مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۴، ۴۸۹-۴۸۱
Journal of Veterinary Research. 71,4:481-489, 2016
Original Article

مطالعه تنوع ژنی مجتمع سازگاری نسجی و ارتباط آن با ژن فاکتور رشد شبه انسولینی ۱ در طیور بومی خراسان

عاطفه اسماعیل نژاد[۱*] غلامرضا نیکبخت بروجنی[۲]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ تیر ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۶ مهر ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: مجتمع سازگاری نسجی (MHC) در طیور با حساست یا مقاومت نسبت به بیماری‌ها، صفات تولیدی و تولیدمثلی در ارتباط است و تشخیص تنوع آن در جمعیت‌های در حال اصلاح نژاد می‌تواند به انتخاب جمعیت‌های مقاوم به بیماری‌ها همراه با خصوصیات تولیدی برتر کمک نماید. ارتباط MHC با صفات کمی می‌تواند به عدم تعادل پیوستگی جایگاه MHC با ژن‌های اصلی کنترل‌کننده صفات کمی مربوط باشد. **هدف:** بررسی تنوع ژن‌های MHC و احتمال پیوستگی آن با ژن فاکتور رشد شبه انسولینی ۱ (IGF۱) در جمعیت طیور بومی خراسان. **روش کار:** در مطالعه حاضر تعداد ۳۱۳ نمونه DNA مربوط به جمعیت طیور بومی خراسان آزمایش شدند. به منظور تعیین ژنوتیپ‌های MHC از ریزماهواره LEI۰۲۵۸ و روش تحلیل قطعه‌ای استفاده شد. تنوع تک نوکلئوتیدی (SNP) در ناحیه UTR- ۵' ژن IGF۱ با کمک آزمون RFLP و آنزیم محدودیت PstI مورد بررسی قرار گرفت. پیوستگی بین دو جایگاه ژنتیکی MHC و IGF۱ نیز با با کمک نرم‌افزار SAS/Genetics و آزمون نسبت درست نمایی مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** در جمعیت طیور بومی خراسان در مجموع ۲۵ آلل (۱۸۵ تا ۴۹۳ جفت باز) و ۷۶ ژنوتیپ از ریزماهواره LEI۰۲۵۸ تشخیص داده شد. دو آلل (PstI -) A و (PstI +) B و سه ژنوتیپ (AA، AB و BB) نیز برای ژن IGF۱ شناسایی شدند. در جمعیت حاضر عدم تعادل پیوستگی بین دو جایگاه ژنتیکی MHC و IGF۱ مشاهده شد (p=۰/۰۰۸۳). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این مطالعه بیانگر تنوع ژنتیکی بالای MHC در جمعیت طیور بومی خراسان و نشان‌دهنده اهمیت این توده بومی به عنوان یک ذخیره ژنتیکی ارزشمند است. نتایج مطالعه پیوستگی ژنی موید فرضیه ارتباط MHC با صفات تولیدی از طریق پیوستگی آلل‌های MHC با ژن‌های کنترل‌کننده این صفات است.

واژه‌های کلیدی: مجتمع سازگاری نسجی، IGF۱، پیوستگی ژنی، طیور بومی

مقدمه

صنعت طیور یکی از مهم‌ترین منابع تأمین غذا در سراسر دنیا بوده و از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. گوشت و تخم طیور یکی از مهمترین منابع پروتئینی در جهان هستند و پیش‌بینی شده که گوشت طیور پرمصرف‌ترین گوشت در ۱۰ تا ۲۰ سال آینده خواهد بود (۶). سازمان خواروبار و کشاورزی (FAO) پیش‌بینی کرده است که تا سال ۲۰۳۰ میلادی، تولیدات طیور سالیانه یک رشد ۲/۵ درصدی در کشورهای توسعه یافته و ۳/۴ درصدی در کشورهای در حال توسعه خواهد داشت. این رشد دلایل مختلفی دارد که از این جمله می‌توان به بهبود دستگاه‌های مدیریت، افزایش سطح بهداشت، بهبود واکسیناسیون و معرفی هیبریدهای تجاری به فارم‌ها اشاره کرد (۲۵). در طی چهار دهه گذشته صنعت طیور به سمت انتخاب لاین‌های تجاری با رشد و تولید بیشتر و ضریب تبدیل کمتر پیش رفته است. اگرچه روش سنتی انتخاب بر مبنای صفات فنوتیپی در نژادهای گوشتی باعث بهبود رشد و افزایش تولید در طی نیم قرن اخیر شده است، اما متأسفانه این روش‌های اصلاح نژادی با کاهش تنوع ژنتیکی و ضعف کلی در دستگاه ایمنی طیور همراه بوده است (۱۳،۳۳). کاهش تنوع، تحقیقات نوین پیرامون گونه‌های مختلف طیور را محدود خواهد ساخت. نکته مهم تر جمعیت‌هایی هستند که از نظر ژنتیکی یکسان و توان مقابله با بیماری‌های جدید را ندارند. این امر خطری جدی برای صنعت طیور محسوب می‌شود (۱۰،۲۸).

توده‌های بومی به عنوان یکی از مهمترین ذخایر ژنتیکی هر مرز و بوم، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. در سرتاسر دنیا، جمعیت‌های بومی متعددی از طیور با خصوصیات فنوتیپی منحصر به فرد و در نتیجه انتخاب و اهلی‌سازی آن‌ها ایجاد شده است (۴). خصوصیات منحصر به فرد این توده‌ها مانند تنوع ژنتیکی بالا، مقاومت طبیعی به بیماری‌ها، طول عمر بیشتر و نیاز غذایی کمتر، آن‌ها را نسبت به نژادهای تجاری متمایز می‌نماید. این جمعیت‌ها در نتیجه مواجهه مکرر با پاتوژن‌ها و عوامل بیماریزای محیطی در طی قرن‌ها، نسبت به بسیاری از بیماری‌های بومی مقاومت ژنتیکی پیدا کرده و در مقایسه با طیور تجاری نیاز کمتری به انواع درمان و واکسیناسیون دارند (۳۰،۳۵). بنابراین، داشتن اطلاعات جامع از پتانسیل ژنتیکی نژادهای بومی، به منظور ارزیابی توانایی‌های جمعیت‌ها در بهبود و گسترش تولید در آینده، نیاز هر جامعه‌ای است (۳۷).

اهمیت صنعت طیور از نظر اقتصادی، صاحب‌نظران را به سمت این نکته سوق داده است که برای بهینه‌سازی و انتخاب بهتر، توجه بیشتری به عوامل ژنتیکی داشته باشند و با بهره‌گیری از این عوامل در جهت ایجاد لاین‌های مقاوم به بیماری‌ها، با پاسخ‌دهی بهتر به واکسن‌ها و صفات تولیدی برتر تلاش کنند (۲۸،۳۳). در راستای بهبود صفات تولیدی همراه

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۷۱-۳۶۱۳۸۶۹۰ نمابر: ۰۷۱-۳۲۲۸۶۹۴۰ Email: Esmailnejad82@gmail.com

با افزایش مقاومت به بیماری در جمعیت‌ها، استفاده از نشانگرهای ملکولی که با هر دوی این صفات مرتبط هستند سودمند خواهد بود. از این نشانگرها می‌توان به منظور معرفی و یا حفظ و بقای آلل‌های سودمند و بهبود صفات با وراثت‌پذیری بالا در فرایند "انتخاب بر اساس نشانگر" استفاده کرد (۳،۵).

یکی از مهمترین نشانگرهای ژنتیکی، مجتمع سازگاری نسجی (MHC) است که نقش آن در کنترل بسیاری از بیماری‌ها (باکتریایی، ویروسی و انگلی) و بهبود بسیاری از صفات تولیدی و تولیدمثلی مشخص شده است (۷،۲۹،۳۴). خوشه ژنی MHC در طیوربه شکلی بسیار متراکم بر روی میکروکروموزوم ۱۶ واقع شده است و تنها ژن‌های ضروری را دارا می‌باشد (۲۳). ژن‌های MHC در طیوربا مقاومت یا حساسیت نسبت به تعدادی از پاتوژن‌های باکتریایی و ویروسی در ارتباط بوده وبه علاوه، بسیاری از خصوصیات دیگر غیروابسته به ایمنی از جمله صفات تولیدی و تولیدمثلی نیز در طیور توسط این خوشه ژنی کنترل می‌شوند (۸،۱۱،۱۴،۱۶،۳۹). مطالعات نشان می‌دهند که انتخاب جمعیت‌های طیور بر اساس رشد بیشتر، تولید بالاتر، صفات تولیدمثلی برتر و مقاومت بیشتر نسبت به بیماری‌ها، فراوانی هاپلوتیپ‌های MHC را در آن‌ها تغییر داده است (۳۱،۳۲). امروزه 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 (۸).

برای ارتباط بین هاپلوتیپ‌های MHC و صفات تولیدی فرضیه‌های مختلفی مطرح شده است. Lunden و همکاران در سال ۱۹۹۳ و Ewald و همکاران در سال ۲۰۰۷ در فرضیه‌ای علت این ارتباط را عدم تعادل پیوستگی (Linkage disequilibrium) جایگاه ژنی MHC با ژن‌های اصلی و یا فرعی کنترل‌کننده این صفات کمی (Quantitative trait loci (QTLs)) دانسته‌اند (۸،۱۹). هورمون رشد شبه انسولینی ۱ (IGF۱) یک تنظیم کننده رشد، تکثیر، تمایز سلولی و سنتز پروتئین در انواع رده‌های مختلف سلولی است. بخش اعظم فعالیت‌های هورمون رشد نیز در طیور با واسطه IGF۱ صورت می‌گیرد. مطالعات متعددی نشان می‌دهند که تنوع ژنیIGF۱ با خصوصیات تولیدی و تولیدمثلی مختلفی در طیور همراه بوده و این ژن می‌تواند به عنوان یک QTL اصلی کنترل کننده صفات تولیدی، نشانگر مناسبی برای مطالعه این صفات و بررسی ارتباط آن‌ها با MHC باشد (۱۳،۱۷،۳۶).

هدف از مطالعه حاضر بررسی تنوع ژنتیکیMHC و پیوستگی آن با ژن IGF۱، در جمعیت طیور بومی خراسان است. جمعیت مذکور به مدت ۸ نسل تحت برنامه‌های اصلاح نژادی به منظور بهبود و افزایش صفات تولیدی قرار داشته‌اند. جهت بررسی تنوع MHC از نشانگر ریزماهواره LEI۰۲۵۸ استفاده شده است که در میکروکروموزوم ۱۶ و در ناحیه خوشه ژنی MHC قرار دارد (۹).

مواد و روش‌کار

نمونه‌گیری و استخراج DNA: در این مطالعه ۳۱۳ نمونه خون کامل از مرکز اصلاح نژاد و پشتیبانی مرغ بومی خراسان رضوی و بر اساس فرمول ارائه شده توسط Bashalkhanov و همکاران در سال ۲۰۰۹ تهیه شد (۲). فعالیت‌های اصلاح نژادی این مرکز از سال ۱۳۸۵ و به منظور حفظ وحراست از ذخایر پرارزش ژنتیکی مرغ بومی، بررسی وشناسایی پتانسیل تولیدی، اصلاح نژاد و بهبود صفات تولیدی در مرغ بومی خراسان آغاز شده است. در حال حاضر جمعیت این مرکز به مدت ۸ نسل تحت برنامه اصلاح نژاد به منظور افزایش تعداد تخم مرغ، افزایش وزن تخم مرغ و کاهش سن بلوغ جنسی و افزایش وزن بدن در هنگام بلوغ جنسی قرار دارند. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در لوله‌های حاوی EDTA و در دمای ۲۰C°- نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (BIONEER، کره) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب به کمک روش‌های اسپکتروفتومتری و ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تعیین ژنوتیپ‌های MHC: تعیین ژنوتیپ‌های MHC با استفاده ازنشانگر ریزماهواره LEI۰۲۵۸ و به کمک روش تحلیل قطعه‌ای انجام شد. برای تکثیر این نشانگر، ابتدا آغازگر رشته پیشروی مرتبط با ریزماهواره LEI۰۲۵۸ با رنگ فلورسنت FAM-۶ نشاندار شده (رنگ به قسمت'۵ آغازگر متصل می‌شود) و سپس در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت. واکنش در حجم نهایی ۲۵µl شامل DNA ۲۰ng ژنومی، ۱۰ pm از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی ریزماهواره مذکور ، ۱/۵mM کلرید منیزیم، ۲۵۰µM از هر یک از بازهای آلی (dNTP)، بافر ۱x (۲۰ mM Tris-HCl, pH ۸/۴, ۵۰ mM KCl) و یک واحد آنزیم پلی‌مراز Taq (Fermentas، آلمان) صورت گرفت. چرخه‌های دمایی شامل یک مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، ۳۵ چرخه سه مرحله‌ای، شامل مرحله واسرشته سازی در دمای ۹۲°C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۷°C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و در انتها یک مرحله بسط انتهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه بود. آغازگرهای ریزماهواره LEI۰۲۵۸ طبق گزارش McConnell و همکاران در سال ۱۹۹۹ (به شماره دسترسی Z۸۳۷۸۱ در بانک ژن) مورد استفاده قرار گرفتند (۲۲). پس از تکثیر آلل‌های ریزماهواره LEI۰۲۵۸ با آغازگر نشاندار، ۵µl از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز ۴٪ به مدت ۳ ساعت الکتروفورز شد. پس از مشاهده باند قوی و مناسب، نمونه‌ها برای انجام تحلیل قطعه‌ای انتخاب شدند. به منظور انجام تحلیل قطعه‌ای، ۰/۵µl از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۰/۵µl از نشانگر وزنی(Gene Scan 500 LIZ Size standadrd, GS۵۰۰LIZ (Applied Biosystems و ۹µl فرمامید ترکیب شد و ۳ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار گرفتند. قطعات DNA تک‌رشته‌ای بلافاصله به

روی یخ انتقال داده شده و با استفاده از دستگاه آنالایزر ژنتیکی ABI ۳۱۳۰ تفکیک شدند (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). در نهایت نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار Peack scanner نسخه ۱/۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۹).

تعیین ژنوتیپ‌های IGF۱: قطعه ۶۲۱ جفت بازی مربوط به ناحیه غیرترجمه شونده سمت '۵ (UTR '۵) ژن IGF۱ با کمک آغازگرهای '۵-GACTATACAGAAAGAACCCAC-۳' و '۵-TCACTCAAGTGGCTCAAGGT-۳' افزوده‌سازی شد. واکنش در حجم نهایی ۲۵µl شامل DNA ۵۰ng ژنومی، ۱۰pm از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی IGF۱، ۲mM کلرید منیزیم، ۲۰۰µM از هر یک از بازهای آلی (dNTP)، بافر ۱x (mM Tris-HCl, ۸/۴, ۵۰ mM KCl ۲۰ pH) و یک واحد آنزیم پلی‌مراز Taq (Fermentas، آلمان) انجام شد. چرخه‌های دمایی شامل یک مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه سه مرحله‌ای، شامل مرحله واسرشته سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۷°C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه و در انتها یک مرحله بسط انتهایی در دمای ۷۲°Cبه مدت ۱۰ دقیقه است. در نهایت ۵µl از محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۲٪ (در بافر ۱X TBE) الکتروفورز شده و کیفیت محصول PCR برای مراحله بعد مورد ارزیابی قرار گرفت. تنوع تک نوکلئوتیدی (SNP) در ناحیه '۵ UTR ژن IGF۱ با کمک آزمون RFLP و آنزیم محدودیت PstI شناسایی شد. هضم آنزیمی بر روی ۵ µl از محصول PCR مرحله قبل همراه با دو واحد آنزیم PstI (Roche، آلمان) به مدت یک شب در دمای ۳۷°C درجه صورت گرفت. قطعات حاصل از برش آنزیمی بر روی ژل اکریل آمید ۱۰٪ (در بافر ۱X TBE) به مدت ۹۰ دقیقه با اختلاف پتانسیل ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. سپس رنگ‌آمیزی انجام گرفت. تصاویر به دست آمده از ژل‌ها به کمک نرم افزارPhotocapture نسخه ۹۹/۰۳ آنالیز و طول قطعات بریده شده تعیین گردید (۲۶). برای تأیید نتایج RFLP، از هر یک از پروفایل‌های حاصله دو نمونه خالص‌سازی شده (Macrogen، کره) و جهت تعیین توالی مستقیم ارسال شد. تعیین توالی با استفاده از روش سنجر و دستگاه آنالایزر ژنتیکی ABI۳۷۳۰ انجام شد (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). توالی‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزارهایCLC sequence viewer ۶/۷ و Bio edit با یکدیگر و با توالی‌های مرجع وب سایت NCBI هم ردیف و مقایسه شدند.

تحلیل ژنتیک جمعیت: آلل‌های ریزماهواره LEI۰۲۵۸ و ژن IGF۱ بر اساس اندازه (جفت باز) شناسایی شدند. تعداد آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مشاهده شده، فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها، محتوای اطلاعات پلی‌مرفیسم (PIC)، میزان هتروزیگوسیتی و هوموزیگوسیتی مورد مشاهده و مورد انتظار برای هر ژن بطور جداگانه توسط نرم افزار POP GENE نسخه ۱/۳۲ مورد ارزیابی قرار گرفت (۴۰). انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ (HWE) در هر جایگاه با استفاده از آزمون دقیق فیشر و با استفاده از نرم‌افزار SAS/Genetics بررسی شد (SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.). عدم تعادل پیوستگی (LD) بین دو جایگاه ژنتیکی LEI۰۲۵۸ و IGF۱ نیز با کمک نرم‌افزار SAS/Genetics و آزمون نسبت درست نمایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

در بررسی تنوع MHC در ۳۱۳ نمونه متعلق به جمعیت طیور بومی خراسان، ۲۵ آلل از ریزماهواره LEI۰۲۵۸ (۱۸۵ تا ۴۹۳ جفت‌باز) مشاهده شد که نشان دهنده تنوع بالای MHC در این جمعیت است. آلل ۳۶۱ ریزماهواره LEI۰۲۵۸ بیشترین فراوانی (۲۶/۴۴٪) و آلل‌های ۲۰۷ و ۲۶۲ کمترین فراوانی (۰/۱۶٪) را در جمعیت نشان دادند (جدول ۱). به لحاظ هم

جدول ۱. فراوانی آلل‌های ریزماهواره LEI۲۵۸ و ژنIGF۱ در طیور بومی خراسان.

جایگاه‌ژنتیکی	آلل(bp)	فراوانی(٪)	خطای استاندارد	فاصله اطمینان ۹۵٪	
	۱۸۵	۰/۳۲	۰/۰۰۲۳	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۸۰
	۱۹۴	۱۱/۳۸	۰/۰۱۲۳	۰/۰۹۱۳	۰/۱۳۹۹
	۲۰۷	۰/۱۶	۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۴۸
	۲۲۰	۷/۵۳	۰/۰۱۱۱	۰/۰۵۴۳	۰/۰۹۹۴
	۲۴۶	۳/۲۱	۰/۰۰۶۹	۰/۰۱۷۷	۰/۰۴۶۵
	۲۵۰	۰/۴۸	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۰۰	۰/۰۱۱۲
	۲۵۴	۰/۳۲	۰/۰۰۲۳	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۸۰
	۲۶۲	۰/۱۶	۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۴۸
	۲۶۵	۲/۸۸	۰/۰۰۶۶	۰/۰۱۶۱	۰/۰۴۱۷
	۲۶۶	۰/۶۴	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۱۶	۰/۰۱۲۹
	۲۹۷	۰/۹۶	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۳۲	۰/۰۱۷۶
	۳۱۰	۶/۲۵	۰/۰۱۰۲	۰/۰۴۴۷	۰/۰۸۳۱
	۳۱۱	۴/۱۷	۰/۰۰۸۵	۰/۰۲۵۶	۰/۰۵۹۳
	۳۱۳	۲۳/۵۶	۰/۰۱۵۷	۰/۲۰۵۱	۰/۲۶۶۹
	۳۲۵	۰/۳۲	۰/۰۰۲۳	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۸۰
	۳۴۵	۰/۶۴	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۱۶	۰/۰۱۲۹
LEI۰۲۵۸	۳۵۰	۰/۸۰	۰/۰۰۳۶	۰/۰۰۱۶	۰/۰۱۶۰
	۳۶۱	۲۶/۴۴	۰/۰۱۷۴	۰/۲۲۹۹	۰/۲۹۷۱
	۳۸۱	۰/۴۸	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۰۰	۰/۰۱۱۲
	۳۸۴	۱/۱۲	۰/۰۰۴۲	۰/۰۰۳۲	۰/۰۱۹۲
	۳۹۴	۱/۶۰	۰/۰۰۵۰	۰/۰۰۸۰	۰/۰۲۷۲
	۴۲۵	۲/۵۶	۰/۰۰۶۲	۰/۰۱۴۵	۰/۰۳۹۹
	۴۳۶	۱/۹۲	۰/۰۰۵۴	۰/۰۰۹۶	۰/۰۳۰۴
	۴۵۱	۱/۱۲	۰/۰۰۴۲	۰/۰۰۳۲	۰/۰۲۰۹
	۴۹۳	۰/۹۶	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۳۲	۰/۰۱۷۶
IGF۱	A	۳۹/۹۴	۰/۰۱۶۵	۰/۳۶۷۴	۰/۴۲۹۷
	B	۶۰/۰۶	۰/۰۱۶۵	۰/۵۷۰۳	۰/۶۳۲۶

جدول ۲. هتروزیگوسیتی و هوموزیگوسیتی مورد مشاهده و مورد انتظار و آزمون تعادل هاردی-وینبرگ در طیور بومی خراسان. ۱) Observed homozygosity. ۲) Observed heterozygosity. ۳) Expected homozygosity. ۴) Expected heterozygosity. ۵) Hardy-Weinberg equilibrium.

جایگاه ژنتیکی	تعداد نمونه	تعداد آلل	هموزیگوسیتی مورد مشاهده[1] (٪)	هتروزیگوسیتی مورد مشاهده[2] (٪)	هموزیگوسیتی مورد انتظار[3] (٪)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار[4] (٪)	HWE[5] p value
LEI۰۲۵۸	۶۲۶	۲۵	۱۲/۷۸	۸۷/۱۸	۱۵/۱۴	۸۴/۸۶	۰/۲۳۸۰
IGF۱	۶۲۶	۲	۳۷/۷۰	۶۱/۹۸	۵۷/۸۸	۴۸/۱۲	<۰/۰۰۰۱

جدول ۳. آزمون عدم تعادل پیوستگی بین دو جایگاه ژنی LEI۰۲۵۸ و IGF۱ در طیور بومی خراسان. ۱) Degree of freedom. ۲) p<۰/۰۵ معنی‌دار است.

فرضیه	درجه آزادی[1]	Log Like	مربع کای	p value[2]
عدم وجود ارتباط= H۰	۲۵	-۱۵۳۹		
وجود ارتباط آللی= H۱	۴۸	-۱۵۱۸	۴۲/۳۴۱۱	۰/۰۰۸۳

بـارز بودن آلل‌های ریزماهواره، از مجموع ۲۵ آلل، ۷۶ ژنوتیپ (۶ ژنوتیپ هوموزیگوت و ۷۰ ژنوتیپ هتروزیگوت) مشاهده شد که ژنوتیپ ۳۱۳/۳۶۱ بیشترین فراوانی (۱۶/۳۵٪) را دارا بود. بررسی جمعیت طیور بومی خراسان درصـد بالایی از هتروزیگوسـیتی را نشـان می‌دهد، به طـوری که ۸۷٪ جمعیت در این جایگاه ژنتیکی هتروزیگوت بودند. با بررسی تعادل هاردی-وینبرگ در جایگاه LEI۰۲۵۸ با استفاده از آزمون فیشر انحراف معنی‌داری از تعادل در این جایگاه مشـاهده نشد و جمعیت در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشت (p=۰/۲۳۸) (جدول ۲).

بررسـی تنوع تک نوکلئوتیـدی در قطعه ۶۲۱ جفت‌بـازی مربوط به ناحیـه 5' UTR ژن IGF۱، یک جایگاه برش آنزیـم PstI را در این ناحیه نشان می‌دهد که SNP در آن منجر به ایجاد آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف می‌شـود. نتایج تعیین توالی این قطعه نشان می‌دهد جایگزینی نوکلئوتید تیمین (T) به جای سیتوزین (C) در موقعیت ۲۵۷ باعث از بین رفتن جایگاه برش آنزیم شده و الگوی متفاوتی در RFLP ایجاد می‌کند. با کمک آزمون RFLP دو آلـل A (۶۲۱ جفت باز) و B (۲۵۷+۳۶۴ جفت‌باز) و سـه ژنوتیپ AA (۶۲۱ جفت‌بـاز)، AB (۶۲۱+۲۵۷+۳۶۴ جفت‌بـاز) و BB (۲۵۷+۳۶۴ جفت باز) در جمعیت مشـاهده شـد. فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب ۴۰ و ۶۰٪ و ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب ۹، ۶۲ و ۲۹٪ بوده اسـت (جدول ۱). توالی ژن IGF۱ در جمعیت حاضر مشـابه با سایر جمعیت‌های دنیـا بـوده و تفاوتی با گزارش‌های بانک ژن نداشـت. در مورد این جایگاه نیز درصد بالای هتروزیگوتـی (۶۲٪) و انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ (p<۰/۰۰۰۱) در جمعیت طیور بومی خراسان دیده شد (جدول ۲).

در مطالعه پیوسـتگی ژنی نیز عدم تعادل پیوستگی قابل ملاحظه‌ای بین دو جایگاه ژنتیکیLEI۰۲۵۸ وIGF۱ در جمعیت طیور بومی خراسـان مشاهده شد (p=۰/۰۰۸۳) (جدول ۳).

بحث

انتخاب ژنتیکی یکـی از روش‌های کاربردی برای بهبود خصوصیات تولیدی در حیوانات در چند سـال اخیر بوده است. شناسایی پیوستگی بین نشانگرهای ژنتیکی و جایگاه‌های کنترل کننده صفات فنوتیپی، در فرایند انتخاب بر اسـاس نشانگر سـودمند خواهد بود. اگر یک نشانگر DNA با ژن‌هـای اصلی کنترل کننده این صفات پیوسـتگی داشـته باشـد، آنگاه آلل‌های مختلف این نشانگر با اثرات مختلف این ژن‌ها بر صفت مورد نظر، همراه خواهند بود. از نشـانگرهایی کـه در ارتباط نزدیک با ژن‌های اصلی کنترل‌کننده این صفات هستند می‌توان در جهت انتخاب و بهبود صفات در جمعیت‌ها بهره برد (۳،۵).

یکـی از مهمتریـن و مؤثرتریـن جایگاه‌های ژنتیکـی کنترل کننده صفات در طیور خوشـه ژنی MHC بوده که نقش آن در بهبود بسیاری از صفات تولیدی و تولیدمثلی از جمله وزن بدن، میزان تخمک‌گذاری، تولید تخم‌مـرغ، وزن تخم‌مرغ، میزان باروری، میزان جوجه‌درآوری، سـن بلوغ جنسـی و وزن بدن در هنگام رسـیدن به بلوغ جنسی مشخص شده است (۱۱،۲۱،۲۹،۳۴). لازم بـه ذکر اسـت که برخی از این ارتباطات ذکر شـده بین MHC و صفات تولیدی، اختصاصی نژاد بوده و ممکن است در سایر جمعیت‌ها مشـاهده نشوند. به علاوه زمینه ژنتیکی جمعیت و تعامل آن با MHC نیز در برقراری این ارتباطات نقش بسـیار مهمی دارد. بنابراین، در صورت نیاز به طراحی یک برنامه اصلاح نژاد بر مبنای ژنتیک برای جمعیت مدنظر، باید ابتدا خصوصیات ژنتیکی و تنوع MHC و همچنین ارتباط آن با صفات تولیدی را در جمعیت مذکور به طور دقیق مطالعه نمود تا بتوان برای نسل‌های آینده برنامه‌ریزی دقیقی داشت (۳۱).

در تحقیق حاضر به بررسـی تنوع MHC در طیور بومی خراسـان با استفاده از ریزماهواره LEI۰۲۵۸ پرداخته شده است. ریزماهواره LEI۰۲۵۸ در میکروکروموزوم ۱۶ طیورو در مجاورت ژن‌های MHC قرار گرفته است. میزان پلی‌مورفیسـم و تنوع آللی در ژنوتیپ‌هـای این ریزماهواره می‌تواند شـاهدی بر تنوع در هاپلوتیپ‌های خوشه ژنی MHC باشـد (۲۷،۳۵). در جمعیت مورد مطالعه ۲۵ آلل و ۷۶ ژنوتیپ مربوط به این ریزماهواره شناسایی شد که نشان دهنده تنوع بالای MHC در این جمعیت است.تنوع MHC در طیور بومی خراسان (۲۵ آلل) مشابه با سایر جمعیت‌های بومی از جمله طیـور بومی مرندی (۲۳ آلل) ویتنـام (۲۴ آلل)، تانزانیا (۲۳ آلل)، چین (۲۰ آلل)، تایوان (۱۶ آلل) و برزیل (۱۵ آلل) و متفاوت از جمعیت‌های تجاری (۳ تا ۵ آلل) است (۴،۱۲،۱۸،۲۰،۲۹،۳۴). میزان بالای هتروزیگوسیتی (۸۷٪) در جمعیت طیور بومی خراسـان نیز مشابه با طیور بومی تانزانیا (۸۶/۴٪)، ویتنام (۹۱٪) و مرندی (۸۱٪) و بالاتر از طیور گوشتی آرین (۳۴٪) بوده است (۲۷،۳۲). نتایج مربوط به تعداد آلل‌ها و همچنین میزان هتروزیگوسیتی در

جمعیت طیور بومی خراسان نشان می‌دهد که این جمعیت تنوع ژنتیکی بسیار بالایی در ناحیه خوشه ژنی MHC داشته و می‌تواند به عنوان یک ذخیره ژنتیکی ارزشمند در برنامه‌های حفظ و اصلاح نژاد مدنظر قرار گیرد.

ژن IGF۱ در کروموزوم ۱ طیور و در ناحیه‌ای که جایگاه‌های کنترل کننده رشد قرار گرفته‌اند، واقع شده است. تأثیر فاکتورهای رشد شبه انسولینی بر صفات تولیدی و تولیدمثلی در طیور حاصل مطالعاتی است که مقادیر مختلفی از فاکتورهای رشد شبه انسولینی، هورمون رشد و گنادوتروپین را به طیور تزریق کرده و اثرات آن‌ها را بر صفات مختلف مورد بررسی قرار دادند. اولین بار Nagaraja و همکاران در سال ۲۰۰۰ تنوع ناحیه غیر ترجمه شونده سمت '۵ ژن IGF۱ را در نژاد لگهورن سفید با استفاده از آنزیم PstI مورد بررسی قرار دادند و استفاده از روش RFLP و آنزیم محدودیت PstI را به عنوان یک روش مناسب جهت ژنوتایپینگ IGF۱ معرفی کردند (۲۶). در این تحقیق نیز تنوع ناحیه UTR '۵ ژن IGF۱ در جمعیت طیور بومی خراسان با استفاده از این روش مورد بررسی قرار گرفت و دو آلل A (PstI–) و B (PstI+) به ترتیب با فراوانی ۴۰ و ۶۰٪ و سه ژنوتیپ PstI (+/+)، PstI (–/+) وPstI (–/–) در جمعیت شناسایی شد. Nagaraja و همکاران در سال ۲۰۰۰ ارتباط تنوع ژنی IGF۱ را با چند صفت فنوتیپی مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند آلل B (PstI+) بیشترین فراوانی (۰/۸۳) را داشته و ژنوتیپ‌های PstI (+/+) و PstI (–/+) با افزایش میانگین وزن تخم‌مرغ و ژنوتیپ PstI (–/+) با افزایش وزن و استحکام پوسته تخم‌مرغ همراه بوده‌اند (۲۶).

در مطالعه‌ای که توسط Kim و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی ۱۰۴ نمونه از جمعیت بومی کره (KNOC) انجام شده است، بر خلاف جمعیت ماکیان بومی خراسان آلل A (PstI–) و ژنوتیپ A/A فراوانی بیشتری داشته است. در این مطالعه ژنوتیپ B/B با افزایش تولید تخم‌مرغ در ۵۰ هفتگی همراه بود (۱۵). Tang و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز تنوع ژن‌های IGF۱ و IGF۲ و همچنین ارتباط آن‌ها با برخی صفات تولیدی و تولیدمثلی را در دو جمعیت بومی چین (Beijing و Silkies) مورد بررسی قرار دادند. فراوانی آلل‌های A و B در نژاد Silkies به ترتیب ۴۵ و ۵۵٪ و در نژاد Beijing به ترتیب ۱۰۰ و صفر بوده است. نتایج این مطالعه ارتباط بین آلل A (PstI–) ژن IGF۱ را با افزایش وزن بدن و همچنین افزایش طول و ضخامت ساق پا، در نژاد Silkies نشان داد (۳۶).

Li و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطالعه‌ای بر روی ۱۲۰نمونه از جمعیت بومی چین (Wenchang) انجام دادند. فراوانی آلل‌های A و B در جمعیت مورد مطالعه به ترتیب ۵۳ و ۴۷٪ بوده و ارتباط معنی‌داری بین آلل B (PstI+) با افزایش تعداد تخم‌مرغ و افزایش طول دوره تخم‌گذاری بدست آمد (۱۷). مطالعه دیگری نیز بر روی همین جمعیت (Wenchang) توسط Li و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت و ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ A/B از IGF۱ با افزایش وزن و استحکام پوسته تخم‌مرغ گزارش شد. در مطالعه‌ای که در ایران توسط Abbasi و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی نژاد بومی مازندران انجام شده است نیز دو آلل و سه ژنوتیپ برای ژن IGF۱ مشاهده شد. جمعیت بومی مازندران از شهرها و روستاهای شمال کشور جمع‌آوری شده و در مرکز اصلاح نژاد نگهداری می‌شوند. در جمعیت بومی مازندران نیز مشابه جمعیت خراسان آلل B (۵۱٪) و ژنوتیپ A/B (۵۰/۲۳٪) بیشترین فراوانی را داشته‌اند (۱).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که تنوع ژنیIGF۱ با خصوصیات تولیدی و تولیدمثلی مختلفی همراه بوده و پیشنهاد شده است که این ژن می‌تواند در یک ارتباط نزدیک (پیوستگی) با ژن‌های اصلی کنترل کننده رشد و تولید تخم‌مرغ در طیور باشد (۱۷،۲۶،۳۶). نکته مهم آنکه عدم تعادل پیوستگی غالباً برای ژن‌هایی مطرح می‌شود که از نظر فیزیکی به هم پیوسته‌اند و به نظر می‌رسد که بررسی عدم تعادل پیوستگی بین ژن‌های واقع در کروموزوم‌های متفاوت (MHC کروموزوم ۱۶ و IGF۱ کروموزوم ۱) امکان پذیر نیست. بر اساس تعریف، عدم تعادل در پیوستگی ژن‌ها الزاماً به پیوستگی فیزکی آن‌ها مربوط نیست، اگر چه به طور معمول ژن‌های مجاور هم در عدم تعادل پیوستگی بیشتری قرار دارند (۲۴). در اینجا عدم تعادل پیوستگی ژن‌های MHC و IGF۱ نمی‌تواند به جایگاه ژنتیکی آن‌ها مرتبط باشد چرا که بر روی کروموزوم‌های متفاوتی قرار دارند، ولی می‌تواند حاصل انتخاب طبیعی برای همگامی تولید و سلامت باشد. به عبارتی حیواناتی که تولید بالایی دارند، به دلیل مصرف انرژی برای تولید، انرژی کمتری برای پاسخ‌های ایمنی دارند. این حقیقت پیش از این در مورد طیور تجاری نشان داده شده است، به گونه‌ای که توان بالای تولید می‌تواند باعث کاهش ایمنی شود، ولی افزایش توان ایمنی الزاماً باعث کاهش تولید نخواهد شد (۳۸). از اینرو می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً ژن‌های مرتبط با ایمنی و مقاومت بیشتر، و یا حتی مناسب با شرایط زیست محیطی، همزمان با دسته‌ای از ژن‌های مرتبط با تولید به ارث رسیده‌اند تا تعادل بین ایمنی و تولید حفظ گردد. با این توصیف، ژن‌های مرتبط با تولید بالا که بر روی پاسخ‌های ایمنی اثری منفی دارند در طی نسل‌های متمادی حذف شده‌اند.

لازم به ذکر است این مشاهدات بیشتر بر روی جمعیت‌هایی قابل انجام است که تحت تأثیر روش‌های انتخابی طبیعی قرار دارند.این خود دلیلی برای توجه بیشتر به ذخایر بومی کشور است. طیور بومی خراسان اگر چه در مرکز اصلاح نژاد و تحت نظارت متخصصین اصلاح نژاد قرار دارندولی هنوز هویت ژنتیکی آن‌ها حفظ شده (در تعادل هاردی وینبرگ قرار دارند) و در مراحل مطالعاتی هستند و در طی هشت نسل، انتخاب برای صفت خاصی در آن‌ها صورت نگرفته است و می‌توانند برای مطالعات ژنتیک جمعیت و ایمونوژنتیک انتخاب شوند.

نتیجه گیری: IGF۱ می‌تواند نماینده مناسبی برای مطالعه صفات تولیدی در طیور بوده و بررسی ارتباط آن با ژن‌های MHC برای انتخاب نشانگر ژنتیکی مناسب جهت اصلاح نژاد و بهبود صفات تولیدی در طیور

داخل کشور بسیار کمک کننده خواهد بود. در مطالعه حاضر بر اساس فرضیه Lunden و Ewald ارتبـاط بین خوشـه ژنی MHC به عنوان نشـانگر ژنتیکـی با ژن IGF۱ به عنوان یـک QTL کنترل کننده صفات کمی، در جمعیت طیور بومی خراسان مورد مطالعه قرار گرفت. عدم تعادل پیوستگی قابـل ملاحظه‌ای بین دو جایگاه LEI۰۲۵۸ و IGF۱در جمعیت طیور بومی خراسان مشاهده شد (p=۰/۰۰۸۳). نتایج این مطالعه، فرضیه Lunden و Ewald مبنی بر اینکه تأثیر MHC بر صفات فنوتیپی می‌تواند در نتیجه پیوستگی آن با ژن‌های اصلی کنترل کننده صفات باشد را تقویت می‌کند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بامساعدت کارشناسان محترم مرکزاصلاح نژادوپشتیبانی مرغ بومی خراسـان رضوی وبابودجه طرح پژوهشـی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به شماره۷۵۰۲۰۱۵/۶/۲۳ انجام شده است.

References

1. Abbasi, H.A., Kazemi, M. (2011) Detection of polymorphism at the Insulin Like Growth Factor-I gene in Mazandaran native chicken using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. Am J Vet Sci. 6: 80-83.
2. Bashalkhanov, S., Pandey, M., Rajora, O. (2009) A simple method for estimating genetic diversity in large populations from finite sample sizes. BMC Genetics. 10: 84.
3. Bulut, Z., Kurar, E., Ozsensoy, Y., Nizamlioglu, M., Garip, M., Yilmaz, A., Caglayan, T., Dere, S., Kurtoglu, V., Dogan, M. (2013) Determination of chromosomal regions affecting body weight and egg production in Denizli X White Leghorn F2 populations. Eurasian J Vet Sci. 29: 30-38.
4. Chang, C.S., Chen, C.F., Berthouly-Salazar, C., Chazara, O., Lee, Y.P., Chang, C.M., Chang, K.H., BedHom, B., Tixier-Biochard, M. (2011) A global analysis of molecular markers and phenotypic traits in local chicken breeds in Taiwan. Anim Genet. 43: 172-182.
5. Chatterjee, R., Sharma, R.P., Bhattacharya, T.K., Niranjan, M., Reddy, B.L. (2010) Microsatellite variability and its relationship with growth, egg production, and immunocompetence traits in chickens. Biochem Genet. 48: 71-82.
6. Cheng, H.H. (2003) 21 Selection for Disease Resistance: Molecular Genetic Techniques.In: Poultry Genetics, Breeding, and Biotechnology. Muir, W.M., Aggrey, S.E. (eds.). (1st ed.) CABI publishing, UK. p. 385-399.
7. Dunnington, E.A., Larsen, A.S., O'Sullivan, N.P., Siegel, P.B. (1992) Growth and egg production traits in chickens as influenced by major histocompatibility types and background genomes. J Anim Breed Genet. 109: 188-196.
8. 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.
9. 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
10. Hoffmann, I. (2009) The global plan of action for animal genetic resources and the conservation of poultry genetic resources. World Poult Sci J. 65: 286-297.
11. Hunt, H.D., Jadhao, S., Swayne, D.E. (2010) Major histocompatibility complex and background genes in chickens influence susceptibility to high pathogenicity avian influenza virus. Avian Dis. 54: 572-575.
12. Izadi, F., Ritland, C., Cheng KM. (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.
13. Javanrouh Aliabad, A., Seyedabadi, H., Taheri Dezfuli, B. (2011) Association of insulin-like growth factor-I gene with body comosition traits in Iranian commercial broiler lines. World App Sci J. 14: 71-76.
14. Joiner, K.S., Hoerr, F.J., Van, S.E., Ewald, S.J. (2005) The avian major histocompatibility complex influences bacterial skeletal disease in broiler breeder chickens. Vet Pathol. 42: 275-281.
15. Kim, M.H., Seo, D.S., Ko, Y. (2004) Relationship between egg productivity and insulin-like

growth factor-I genotypes in Korean native Ogol chickens. Poult Sci. 83: 1203-1208.
16. 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.
17. Li, H.F., Zhu, W., Chen, K., Song, W., Shu, J., Han, W. (2010) Effect of the polymorphism of GHR gene and IGF-I gene on egg quality in wenchang chicken. Res J Poult Sci. 3: 19-22.
18. 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.
19. Lunden, A., Edfors-Lilja, I., Johansson, K., Liljedahl, L.E. (1993) Associations between major histocompatibility complex genes and production traits in White Leghorns. Poult Sci. 72: 989-999.
20. 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.
21. Malago, J.J., Baitilwake, M.A. (2009) Egg traits, fertility, hatchability and chick survivability of Rhode Island Red, local and crossbred chickens. Tanz Vet J. 26: 24-36.
22. McConnell, S.K., Dawson, D.A., Wardle, A., Burke, T. (1999) The isolation and mapping of 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken. Anim Genet. 30: 183-189.
23. 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.
24. Mueller, J. (2004) Linkage disequilibrium for different scales and applications. Brief Bioinform. 5: 355-364.
25. Muir, W.M., Wong, G.K.S., Zhang, Y., Wang, J.M. Groenen, A., Crooijmans, R.P., Megens, H.J., Zhang, H., Okimoto, R., Vereijken, A., Jungerius, A., Albers, G.A.A., Lawley, C.T., Delany, M.E., MacEachern, S., Cheng, H.H. (2008) Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. Proc Natl Acad Sci. 105: 17312-17317.
26. Nagaraja, S.C., Aggrey, S.E., Yao, J., Zadworny, D., Fairfull, R.W., Kuhnlein, U. (2000) Trait association of a genetic marker near the IGFI gene in egg-laying chickens. J Hered. 91: 150-156.
27. Nikbakht, G., Esmailnejad, A., Barjesteh, N. (2013) LEI0258 Microsatellite Variability in Khorasan, Marandi, and Arian Chickens. Biochem Genet. 51: 341-349.
28. Notter, D.R. (1999) The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. J Anim Sci. 77: 61-69.
29. Owen, J.P., Delany, M.E., Mullens, B.A. (2008) MHC haplotype involvement in avian resistance to an ectoparasite. Immunogenetics. 60: 621-631.
30. Safalaoh, C.L. (2001) Village chicken upgrading programme in Malawi. World Poult Sci J. 57: 180-187.
31. Sander, J.E. (1993) The major histocompatiblity complex and its role in poultry production. World Poult Sci J. 49: 132.
32. 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.
33. Sheldon, B.L. (2000) Research and development in 2000: Directions and priorities for the World's Poultry Science Community. Poult Sci. 78: 147-158.
34. 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 sarco-

ma virus J-strain tumors. Poult Sci. 89: 651-657.
35. Tadelle, D., Alemu,Y., Peters, K.J. (2000) Indigenous chickens in Ethiopia: genetic potential and attempts at improvement. World Poult Sci J. 56: 45-54.
36. Tang, S., Sun, D., Ou, J., Zhang, Y., Xu, G., Zhang, Y. (2010) Evaluation of the IGFs (IGF1 and IGF2) genes as candidates for growth, body measurement, carcass, and reproduction traits in Beijing You and Silkie chickens. Anim Biotech. 21: 104-113.
37. Vali, N. (2008) Indigenous chicken production in Iran: A Review. Pak J Biol Sci. 11: 2525-2531.
38. Van der Most, P.J., De Jong, B., Parmentier, H.K., Verhulst, S. (2011) Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments. Funct Ecol. 25: 74-80
39. Weigend, S., Matthes, S., Solkner, J., Lamont, S.J. (2001) Resistance to Marek's disease virus in White Leghorn chickens: effects of avian leukosis virus infection genotype, reciprocal mating, and major histocompatibility complex. Poult Sci. 80: 1064-1072.
40. Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Mao, J.X. (1997) POPGENE software: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. (version 1.32) Center for International Forestry Research, University of Alberta. Edmonton, Canada.

Study of MHC polymorphism and its linkage to IGF1 gene in Khorasan indigenous chicken

Esmailnejad, A.[1*], Nikbakht Brujeni, Gh.R.[2]

[1]*Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran*
[2]*Department of Microbiology and Immunology, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

(Received 14 July 2016, Accepted 27 September 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Indigenous chickens could serve as precious genetic resources that should be considered in conservation and breeding programs. The Major Histocompatibility Complex (MHC) has a strong association to disease resistance/susceptibility, production and reproduction traits in chicken. Therefore, identifying its polymorphism in populations under selective breeding could be used for selection of disease resistant and higher productive breeds. MHC association with quantitative traits could be a result of its linkage with causative genes controlling these traits. Insulin-like growth factor 1 (IGF1) is a candidate marker for phenotypic traits in chicken which are associated with important production and reproduction features. **OBJECTIVES:** Based on this hypothesis, MHC polymorphism and its association to IGF1 gene (as a marker for production traits) were investigated in Khorasan indigenous chicken. **METHODS:** In total, 313 DNA samples that belonged to the Khorasan indigenous chicken were analyzed. LEI0258 microsatellite marker and fragment analysis method was used for MHC genotyping. Single nucleotide polymorphism (SNP) of the IGF1 5'-UTR was detected by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and PstI restriction endonuclease enzyme. Linkage disequilibrium between MHC and IGF1 loci were also determined using SAS/Genetics software and likelihood ratio test. **RESULTS:** Collectively, 25 different alleles (185-493 bp) and 76 genotypes of LEI0258 microsatellite were identified in Khorasan population. Two alleles, A (PstI -) and B (PstI +) and three genotypes (AA, AB and BB) were identified for IGF1 gene. Significant linkage disequilibrium (p=0.0083) was observed between LEI0258 and IGF1 loci in this population. **CONCLUSIONS:** These results indicate a high MHC genetic diversity in Khorasan indigenous chicken as a valuable genetic resource. Results from MHC/IGF1 linkage study confirm the hypothesis that MHC association with production traits could be as a result of MHC linkage with causative genes controlling the traits.

Keyword: major histocompatibility complex, IGF1, linkage, indigenous chicken

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Allele frequency of LEI0258 microsatellite and IGF1 gene in Khorasan indigenous chicken.

Table 2. Observed and expected heterozygosity and homozygosity and Hardy-Weinberg equilibrium test in Khorasan indigenous chicken.

Table 3. Linkage disequilibrium between LEI0258 and IGF1 loci in Khorasan indigenous chicken.

***Corresponding author's email: Esmailnejad82@gmail.com, Tel: 071-36138690, Fax: 071-32286940**