تجزیه و تحلیل مولکولی جمعیتی از مرغ بومی مازندران با استفاده از توالی ناحیه HVR-I ژنوم میتوکندری

نصرالله پیرانی[1*]، آرزو محمدهاشمی[2]، صادق علیجانی[1]، رامین رضازاده گلی[1]، صابر قنبری [3]

[1] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[2] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مشهد

[3] دانشگاه گوتنینگن آلمان

چکیده

حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بومی مرغ در نقاط مختلف ایران به دلیل اندازه کم جمعیت آنان برای انجام برنامه‌های اصلاح نژادی و افزایش تولید ضروری است. اولین گام در این راه تعیین تنوع ژنتیکی در این جمعیت‌ها است. بررسی توالی ناحیه HVR-I ژنوم میوکندری می‌تواند شاخصی مناسبی از میزان تنوع موجود در جمعیت‌های مورد بررسی ارائه دهد. هدف از این تحقیق تعیین توالی ناحیه HVR-I از ژنوم میتوکندری جمعیتی از مرغ مازندرانی ایران، تعیین میزان تنوع موجود در این جمعیت و ترسیم رابطه فیلوژنی آن با سایر نژادهای مرغ بود. به این منظور از تعداد 20 قطعه مرغ مازندرانی به طور تصادفی خون‌گیری انجام شد. پس از استخراج DNA از خون کامل، ناحیه HVR-I با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و قطعات تکثیر شده پس خالص سازی توالی یابی شدند. در کل 19 توالی با کیفیت مناسب بدست آمد. پس از اخذ توالی‌های مشابه ژنوم میتوکندری دیگر نژادهای موجود در بانک جهانی ژن و مرغ مرندی ایران درخت فیلوژنی با استفاده از آنها ترسیم شد. نتایج فیلوژنی مشخص کرد که مرغ بومی مازندرانی ایران با مرغ مرندی ایران، بومی کشور آذربایجان، لگهورن سفید، پلیموتراک پر خطدار، مرغ ابریشمی و جنگلی خاکستری (سونراتی) در یک دسته قرار دارند. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مرغ مازندرانی احتمالا" واجد برخی شباهت‌های ژنتیکی با این نژادها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *تعیین توالی، ژنوم میتوکندری، فیلوژنی، مرغ بومی مازندرانی، ناحیه بسیار متغیر 1.*

* نویسنده مسئول : نصرالله پیرانی تلفن: **0411-3392029** Email: npirany@gmail.com

مقدمه

وجود بیش از یکصد توده ژنتیکی بومی دام و طیور در ایران که با شرایط محل زندگـــی خود به خوبی سازگـــار شده و نسبت به بیماری های منطقه ای مقاومت نسبی پیدا کرده اند، از سرمایه-های مهم و ملی کشور به‌شمار می آیند (Tavakolian, 1999). پرورش مرغ بومی از دیرباز در نقاط مختلف روستایی و حتی شهری، بخصوص در مناطق شمالی ایران رایج بوده و پرورش دهندگان علاوه بر نیازهای خود، مازاد تولیدات را به فروش می رسانند. از این رو ضمن ایجاد اشتغال، کمک به اقتصاد خانوارهای روستایی و در تولید بخشی از منابع غذایی نقش مهمی ایفا می کنند. بنابراین، استفاده از طیور بومی به عنوان جمعیت مولد ژنتیکی پایه در برنامه‌های اصلاح نژادی طیور کشور دارای مزایای بسیاری است و شناخت دقیق تر و کسب اطلاعات بیشتر در مورد آنها جهت حفظ این ذخایر ژنتیکی ضروری به‌نظر می رسد. یکی از راههای شناسایی این نژادها استفاده از تکنیکهای مولکولی بخصوص استفاده از ژنوم میتوکندری (mtDNA) است. میتوکندری اندامکی سیتوپلاسمی است که در بیشتر سلول‌های بدن وجود دارند. این اندامک که قادر به تولید انرژی برای سلول است دارای DNA حلقوی اختصاصی و مستقل از DNA هسته ای است و در گونه‌های جانوری 37 ژن را کد می‌کند که شامل 13 ژن کد کننده زنجیره تنفسی، 22 ژن کد کننده tRNA و 2 ژن کد کننده rRNA است و طول تقریبی آن در طیور 16 کیلو جفت باز می باشد (Wallce, 1992). ژنوم میتوکندری دارای ناحیه‌ای به نام D-loop یا ناحیه کنترل[1] است که فاقد هر گونه ژن رمز کننده‌ای بوده و بنابراین وقوع هر نوع جهش می‌تواند در آنجا تثبیت شود و میزان جهش نوکلئوتیدها در این منطقه حدود 10 برابر DNA هسته‌ای است (Anderson et al., 1981). میزان بالای جهش و وجود تفاوت در افراد مختلف در این ناحیه سبب شده تا توالی‌یابی بخش‌های مختلف این ناحیه از ژنوم میتوکندری جهت تعیین تنوع ژنتیکی و شناسایی منشأ نژادهای مختلف مورد توجه قرار گیرد. ناحیه D-loop به سه ناحیه کنترلی کاملاً مشخص تقسیم می‌شود. قطعه آغازین یا ناحیه کنترل[2] I (HVR-I) در انتهای $3'$، قطعه انتهایی یا ناحیه کنترل III (HVR-III) در انتهای $5'$ و قطعه میانی یا ناحیه کنترل II در بین دو ناحیه فوق قرار دارد. نواحی کنترل I و III دارای بالاترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی در افراد مختلف هستند و به خاطر تکامل سریع، مطالعه توالی این نواحی در بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط میان گونه‌ها بسیار ارزشمند است، اما ناحیه کنترل II اغلب توالی حفاظت شده‌ای دارد و دارای کمترین میزان

[1] Control region (CR)
[2] Hyper variable Regions I, II, III

تغییرات نوکلئوتیدی است (Sultana & Mannen, 2004). از کاربردهای ژنوم میتوکندری می‌توان به تشخیص همزمان گوشت گونه های مختلف مثل گاو، گاو میش، گوسفند و بز در مخلوط گوشت (Pirany & Elyasi Zarrin Ghobai, 2009)، تشخیص وجود بقایای طیور و نشخوارکنندگان در نمونه هایی از پودر ماهی (Heravy *et al*., 2007)، تشخیص هویت (Lutz *et al*., 1998) و تشخیص تنوع ژنتیکی و تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم (Hiendleder *et al*., 1998) اشاره نمود. اولین توالی کامل ژنوم میتوکندری مرغ به طول 16775 جفت باز و همچنین طول ژن‌های مختلف واقع بر آن و ناحیه D-loop به طول 1227 با کد دسترسی X52392 گزارش شده است (Desjardins & Morais, 1990). استفاده از نواحی کنترلی میتوکندری در آنالیزهای مولکولی اولین بار با مطالعه ناحیه کنترل غیر کد کننده mtDNA پرندگان مختلف به روش RFLP صورت گرفت و زیر گونه مرغ جنگلی قرمز (گالوس گالوس) به عنوان جد مادری تمام نژادهای اهلی معرفی شد (Fumihito et al., 1994). از آن زمان تا کنون مطالعات بر پایه توالی ژنوم میتوکندری سرعت یافته است. در مطالعه دیگری توالی ناحیه D-Loop میتوکندری به طول 1232–1231 جفت باز در 20 نژاد مرغ بومی ژاپنی و همچنین لگهورن سفید، ردآیلندرد و مرغهای بومی اندونزیایی بررسی و روابط فیلوژنتیک و مسیر و منشأ مادریشان مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه فوق 42 هاپلوتیپ و 7 هاپلوگروه (A تا G) مشخص شد (Oka *et al*., 2007). در مطالعه دیگری که روی ژنوم میتوکندری 140 پرنده از زیر گونه‌های مرغ جنگلی لافایتی، سبز و قرمز انجام گرفت، 44 عدد SNP از 42 هاپلوتیپ از 6 گروه هاپلوئیدی شناسایی شد (Silva *et al*., 2008). همچنین در تحقیقی که بر روی مرغ مرندی ایران انجام گرفته است پس از توالی یابی و بررسی تنوع در قطعه HVR-I تعداد 5 هاپلوتیپ مشاهده شد (Mohammadi Pestehbig, 2009). هدف از این تحقیق تعیین و بررسی توالی نوکلئوتیدهای بخش HVR-I از ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری مرغ بومی مازندران ایران بود تا اطلاعاتی از وضعیت توالی این ناحیه از ژنوم میتوکندری این نژاد بدست آورده و ضمن مقایسه با سایر نژادها توالی بدست آمده برای این توده بومی در بانک جهانی ژن ثبت شود.

مواد و روش ها

نمونه ها و استخراج DNA

برای اجرای این پژوهش نمونه های خون به طور تصادفی از تعداد 20 قطعه مرغ (10 مرغ و 10 خروس) غیرخویشاوند مازندرانی گرفته شد. نمونه های خون مورد استفاده در این پژوهش از

جوجه‌های مازاد مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران اخذ شد (شکل 1).

استخراج DNA توسط یک روش بهینه یافته انجام شد (Bailes et al., 2007). کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و کیفیت آن با الکتروفورز روی ژل آگارز 0/8 درصد تعیین شد.

شکل 1- گله مرغ مازندرانی.

Figure 1- Mazandrani chicken flock.

انتخاب آغازگرها و واکنش زنجیره ای پلیمراز

در این پژوهش از دو آغازگر اختصاصی رفت و برگشت ناحیه (قسمت اول ناحیه D-loop) ژنوم میتوکندری گونه مرغ که 20 نوکلئوتید طول داشتند استفاده شد. آغازگر رفت در فاصله 16775-16756 بازی و آغازگر برگشت هم در فاصله 649-668 بازی از ژنوم کامل میتوکندری مرغ اهلی با شماره دسترسی (X52392) متصل می شدند (Desjardins & Morais, 1990). توالی دو آغازگر به شرح زیر است (شرکت MWG آلمان).

F (5'-GGCTTGAAAAGCCATTGTTG-3')
R (5'-CCCCAAAAAGAGAAGGAACC-3')

دو آغازگر M13-F (5'-GTAAAACGACGCCAG-3') و M13-R- (CAGGAAACAGCTAGGAC-3') به انتهای 5َ هر کدام از آغازگرهای تکثیر کننده ناحیه HVR-I متصل شدند. این توالی‌های جهانی جهت ایجاد نقاط هدف برای آغازگرهای تعیین توالی بعد از تولید محصولات واکنش زنجیره ای مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از مخلوط Taq شروع گرم[1] (شرکت کیاژن آلمان) در حجم نهایی 20 میکرولیتر شامل 50 نانوگرم DNA ژنومی و 6 پیکومول از هر آغازگر انجام گرفت.

[1] Hot start Taq Master Mix

برنامه حرارتی شامل دمای واسرشته شدن اولیه 94 درجه سانتیگراد به مدت 3 دقیقه، 30 چرخه دمایی با دمای واسرشت 95 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه، دمای اتصال 55 درجه سانتیگراد مدت 45 ثانیه، دمای تکثیر 72 درجه سانتیگراد به مدت 90 ثانیه و دمای تکثیر نهایی 72 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه انجام شد. برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، نمونه ها و DNA اندازه روی ژل آگارز (شرکت مرک آلمان) با غلظت 1/5 ٪ الکتروفورز شدند (شکل 2).

تعیین توالی محصولات تکثیر شده

محصولات تکثیر شده با استفاده از کیت ExoSAP-IT (شرکت USB آلمان) تخلیص شده و سپس با استفاده از آغازگرهای فلورسنس دار مکمل با آغازگرهای متصل شده (M13-F و M13-R) و با استفاده از کیت توالی‌یابی[1] (شرکت USB آلمان) توالی یابی شدند. بدین منظور محصولات آماده شده روی ژل پلی‌آکریلامید 6 درصد دستگاه LICOR اجرا شدند. توالی های رفت و برگشت با استفاده از نرم افزار دستگاه فوق (شرکت LICOR آلمان) هم ردیف و توالی نهایی مشخص شد. پس از بررسی اولیه توالی‌های حاصله از آنجا که مشخص شد تمامی تغییرات نوکلئوتیدی در فاصله 455 جفت بازی قرار دارند بنابراین همین اندازه مبنای مقایسه برای تمامی توالی های بدست آمده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل توالی ها

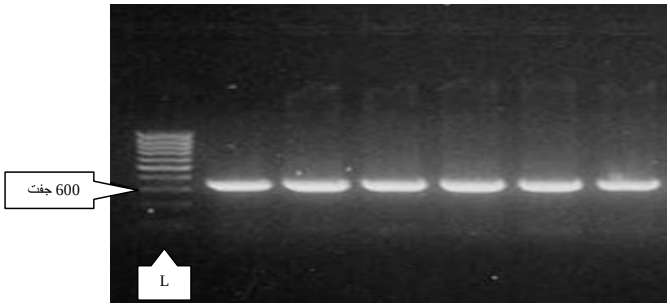
تجزیه و تحلیل توالی ها توسط برنامه های نرم افزاری مختلفی انجام گرفت. کلیه توالی‌های مربوط به مرغ مازندرانی توسط نرم افزار MEGA 4 (Tamura et al., 2007) در یک فایل ادغام و پس از همردیف کردن توالی‌های به دست آمده، نوکلئوتیدهای جایگزین، حذف و یا اضافه شده تعیین و هاپلوتیپ‌ها نیز مشخص شدند. فاصله درون هاپلوتیپی، تنوع هاپلوتیپی (هتروزیگوسیتی) و تنوع نوکلئوتیدی (π) توسط نرم افزار Arlequin 3.5 (Excoffier et al., 2005) محاسبه شد. درخت فیلوژنی برای تعیین نزدیکی هاپلوتیپ‌های این نژاد و نژاد مرندی پس از هم ردیف شدن توالی‌های هر دو، توسط رویه NJ[2] بر پایه ML[3] به کمک نرم‌افزار MEGA 4 رسم گردید. توالی کلی (جامع)[4] مرغ مازندرانی با توالی این ناحیه در نژاد و سویه‌های مختلف مرغ اهلی اخذ شده از بانک ژن (NCBI, 2010) به همان طریق در ابتدا همردیف و سپس درخت فیلوژنی مربوطه ترسیم شد.

[1] Thermo Sequence Cycle

[2] Neighbor- Joining
[3] Maximum Likelihood
[4] Consensus

نتایج و بحث

کیفیت و اندازه تقریبی محصولات واکنش زنجیره ای پلی مراز در شکل 2 آورده شده است. با توجه به شکل فوق ضمن قابل قبول بودن کیفیت محصولات تکثیر شده اندازه آنها نیز در حد قابل انتظار بود.



شکل 2- الکتروفورز محصولات PCR. قطعات تکثیر شده در محدود باندهای 600 تا 700 قرار دارند (L: DNA اندازه 100 جفت بازی).

Figure 2- Electrophoresis of PCR products. The sizes of products are in the range of 600-700 bps (L: 100 bp DNA ladder).

توالی یابی در 19 نمونه به خوبی انجام گرفت و فقط در یک نمونه کیفیت خوبی نداشت که از مجموعه داده کنار گذاشته شد. به طور متوسط در تمام نمونه ها، تعداد 455 نوکلئوتید مورد استفاده قرار گرفتند که بیشترین تغییرات نوکلئوتیدی در آن ناحیه قرار داشتند. تعداد 6 هاپلوتیپ از بین توالی-های مورد بررسی تعیین شدند که دارای 10 جایگاه چند شکل (SNP) بودند. از جایگاههای چند شکل حاصله تعداد 9 عدد حاصل از تغییرات درون بازهای پورینی و یا پیریمیدینی[1] و یکی هم (جایگاه شماره 198) حاصل تبدیل به هر نوکلئوتید[2] دیگر بود. این تغییرات به طور عمده از نوکلئوتید شماره 198 تا 446 مشاهده شدند. ویژگی‌های نمونه‌های مورد بررسی در جدول 1 آورده شده است. نتایج جایگزینی نوکلئوتیدها در این تحقیق از نسبت جهش‌ها در میان 4 نوکلئوتید موجود در ساختمان DNA که توسط سایرین (Li et al., 1984) گزارش شده پیروی می کند. به عنوام مثال در گزارش فوق سرعت جهش نسبی تبدیل نوکلئوتید تیپ وحشی C به A حدود 6/5 ذکر شده که این حالت هم در این تحقیق فقط در یک جایگاه (شماره 198) رخ داده است. بیشترین فراوانی نسبی هاپلوئیدی مربوط به نوع چهارم است که در حدود 47/4 درصد از موارد را شامل می‌شود. بیشترین فاصله درون

[1] Transition
[2] Transversion

هاپلوتیپی بین هاپلوتیپ 4 با هاپلوتیپ‌های 3 و 5 به ترتیب با 8 و 7 نوکلئوتید و کمترین نیز بین هاپلوتیپ‌های 3 و5 و همچنین هاپلوتیپ 1 با هاپلوتیپ های 2 و 6 (با 1 نوکلئوتید) مشاهده شد.

تعدادی از جایگاههای چند شکل مشاهده شده در این تحقیق هم از نظر محل و هم از نظر نوع جایگزینی نوکلئوتیدی مطابق با تعدادی از گزارشات در رابطه با مرغ اهلی بود. به عنوان مثال 6 عدد از این چندشکلی‌ها با آنچه برای مرغان اندونزیایی (Sulandari et al., 2008) و اقیانوسیه (Dancause et al., 2011) و 4 عدد نیز مشابه با مرغان ویتنامی (Cuc et al., 2011) بود. این مشابهت می‌تواند دلیلی بر صحت توالی‌های بدست آمده و همچنین وجود جد و یا اجداد مشترک بین جمعیت‌های مورد بررسی باشد.

جدول1- SNP های به دست آمده برای هاپلوتیپ‌های مرغ مازندرانی.

		موقعیت SNP SNP position									
هاپلوتیپ Haplotype	فراوانی Frequency	198	199	217	222	249	281	306	310	355	446
1	4	C	C	C	A	A	A	T	T	T	T
2	2	.	T	T	.	.	G	C	.	.	C
3	2	.	T	.	G	G	.	.	C	C	.
4	9	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
5	1	.	T	.	G	G	.	.	.	C	.
6	1	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.

Table 1- SNP positions of Mazandrani chicken haplotypes.

از آنجا که تعداد جایگاههای چند شکل به تعداد نمونه وابسته می‌باشد لذا از پارامتر دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی (π) یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید استفاده شد که به طول DNA و اندازه نمونه بستگی ندارد و عبارت از متوسط تفاوت نوکلئوتیدی بین دو توالی در هر جایگاه می باشد (Nei, 1987). تنوع نوکلئوتیدی (π±SD) در جمعیت مرغ مازندرانی 0/0032 ± 0/0051 تخمین زده شد. مقدار تنوع نوکلئوتیدی در مطالعه حاضر در محدوده مقداری است (0/019-0/002) که برای موجودات یوکاریوت ذکر شده است (Nei, 1987). متوسط تنوع نوکلئوتیدی برای

15 جمعیت از مرغان اندونزیایی 0/00994 گزارش شده است (Sulandari et al., 2008) که اندکی بیشتر از مقدار برآورد شده برای مرغ مازندرانی است. مقدار تنوع هاپلوتیپی (هتروزیگوسیتی یا تنوع ژنی) در جمعیت حاضر 00852/ ± 0/7424 برآورد شد. این مقدار در محدوده گزارش شده (0/78 – 0/29) برای مرغان آسیای جنوب شرقی، مرغان زیمبابویه‌ای با منشأ هندی و برخی لاینهای تخمگذار و گوشتی تجارتی و خیلی نزدیک به مقدار گزارش شده برای لاینهای گوشتی تجارتی است (Muchadeyi et al., 2008). در صورتی که این مقدار برای برخی از جمعیتهای مرغ ویتنامی خیلی زیاد (0/94) گزارش شده است (Cuc et al., 2011) که نشان دهنده تنوع متوسط و پایین در این جمعیت می‌باشد. فراوانی نسبی نوکلوتیدها در توالی تک رشته ناحیه HVR-I توالی کلی مرغ مازندرانی به طول 455 نوکلئوتید با توالی ناحیه مشابه در مرغ مرندی به عنوان تنها نژاد ایرانی با توالی ثبت شده با کدهای دسترسی GU481096-105 در جدول 2 آورده شده است که تفاوت بسیار اندکی در آنها مشاهده می‌شود. با این وجود تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی در مرغ نژاد مرندی بیشتر است که بیانگر وجود تنوع بیشتر در این جمعیت می‌باشد.

جدول 2- تعداد هاپلوتیپ، درصد فراوانی نسبی نوکلئوتیدها، تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوئیدی ناحیه HVR-I مرغ مازندرانی و مرندی.

جمعیت Population	تعداد نمونه Sample size	تعداد هاپلوتیپ No. of Haplotype	A	G	C	T	تنوع نوکلئوتیدی Nucleotide diversity (±SD)	تنوع هاپلوئیدی Haplotype diversity (±SD)
مازندرانی Mazandrani	19	6	29.2	13.1	27.6	30.2	0.0051 ± 0.00324	0.74 ± 0.0085
مرندی Marandi	10	5	29.2	13.1	27.5	30.2	0.0115 ± 0.00689	0.82 ± 0.0969

Table 2- Number of haplotypes, nucleotides relative frequency percentage, nucleotide and haplotype diversities of Mazandrani and Marandi chickens HVR-I.

همچنین جهت تعیین میزان شباهت هاپلوتیپ-های موجود در این دو نژاد، نمودار فیلوژنی با توالی هاپلوتیپ های ناحیه HVR-I از قسمت D-loop مرغ مازندرانی (MAZ) و مرندی (MAR) ترسیم شد. همانطور که در شکل 3 مشاهده می‌شود توالی این ناحیه در برخی از هاپلوتیپ های مرغ مازندرانی با مرندی بسیار نزدیک است و با مقایسه تک تک نوکلئوتیدها در هاپلوتیپ‌های این دو نژاد مشاده شد که هاپلوتیپ‌های شماره های 2 و 4 در هر دو نژاد دقیقاً مشابه می‌باشند که می‌تواند هم به دلیل نزدیکی جغرافیایی و هم تفرق این دو جمعیت در فاصله زمانی کمی باشد.

برای تعیین موقعیت این نژاد در بین برخی نژادها نمودار فیلوژنی با توالی کلی بخش HVR-I ازناحیه D-loop مرغ مازندرانی و 14 نژاد مرغ موجود در بانک جهانی ژن رسم شد. همانطور که در شکل 4 مشاهده می‌شود، توالی این ناحیه در مرغ مازندرانی با مرغ مرندی ایران، بومی آذربایجان، لگهورن سفید، پلیموتراک پر خط دار، مرغ ابریشمی و جنگلی خاکستری (سونراتی) نزدیکی بیشتری دارد که این نزدیکی ممکن است به علت تشابه ژنتیکی مرغ مازندرانی ایران از طریق مشابهت اجدادی به این نژادها باشد. در **پژوهش**های سایر محققین نیز چنین تشابهاتی وجود دارد، مثلاً در مطالعه‌ای که به روش RFLP روی ناحیه کنترل غیر کد کننده mtDNA پرندگان مختلف انجام شده است، زیر گونه مرغ جنگلی قرمز (*گالوس گالوس*) به عنوان جد مادری تمام نژادهای اهلی مرغ معرفی شده است (Fumihito *et al*., 1994). در مطالعه دیگری که به منظور بررسی منشأ مادری و تعیین روابط فیلوژنتیک 20 نژاد بومی ژاپنی و مرغهای بومی اندونزیایی انجام گرفته است نتیجه گرفته شده است که بعضی نژادهای منتسب به ژاپن از داخل ژاپن نشأت نگرفته‌اند و نژادهای سایر کشورها پایه مرغهای بومی ژاپنی را تشکیل داده اند (Oka *et al*., 2007).

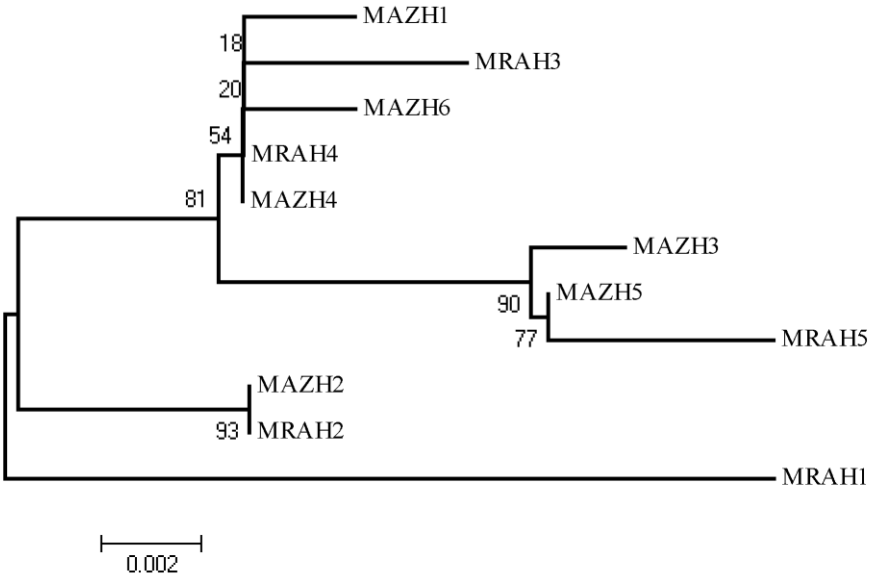
نتیجه گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیکی متوسط تا پایینی در این جمعیت وجود دارد. مشابهت تعدادی از جایگاههای چند شکل نشان دهنده نزدیکی ژنتیکی این جمعیت با نژادهای مرغ سایر کشورهاست. ورود مرغ‌های اصلاح شده خارجی به کشور موجب بی توجهی به ظرفیت تولیدی مرغ های بومی شده‌است. با توجه به سازگاری نژاد های مرغ بومی نسبت به شرایط محل زندگـــی خود و مقاومت نسبی آنها به بیماری‌های موجود در منطقه، به کمک شیوه های اصلاح نژادی امکان افزایش ظرفیت تولیدی آنها وجود دارد. به کمک توالی یابی ناحیه HVR-I ژنوم میتوکندری با توجه به طول کوتاه و آسان بودن روش و آنالیز داده‌ها و مقایسه آن با برخی از نژادهای پرتولید

تجارتی می‌توان دریافت که این نژادها در برخی موارد شباهتهایی با نژادهای پرتولید دارند که بیانگر توانایی و قابلیت تولیدی این نژادها می باشد. همچنین با استفاده از توالی های فوق و ثبت آنها در بانک جهانی ژن به نام کشورمان می تواند به عنوان شاخص مناسبی جهت شناسایی نژادهای مرغ بومی مورد استفاده قرار گیرد.

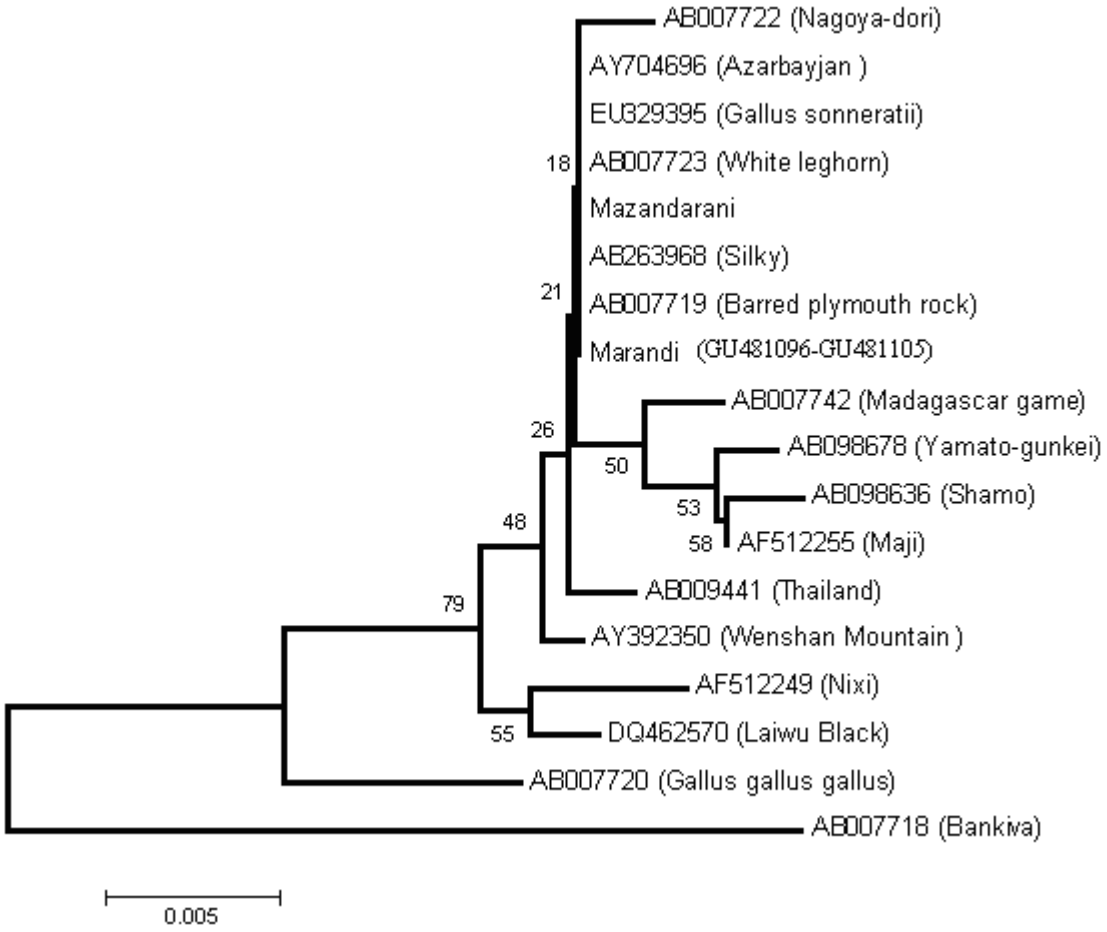
سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین و دست اندرکاران مرکز اصلاح نژاد مرغ مازندرانی بخاطر تلاش در جهت حفظ و افزایش توانایی تولید این نژاد و همچنین از آزمایشگاه آقای S. Weigend (Institute of Farm Animal Genetics, Mariensee, Germany) بخاطر کمکهای ارزنده‌شان در تعیین توالی نمونه‌ها تشکر و قدردانی می‌شود.



شکل3- نمودار فیلوژنی (نمودار درختی NJ) ترسیم شده با استفاده از نرم افزار MEGA 4 با استفاده از توالی 11 هاپلوتیپ مربوط به مرغ مازندرانی (MAZ) و مرندی (MAR). هاپلوتیپ‌های هر نژاد با استفاده از Hx نشان داده شده است. اعداد روی گره ها مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از 1000 مرتبه نمونه گیری می‌باشد.

Figure 3- Neighbour-joining tree reconstructed using MEGA 4 software from 11 haplotypes sequences of Mazandrani (MAZ) and Marandi (MAR) chickens. The haplotypes of each population was showed with Hx. The numbers at the nodes represented the percentage bootstrap values for interior branches after 1000 replications.



شکل4- نمودار فیلوژنی (نمودار درختی NJ) بر اساس توالی کلی مرغ مازندرانی و برخی نژادهای مرغ موجود در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آنها. اعداد روی گره ها مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از 1000 مرتبه نمونه‌گیری است.

Figure 4- Phylogenetic tree (NJ) based on consensus sequences of Mazandrani and other chicken breeds are taken from GenBank along with their accession numbers. The numbers at the nodes represented the percentage bootstrap values for interior branches after 1000 replications).

منابع

1. Anderson SAT, Bankier G, Barrell M, de Bruijn A, Couson J, Drouin I, Nierlich B, Roe F, Sanger PH, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457-465.

2. Bailes SM, Devers JJ, Kirby JD, Rhoads DD (2007) An expensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. Poultry Science 86: 102- 106.
3. Cuc NTK, Simianer H, Groeneveld LF, Weigend S (2011) Multiple maternal lineages of Vietnamese local chickens inferred by mitochondrial DNA D-loop sequences. Asian-Australian Journal of Animal Sciences 24: 155-161.
4. Dancause KN, Vilar, MG, Steffy R, Lum JK (2011) Characterizing genetic diversity of contemporary pacific chickens using mitochondrial DNA analyses. PLos ONE [on line] 6: 1-8.
5. Desjardins P, Morais R (1990) Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. Journal of Molecular Biology 212: 599-634.
6. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.
7. Fumihito A, Miyake T, Sumi S, Takada M, Ohno S, Kondo N (1994) One subspecies of the red jungle fowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. National Academy of Sciences of the United States of America 91: 12505-12509.
8. Heravy Musavi A, Nassiry MR, Pouseifi khimehsaray GH, Soltani M, Javadmansh A (2007) Development of a polymerase chain reaction-based method to identify poultry, ruminants, and equine components in fish meal. Agricultural Sciences and Technology. 20: 259-266.
9. Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. Molecular Biology and Evolution 47: 441-448.
10. http:// www. Ncbi. Nlm. Nih. Gov.
11. Li WH, Wu CI, Luo CC (1984) Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. Journal of Molecular Evolution 21: 58-71.
12. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S (1998) Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. International Journal of Legal Medicine 111: 57-77.
13. Mohammadi Pestehbig F (2009) Determination of mitochondrial D-Loop sequences of Iranian native Marandi chicken. M.Sc. Thesis. University of Tabriz, Tabriz, Iran.
14. Muchadeyi FC, Eding H, Simianer H, Wollny CBA, Groeneveld E, Weigend S (2008) Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. Animal Genetics 39: 615–622.
15. Nei M (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
16. Oka T, Ino Y, Nomura K, Kawashima S, Kuwayama T, Hanada H, Amano T, Takada M, Takahata N, Hayashi Y, Akishinonomiya F (2007) Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. Animal Genetics 38: 287-293.
17. Pirany N, Elyasi Zarringhabaie GH (2009) Use of mitochondrial Cytochrome-b gene for simultaneous detection of cattle, buffalo, sheep and goat meat by multiplex-PCR. Animal Science Researches 20: 41-49.
18. Silva P, Guan X, Ho-Shing O, Jones J, Xu J, Hui D, Notter D, Smith E (2008) Mitochondrial DNA-based analysis of genetic variation and relatedness among Sri Lankan indigenous chickens and the Ceylon jungle fowl (*Gallus lafayetti*). Animal Genetics 40: 1–9.

19. Sulandari S, Zein M, Sartika T (2009) Molecular characterization of indonesian indigenous chickens based on mitochondrial DNA displacement (D)-loop sequences. HAYATI Journal of Biosciences [on line] 15: 145-154.
20. Sultana S, Mannen H (2004) Polymorphism and evolutionary profile of mitochondrial DNA control region inferred from the sequences of Pakistani goats. Animal Science Journal 75: 303-309.
21. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.
22. Tavakolian J (1999) A look at livestock and chicken genetic pool of Iran. Animal Research Institute of Iran.
23. Wallce DC (1992) Mitochondrial genetics a paradigm for aging and degenerative diseases. Science 256: 628-632.

Molecular Analysis of Mazandrani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA

Pirany N. *[1], Mohammadhashemi A[2]., Alijani S[2]., Rezazadeh Goli R[2]., Ghanbari S[3].

[1] College of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[2] College of Agriculture, University of Mashhad, Iran
[3] University of Gottingen, Germany

Abstract

Reserving genetic diversity in native chicken breeds of Iran because of little population size is necessary for breeding goals and increasing their production. The first step is determination of genetic diversity in existing populations. Studying mitochondrial HVR-I can give useful information about genetic diversity in those populations. This study was carried out for determination of the mitochondrial HVR-I sequence in Mazandarani native chicken in Iran, estimation of genetic diversity and determining its phylogenetic relationship with other chicken breeds. Blood samples were taken randomly from 20 birds. After extracting DNA, HVR-I region was amplified with specific primers and after purification was sequenced. From 20 primary sequences, 19 were sequenced properly. The phylogenic tree was drawn with consensus sequence of Mazandarani breed and other similar sequences of different chicken breeds obtained from GenBank. In the phylogenic tree, the Mazandarani breed was clustered with Iranian Marandi native chicken, Azarbayjan native, white Leghorn, Barred Plymouth rock, Silky and Sonerati breeds. Then, it can be concluded that Mazandarani breed has some genetic similarities with these chicken breeds.

Key words*:* *DNA sequencing, HVR-I, Mazandrani native chicken, mtDNA, phylogeny***.**

*Corresponding author : Pirany Nasrollah Tel: 04113392029 Email: npirany@gmail.com