نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد چهارم، شماره سوم، ۱۳۹۵
http://ejrr.gau.ac.ir

تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در شش نژاد گوسفند ایرانی

زهرا سجادی زرجانی[۱]، *محمدرضا بحرینی بهزادی[۲] و مجید فردایی[۳]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد و [۲]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
[۳]دانشیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۴

چکیده

سابقه و هدف: به‌دلیل تعداد افراد کم در جمعیت‌های گوسفند بومی موجود در نقاط مختلف ایران، حفظ تنوع ژنتیکی این جمعیت‌ها برای انجام برنامه‌های اصلاح نژادی بسیار مهم است. همچنین این نکته را باید متذکر شد که نژادهای گوسفند بومی به‌عنوان سرمایه ملی کشور محسوب می‌شوند و حفظ تنوع ژنتیکی آن‌ها بسیار ضروری می‌باشد. بررسی ژنوم میتوکندری شاخصی مناسب برای نشان دادن میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف دامی است. در پژوهش حاضر به منظور بررسی ساختار ژنتیکی و ترسیم روابط فیلوژنتیکی، ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری شش جمعیت از گوسفندان بومی ایران با دیگر گوسفندان خارجی موجود در بانک جهانی ژن NCBI مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها: از تعداد ۳۰ رأس گوسفند متعلق به نقاط مختلف کشور شامل نژادهای قزل، مهربان، لک قشقایی، بهمئی، قره‌گل و کرمانی نمونه‌های خون جمع‌آوری شد. DNA کلیه نمونه‌ها به روش شستشوی نمکی استخراج شد و به عنوان الگو جهت تکثیر و توالی‌یابی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری مورد استفاده قرار گرفت. سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد تعیین شد. آغازگرهای رفت و برگشت جهت تکثیر بخشی از ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری به طول ۶۲۳ جفت باز طراحی گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام گرفت. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پس از خالص‌سازی تعیین توالی شدند. این توالی‌ها با ۱۹ توالی

*نویسنده مسئول: bahreini@yu.ac.ir

مشابه ژنوم میتوکندری دیگر متعلق به نژادهای گوسفندان موجود در بانک جهانی ژن مقایسه شده و درخت فیلوژنتیکی آن‌ها ترسیم گردید.

یافته‌ها: با بررسی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری گوسفندان مورد مطالعه، ۳۹ جایگاه نوکلئوتیدی متغیر و ۱۷ هاپلوتیپ شناسایی شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنها ۷ درصد از تغییرات در بین گروه‌ها و ۹۳ درصد در درون جمعیت‌ها توزیع شده است. همچنین اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه براساس شاخص تثبیت در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبوده و مقدار آن ۰/۰۷۱ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: مقدار شاخص تثبیت به دست آمده در این مطالعه بیانگر این است که میزان تمایز ژنتیکی متوسط متمایل به پایین بین جمعیت‌های مورد مطالعه وجود داشت. نتایج فیلوژنی نشان داد که تمامی گوسفندان مورد مطالعه به جز نژاد مهربان همگی در یک کلاستر دسته‌بندی شدند. گروه‌بندی نژادهای قره‌گل، کرمانی، لک قشقایی، قزل و بهمئی با نژادهای مربوط به کشورهای چین، ترکیه، اندونزی، تاجیکستان، هند و قزاقستان می‌تواند به دلیل مشابهت ژنتیکی آن‌ها با توجه به نزدیکی جغرافیایی مکان زیستی آن‌ها باشد. همچنین گوسفند نژاد مهربان با یکی از نژادهای گوسفندان چینی (شماره دسترسی DQ903266.1) با هم گروه‌بندی شدند که در شاخه‌ای دیگر اما نزدیک به گوسفندان دیگر مورد مطالعه قرار گرفتند که این گروه‌بندی می‌تواند نشان دهنده قرابت ژنتیکی این دو نژاد باشد.

واژه‌های کلیدی: ژنوم میتوکندری، فیلوژنی، گوسفند، ناحیه HVR1

مقدمه

گوسفند نخستین حیوانی است که حدود ۸ تا ۹ هزار سال پیش در نـواحی بـین سـوریه، قبـرس و ایران اهلی شده است (۳ و ۱۶). گوسفندداری در ایران از سابقه‌ای طولانی برخوردار بوده و این کشور به دلیل داشتن تنوع آب و هوایی و وسعت زیاد دارای تنوع نژادی نسـبتاً خـوبی از گوسـفندان اسـت. فصول مختلف موجب شده که میزان رشد مرتع و در نتیجه وجود علوفه در دسترس دام در طول سـال متغیر باشد، بنابراین تقریباً تمام گوسفندان ایران دنبه‌دار مـی‌باشـند. همچنـین از نظـر نـوع پشـم کلیـه نژادهای گوسفندان ایرانی دارای پشمی ضخیم بوده که از آن در صنایع قالی‌بافی استفاده می‌شـود. لازم به ذکر است که اغلب نژادهای گوسفند در ایران از نظر صفات تولیدی چند منظوره بوده و بـه منظـور تولید گوشت، شیر، پشم و پوست پرورش داده می‌شـوند (۱۰). بـا توجـه بـه اهمیـت نژادهـای بـومی گوسفند که به‌عنوان یک سرمایه ملی به شمار می‌روند، حفاظت از آن‌ها از نظر حفظ تنوع زیستی بسیار حائز اهمیت است. استفاده از گوسفند در برنامه‌های اصلاح نژادی کشور دارای مزایای بسیاری است و شناخت دقیق‌تر و کسب اطلاعات بیشتر در مورد آن‌ها جهت حفظ این ذخایر ژنتیکی ضروری به نظـر می‌رسد (۱۰ و ۱۴).

یکی از راه‌های شناسایی نژادهای مختلف دامی استفاده از ژنوم میتوکندری است. توالی‌یـابی ژنـوم میتوکندری یکی از بهترین روش‌ها جهت بررسی خلوص نژادهای بومی و بـه عنـوان ابـزاری مناسـب جهت مطالعه تنوع ژنتیکی حیوانات می‌باشد. همچنین در طبقه‌بندی ژنتیکی جمعیت‌ها نقـش داشـته و امکان تشخیص گونه‌ها و نژادها را فراهم می‌کند و می‌تواند نقش مهمی در جهت حفظ گونه‌های بومی در معرض خطر انقراض و بررسی اختلاط ژنتیکی آنها با سایر نژادها داشته باشد (۸). میتوکندری یـک اندامک سیتوپلاسمی است که در بیشتر سلول‌های بدن وجود داشته و نقش مهمی در تامین انرژی بدن دارد. علاوه بر تولید ATP این اندامک دارای نقشی کلیدی در بیولوژی سلول‌هـا شـامل تولیـد گرمـا، نگهداری پتانسیل ردوکس و تمایز سـلولی، تـنفس سـلولی، متابولیسـم لیپیـدهـا، سـنتز هورمـون‌هـای استروئیدی، تنظیم آپوپتوز و ذخیره کلسیم می‌باشد (۲۰، ۲۴). این انـدامک بیضـوی بـوده و مسـتقل از DNA هسته‌ای است. در گونه‌های جانوری میتوکندری ۳۷ ژن را کد می‌کند که شامل ۱۳ ژن کدکننـده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کدکننده tRNA و ۲ ژن کدکننده rRNA اسـت (۲۷). اولـین مطالعـه بـر روی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری گوسفند بـه روش RFLP توسـط هایندلـدر و همکـاران (۱۹۹۸) انجـام گرفت و آن‌ها منشأ اصلی گوسفندان اهلی امروزی را مشـخص کردنـد. ایـن پژوهشـگران گونـه‌هـای

موفلون و اوریال را به‌عنوان اجداد مادری تمام نژادهـای اهلـی گوسـفند معرفـی کردنـد و تعـداد کـل نوکلئوتیدهای موجود در ژنوم میتوکندری گوسفند را حدود ۱۶۶۱۶ نوکلئوتید گـزارش کردنـد (۸). در میتوکندری دو ناحیه کدکننده و غیر کدکننده (ناحیه کنترل) وجـود دارد (۲۵). ناحیـه کنتـرل یـا ناحیـه D-loop شامل دو ناحیه HVR1 و HVR2 می‌باشد (۲۲). ناحیه کنترل فاقد هـر گونـه ژن رمزکننـده بوده و هیچ پروتئینی را کد نمی‌کند و در شروع رونویسی نقشی ندارد، همچنین شروع همانندسازی در این ناحیه صورت می‌گیرد (۹). جینتر و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کردند که ناحیـه ۱ منطقـه D-loop متغیرتر از ناحیه ۲ می‌باشد. همچنین آن‌ها به اهمیت تکثیر ناحیه HVR1 جهت مطالعـات چندشـکلی در ناحیه کنترل اشاره کردند (۶).

از کاربردهای ژنوم میتوکندری می‌توان به تشخیص هم زمان گوشت گونه‌های مختلف دامی مثل گاو، گاومیش، گوسفند و بز در مخلوط گوشت، تشخیص هویت، تشخیص تنوع ژنتیکی، تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم اشاره کرد (۸، ۱۱ و ۱۸). در مطالعات مربوط به بررسی زیستگاه و مبدأ بسیاری از گونه‌ها شامل گاو، گوسفند، بز، خوک و اسب می‌توان از ژنوم میتوکندری استفاده نمود (۴). از نشانگرهای تشخیص گونه مرتبط با ژنوم میتوکندری می‌توان سیتوکروم بی[1]، 12sRNA و 16sRNA را نام برد (۷). نرخ جهش‌پذیری بالاتر میتوکندری نسبت به DNA هسته‌ای که حدود ۵ تا ۱۰ برابر می‌باشد موجب شده است که ژنوم این اندامک به عنوان ابزاری کارآمد جهت تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم تبدیل شود (۲، ۲۳).

هدف از پژوهش حاضر بررسی ساختار ژنتیکی و ترسیم روابط فیلوژنتیکی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری شش جمعیت از گوسفندان بومی ایران و مقایسه با دیگر گوسفندان خارجی موجود در بانک جهانی ژن NCBI بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش تعداد ۳۰ رأس گوسفندان بومی استان‌های فارس، کهگیلویـه و بویراحمـد، آذربایجان، همدان و کرمان شامل نژادهای قزل، مهربان، لک‌قشقایی، بهمئی، قـره‌گـل و کرمـانی مـورد استفاده قرار گرفت. از هر نژاد ۵ رأس به طور تصادفی انتخاب و خون‌گیری شد. خون‌گیری با استفاده از ونوجکت‌های ۳ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد از سیاهرگ وداجی انجام شد. نمونـه‌هـا تـا زمـان

1. Cytochrome b

استخراج DNA در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA توسط روش شستشوی نمکی انجام گرفت (۱۲). کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش طیف‌سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ[1] تعیین شد. همچنین کیفیت آن با الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد تعیین شد. جهت تکثیر بخشی از ناحیه D-loop به طول ۶۲۳ جفت باز از دو آغازگر رفت و برگشت استفاده شد. در این مطالعه جهت طراحی آغازگرها از نرم‌افزار Primer-3 و Primer Blast موجود در پایگاه اطلاعاتی بانک جهانی ژن NCBI استفاده گردید. توالی دو آغازگر رفت و برگشت مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Table 1. Primers used in this study

آغازگرها Primers	توالی Sequence	طول محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Length of PCR product
رفت Forward	5'CTT GAC CGT ACA TAG TAC ATG3'	623bp
برگشت Reverse	5'TTA TGT ATG TGA CCC AGG TG3'	

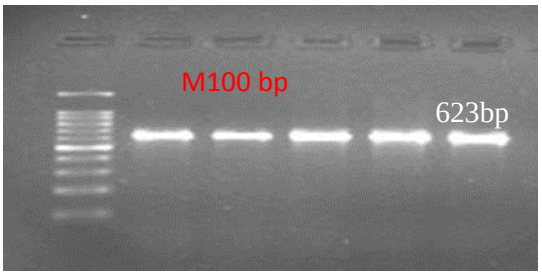
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA، یک واحد آنزیم تک پلیمراز[2]، ۱/۵ میلی‌مولار $Mgcl_2$، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط dNTP، بافر PCR با غلظت (۱x)، یک میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت ۱۰ پیکو مول، یک میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت ۱۰ پیکو مول و ۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه بود. برنامه حرارتی شامل دمای واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشت شدن کامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه انجام شد. جهت تایید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز ۲ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید انجام گرفت. سپس محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به همراه آغازگر رفت جهت خالص‌سازی و تعیین توالی‌یابی یک طرفه به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

1. THERMO ND-1000-USA
2. Taq polymerase

جهت تجزیه و تحلیل توالی‌های به‌دست آمده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مختلفی شامل Bio Edit، MEGA5 و GenALEx استفاده شد. تمام توالی‌های ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری مربوط به گوسفندان مورد مطالعه توسط نرم‌افزار Bio Edit ویرایش شده و به طول ۴۷۳ جفت باز درآمدند. سپس این توالی‌ها با یک توالی مرجع (NC_001941.1) برهمنهش شده و کلیه جایگاه‌های حذف و اضافه و سایر جهش‌های جایگزینی مشخص شدند. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 و به روش Neighbor-joining با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد انجام و درخت فیلوژنتیکی ترسیم گردید. جهت تعیین ساختار ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها و تعیین تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها و تعیین هاپلوتیپ از نرم‌افزار GenALEx استفاده شد.

نتایج و بحث

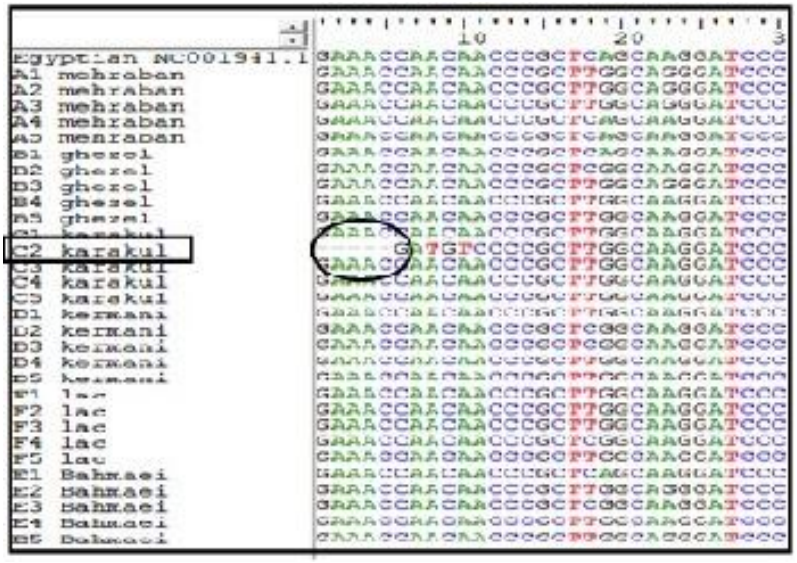
استخراج DNA از خون در تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام گرفت. نتایج طیف‌سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برخوردار بود. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ۲ درصد نشان دهنده فعالیت خوب آغازگرهای طراحی شده و قابل قبول بودن کیفیت محصولات تکثیری بوده و اندازه قطعات اختصاصی برای بخشی از منطقه D-loop که شامل ناحیه HVR1 است، به طول ۶۲۳ جفت باز می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (مربوط به نژاد مهربان) به طول ۶۲۳ جفت باز روی ژل آگارز ۲ درصد. (M:DNA اندازه ۱۰۰ جفت باز)

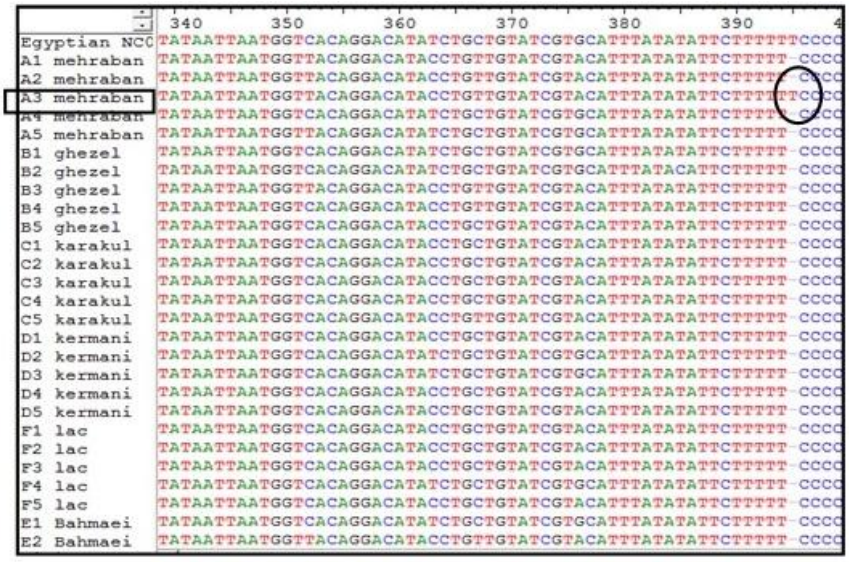
Figure 1. Electrophoresis of 623 bp PCR products on 2% agarose gel (mehraban breed, M: 100bp DNA Ladder)

پس از بررسی کیفیت توالی‌یابی، نوکلئوتیدهایی که دارای کیفیت پایینی بودند از دو انتهای توالی‌ها حذف شدند. بنابراین در تمام نمونه‌ها تعداد ۴۷۳ نوکلئوتید مورد استفاده قرار گرفت که دارای بیشترین تغییرات نوکلئوتیدی در ناحیه مورد نظر بودند. این تغییرات به طور عمده از نوکلئوتید شماره ۶ تا ۴۶۸ مشاهده شد. نتایج حاصل از برهمنهش توالی‌های ناحیه HVR1 بین شش نژاد مورد مطالعه با توالی مرجع (NC_001941.1) نشان داد که توالی‌های نوکلئوتیدی این ناحیه بین این شش نژاد یکسان نبوده و تفاوت‌های نوکلئوتیدی وجود داشت. به طور کلی با بررسی قطعه ۴۷۳ جفت بازی از ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری گوسفندان مورد مطالعه، ۳۹ جایگاه نوکلئوتیدی متغیر یا چندشکلی و ۱۷ هاپلوتیپ شناسایی شد. از بین جایگاه‌های متغیر بدست آمده در ۳۳ جایگاه جهش‌های جایگزینی، در ۵ جایگاه حذف نوکلئوتیدی (شکل ۲) و تنها در یک جایگاه افزایش نوکلئوتیدی (شکل ۳) مشاهده گردید. ۵ جهش حذف در گوسفند شماره ۲ نژاد قره‌گل و یک جهش اضافه در گوسفند شماره ۳ نژاد مهربان وجود داشت و سایر جهش‌های جایگزینی در تمامی نمونه‌ها مشاهده شدند.



شکل ۲- ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری توالی مرجع با توالی‌های این ناحیه در نژادهای گوسفند مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار بایو ادیت. پنج جهش حذف در گوسفند شماره ۲ نژاد قره‌گل از موقعیت ۱ تا ۵ وجود دارد.

Figure 2- HVR1 region of reference sequence with the same sequences of this region in 6 sheep breeds studied using BioEdit software. There are 5 deletion mutations in karakul sheep (number 2) from position 1 to 5.



شکل ۳- ناحیه HVR1 توالی مرجع با توالی‌های این ناحیه در گوسفندان ۶ نژاد مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار بایو ادیت. یک جهش اضافه در گوسفند شماره ۳ نژاد مهربان در موقعیت ۳۹۵ وجود دارد.

Figure 3. HVR1 of reference sequence with the same sequences of this region in 6 sheep breeds studied using BioEdit software. There is a single insertion mutation in mehraban sheep (number 3) in position 395.

جهش‌ها اکثراً از نوع جایگزینی T→C بودند. نسبت جهش ترانزیشن به ترانس‌ورژن در ژنوم میتوکندری بیشتر است. این نسبت نزدیک به ۲۰ بوده که خیلی بیشتر از ژنوم هسته‌ای است (۵). این جهش‌ها هم در ناحیه کدکننده و هم در ناحیه کنترل دیده شدند. در این مطالعه جهش‌های جایگزینی ترانزیشن بیشتری نسبت به ترانس‌ورژن در ناحیه مورد سنتز دیده شد. این نتایج با نتایج تحقیقات گالتیر و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت داشت (۵). نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم افزار بایو ادیت درون هر یک از نژادها نشان داد که بیشترین جهش‌های به وقوع پیوسته در نژاد مهربان بوده و تعداد ۱۷ چندشکلی دیده شد. همچنین کمترین تعداد جهش‌ها در نژادهای کرمانی ۶ عدد و قره گل ۸ عدد مشاهده گردید. نتایج این مطالعه حاکی از وجود جهش و تفاوت‌های نوکلئوتیدی بین نمونه‌های مورد آزمایش در ناحیه HVR1 بود که با نتایج پژوهش محمدهاشمی و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. این محققین ناحیه HVR1 از منطقه D-loop میتوکندری را در جمعیتی از گوسفندان نژاد مغانی به‌منظور تعیین تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار دادند. در پژوهش ذکر شده تعداد ۹

چندشکلی از نوع جایگزینی مشاهده گردید اما جهش‌های از نوع حذف و اضافه گزارش نشد و همچنین تعداد ۵ هاپلوتیپ در این ناحیه مشاهده گردید (۱۵). در پژوهشی دیگر تنوع ژنتیکی و ساختار فیلوژنتیکی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری ۳۳۰ گوسفند متعلق به ۱۲ نژاد هندی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۷۷ جایگاه نوکلئوتیدی متغیر و ۱۹۳ هاپلوتیپ شناسایی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تنوع ژنتیکی مطلوب و نسبتاً بالایی در جمعیت‌های مورد مطالعه وجود داشت (۲۱). همچنین تنوع ژنتیکی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری ۲۹۰ رأس گوسفند از گوسفندان نیجریه در پژوهش دیگری مورد بررسی قرار گرفت و ۹۶ هاپلوتیپ گزارش شد. این تعداد هاپلوتیپ در مقایسه با تعداد کل نمونه‌ها می‌تواند نشان‌دهنده تنوع بالا در نمونه‌های مورد مطالعه باشد (۱). بنابراین با توجه به تغییرات نوکلئوتیدی بالا در نمونه‌های مورد مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که ناحیه مورد بررسی بسیار متغیر بوده و این تغییرات نشان دهنده تنوع بالا در توالی‌های مورد مطالعه می‌باشد.

برای بررسی تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه از شاخص تثبیت[1] استفاده شد. شاخص تمایز ژنتیکی کل جمعیت‌های مورد مطالعه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبوده و مقدار آن ۰/۰۷۱ به‌دست آمد. در بررسی‌های جمعیتی معمولاً میزان شاخص تثبیت معیار مهمی است که جهت مشخص کردن تفکیک و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. مقدار شاخص تثبیت به دست آمده در تجزیه تمایز ژنتیکی بیانگر تمایز ژنتیکی متوسط رو به پایین بین جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد. بر اساس معیار رایت[2] (۱۹۷۸) مقادیر از صفر تا ۰/۰۵ نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی پایین، بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالا و مقادیر بیش از ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالا را نشان می‌دهد (۲۶). نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع درون نمونه‌های مناطق مختلف (درون جمعیت‌ها) حدود ۹۳ درصد از تنوع کل را شامل شد ولی تنوع بین جمعیت‌ها پایین بوده و حدود ۷ درصد بود و می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که جریان ژنی بالا، آمیزش‌های خویشاوندی و حتی مهاجرت در بین جمعیت‌های مورد مطالعه وجود داشته است (جدول ۲).

1. F_{st}
2. Wright

جدول ۲- تجزیه واریانس مولکولی در شش نژاد گوسفند مورد مطالعه

Table 2. Analysis of molecular variance in six breeds of sheep

درصد تغییرات Percentage of variation	مولفه‌های واریانس Variance components	مجموع مربعات Sum of squares	درجه آزادی Degree of freedom	منبع تغییر Source of variation
7^{NS}	0.26	23.47	5	بین جمعیت‌ها Among population
93	3.40	81.60	24	درون جمعیت‌ها Within population
	3.66	105.07	29	کل Total

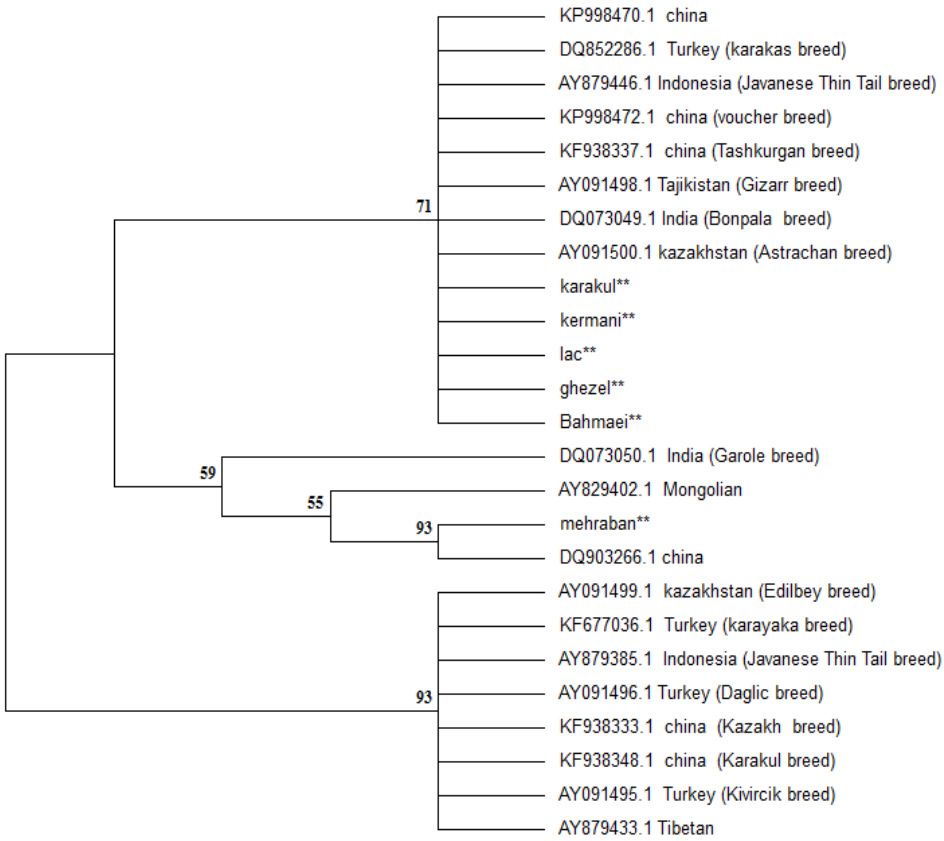
NS = معنی‌دار نیست
Non significant

در پژوهشی توالی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری جمعیتی از گوسفندان بومی متعلق به سه کشور آلبانی، ایتالیا و یونان مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۹۳ جایگاه متغیر و ۱۵۴ هاپلوتیپ شناسایی شد. در این مطالعه فاصله ژنتیکی برای جمعیت‌های مورد مطالعه محاسبه شد و شاخص تثبیت در سطح ۵ درصد معنی‌دار بوده و مقدار آن ۰/۰۴۹ گزارش شد. همچنین درصد واریانس میان نژادهای مورد مطالعه ۴/۰۶ درصد و درون نژادها ۹۵/۰۴ درصد گزارش گردید (۱۷). همچنین تنوع ژنتیکی بر اساس تغییرات موجود در ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری در جمعیتی از بزهای بومی آباده، خلخال و قزوین مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تعداد ۳۰ هاپلوتیپ مشخص گردید. تنوع هاپلوتیپی ۰/۹۹۴ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۹۶۷ گزارش شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که بیشترین تغییرات ژنتیکی در درون جمعیت‌ها بوده در حالی‌که تنها ۳/۰۸ درصد این تغییرات مربوط به بین جمعیت‌ها بود و همچنین درصد تغییرات بین جمعیت‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود (۱۳).

جهت ترسیم درخت فیلوژنی نژادهای مورد مطالعه با سایر نژادهای گوسفند، ابتدا توالی‌های توافقی ناحیه HVR1 از منطقه D-loop در شش نژاد مورد مطالعه با توالی‌های مشابه موجود در پایگاه بانک جهانی ژن NCBI با روش Blast مقایسه شدند. تعیین توالی توافقی یکی از روش‌های معمول جهت ثبت و شناسایی نژادها می‌باشد (۱۵ و ۱۶). بنابراین طی این فرآیند تعداد ۱۹ توالی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندریایی گوسفندان موجود در بانک جهانی ژن که با نواحی مورد مطالعه هم‌پوشانی داشتند از این پایگاه دریافت و تحت رویه Clustalw برنامه MEGA5 هم‌ردیف‌سازی شدند و سپس

درخت فیلوژنی ترسیم گردید (شکل ۴). نتایج تجزیه فیلوژنی نشان داد که گوسفندان ایرانی به یکدیگر نزدیکی بیشتری دارند که این امر نشان دهنده منشأ مشترک این نژادها با توجه به نزدیکی منطقه جغرافیایی محل زندگی آن‌ها می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود گوسفندان نژادهای قره‌گل، کرمانی، لک قشقایی، قزل و بهمئی با نژادهای کشورهای چین، ترکیه، اندونزی، تاجیکستان، هند و قزاقستان با هم گروه‌بندی شدند و این امر نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی و نزدیکی جغرافیایی نژادهای یاد شده می‌باشد. نژاد مهربان با یکی از نژادهای گوسفندان چینی با هم گروه‌بندی شده و در شاخه‌ای دیگر اما نزدیک به سایر گوسفندان مورد پژوهش قرار گرفت. دلیل نزدیکی گوسفند نژاد مهربان با یکی از نژادهای گوسفندان چینی می‌تواند به علت موقعیت کشور ایران در مسیر جاده ابریشم باشد و ممکن است در گذشته کشور ایران به عنوان گذرگاهی جهت عبور گوسفندان از آسیا به اروپا و آفریقا و یا برعکس بوده است. با توجه به نزدیکی مکان جغرافیایی نژادهای یاد شده نتایج این تجزیه فیلوژنی منطقی به نظر می‌رسد. در پژوهشی با هدف بررسی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در ۱۰ رأس گوسفند مغانی که توسط محمد هاشمی و همکاران (۲۰۱۲) انجام گرفت؛ با انجام تجزیه فیلوژنی به این نتیجه رسیدند که گوسفند مغانی به گروه هاپلوتیپی A تعلق دارد و گروه‌بندی نژاد مغانی با نژاد بلوچی به دلیل مشابهت ژنتیکی این دو نژاد می‌باشد (۱۵). عثمان و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهش خود در ۵ نژاد گوسفند مصری شامل بارکی[1]، اسیمی[2]، رحمانی[3]، سعیدی[4] و سوهاگی[5] توانستند ۵ گروه هاپلوتیپی برای گوسفندان مورد مطالعه خود تعیین کنند (۱۶). در پژوهشی دیگر ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در ۲۰ رأس گوسفند نژاد افشاری به منظور تعیین تنوع ژنتیکی و ترسیم روابط فیلوژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که گوسفندان نژاد افشاری در گروه هاپلوتیپی A می‌باشند و این نژاد دارای کمترین فاصله ژنتیکی با نژادهای مغانی و بلوچی می‌باشد. همچنین نتایج این پژوهش با نتایج محمد هاشمی و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد (۱۹).

1. Barki
2. Ossimi
3. Rahmani
4. Saidi
5. Sohagi



شکل ۴- درخت فیلوژنی توالی‌های ناحیه HVR1 در نژادهای مورد مطالعه با برخی نژادهای گوسفند موجود در بانک جهانی ژن NCBI به همراه کد دسترسی آن‌ها (اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰۰ مرتبه نمونه‌گیری می‌باشد).

**** توالی توافقی هر کدام از شش نژاد مورد مطالعه**

Figure 4.Phylogenetic tree sequences of HVR1 region in breeds studied with other sheep breeds are taken from GenBank (NCBI) with their accession numbers.(The numbers at the nodes represented the percentage bootstrap values for interior branches after 1000 replications).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که تمایز ژنتیکی متوسط به پایین در بین جمعیت‌های مورد مطالعه وجود دارد. با توجه به شباهت ژنتیکی در برخی نژادهای مورد مطالعه لزوم کنترل تلاقی‌های جمعیت-ها و کنترل تولید نتاج پیشنهاد می‌گردد. شاید یکی از دلایل پایین بودن تنوع بین جمعیت‌ها تعداد

محدود نمونه‌های مورد بررسی باشد لذا به منظور تکمیل نتایج این تحقیق استفاده از نمونه‌های بیشتر توصیه می‌گردد. گروه‌بندی نژادهای گوسفندان ایرانی با سایر گوسفندان موجود در کشورهای همسایه ایران نشان‌دهنده نزدیکی ژنتیکی این نژادها با توجه به نزدیکی جغرافیایی مکان زیستی آن‌ها می‌باشد.

منابع

1. Agaviezor, B.O., Adefenwa, M.A., Peters, S.O., Yakuba, A., Adebambo, O.A., Ozoje, M.O., Ikeobi, C.O.N., Ilori, B.M., Wheto, M.O., Ajayi, O., Amusan, S.A., Okpeku, M., Donato, M.D., and Imumorin, I.G. 2012. Genetic diversity analysis of the mitochondrial D-loop of Nigerian indigenous sheep. Anim. Genet. 50: 13-20.
2. Bruford, M.W., Bradley, D.G., and Luikart, G. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nat. Rev. Genet. 4: 900–910.
3. Chen, S.Y., Duan, Z.Y., Sha, T., Xiangyu, J., Wu, S.F., and Zhang, Y.P. 2006. Origin, genetic diversity, and population structure of Chinese domestic sheep. Gene. 376: 216–223.
4. Chen, S.Y., Su, Y.H., Wu, S.F., Sha, T., and Zhang, Y.P. 2005. Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of Chinese domestic goats. Mol. Phylogenet. Evol. 37: 804–814.
5. Galtier, N., Enard, D., Radondy, Y., Bazin, E., and Belkhir, K. 2006. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. Genome Res. 16: 215–222.
6. Ginther, C., Issel-Tarver, L., and King, M.C. 1992. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. Nature Genet. 2: 135-138.
7. Guha, S., Goyal, S.P., and Kashyap, V.K. 2006. Genomic variation in the mitochondrially encoded cytochorome b and 12s RNA genes. Characterization of eight endangered pecorn species. Anim. Genet. 37: 262-265.
8. Hiendleder, S., Mainz, K., Plante, Y., and Lewalski, H**.** 1998. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from Urial and Argali sheep. J. Hered. 89: 113-120.
9. Jazin, E., Soodyall, H., Jalonen, P., Lindholm, E., Stoneking, M., and Gyllensten, U. 1998. Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism. Nature Genet. 18: 109-110.
10. Khaldari, M. 2004. Sheep and Husbandry. Jahad daneshgahi Press, Tehran. 505p. (In Persian)
11. Lutz, S., Weisser, H.J., Heizmann, J. , and Pollak, S. 1998. Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. Int. J. Legal Med. 111: 57-77.

12.Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. 1998. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 16: 12-15.
13.Moazeni, F., Afraz, F., Vahidi, S.M.F., and Toulgilani, I. 2015. Study of mitochondrial DNA diversity in native goat populations, Abadeh, Khalkhali and Ghazvini. The 1th International and 9th National Biotechnology Congress of Iran. (In Persian)
14.Mohammadhashemi, A., Tahmoorespour, M., Pirany, N., and Nosrati, M. 2011. Phylogenetic analyses of HVR1 region of mtDNA in Iranian Shall and Sangsari native sheep breeds. The 7th National Biotechnology Congress of Iran, Tehran, Iran. (In Persian)
15.Mohammad hashemi, A., Pirani, N., Nassiri, M.R., Abbassi Daloii, T., and Baghban Kohnegroz, B. 2012. Studying the Partially Sequenced mtDNA Hypervariable Region 1 (HVR1) of Iranian Moghani Sheep. Ann. Biol. Res. 3: 2906-2910.
16.Othman, O.E., Balabel, E.A., and Abdel-Samad, M.F. 2014. Mitochondrial DNA Diversity in Five Egyptian Sheep Breeds. Global Veterinaria. 12: 369-375.
17.Pariset, L., Mariotti, M., Gargani, M., Joost, S., Negrini, R., Perez, T., Bruford, M., Marsan, P.A., and Valentini, A. 2011. Genetic Diversity of Sheep Breeds from Albania, Greece, and Italy Assessed by Mitochondrial DNA and Nuclear Polymorphisms (SNPs). Sci. World J. 11: 1641–1659.
18.Pirany, N., Elyasi Zarringhabaie, Gh., and Taghizadeh, A. 2009. Genetic diversity and Genetic Relationship of 6 Iranian Native Chicken Populations Using RAPD Markers. J. Sci. Res. 19: 69-79. (In Persian)
19.Pirkhezranian, Z., Tahmoorespur, M., Mohammad hashemi, A., Pirani, N., and Azghandi, M. 2015. Genetic and Phylogenetic Analyses of HVR-I Region of mtDNA in Afshari Sheep Breed. Agric. Biotechnol. 14: 65-71. (In Persian)
20.Reicher, S., Seroussi, E., Weller, J.I., Rosov, A., and Gootwine, E. 2012. Ovine mitochondrial DNA sequence variation and its association with production and reproduction traits within an Afec-Assaf flock. J. Anim. Sci. 90: 2084-2091.
21.Singh, S., Kumar S., Jr, A., Kolte, P., and Kumar, S. 2013. Extensive variation and sub-structuring in lineage a mtDNA in Indian sheep: Genetic evidence for domestication of sheep in India. PLoS ONE, 8: e77858.
22.Sultana, S., and Mannen, H. 2004. Polymorphism and evolutionary profile of mitochondrial DNA control region inferred from the sequences of Pakistani goats.J. Anim Sci. 75: 303-309.
23.Sutarno, Cummins, J.M., Greeff, J., and Lymbery, A.J. 2002. Mitochondrial DNA polymorphism and fertility in beef cattle. Theriogenology. 57:1603–1610.
24.Tapio, M., and Grigaliunaite, I. 2002. Is there a role for mitochondrial inheritanc,e in sheep breeding? Vet. Zootec. 18: 108-111.

25. Wang, X., Chen, H., and Lei, C.Z. 2007. Genetic Diversity and Phylogenetic Analysis of the mtDNA D-loop Region in Tibetan Sheep. Asian-Aust. J. Anim Sci. 3: 313–315.
26. Zawadzki, C.H., Renesto, E., Dolores Peres, M., and Paiva, S. 2008. Allozyme variation among three populations of the armored catfish Hypostomus regani (Ihering, 1905) (Siluriformes, Loricariidae) from the Paraná and Paraguay River basins, Brazil. Genet. Mol. Biol. 31: 767-771.
27. Zhao, X., Li, N., Guo, W., Hu, X., Liu, Z., Gong, G., Wang, A., Feng, J., and Wu, C. 2004. Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (Ovis Aries). Hered. 93: 399-403.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 4(3), 2016
http://ejrr.gau.ac.ir

Genetic and phylogenetic analysis of six Iranian sheep breeds based on mtDNA HVR1 sequences

Z. Sajjadi Zarjani[1], *M.R. Bahreini Behzadi[2], M. Fardaei[3]
[1]M.Sc. Student and [2]Assistant Prof ., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Yasouj University, [3]Associate Prof., Dept. of Medical Genetics, Shiraz University of Medical Sciences, Iran
Received: 01/30/2016; Accepted: 06/24/2016

Abstract

Background and objectives: Maintaining genetic diversity in native sheep breeds of Iran is very important for breeding goals and increasing their production. Native sheep breeds are national treasure and conservation of these populations is necessary from genetic diversity aspects. Investigation of mtDNA gives useful information about genetic diversity in native populations. In order to investigate the genetic structure and phylogenetic relationships, HVR1 region's of mtDNA in six indigenous sheep populations compared with other foreign sheep in NCBI.

Materials and methods: 30 blood samples Includes Ghezel, Mehraban, Lac, Bahmaei, Karakul and Kermani breeds were collected from different parts of the country. All of samples of DNA were extracted by salting out, and as a template to use for replicating and sequencing of HVR1, and then the quality and quantity of extracted DNA using 2% agarose gel electrophoresis, spectrophotometry, respectively were detected. PCR was performed using specific primers. HVR1 region was amplified with specific primers and after purification was sequenced. These sequences with 19 other similar sequences of different sheep breeds obtained from GenBank of NCBI were compared and the phylogenic tree was drawn.

Results: By studying HVR1 region of mtDNA Were detected 39 variable site and 17 haplotypes. Analysis of molecular variance showed that only 7% of the variation observed among the six populations and 93% of genetic variation was distributed within populations. AMOVA analysis showed That Genetic disorder among the population studied According to the fixation index was not significant at the 5% and this value was calculated 0.071.

*Corresponding author; bahreini@yu.ac.ir

Conclusion: F_{st} value indicated there were low toward medium genetic differentiation among these populations. The results of phylogeny showed that all of sheeps except Mehraban breed were classified in a cluster. Five breeds Includes Karakul, Kermani, Lac, Ghezel, and Bahmaei were categorized with other breeds of China, Turkey, Indonesia, Tajikistan, India and Kazakhstan Because of their genetic similarity due to the geographical Vicinity of them in biological locations. Mehraban sheep breed and one of Chinese sheep breeds (DQ903266.1) were grouped together but in other branches close to other sheep breeds in this study. This grouping could be due to genetic relationship of these two breeds.

***Keywords*:** mtDNA, Phylogeny, Sheep, HVR1