|---|---|---|---|
| IgL | 354 bp | 49 °C / 30 Second | F:5′-GGGAAATACTGGTGATAGGTG-3'<br>R: 5′-TTTATACCCGCGTCCTTC-3' | *Sau96 I*<br>(Kramer *et al.*, 2003) |
| IFNγ | 129 bp | 40 °C / 30 Second | F: 5′-ATTCTGATGTCTGCCAC-3'<br>R:5′-GGCTTAGGCATACTCTTA-3' | *Tsp509 I*<br>(Kramer *et al.*, 2003) |

واکنش نهایی زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰ - ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، پنج میکرولیتر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (Taq DNA polymerase، بافر، dNTPs، Red dye و $Mgcl_2$) (شاخت شرکت AMPLIQON) و هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (ساخت شرکت BiONEER) با غلظت ۰/۲ پیکومول، برای تکثیر قطعه ژنی ۳۵۴ جفت بازی از پروموتور ژن IgL انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دمای واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی دوم در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۴۹ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد.

تکثیر قطعه‌ای از پروموتور جایگاه ژنی IFNγ به طول ۱۲۹ جفت باز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰ -۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، شش میکرولیتر Taq DNA polymerase 2X Master mix red(Taq DNA polymerase، بافر، dNTPs، Red dye و $Mgcl_2$) (ساخت شرکت AMPLIQON) و هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (ساخت شرکت BiONEER) با غلظت ۰/۳ پیکومول انجام شد. برای این جایگاه ژنی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با دمای واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی دوم در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام شد. قطعات تکثیر یافته برای هر جایگاه ژنی در حضور نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (ساخت شرکت Thermo Scientific) روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز و صحت تکثیر قطعات مورد نظر بدون حضور نوارهای غیراختصاصی و محصولات ناخواسته تأیید شد (شکل ۲).

*تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها و تجزیه و تحلیل داده‌ها:* در این تحقیق جهت تعیین چندشکلی جایگاه‌های ژنی مورد نظر از تکنیک PCR-RFLP و برای هضم آنزیمی محصولات PCR از آنزیم‌های برشی اختصاصی *Sau96I* و *Tsp509I* (ساخت شرکت Thermo Scientific) استفاده شد (جدول ۱). این واکنش‌ها در حجم نهایی ۱۵/۵ میکرولیتر، شامل پنج میکرولیتر محصول PCR، یک میکرولیتر بافر و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم (با غلظت ۱۰ واحد در یک میکرولیتر) و در نهایت نه میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام شد. واکنش‌های هضم آنزیمی برای دو جایگاه ژنی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (برای جایگاه ژنی IgL) و ۶۵ درجه سلسیوس (برای جایگاه ژنی IFNγ) به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. بعد از هضم آنزیمی، مشاهده نوارها و جهت تعیین الگوهای ژنوتیپی از ژل آگارز چهار درصد و نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت بازی (ساخت شرکت Thermo Scientific) استفاده شد.

برای برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص تعادل هاردی - واینبرگ، شاخص تثبیت و شاخص اطلاعات شانون و دیگر پارامترهای ژنتیکی در توده‌های مرغ‌های بومی مورد مطالعه از نرم‌افزار POPGENE نسخه ۱/۳۲ (Yeh *et al.*, 2000) استفاده شد.

## نتایج و بحث

بعد از هضم آنزیمی جایگاه ژنی IgL، سه نوع ژنوتیپ AA، AB و BB شناسایی شد، به طوری‌که آلل A دارای دو نوار ۱۷۳ و ۱۶۱ و دو نوار ۱۰ جفت بازی و آلل B دارای سه نوار ۱۶۱، ۱۰۳، ۷۰ و دو نوار ۱۰ جفت بازی بودند. همچنین در جایگاه ژنی IFNγ بعد از هضم آنزیمی، سه نوع ژنوتیپ CC، CG و GG شناسایی شد که آلل C دارای یک نوار ۱۲۹ جفت بازی و آلل G دارای دو نوار ۹۰ و ۳۹ جفت بازی بودند (شکل ۳).

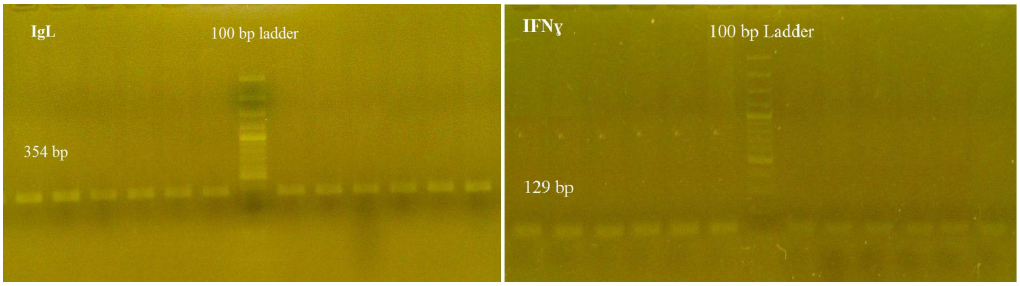


Fig. 2. PCR products for studied loci of IgL and IFNγ on %2 agarose gel with 100 bp molecular weight marker

شکل ۲- محصولات PCR برای جایگاه‌های ژنی IgL و IFNγ روی ژل آگارز دو درصد با نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز

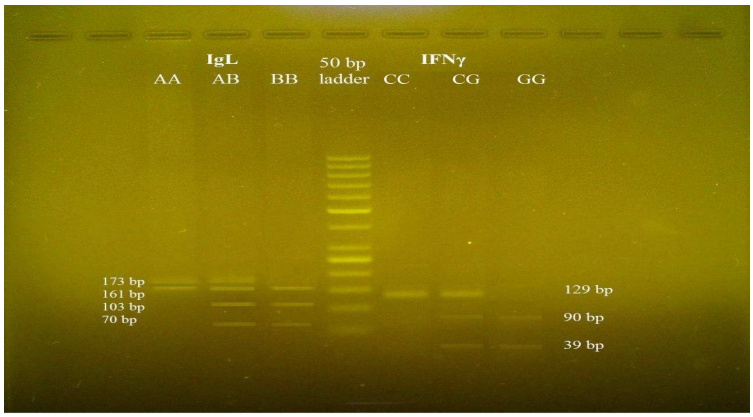


Fig. 3. Genotypic patterns obtained from enzymatic digestion of PCR products for studied loci on 4% agarose gel with 50 bp molecular weight marker

شکل ۳- الگوهای ژنوتیپی حاصل از هضمی آنزیمی محصولات PCR برای جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه روی ژل آگارز چهار درصد با نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت باز

در تحقیق حاضر برای جایگاه ژنی IgL، در کل توده‌های مرغ‌های بومی، فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب ۰/۵۸ و ۰/۴۲ و همچنین فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب ۰/۲۸، ۰/۶۰ و ۰/۱۲ برآورد شد (جدول ۲). در تمامی نژادهای مرغ بومی مورد مطالعه، فراوانی آلل A و فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت AA و هتروزیگوت AB بیشتر از نتایج تحقیق Tohidi *et al.* (2012) بودند. در تحقیق دیگر (Tohidi *et al.*, 2012)، اثرات چندشکلی جایگاه ژنی IgL را روی مقاومت به سالمونلا در دو نژاد مرغ بومی مالزی (روستایی و جنگلی) مورد بررسی قرار داده بودند. بعد از تکثیر جایگاه ژنی یاد شده (به طول ۳۵۴ جفت باز) با استفاده از آنزیم برشی *Sau96I*، قطعات تکثیر شده هضم شدند. در نتایج این تحقیق در مرغ‌های بومی روستایی، فراوانی آلل‌های A و G به ترتیب برابر با ۰/۲۰ و ۰/۸۰ و فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AG و GG به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۳۰ و ۰/۶۵ و همچنین در مرغ‌های بومی جنگلی، فراوانی آلل‌های A و G به ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۶۵ و فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AG و GG به ترتیب ۰/۱۰، ۰/۵۱ و ۰/۳۹ برآورد شد. تفاوت در فراوانی آللی و ژنوتیپی می‌تواند به تفاوت ساختار ژنتیکی افراد و همچنین به نحوه تلاقی افراد در داخل توده‌های مورد مطالعه مربوط باشد.

در مطالعه حاضر برای جایگاه ژنی IgL، در تمامی توده‌های مرغ بومی مورد مطالعه، ژنوتیپ AA دارای دو نوار ۱۷۳ و ۱۶۱ جفت بازی، ژنوتیپ AB دارای چهار نوار ۱۷۳، ۱۶۱، ۱۰۳ و ۷۰ جفت بازی و ژنوتیپ BB دارای سه نوار ۱۶۱، ۱۰۳ و ۷۰ جفت بازی بودند که با گزارش تحقیقات دیگر (Zhou *et al.*, 2001; Malek and Lamont, 2003) مطابقت داشت. این محققین چندشکلی

جایگاه ژنی IgL را روی پاسخ به آنتی‌بادی در مرغ‌های نژادهای لگهورن و فایومی مورد بررسی قرار دادند و منطقه‌ای به طول ۳۵۴ جفت باز را تکثیر و با آنزیم برشی *Sau96I* برش دادند. در نتایج تحقیقات یاد شده، وجود نوار ۱۶۱ جفت بازی و دو نوار ۱۰ جفت بازی در دو نژاد یاد شده مشترک بوده و به غیر از این نوارها در نژاد لگهورن، یک نوار اضافی به طول ۱۷۳ جفت باز و در نژاد فایومی، دو نوار اضافی دیگر به طول‌های ۱۰۳ و ۷۰ جفت باز مشاهده شده بود.

در تحقیق حاضر، در جایگاه ژنی IgL، توده‌های مرغ‌های بومی عمومی، آذربایجان غربی، مرندی و مازندرانی به ترتیب شاخص اطلاعات شانون ۰/۶۴، ۰/۶۸، ۰/۶۹ و ۰/۶۶ برآورد شد (جدول ۲). مقادیر یاد شده بیشتر از نتایج گزارش شده به وسیله محققین دیگر (Tohidi *et al.*, 2012) در مرغ بومی روستایی (۰/۴۹) بود و فقط مقدار شاخص اطلاعات شانون توده مرغ بومی عمومی کمتر از مقدار شاخص اطلاعات شانون در مرغ بومی جنگلی (۰/۶۵) مشاهده شد. این مقادیر بیانگر تنوع ژنتیکی بالای این نشانگر در توده‌های مورد مطالعه است. شاخص تثبیت برای جایگاه ژنی IgL در توده‌های مرغ‌های بومی عمومی، آذربایجان غربی، مرندی و مازندرانی به ترتیب ۰/۳۶-، ۰/۲۹-، ۰/۲۰- و ۰/۱۸- محاسبه شد (جدول ۲)، که مغایر با نتایج گزارش شده به وسیله Tohidi *et al.* (2012) در مرغ بومی روستایی (۰/۰۳) و مطابق مقدار شاخص تثبیت برای مرغ بومی جنگلی (۰/۱۱-) بود. منفی بودن شاخص تثبیت می‌تواند ناشی از کاهش هتروزیگوسیتی و افزایش هموزیگوسیتی یا افزایش هم‌خونی و همچنین انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ در توده-ها باشد. در جایگاه ژنی IgL، $\chi^2$ محاسبه شده در کل توده‌ها و همچنین در توده‌های مرغ‌های بومی نژادهای عمومی و آذربایجان غربی معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۲) که با نتایج گزارش شده به وسیله محققین دیگر (Tohidi *et al.*, 2012) (معنی‌دار نبودن $\chi^2$ برای دو توده مرغ‌های بومی روستایی و جنگلی) هم‌خوانی نداشت. با توجه به اثرات زیاد مهاجرت‌های متعدد، آمیزش‌های غیر تصادفی، رانش ژنتیکی، انتخاب و جهش روی توده‌های کوچک، این عوامل می‌توانند علت معنی‌داری $\chi^2$ و یا سبب وجود عدم تعادل در توده‌های مورد مطالعه محسوب شوند.

جدول ۲ - فراوانی آللی و ژنوتیپی و فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی IgL در توده‌های مرغ‌های بومی

Table 2. Allelic and genotypic frequencies and observed and expected heterozygosity frequencies for IgL locus in indigenous chicken populations

| | Allele and Genotype | Breed | | | | Total populations |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Common | W. Azarbaijan | Marandi | Mazandarani | |
| Allelic frequency | A | 0.65 | 0.56 | 0.50 | 0.62 | 0.58 |
| | B | 0.35 | 0.44 | 0.50 | 0.38 | 0.42 |
| Genotypic frequency ob. (ex.) | AA | 0.34 (0.42) | 0.24 (0.32) | 0.20 (0.26) | 0.34 (0.38) | 0.28 (0.34) |
| | AB | 0.62 (0.46) | 0.64 (0.50) | 0.60 (0.50) | 0.56 (0.48) | 0.60 (0.49) |
| | BB | 0.04 (0.12) | 0.12 (0.18) | 0.20 (0.24) | 0.10 (0.14) | 0.12 (0.17) |
| $\chi^2$ | | 6.24* | 4.16* | 1.80 ns | 1.59 ns | 11.65* |
| Heterozygosity (Homozygosity) observed frequency | | 0.62 (0.38) | 0.64 (0.36) | 0.60 (0.40) | 0.56 (0.44) | 0.61 (0.39) |
| Heterozygosity (Homozygosity) expected frequency | | 0.45 (0.55) | 0.49 (0.51) | 0.51 (0.49) | 0.47 (0.53) | 0.49 (0.51) |
| Shannon's Information index | | 0.64 | 0.68 | 0.69 | 0.66 | 0.67 |
| Fixation index | | -0.36 | -0.29 | -0.20 | -0.18 | -0.24 |

* Significant ($P < 0.05$)

ns: Non significant ($P > 0.05$)

برای جایگاه ژنی IFNγ، در کل توده‌های مرغ‌های بومی، فراوانی آلل‌های C و G به ترتیب ۰/۵۱ و ۰/۴۹ و فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CG و GG به ترتیب ۰/۲۱، ۰/۵۹ و ۰/۲۰ محاسبه شد (جدول ۳). کمتر بودن فراوانی‌های ژنوتیپ‌های هموزیگوت از فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت مطابق با نتایج تحقیقات قاسمیان و همکاران (۱۳۹۱) و Tohidi *et al.* (2012) بود. در تحقیق قاسمیان و همکاران (۱۳۹۱) با استفاده از آنزیم برشی *Tsp509I* چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی جایگاه ژنی IFNγ به طول ۶۷۰ جفت بازی در مرغ‌های مولد بومی مازندرانی بررسی شد. از نمونه‌های DNA، قطعه مورد نظر تکثیر و با استفاده از آنزیم یاد شده، نمونه‌های تکثیر یافته را برش دادند. در نتایج این تحقیق، دو آلل A و G به ترتیب با فراوانی ۰/۵۳ و ۰/۴۷ و همچنین سه

ژنوتیپ AA، AG و GG به ترتیب با فراوانی ۰/۳۱، ۰/۴۴ و ۰/۲۵ شناسایی شده بود. در تحقیق دیگر (Tohidi *et al.*, 2012)، جایگاه ژنی IFNγ به طول ۶۷۰ جفت باز را بعد از تکثیر به وسیله آنزیم برشی *Tsp509I* برش دادند که برای این جایگاه ژنی دو آلل A و G به ترتیب با فراوانی ۰/۵۵ و ۰/۴۵ و همچنین سه ژنوتیپ AA، AG و GG به ترتیب با فراوانی ۰/۳۲، ۰/۴۶ و ۰/۲۲ مشاهده شد. بیشتر بودن فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت احتمالاً بیانگر وجود تلاقی‌های غیر خویشاوندی در بین افراد توده‌های مورد مطالعه است. چنانچه در بخش بالا ذکر شد در تحقیق حاضر برای این جایگاه نشانگری سه نوع ژنوتیپ مورد شناسایی قرار گرفت که با تحقیق دیگر (Kramer *et al.*, 2003) مطابقت نداشت. در پژوهش Kramer *et al.* (2003)، ارتباط بین چندشکلی‌های مربوط به جایگاه ژنی IFNγ (به طول ۱۲۹ جفت باز) با پاسخ به آلودگی سالمونلایی در مرغ‌های بومی هلندی (دو گروه) و هیبرید تجاری گوشتی (سه گروه) مطالعه شد. در این مطالعه بعد از آلودگی میکروبی، نمونه‌های DNA جایگاه ژنی مورد نظر را تکثیر و با استفاده از آنزیم *Tsp509I* برش دادند. طبق بررسی‌های صورت گرفته سه نوع ژنوتیپ شناسایی شد که فراوانی متفاوتی را در بافت‌های مختلف از جمله کبد، سکوم و طحال نشان دادند. در مرغ‌های بومی هلندی فقط ژنوتیپ GG شناسایی شد و از تمامی مرغ‌های مورد مطالعه فقط شش مرغ دارای ژنوتیپ AA بودند. تفاوت در نتایج مشاهده شده در دو جایگاه ژنی مورد مطالعه در مقایسه با نتایج تحقیقات دیگر را می‌توان به تفاوت در ساختار ژنتیکی توده‌های مورد مطالعه و یا به تکنیک‌های تعیین ژنوتیپ نسبت داد.

در مطالعه حاضر، در جایگاه ژنی IFNγ، شاخص اطلاعات شانون توده‌های مرغ‌های بومی عمومی، آذربایجان غربی، مرندی و مازندرانی به ترتیب ۰/۶۹، ۰/۶۸، ۰/۶۹ و ۰/۶۸ برآورد شد (جدول ۳). مقادیر یاد شده مطابق نتایج تحقیق دیگر (Tohidi *et al.*, 2012) در مرغ بومی روستایی (۰/۶۸) و مرغ بومی جنگلی (۰/۶۹) بود. همچنین شاخص تثبیت در توده‌های مرغ‌های بومی عمومی، آذربایجان غربی، مرندی و مازندرانی به ترتیب ۰/۳۲-، ۰/۲۱-، ۰/۰۷ و ۰/۲۹- محاسبه شد (جدول ۳). شاخص‌های تثبیت محاسبه شده (به غیر از شاخص تثبیت مرغ بومی مرندی) مغایر با نتایج گزارش شده به وسیله Tohidi *et al.* (2012) در مرغ بومی روستایی (۰/۰۷) و مرغ بومی جنگلی (۰/۰۷) بود. مثبت بودن شاخص تثبیت می‌تواند بیانگر افزایش هتروزیگوسیتی و کاهش هم‌خونی در توده‌ها باشد. $\chi^2$ محاسبه شده (شاخص تعادل) برای جایگاه ژنی IFNγ در کل توده‌های مورد مطالعه و همچنین در توده‌های مرغ‌های بومی عمومی و مازندرانی معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۳) که با نتایج گزارش شده به وسیله Tohidi *et al.* (2012) (عدم معنی‌داری برای دو توده‌ی مرغ‌های بومی روستایی و جنگلی) هم‌خوانی نداشت. عدم معنی‌داری $\chi^2$ می‌تواند نشانگر وجود تعادل در توده‌های مورد مطالعه باشد.

جدول ۳- فراوانی آللی و ژنوتیپی و فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی IFNγ در توده‌های مرغ‌های بومی

Table 3. Allelic and genotypic frequencies and observed and expected heterozygosity frequencies for IFNγ locus in indigenous chicken populations

| | Allele and Genotype | Breed | | | | Total populations |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Common | W. Azarbaijan | Marandi | Mazandarani | |
| Allelic frequency | C | 0.51 | 0.44 | 0.51 | 0.56 | 0.51 |
| | G | 0.49 | 0.56 | 0.49 | 0.44 | 0.49 |
| Genotypic Frequency ob. (ex.) | CC | 0.18 (0.26) | 0.14 (0.20) | 0.24 (0.25) | 0.24 (0.32) | 0.21 (0.25) |
| | CG | 0.36 (0.50) | 0.60 (0.50) | 0.46 (0.51) | 0.64 (0.50) | 0.59(0.50) |
| | GG | 0.16 (0.24) | 0.26 (0.30) | 0.26 (0.24) | 6 (0.18) | 0.20 (0.25) |
| $\chi^2$ | | 4.81* | 2.15$^{ns}$ | 0.40$^{ns}$ | 4.16* | 6.30* |
| Heterozygosity (Homozygosity) observed frequency | | 0.66 (0.34) | 0.60 (0.40) | 0.46 (0.54) | 0.64 (0.36) | 0.59 (0.41) |
| Heterozygosity (Homozygosity) expected frequency | | 0.51 (0.49) | 0.49 (0.51) | 0.51 (0.49) | 0.49 (0.51) | 0.51 (0.49) |
| Shannon's Information index | | 0.69 | 0.68 | 0.69 | 0.68 | 0.69 |
| Fixation index | | -0.32 | -0.21 | 0.07 | -0.29 | -0.18 |

* Significant ($P < 0.05$)

ns: Non significant ($P > 0.05$)

## نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر، با وجود چندشکلی در دو جایگاه ژنی کاندیدای دخیل در مقاومت یا حساسیت در برابر بیماری‌ها، می‌توان از این جایگاه‌ها در برنامه‌های انتخاب برای افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها بهره برد. چندشکلی‌های موجود در جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه پل ارتباطی برای مطالعات بعدی جهت مطالعه پاسخ ایمنی ژنوتیپ‌های شناسایی شده در مرغ‌های بومی خواهد بود.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق با همکاری موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، معاونت امور دام جهاد کشاورزی استان آذربایجان غربی و با مساعدت و همکاری معاونت محترم پژوهشی و فن‌آوری و مدیریت آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مراغه انجام گرفت. از همکاری بی‌دریغ همه همکاران و عزیزان مراکز یاد شده کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

## فهرست منابع

پیش جنگ ج.، رحیمی میانجی ق.، حافظیان ح. و قلی‌زاده م. ۱۳۹۷. شناسایی جهش در دو ژن کاندید با پتانسیل مقاومت در برابر آنفلوانزا و سالمونلا در برخی از سویه‌های مرغ بومی و تجاری ایران. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک، ۳۱ (۲): ۵۰-۴۲.

علی‌نقی‌زاده ر.، محمد آبادی م. ر. و زکی زاده س. ۱۳۸۹. چندشکلی اگزون ۲ ژن *BMP15* در بز سرخ جبال بارز. بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲(۱): ۸۰-۶۹.

قاسمیان سوربنی ا.، رحیمی میانجی ق.، انصاری پیرسرایی ز. و کاظمی ح. ۱۳۹۱. استفاده از نشانگر آنزیمی *Tsp509I* برای شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ناحیه‌ی پروموتور ژن اینترفرون گاما در مرغ‌های مولد ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

Akdis M., Burgler S., Crameri R., Eiwegger T., Fujita H., Gomez E., Klunker S., Meyer N., O'Mahony L., Palomares O., Rhyner C., Ouaked N., Schaffartzik A., Van De Veen W., Zeller S., Zimmermann M. and Akdis C. A. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-γ: receptors, functions, and roles in diseases. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 127(3): 701-721.

Basiri R., Pish Jang J. and Ghorbani A. 2015. Genetic diversity in the mitochondrial DNA of the Iranian Common native and exotic chicken breeds. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 7(1): 537-542.

Crawford R. D. 1990. Genetics and Breeding of Poultry (Ed.), Disease Genetics. Amsterdam: Elsevier. pp. 805-846.

Hawken R. J., Beattie C. W. and Schook L. B. 1998. Resolving the genetics of resistance to infectious diseases. Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics), 17: 17-25.

Javanmard A., Mohammadabadi M. R., Zarrigabayi G. E., Gharahedaghi A. A., Nassiry M. R., Javadmansh A. and Asadzadeh N. 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.

Kramer J., Malek M. and Lamont S. J. 2003. Association of twelve candidate gene polymorphisms and response to challenge with Salmonella enteritidis in poultry. Animal Genetics, 34: 339-348.

Malek M. and Lamont S. J. 2003. Association of *INOS*, *TRAIL*, *TGF-b2*, *TGF-b3*, and *IgL* genes with response to *Salmonella enteritidis* in poultry. Genetics Selection Evolution, 35(1): 99-111.

Miller S. A., Dykes D. D. and Polesky H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16(3): 12-15.

Moazeni S., Mohammadabadi M. R., Sadeghi M., Shahrbabak H., Koshkoieh A. and Bordbar F. 2016a. Association between UCP gene polymorphisms and growth, breeding value of growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. Open Journal of Animal Sciences, 6(1): 1-8.

Moazeni S. M., Mohammadabadi M. R., Sadeghi M., Moradi Shahrbabak H. and Esmailizadeh A. K. 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.

Mohammadi A., Nassiry M. R., Mosafer J., Mohammadabadi M. R. and Sulimova G. E. 2009. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). Russian journal of genetics, 45(2): 198-202.

Mohammadifar A. and Mohammadabadi M. R. 2011. Application of microsatellite markers for a study of Kermani sheep genome. Iranian journal of Animal Science, 42(4): 337-344.

Mousavizadeh A., Mohammad Abadi M. R., Torabi A., Nassiry M. R., Ghiasi H. and Esmailizadeh A. K. 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.

Reen J. K., Sankhyan V., Katoch S. and Thakur Y. P. 2013. Candidate gene polymorphism for IL-Rγ and ChB6 gene in the indigenous chicken of North Western Himalayan State of Himachal Pradesh. Indian Poultry Science Journal, 1(2): 87-92.

Roitt I. M. 1993. Fundamental Immunology. Raven Press, New York. 80 p.

Shojaei M., Mohammadabadi M. R., Asadi Fozi M., Dayani O., Khezri A. and Akhondi M. 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Journal of Cell and Molecular Research, 2: 67-73.

Tohidi R., Idris I. B., Panandam J. M. and Bejo M. H. 2012. The effects of polymorphisms in IL-2, IFN-γ, TGF-β2, IgL, TLR-4, MD-2, and iNOS genes on resistance to Salmonella Enteritidis in indigenous chickens. Avian Pathology, 41(6): 605-612.

Yeh F. C., Rongcal Y. and Boyle T. 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.

Zamani P., Akhondi M., Mohammadabadi M. R., Saki A. A., Ershadi A., Banabazi M. H. and Abdolmohammadi A. R. 2013. Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology, 10: 1812-1817.

Zandi E., Mohammadabadi M. R., Ezzatkhah M. and Esmailizadeh A. K. 2014. Typing of toxigenic isolates of *Clostridium perfringens* by multiplex PCR in ostrich. Iranian Journal of Applied Animal Science, 4(4): 795- 801.

Zhou H., Buitenhuis A. J., Weigend S. and Lamont S. J. 2001. Candidate gene promoter polymorphisms and antibody response kinetics in chickens: Interferon-γ, Interleukin-2, and Immunoglobulin Light Chain. Poultry Science, 80: 1679-1689.

**Animal Production Research**

Vol. 8, No. 1, 2019 (67-76)

University of Guilan

## Research paper

# Identification of single nucleotide polymorphisms in IgL and IFNɣ loci in some indigenous chickens

**J. Pish Jang Aghajeri[1,2], Gh. Rahimi Mianji[3], S. H. Hafezian[4*], M. Gholizadeh[5]**

1. Ph.D Graduated in Genetics and Animal Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Department of Animal Science, Islamic Azad University, Maragheh branch, Maragheh, Iran
3. Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
4. Associate Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
5. Assistant Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

(Received: 11-04-2018 – Accepted: 25-07-2018)

**Abstract**

Genetic resistance to diseases is very important in chickens. Determining the genetic diversity of the chicken immune system is one of the main options for examining differences in resistance to diseases. Two hundred blood samples were taken from indigenous chickens populations of Common, West Azarbaijan, Marandi and Mazandarani and genomic DNA was extracted by salting out method. The allelic polymorphisms were investigated in IgL and IFNɣ loci involved in the immune system using PCR-RFLP and the *Sau96I* and *Tsp509I* enzymes. After enzymatic digestion, for IgL marker site (354 bp), three genotypes of AA, AB and BB and allele A (with two bands of 173, 161 and two bands of 10 bp) and allele B (with three bands of 161, 103 and 70 and two bands of 10 bp) and for IFNγ marker site (129 bp), three genotypes of CC, CG, and GG and allele C (with one band of 129 bp) and allele G (with two bands of 90 and 39 bp) were identified. The total populations for loci were not in Hardy-Weinberg equilibrium. The Shannon information index for markers' sites of IgL and IFNɣ (0.67 and 0.69, respectively), fixation index values (-0.24 and -0.18, respectively) and the highest observed heterozygosity index (0.61 and 0.59, respectively) was estimated. Regarding the presence of polymorphism in the studied loci, it is possible to use these candidate genes in selection programs to increase disease resistance.

**Keywords:** Polymorphism, Igl and IFNɣ loci, Indigenous chicken, PCR-RFLP

*Corresponding author: hassanhafezian@yahoo.com

doi: 10.22124/ar.2019.10115.1301