نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، ص. ۱۳۹-۱۳۱

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 10, No. 1, Spring 2018, p. 131-139

تنوع ژنتیکی و آنالیز فیلوژنتیکی ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری گوسفند نژاد بلوچی

فاطمه بحری بیناباج[1*]- گلناز بی همتا[2]- زانا پیرخضرانیان[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۲۵

چکیده

توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از رایج‌ترین روش‌های طبقه بندی تکاملی حیوانات می‌باشد. به منظور بررسی تاریخچه تکاملی گوسفند نژاد بلوچی واقع در منطقه شرق کشور ایران، از ۳۰ نمونه گوسفندان واقع در مرکز اصلاح نژاد شمال‌شرق کشور به صورت تصادفی خونگیری شد. بعد از استخراج DNA توسط کیت DIAtom DNA Prep و تکثیر ناحیه D-loop میتوکندری ژنوم به کمک پرایمرهای اختصاصی، توالی‌یابی انجام پذیرفت. بررسی کیفیت توالی‌ها، ساختار نوکلئوتیدی و جهش‌های مربوطه با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف انجام شد. هشت زیر گروه هاپلوتایپی هر یک با فراوانی ۷/۴، ۷/۴، ۱۴/۸۱، ۱۱/۱۱، ۱۸/۵۱، ۱۴/۸۱، ۱۱/۱۱ و ۱۴/۸۱ مشاهده و تنوع ژنتیکی موجود در بین ۲۷ نمونه ۰/۰۰۵± ۰/۰۱۳۱ محاسبه شد که این مقدار در محدوده‌ی متوسط تنوع نوکلئوتیدی در یوکاریوت‌ها قرار داشت. آنالیز فیلوژنتیکی این نمونه‌ها نشان داد که گوسفند نژاد بلوچی در گروه هاپلوتایپی A واقع شده است. از آنجا که خاستگاه اصلی هاپلوتایپ A مربوط به آسیا و خاورمیانه می‌باشد و با توجه به نتایج مطالعات قبلی بر روی گوسفندهای بومی ایران که حاکی از قرار گرفتن این گوسفندان در هاپلوتایپ مذکور می‌باشد، قرار گرفتن گوسفند بلوچی نیز در این هاپلوتایپ قابل توجیه است.

واژه های کلیدی: ژنوم میتوکندری، فیلوژنتیک، گوسفند بلوچی، هاپلوتایپ.

مقدمه

از جمله سرمایه‌های ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور، حیوانات و گیاهان بومی هستند که حفظ و تکثیر آنها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. چرا که پس از هزاران سال انتخاب طبیعی و مصنوعی و نیز عبور از موانع بسیار و با غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان توانسته‌اند به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل بپردازند و نسبت به محدودیت‌های محیطی سازگاری پیدا کنند (۱۶). نژادهای بومی به دلیل شدت انتخاب پایین، تعداد پرورش‌دهندگان و محدودیت استفاده از تلقیح مصنوعی از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار هستند. از طرفی با گذشت زمان و کسب آگاهی بیشتر نسبت به اهمیت صفات مختلف، نیازهای جدیدی مطرح می‌شود که متخصصین اصلاح‌نژاد را بر آن می‌دارد که از ژن‌های بومی استفاده نمایند. این مسئله به خصوص با افزایش تولید محصولات دامی و تولید محصولات پیش‌بینی نشده در آینده، لزوم حفظ تنوع ژنتیکی در دام‌های بومی را الزامی ساخته است. ژنوم میتوکندری در پستانداران یک مولکول در هم پیچیده حلقوی با وزن ملکولی تقریباً ۱۶ کیلو جفت باز و حاوی ژن‌های ریبوزومی و tRNA و mRNA می‌باشد. این ژنوم در گوسفند ۱۶/۵۸کیلو جفت باز بوده و سازماندهی آن همانند سایر پستانداران است (۷، ۳۴). روش‌های مولکولی مانند توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (۳، ۲۵). نرخ تکامل در DNA میتوکندریایی[4] ۵ تا ۱۰ برابر سریع‌تر از DNA هسته‌ای است و ژن‌های این ناحیه معمولاً دچار نوترکیبی نمی‌شوند (۲۵، ۳۳). mtDNA در حیوانات، دارای توارث مادری و در داخل یک گونه بسیار متغیر است؛ بنابراین می‌توان از آن به عنوان یک ماده ژنتیکی مهم برای استنباط‌های فیلوژنتیکی و آنالیزهای تنوع ژنتیکی استفاده نمود (۲۵، ۳۵). سه ویژگی مهم mtDNA آن را به مارکر ژنتیکی کارآمدی برای بررسی سیستماتیک مولکولی، ژنتیک جمعیت و بررسی روابط شجره‌ای گونه‌های خویشاوند نزدیک تبدیل کرده است. این ویژگی‌ها عبارتند از اینکه mtDNA از مادر بدون توجه به جنسیت به فرزند به

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی ومنابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس
۲ و ۳- به ترتیب فارغ التحصیل کارشناسی ارشد و دانشجوی دکترا ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*-نویسنده مسئول: Email: fatemebahri_b@yahoo.com)
DOI: 10.22067/ijasr.v1397i1.63715

4- Mitochondrial DNA (mtDNA)

ارث می‌رسد (۲)، در mtDNA نوترکیبی رخ نمی‌دهد از این رو می‌توان شجره مادری را به طور واضح بررسی و تعیین نمود (۱۰). همچنین سرعت متوسط تعویض و جایگزینی نوکلئوتیدهای mtDNA در مهره‌داران عالی تقریباً ۱۰-۵ برابر سرعت ژنوم هسته‌ای است. DNA میتوکندری یک ملکول دو رشته‌ای حلقوی است که در خارج از هسته قرار دارد و طول آن در گونه‌های مختلف بین ۱۵ تا ۲۰ کیلو جفت باز است. ژنوم میتوکندری دارای ناحیه‌ای به نام D-loop یا ناحیه کنترل است که فاقد هر گونه ژن رمزکننده بوده و میزان جهش نوکلئوتیدها در این منطقه حدود ۱۰ برابر DNA هسته‌ای است (۱). D-loop حاوی پروموتورهای تنظیم رونویسی در میتوکندری می‌باشد (۱۷) و به دو ناحیه اصلی HVR1 و HVR2 تقسیم می‌گردد. به دلیل اینکه این ناحیه هیچ نوع پروتئینی را کد نمی‌کند، جهش‌هایی که در آن صورت می‌گیرد ابقاء می‌شوند (۱۳). به دلیل هاپلوئید بودن ژنوم میتوکندری و انجام نشدن فرایند میوز، امروزه توالی D-loop ناحیه ژنوم میتوکندری به عنوان ابزاری قدرتمند برای مطالعه منشاء و نحوه تفرق انواع گونه‌های حیوانی مورد استفاده قرار گرفته است (۱). منشأ گوسفند اهلی کنونی (*Ovis aries*) کاملاً مشخص نیست. احتمالاً اجداد گوسفند اهلی کنونی، چندین گونه و زیر گونه گوسفند وحشی است (۲۶). البته پیشنهاد شده است که گوسفندان نژاد اورال (*O.vignei*) و موفلون (*O. musimon or O. orientalis*) می‌توانند اجداد گوسفندان اهلی امروزی باشند (۳۶). پژوهشگران با مطالعه روی ژنوم میتوکندری گوسفند توانستند که گوسفندان را در پنج هاپلوگروپ مختلف A, B, C, D و E گروه‌بندی کنند. هاپلوگروپ‌های A و B برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ گزارش شدند (۳۶) که بیشترین فراوانی را نیز دارند. در ادامه محققین موفق به شناسایی هاپلوگروپ دیگری شدند که آن را C نام‌گذاری کردند (۱۱). این هاپلوگروپ در پی فرایند رشد جمعیت گوسفند در اثر اهلی شدن این حیوان یافت شد. سپس در سال ۲۰۰۶ نیز یک گروه هاپلوگروپ دیگر (هاپلوگروپ D) گزارش شد (۳۱). هاپلوتایپ گروپ D فراوانی کمی دارند بنابراین هنوز چگونگی پیدایش این هاپلوگروپ‌ها بررسی نشده است. مقیاس‌های وسیعی از توزیع جغرافیایی که از چند شکلی‌های حاصله از توالی‌های اضافه شده مربوط به رتروویروس‌ها به وجود آمده، دو موج اصلی از مهاجرت‌های گوسفند را پیشنهاد کرده است. موج اول مربوط به توسعه گوسفندان اولیه اهلی است که با دومین موج مهاجرت گوسفند از جنوب غرب آسیا که شامل گوسفندانی با صفاتی بهبود یافته بود جایگزین شد. این اتفاق تقریباً مربوط به ۵۰۰۰ سال قبل از زمان حاضر (YBP[1]) بود (۵). گوسفند بلوچی یکی از مهم‌ترین و پرجمعیت‌ترین گوسفندان ایرانی است که نقش مهمی در تولید گوشت قرمز در ایران را دارد. نژاد بلوچی، با توزیع جغرافیایی شرق و جنوب شرقی کشور ایران، به دلیل قدرت راهپیمایی بالا و مقاومت در برابر کم آبی توانسته است به خوبی با شرایط جوی گرم و خشک منطقه شرق و جنوب شرق کشور ایران سازگار شود (۲۹). با توجه به تنوع زیاد گونه‌ها و زیرگونه‌ها، اهمیت نگهداری خلوص نژادهای بومی و اطلاعات ناقص درمورد منشأ اهلی شدن گوسفندان ایرانی، این پژوهش با هدف بررسی میزان تنوع موجود در گوسفندان نژاد بلوچی، بررسی نوع هاپلوتایپ این نژاد و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ناحیه D-loop میتوکندریایی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA

به منظور انجام این تحقیق تعداد ۳۰ نمونه بیولوژیکی (خون) به صورت تصادفی و با اطمینان از عدم وجود رابطه خویشاوندی بین نمونه‌ها، از مرکز اصلاح نژاد شمال‌شرق کشور جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در لوله‌های حاوی EDTA در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت DIAtom DNA Prep محصول Iso Gene کشور روسیه صورت گرفت. برای آگاهی از میزان خلوص و کیفیت DNA از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و برای تعیین کمیت آن از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND-200 شرکت THERMO آمریکا استفاده شد.

انتخاب آغازگر، انجام واکنش PCR و خالص‌سازی محصولات PCR

جهت تکثیر اختصاصی ناحیه D-loop یک جفت پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier5 (۱۵) طراحی شد. محدوده طراحی این پرایمرها tRNA-Pro و tRNA-Phe بر روی mtDNA بود (جدول ۱). سپس، با استفاده از رویه BLASTPrimer موجود در پایگاه بانک جهانی ژن (NCBI)، میزان همپوشانی آن‌ها با توالی‌های موجود، مقایسه گردید تا از اختصاصی بودن پرایمرهای رفت و برگشت اطمینان حاصل شود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه ۱۱۸۰ جفت بازی ناحیه D-loop از mtDNA توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal براساس روش استاندارد و در ۳۲ چرخه انجام گرفت. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰mM Tris-HCL(PH 8.8)، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۰/۲mM dNtp، ۱/۵mM از MgCl2، ۵ pmol از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی ژن و ۱۰۰ نانوگرم از DNA هدف با استفاده از برنامه حرارتی واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۳۰

1- Year Before Present

ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه برای ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه، یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در ۳۵ سیکل تکثیر شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید در ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد و برای تعیین حدود اندازه آن ازDNA Ladder 100bp استفاده شد.

جدول۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعه تکثیر شده

Table 1- sequences of primers used in this study and length of amplified fragment

پرایمر و محدوده طراحی Primer and range of design	توالی پرایمر Primer sequence	طول محصول PCR Length of PCR product
Forward: tRNA-Pro	5’- CACTATCAACACCCAAAGCTG -3’	1180
Reverse: tRNA-phe	5’-TCATCTAGGCATTTTCAGTG-3’	

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محصولات PCR پس از برش از ژل، خالص‌سازی شد و به همراه ۵۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال گردیدند. نمونه‌ها به روش اتوماتیک و با استفاده از دستگاه AB1 3130 توالی‌یابی گردیدند. لازم به ذکر است که برای بالا بردن دقت توالی‌یابی، هر نمونه با هر دو پرایمر مستقیم و معکوس توالی‌یابی شد.

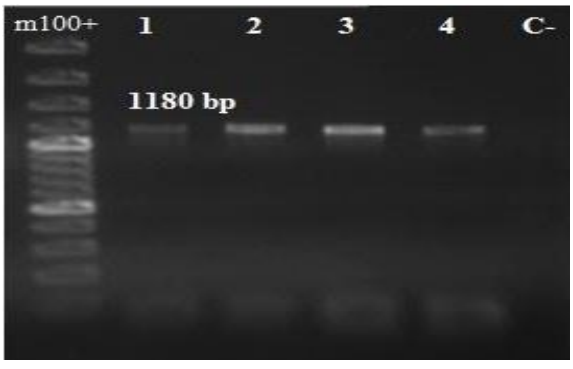
توالی‌یابی ناحیه D-loop و آنالیز توالی‌ها

آنالیز قطعات توالی‌یابی شده با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی CLC Main workbench 5.5 (۱۴)، Chromas Lite 2.01 (۳۲)، MEGA5 (۳۰) و Bio Edit (۹) برای ۳۰ نمونه انجام گرفت. ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Chromas Lite 2.01 ویرایش شدند، بعد از اطمینان از کیفیت توالی‌ها و تبدیل کردن فرمت توالی‌ها از ab1 به FASTA، از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI و نرم‌افزار CLC Main workbench 5.5 جهت تعیین همولوژی توالی به دست آمده با توالی‌های ثبت شده از همین ژن در NCBI و همچنین خود توالی‌ها با هم استفاده شد. میزان تنوع نوکلئوتیدی توسط نرم‌افزارArlequin 3.5 (۶) به دست آمد. همچنین جهت رسم درخت فیلوژنتیکی با ۱۰۰۰ تکرار، از رویه Neighbor-Joining نرم‌افزار MEGA5 و جهت تعیین فاصله ژنتیکی از رویه Create Pairwise Comparison نرم‌افزار CLC Main workbench 5.5 استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

استخراج DNA از نمونه‌های بیولوژیکی خون در تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای انجام PCR برخوردار است. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که پرایمرها به خوبی فعالیت نموده و قطعات اختصاصی برای ناحیه D-loop طول ۱۱۸۰ جفت باز تولید شده است. وجود یک باند اختصاصی نشان داد که ناحیه‌ی مشابه برای جفت شدن آغازگرهای مورد استفاده در محل‌های دیگر ژنوم وجود نداشته است و عدم وجود باند در قسمت کنترل منفی نشان‌دهنده‌ی عدم وجود هر گونه آلودگی در واکنش‌ها بود (شکل ۱).

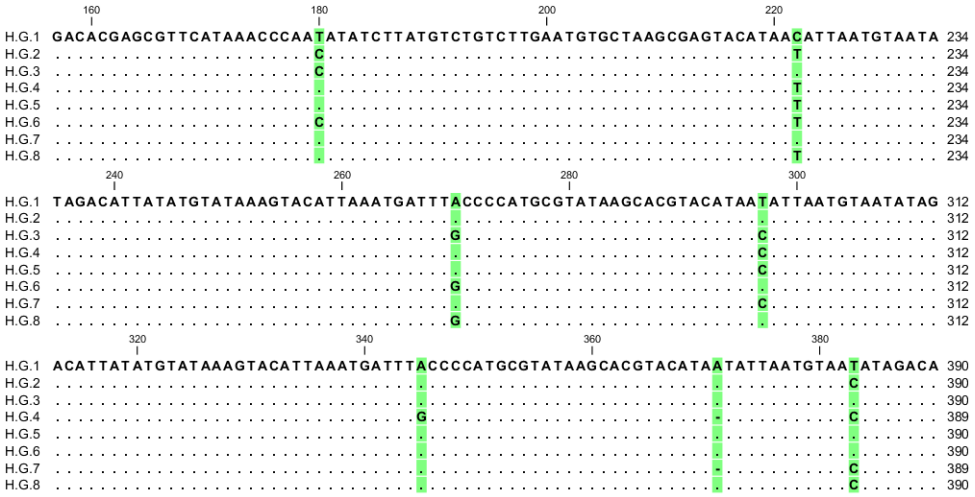


شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ناحیه D-loop میتوکندریایی

Figure 1- Electrophoresis of PCR products of mitochondrial D-loop

آنالیز ساختار ژنتیکی توالی ناحیه D-loop میتوکندری

از مجموع ۳۰ نمونه توالی‌یابی شده ۳ نمونه فاقد کیفیت مناسب بودند در نتیجه تجزیه و تحلیل بر روی ۲۷ نمونه انجام پذیرفت. با تجزیه و تحلیل ۲۷ توالی نهایی به کمک نرم‌افزار CLC Workbench 5.5 وجود هشت زیر گروه هاپلوتایپی در بین نمونه‌های توالی‌یابی شده در این جمعیت اثبات شد (شکل۲). فراوانی هر یک از هشت زیرگروه هاپلوتایپی به ترتیب ۷/۴، ۷/۴، ۱۴/۸۱، ۱۱/۱۱، ۱۸/۵۱، ۱۴/۸۱، ۱۱/۱۱، ۱۴/۸۱بود. میزان اختلاف نوکلئوتیدی و درصد تشابه هر کدام از زیرگروه‌های هاپلوتایپی نسبت به یکدیگر در جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین اختلاف نوکلئوتیدی را دو زیر گروه هاپلوتایپی دو و هفت با ۱۰ نوکلئوتید اختلاف یعنی ۹۹/۱۵ درصد تشابه داشتند و بیشترین درصد تشابه بین زیر گروه‌ها، مربوط به زیر گروه‌های یک و چهار با ۲ نوکلئوتید اختلاف و ۹۹/۸۳ درصد تشابه بود. زیرگروه‌ها توسط ۱۳ جایگاه چند شکل از هم تفکیک شده‌اند (جدول ۲).



شکل ۲- هشت دسته متفاوت هاپلوتیپی در نمونه‌های بررسی شده از گوسفند بلوچی بر اساس همردیف شدن توالی‌ها

Figure 2- Eight different haplotype categories in samples of Baluchi sheep based on the sequences alignment

از آنجا که با افزایش یا کاهش تعداد نمونه‌ها تعداد جایگاه‌های چند شکل تغییر می‌کنند، بهتر است که از پارامتر دیگری به نام تنوع نوکلئوتیدی یا میانگین تنوع ژنی استفاده کرد. این پارامتر علاوه بر اینکه به طول DNA و اندازه نمونه وابسته نیست، تنوع را در سطح نوکلئوتید مورد مطالعه قرار می‌دهد (۲۴). میزان تنوع نوکلئوتیدی در جمعیّت گوسفندان بلوچی در مطالعه حاضر ۰/۰۰۵±۰/۰۱۳۱ می‌باشد. با توجه به گزارش نی و همکاران (۲۱) این میزان تنوع ژنتیکی بدست آمده از ۲۷ نمونه از گوسفندان نژاد بلوچی در محدوده‌ی متوسط تنوع نوکلئوتیدی در یوکاریوت‌ها که بین ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۱۹ می‌باشد، قرار گرفته است. میزان تنوع ژنتیکی در بخش HVR از ناحیه D-loop در گوسفندان نژادهای بلوچی، مغانی، افشاری، زندی، شال و سنگسری که توسط پژهشگران ایرانی گزارش شده است، به همراه چندین گزارش دیگر مربوط به مطالعه‌ی ژنوم میتوکندریایی سایر گوسفندان نژادهای بومی آسیایی در جدول ۳ آورده شده است. تنوع موجود در بخش HVR1 از ناحیه D-loop گزارش شده در گوسفند بلوچی توسط شفق مطلق (۲۸) و تنوع موجود در کل ناحیه D-loop بدست آمده در این پژوهش تقریباً مشابه یکدیگر می‌باشند و همان‌طور که در جدول قابل مشاهده است میزان تنوع ژنتیکی در گوسفندان بلوچی بیشتر از سایر نژادهای ایرانی بررسی شده می‌باشد که احتمالاً به دلیل جمعیّت بالای این نژاد در کشور و در نتیجه افزایش در میزان جمعیّت مؤثر این نژاد است.

محتوای توالی مورد توافق به دست آمده از زیرگروه هاپلوتایپ‌ها شامل: ۳۳٪ آدنین، ۲۲/۹٪ سیتوزین، ۱۴/۴٪ گوانین و ۲۹/۶٪ تیمین بود. میزان C+G، ۳۷/۳ درصد و A+T، ۶۲/۷ درصد بود. به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نژاد بلوچی، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی‌های همردیف شده، رسم گردید. در گوسفندان اهلی تاکنون پنج گروه هاپلوتیپی A، B، C ، D و E تشخیص داده شده است که با توجه به مطالعات اندکی که بر روی گوسفندان با هاپلوتیپ E انجام شده است درخت فیلوژنتیکی با استفاده از چهار هاپلوتایپ A، B، C و D رسم شده است. شماره دسترسی در بانک جهانی NCBI برای هر یک از این چهار هاپلوتیپ DQ097431=A, DQ097451=B, DQ097457=C و D=DQ242212 می‌باشد.

جدول ۲- فواصل ژنتیکی و درصد تشابه بین زیر گروه‌های هاپلوتایپی نمونه‌های توالی‌یابی شده

Table 2- Genetic distances and percentage of similarity between the haplotypes' subgroups in sequenced samples

		1	2	3	4	5	6	7	8
H.G.1	1		5	6	2	4	7	5	7
H.G.2	2	99.58		7	5	3	8	10	6
H.G.3	3	99.49	99.41		4	6	5	7	5
H.G.4	4	99.83	99.58	99.66		4	7	5	5
H.G.5	5	99.66	99.75	99.49	99.66		9	9	9
H.G.6	6	99.41	99.32	99.58	99.41	99.24		6	6
H.G.7	7	99.58	99.15	99.41	99.58	99.24	99.49		8
H.G.8	8	99.41	99.49	99.58	99.58	99.24	99.49	99.32	

اعداد بالای قطر جدول، اختلاف نوکلئوتیدی و اعداد پایین قطر جدول، درصد تشابه ژنتیکی را نشان می‌دهند.

The numbers above the table diameter show the difference between the nucleotide and numbers below the table diameter show percentage of genetic similarity.

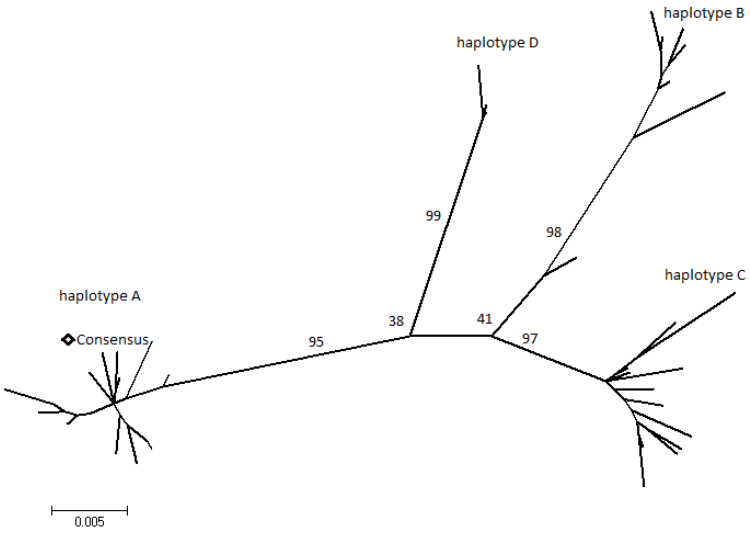
جدول ۳- میزان تنوع ژنتیکی برخی نژادهای ایرانی و آسیایی به همراه تعداد نمونه مورد بررسی از هر یک از جمعیت‌ها

Table 3- The genetic diversity of some Iranian and Asian breeds with number of samples from each population

نژاد گوسفند Sheep breed	ناحیه مورد مطالعه Studied region	تعداد نمونه‌ها Number of samples	تنوع ژنتیکی Genetic diversity	منبع Reference
بلوچی Baluchi	D-loop	27	0.0131	Present study
بلوچی Baluchi	HVR1	14	0.01	(28)
مغانی Moghani	HVR1	10	0.007	(18)
افشاری Afshari	HVR1	19	0.00268	(26)
شال Shall	HVR1	20	0.0092	(19)
سنگسری Sangsari	HVR1	20	0.0083	(19)
بومی پاکستان Native Pakistan	D-loop	25	0.0026	(20)
بومی تاجیکستان Native Tajikistan	D-loop	23	0.0823	(20)
بومی ازبکستان Native Uzbekistan	D-loop	4	0.0018	(20)
بومی ترکیه Native Turkish	D-loop	7	0.0029	(20)
بومی قزاقستان Native Kazakhstan	D-loop	20	0.0722	(20)

برای رسم درخت فیلوژنتیکی گوسفند نژاد بلوچی، از هر یک از چهار گروه هاپلوتیپی اصلی تعداد ۱۵ توالی از زیر گروه هاپلوتیپی شناسایی و همراه با توالی مورد توافق به دست آمده از نمونه‌های مورد بررسی، در رسم درخت مورد استفاده قرار گرفت. چنانچه در درخت رسم شده تعداد توالی‌ها (خطوط) کمتر از میزان ذکر شده است به این علت می‌باشد که توالی‌هایی که خیلی به هم نزدیک بودند، یک خوشه تشکیل دادند و در واقع قابل تفکیک نبوده‌اند (شکل ۳). با استفاده از این درخت می‌توان موقعیت گوسفند نژاد بلوچی (توالی Consensus) را به طور کلی در بین گروه‌های هاپلوتایپی تعیین نمود و در نهایت برخی از تغییرات و خصوصیات مورفولوژیکی این نژاد را توجیه نمود. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود گوسفند نژاد بلوچی در گروه هاپلوتایپی A واقع شده است. سه هاپلوتایپ اصلی A، B و C که هر

یک به ترتیب مربوط به آسیا، اروپا و آسیای مرکزی یا خاورمیانه هستند در مطالعات پیشین گزارش شده اند. در مطالعه‌ای روی ناحیه HVR1 و HVR2 ناحیه D-loop گوسفندان ایرانی نژاد شال و سنگسری گزارش شد که این دو نژاد به همراه دو نژاد دیگر بلوچی و مغانی در گروه هاپلوتایپ A قرار دارند (۱۹)، که با نتایج بدست آمده در این پژوهش تطابق دارد. در پژوهشی روی ناحیه CR1 نژاد گوسفند ایرانی (مغانی) مطالعاتی انجام شد که قرار گرفتن نژاد مغانی در هاپلوتایپ A را اثبات کرد (۱۸). بررسی میزان تنوع در ناحیه HVR1 از ژنوم میتوکندری گوسفند نژاد افشاری نیز نشان داد که این نژاد دارای کمترین فاصله ژنتیکی با نژاد بلوچی و مغانی است و در هاپلوتایپ A قرار دارد که این نتایج احتمالاً مربوط به خاستگاه جغرافیایی مشترک گوسفندان ایرانی می‌باشد (۲۶). بعد از اینکه محققین دو دودمان اصلی A و B را گزارش کردند (۳۶)، گروه دیگری از دانشمندان پس از مقایسه توزیع هاپلوتایپ‌ها در چند نژاد آلمانی، روسیه و قزاقستان، این دو دودمان را به ترتیب دو نژاد آسیایی و اروپایی معرفی کردند (۱۱). در بررسی نژادهای چینی و ترکیه‌ای نیز هاپلوتایپ C گزارش شد (۸، ۲۴). کلیه این مطالعات فیلوژنتیکی نشان دادند که هاپلوتایپ غالب در اروپا هاپلوتایپ B است، هاپلوتایپ C مربوط به خاورمیانه و آسیا و در نهایت هاپلوتایپ A نیز به صورت مشترک مربوط به خاورمیانه، آسیا و بخشی از اروپا می‌باشد (۴). از آنجا که جد پدری گوسفندان آسیایی به طور اختصاصی گوسفند اوریانتالیس (*O. orientalis*) معرفی شده است (۱۲)، بنابراین با توجه به قرار گرفتن کشور ایران در آسیا، و به طور ویژه، قرار گرفتن در منطقه خاورمیانه، غالب بودن هاپلوتایپ A در بین نژادهای مختلف ایرانی به خصوص نژاد بلوچی دور از انتظار نیست. بررسی چند شکلی در ناحیه mtDNA گوسفندان ترکیه هاپلوتایپ A را به عنوان هاپلوتایپ غالب در میان گوسفندان این کشور نشان داد (۲۲). یکی از دلایل حاکم بر این نتایج می‌تواند مربوط به مسیر مشترک و تاریخی باشد که کاروان‌های تجاری مسیرهای بین ترکیه، ایران، هند و چین از آن عبور می‌کردند و به همراه آن‌ها حیوانات اهلی نیز جابجایی داشته‌اند (۲۲).



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی بر اساس رویه Joining-Neighbor نرم‌افزار MEGA5

Figure 3- Phylogenetic tree based on Joining-Neighbor procedures of MEGA5 software

نتیجه‌گیری کلی

شناسایی و حفظ ذخائر ژنتیکی از اهداف ملی هر کشور به شمار می‌آید. تولید و پرورش گوسفند در ایران به دلیل محبوبیت بالای گوشت آن اهمیت به سزایی دارد، بنابراین به منظور اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی مناسب و موفق، شناخت ساختار ژنتیکی و دودمان نژادهای موجود در کشور الزامی می‌باشد. با توجه به توارث مادری میتوکندری و ویژگی غیر کد کنندگی ناحیه D-loop و ابقای هر گونه جهش در آن می‌توان این ناحیه را به عنوان ابزاری قدرتمند برای مطالعه منشاء و نحوه تفرق انواع گونه‌های حیوانی مورد مطالعه قرار داد و رفتارهای تولیدی، نحوه بقا و میزان مقاوت آنها در برابر تنش‌های محیطی را با توجه به هاپلوتایپی که در آن قرار گرفته‌اند پیش بینی کرد.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه گنبد کاووس انجام گردیده است. نویسندگان از مسئولین و کارکنان محترم مرکز اصلاح دام شمال شرق کشور به جهت در اختیار گذشتن نمونه‌ها و اطلاعات لازم برای انجام این تحقیق کمال تشکر را دارند.

منابع

1- Anderson, S. A. T., G. Bankier, M. Barrell, A. de Bruijn, J. Couson, I. Drouin, B. Nierlich, F. Roe, P. H. Sanger., and I. G. Young.1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature, 290: 457-465.
2- Avise, J. C., and R. C. Vrijenhock. 1987. Mode of inheritance and variation of mitochondrial DNA in hybridogenetic fishes of the genus *poeciliopsis*. Molecular Biology and Evolution, 4: 514-525.
3- Bruford, M., D. Bradley., and G. Luikart. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature Reviews Genetics, 3: 900-910.
4- Chen, S. Y., Z. Y. Duan, T. Sha, J. Xiangyu., and S. F. Wu. 2006. Origin, genetic diversity, and population structure of Chinese domestic sheep. Gene, 376: 216–223.
5- Chessa, B., F. Pereira, F. Arnaud, A. Amorim., and F. Goyache. 2009. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. Science, 324: 532–536.
6- Excoffier, L., L. Guillaume, and S. Schneider. 2005. Arlequin: An integrated software for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online, 2005 (1): 47-50.
7- Frankhan, R. 1994. Conservation of genetic diversity for animal improvement. Page 385 in Proc: The 5th world congress on genetic applied to livestock production, University of Guelph, Ontario, Canada.
8- Guo, J., L. X. Du, Y. H. Ma, W. J. Guan., and H. B. Li. 2005. A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). Animal Genetics, 36: 331–336.
9- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-98.
10- Hallerman, E. M. 2003. Population genetics: principles and applications for fisheries scientists. American Fisheries Society.
11- Hiendleder, S., K. Mainz, Y. Plante., and H. Lewalski. 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. Journal of Heredity, 89: 113–120.
12- Hiendleder, S., B. Kaupe, R. Wassmuth., and A. Janke. 2002. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. Pages 893- 904 in Proc. Royal Society of London Biological Sciences.
13- Jazin, E., H. Soodyall, P. Jalonen, E. Lindholm, M. Stoneking., and U, Gyllensten. 1998. Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism. Nature Genetics, 18: 109-110.
14- Knudsen, B., T. Knudsen, M. Flensborg, H. Sandmann, M. Heltzen, A. Andersen, M. Dickenso, J. Bardram, P. Steffensen, S. Mønsted, T. Lauritzen, R. Forsberg, A. Thanbichler, D. Jannick, L. Görlitz, J. Rasmussen, D. Tordrup, M. Værum, M. Nygaard, C. Hachenberg, E. Fisker, P. Dekker, J. Schultz, M. K. Hein., and J. Sinding. 2007. CLC Main Workbench.Version 5.5. Aarhus, Denmark, CLC bio.
15- Lalitha, S. 2000. Primer premier 5. Biotech Software & Internet Report: The Computer Software. Journal for Scientists, 1(6): 270-272.
16- Mirhosseini, S. Z. 1998. Study the genetic diversity of Iranian silkworm using protein markers and DNA. MSc thesis. Tarbiat Modares University. (In Persian).
17- Miyazono, F., P. M. Schneider, R. Metzger, U. Warnecke-Eberz, S. E. Baldus, H. P. Dienes, T. Aikou., and A. H. Hoelscher. 2002. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus. Oncogene, 21: 3780-3783.
18- Mohammadhashemi, A. 2010. Sequencing the HVR-1 region of mithochondrial genome in Moghani sheep breed. MSc thesis. Tabriz University. (In Persian).
19- Mohammadhashemi, A., N. Pirani, M. R. Nassiri, T. Abbassi Dalooii., and B. Baghban. 2012. Studying the partially sequenced mtDNA hypervariable region 1 (HVR1) of Iranian Moghani sheep. Annals of Biological Research, 3 (6): 2906-2910.
20- Naderi, S., H. R. Rezaei, P. Taberlet, S. Zundel, S. A. Rafat, H. Naghash, M. El-Barody, O. Ertugrul., and F. Pompanon. 2007. Large-Scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. Plos one, 10:1-10.
21- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press.
22- Oner, Y., and J. H. Calvo. 2013. Investigation of the genetic diversity among native Turkish sheep breeds using mtDNA polymorphisms. Tropical Animal Health and Production, 45(4): 947-951.
23- Parvari, R., A. Avivi, F. Lentner, E. Ziv, S. Telor, Y. Burstein., and I. Schechter. 1988. Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. The EMBO journal, 7(3): 739.
24- Pedrosa, S., M. Uzun, J. J. Arranz, B. Gutierrezz-Gil, F. San., and P. Rimitivo. 2005. Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. Page 272 in Proc. of Biological Science.

25- Pirani, N., A. Mohammadhashemi, S. Alijani, R. Rezazadeh Goli., and S. Ghanbari. 2009. Molecular analysis of Mazandrani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA. Agricultural Biothechnology, 2 (2): 53-65. (In Persian)
26- Pirkhezranian, Z., M. Tahmoorespur, A. Mohammadhashemi, N. Pirani., and M. Azghandi. 2015. Genetic and phylogenetic analyses of HVR-I region of mtDNA in Afshari sheep breed. Agricultural Biotechnology, 14: 65-71. (In Persian)
27- Ryder, M. L. 1984. Sheep. In: Evolution of Domesticated Animals (Mason SL, ed). London: Longman 63–85.
28- Shafagh Motlagh, A. 2008. A preliminary study on the sequence of the D-loop and HVR1 region of mitochondrial DNA of some groups of domestic and wild sheep and goats. MSc thesis. Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian).
29- Tahmoorespur, M., and M. Sheikhloo. 2011. Pedigree analysis of the closed nucleus of Iranian Baluchi sheep. Small Ruminant Research, 99(1): 1-6.
30- Tamura,K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher,M. Nei., and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10): 2731-2739.
31- Tapio, M., N. Marzanov, M. Ozerov, M. Ćinkulov, G. Gonzarenko, T. Kiselyova, M. Murawski, H. Viinalass, and J. Kantanen. 2006. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. Molecular Biology and Evolution, 23(9): 1776-1783.
32- Technelysium P. L. 2007. Chromas lite version 2.01.
33- Upholt, W. B., and I. B. Dawid. 1977. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D-loop region. Cell, 11: 571 -583.
34- Villalta, M., P. Fernandez-Silva, B. Beltran, L. Enguita, M. J. Lopez-Perez., and I. Montoya. 1992. Molecular characterization and cloning of sheep mitochondrial DNA. Current Genetics, 21:235-240.
35- Wolf, C., J. Rentsch., and P. Hubner. 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 7: 1350-1355.
36- Wood, N., and S. Phua. 1996. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. Animal Genetics, 27(1): 25-33.
37- Zeuner, F. E. 1963. A history of domesticated animals. Hutchinson, London.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 10, No. 1, Spring 2018, p. 131-139

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، ص. ۱۳۹-۱۳۱

Genetic Diversity and Phylogenetic Analysis of D-loop Region of mtDNA in Baluchi Sheep Breed

F. Bahri Binabaj[1*]- G. Bihamta[2] – Z. Pirkhezranian[3]

Received: 13-04-2017
Accepted: 15-05-2017

Introduction Native animals are part of the national capital and strategic reserves of any country which their diversity is very important. Mitochondrial genome (mtDNA) in sheep is 16.58 Kbp. MtDNA has a region named D-loop or control region with no coding gene. Rate of nucleotide mutation in this region is 10 times the nucleus DNA. D-loop has promotors to regulate mtDNA transcription. This region is consisted of HVR1 and HVR2 sites. As the mtDNA is haploid and no meiosis occurs in it, so D-loop region of the mitochondrial genome is a powerful and applicable tool to determine the level of genetic diversity, to study the phylogenetic relationship between the populations and species as well as study the origin and dispersion of animal species. Baluchi sheep breed is one of the important Iranian sheep breeds which has a major role in production of red meat. Due to high strength and resistance to water scarcity it has been able to adapt with hot and dry weather conditions in East and South East of Iran. Due to the high diversity of species and subspecies, the importance of maintaining the purity of native breeds and incomplete information on sheep domestication in Iran, this study was performed to investigate the variation in Baluchi sheep breed and phylogenetic analyzes of mitochondrial D-loop region.

Material and methods Blood samples collection was done randomly from 27 non relative sheep which were kept in Animal Breeding center of Northeast of Iran (Abbasabad breeding station). DNA extraction was done using Diatom DNA Prep kit. DNA quality and quantity were checked using 8% agarose gel and spectrophotometer Nano drop ND-200, respectively. Primers were designed using Primer Premier5 software to amplify 1180 bps fragment of D-loop region of mitochondrial DNA. Primers specificity was checked in BLASTPrimer of NCBI. To Sequence the amplified region, samples were send to Bioneer Company. To enhance the accuracy of sequencing, each sample was sequenced from both sides. Nucleotide sequences were edited with Chromas Lite 2.01 software. After proofing the quality of sequences they were reformatted from ab1 to FASTA. Then homology of the sequences with registered sequences of the same gene in NCBI and with the sequences themselves was determined using BLASTN in NCBI database and CLC Main workbench 5.5 software, respectively. To draw the phylogenetic tree of Baluchi sheep breed, 15 sequences from each 4 haplogroups were identified and along with consensus sequence from samples were used. To draw the phylogenetic tree with 1000 iterations, the Neighbor-Joining method of MEGA5 software was used and to determine the genetic distance the Create Pairwise Comparison procedure of CLC Main workbench 5.5 software was used.

Results and discussion Eight haplogroups were observed. The frequencies of haplogroups were 7.40, 7.40, 14.81, 11.11, 18.51, 14.81, 11.11 and 14.81. Haplogroups 2 and 7 had the highest difference between the nucleotides (10 nucleotides) with 99.15 percent genetic similarity, and haplogroups 1 and 4 had the highest genetic similarity (99.83 percent) with 2 nucleotide difference. The present genetic diversity among the 27 samples was estimated 0.0131±0.005. This level of diversity is in the average range of nucleotide diversity which is reported in eukaryotes. The Phylogenetic analysis in this study showed that Baluchi sheep breed is located in the A haplotype.

Conclusion: Since the origin of haplotype A is from Asia and Middle East, and according to the results of earlier studies on native Iranian sheep breeds shuch as Moghani, Shal, Sangsari and Afshari it can be concluded that the Baluchi sheep was in the mentioned haplotype therefore the placement of this breed in this haplotype is justifiable.

Keywords: Baluchi sheep, Haplotype, Mitochondrial genome, Phylogenic.

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Gonbad Kavoos University, Gonbad, Iran.
2, 3- MSc Graduate and PhD Student in Animal Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad, Iran.
(*Corresponding Author Email: fatemebahri_b@yahoo.com)