مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه سیتوکروم b در مرغ بومی خراسان

محمدرضا نصیری[1]، زهرا رودباری*[2]

[1]دانشیار گروه علوم دامی و پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد

[2]دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: 1392/03/04، تاریخ پذیرش: 1392/04/16

چکیده

حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت مرغان بومی به عنوان سرمایه ملی و کوچک بودن اندازه جمعیت آنها بسیار حائز اهمیت است. بررسی توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b میتوکندری در بین نژادها یا در درون آنها می تواند شاخص مناسبی از میزان تنوع موجود در جمعیت های مورد مطالعه باشد. هدف از پژوهش اخیر، بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b از ژنوم میتوکندری مرغ بومی خراسان است. بدین منظور از 5 قطعه مرغ بومی خراسان نمونه خون جمع آوری گردید. پس از استخراج DNA، تکثیر قطعه 858 جفت بازی ناحیه سیتوکروم b میتوکندری توسط آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. قطعات تکثیر شده پس از خالص سازی به صورت رفت و برگشت توالی یابی شدند. تعداد 2 هاپلوتیپ مختلف بر اساس2 نوکلئوتید چند شکل موجود در توالی ها تعیین گردید. توالی های نهایی بدست آمده از هر هاپلوتیپ با طول تقریبی780 جفت باز که شامل 26/25 درصد آدنین، 13/57 درصد گوانین، 36/36 درصد سیتوزین،23/82 درصد تیمین بود. نتایج فیلوژنتیکی با استفاده از روش UPGM نشان داد، که مرغ بومی خراسان در گروه مرغان آسیایی قرار می گیرد و کمترین فاصله ژنتیکی با مرغ بومی چین دارد.

کلمات کلیدی: فیلوژنی، سیتوکروم b، مرغ بومی خراسان، ژنوم میتوکندری

* نویسنده مسئول: زهرا رودباری تلفن:03482410841 Email:rodbari.zahra@gmail.com

مقدمه

نژادهای بومی هر کشور به عنوان یک سرمایه ملی و محصول استراتژیک مطرح می باشند، پرورش و نگهداری مرغ های بومی در بهبود اقتصاد خانوارهای روستایی اهمیت زیادی دارد، لذا حفظ و تکثیر این نژادها ضرورت دارد. مرغ های بومی بعنوان یک ذخیره ژنتیکی هستند که شناخت دقیق تر و کسب اطلاعات بیشتر در مورد آنها به جهت حفظ ذخایر ژنتیکی برای نسل های آینده نیز ضروری به نظر می رسد. یکی از کاربردی ترین راههای شناسایی این نژادها استفاده از تکنیک مولکولی به خصوص استفاده از ژنوم میتوکندریایی(mtDNA) است که اساس اینگونه تحقیقات بر پایه استخراج DNA، خالص سازی محصولات PCR و توالی یابی می باشد (Pirani *et al*., 2010). میتوکندری اندامکی سیتوپلاسمی است، که در بیشتر سلول های بدن وجود دارند. این اندامک قادر به تولید انرژی برای سلول است. دارای DNA حلقوی اختصاصی و مستقل از DNA هسته ای است و در گونه های جانوری 37 ژن را کد می کند، که شامل 13 ژن کد کننده زنجیره تنفسی، 22 ژن کد کننده tRNA و2 ژن کد کننده rRNA است و طول تقریبی آن در طیور 16 هزار جفت باز می باشد (Mohammadi Pestehbig *et al*., 2011). از مزایای mtDNA می‌توان به بیش از هزار نسخه به ازای هر سلول، کوچک بودن اندازه آن نسبت بهDNA ژنومی، وراثت پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی در آنها، امکان تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و توالی یابی نواحی حفاظت شده و نواحی حفاظت نشده که برای مطالعات تکاملی گونه ها وابسته می باشد اشاره نمود (Bellagamba *et al*., 2001). بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتها با استفاده از ژنوم میتوکندری از سال 1979 شروع شد. از آن زمان به بعد مطالعات تئوری و تجربی این مولکول بسیار متغیر به دانش ما درباره جمعیتهای جانوری افزوده است و مقایسه توالی های مناطق مختلف ژنوم میتوکندری به دلیل سرعت بالای تکامل ژنوم میتوکندری در مقایسه با ژنوم هسته شواهدی را در مورد تنوع ژنتیکی و منشا تکاملی گونه ها فراهم می نماید (Lolai., 2001). اولین توالی کامل ژنوم میتوکندری مرغ به طول 16775 جفت باز و طول قطعات ژنی آن از قبیل ناحیه Cty-b به طول 1142 جفت باز توسط (Desjardins & Morais, 1990) با کد دسترسی X52392.1 گزارش گردید. در مطالعاتی توالی کامل ژن Cyt-b در 9 گونه پرندگان (Kornegay *et al*., 1993) و 13 گونه قرقاول آفریقایی و بلدرچین ژاپنی (Crowe *et al*., 1992) گزارش شده است. از آن زمان تاکنون مطالعات بر پایه توالی ژنوم میتوکندری سرعت گرفته است. در مطالعه دیگری توالی ناحیه Cyt-b میتوکندری به طول 1140 جفت باز در مرغ بومی ژاپن نژاد گوشتی Chuncky که متعلق به لاین تجاری کورنیش است، بررسی و روابط فیلوژنتیک و

مسیر و منشأ مادریشان مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه فوق 9 عدد SNP از18 هاپلوتیپ از 7 گروه هاپلوئیدی مشخص شد(Shen *et al.*, 2002). پژوهشی که بر روی ژنوم میتوکندری 140 پرنده از زیر گونه های مرغ جنگلی انجام گرفت 44 عدد SNP از 42 هاپلوتیپ از 6 گروه هاپلوئیدی شناسایی گردید (Silva *et al.*, 2008). همچنین، در مطالعه ای (Mohammadabadi *et al.*, 2010) جهت بررسی تنوع ژنتیکی در بین سه نژاد مرغ بومی خراسان از چهار مارکر ریزماهواره استفاده کردند و گزارش کردند که این جمعیت مورد مطالعه با توجه به هتروزیگوتی مورد انتظار و مشاهده شده از تنوع بالایی برخوردار است. هدف از مطالعه اخیر بررسی و تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه Cyt-b از DNA میتوکندریایی مرغ بومی خراسان است 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 های خون مرغان بومی خراسان از بانک خون گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی که بانک ژنومی ایران نیز می باشد، تهیه و تعداد 5 نمونه خون با اطمینان از عدم رابطه خویشاوندی بین نمونه ها انتخاب گردید. نمونه های خون تا زمان استخراج در لوله های حاوی EDTA در فریزر در دمای 20- درجه نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از کیت GenNet صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر Nano Drop-ND 2000 شرکت Thermo آمریکا سنجیده شد. طراحی آغازگر برای تکثیر بخشی از توالی ژن Cyt-b ازmtDNA با استفاده از نرم افزار Primer premier 5 (Premier Biosoft, USA) و ژنوم کامل میتوکندری مرغ اهلی (شماره دسترسی X52396) صورت گرفت. توالی آغازگرهای طراحی شده در تحقیق اخیر به صورت زیر بود:

Forward 5´- CGC CCT CAC AAT CCT TAC AAC - 3´

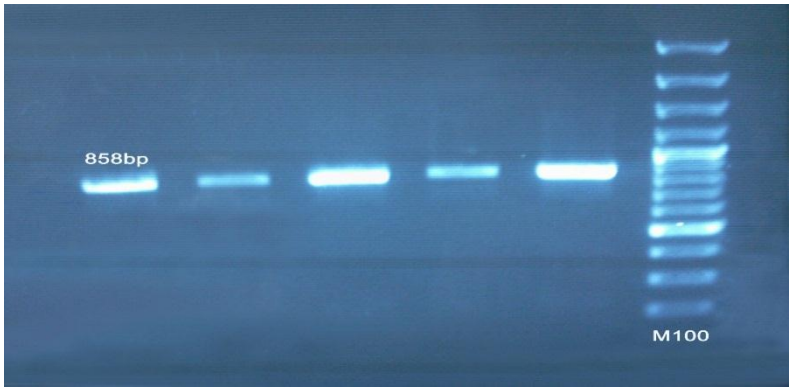
Reverse 5´- GTT TGA TAT GTG GGG GGG TTA C- 3´

سپس، با استفاده از رویه BLAST موجود در پایگاه بانک جهانی ژن (NCBI)، میزان همپوشانی آنها با توالی های موجود، مقایسه گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر قطعه 858 جفت بازی ناحیه ژنی Cyt-b از mtDNA توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal براساس روش استاندارد انجام گرفت. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل (100 mM Tris-HCL(PH 8.8، 1 واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، 0/2mM از هر dNtp، 1/5 mM از $MgCl_2$، 5 pmol از آغازگر اختصاصی ژن و 100 نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی واسرشت سازی در دمای 94 درجه سانتیگراد برای 30 ثانیه، اتصال در دمای 57 درجه برای 30 ثانیه، تکثیر در دمای 72 درجه برای 45 ثانیه، یک

مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتیگراد برای 5 دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای 72 درجه برای 10 دقیقه در 35 سیکل تکثیر شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل آگارز 1 درصد و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. مقدار 100 میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز، خالص سازی شد و به همراه 50 میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده با غلظت 10 پیکامول به منظور تعیین توالی به شرکتMacroGen کره جنوبی ارسال گردید. این نمونه ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی یابی شدند. سپس با استفاده از ابزار قدرتمند BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی های بدست آمده سنجیده شد. به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نژادهای مورد مطالعه، نمودار درختی با استفاده از رویه UPGMA توالی های همردیف شده، به کمک نرم افزارMEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) ترسیم گردید. تعیین هاپلوتیپ ها از رویهDisparity Index Analysis نرم افزار MEGA5 استفاده گردید.

نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه ها با موفقیت انجام گرفت. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار است. الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی آگارز 1 درصد نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعه اختصاصی برای سیتوکروم b به طول 858 جفت باز تکثیر نمودند (شکل 1).



شکل 1- الکتروفورز محصولات PCR به طول858 جفت باز روی ژل آگارز 1 درصد.

Figure 1- Electrophoresis of 858 bp PCR Products on 1/5 % Agarose gel.

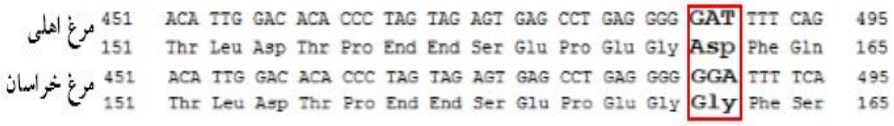
تعیین توالی قطعه 858 جفت بازی سیتوکروم b برای هر پنج نمونه انجام گرفت، اما نتایج حاصل از یکی از نمونه ها به علت کیفیت بسیار پایین کنار گذاشته شد و در آنالیز مورد استفاده قرار نگرفت. قطعه 858 بدست آمده از توالی یابی، ویرایش و قطعه 780 جفت بازی در

همه نمونه ها مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد 2 هاپلوتیپ از بین توالی های مورد بررسی تعیین شدند، که دارای 2 جایگاه چند شکل (SNP) هستند. در یک جایگاه جهش جانشینی که حاصل تبدیل نوکلئوتید پورینی به پیریمیدینی[1] است اتفاق افتاده بود و در جایگاه دیگر اضافه شدن نوکلئوتید[2] رخ داده است که این اضافه شدن نوکلئوتید سبب جایگزینی اسید آمینه آسپارژین با گلایسین در توالی اسید آمینه ای ناحیه سیتوکروم b در مرغ بومی خراسان شده است (شکل2). در بررسی کامل ناحیه سیتوکروم در 8 مرغ بومی Chunky و توالی یابی، Shen et al. (2002) 1140 نوکلئوتید گزارش کردند، که شامل 4 جایگاه چند شکل می باشد که همه آنها از نوع جایگزینی هستند و دو تا از آنها در سومین موقعیت کدون قرار دارند. بنابراین، هیچ جایگزینی در توالی اسید آمینه رخ نداده و دو تای دیگر در اولین موقعیت کدون قرار داشتند، که سبب جایگزینی در توالی اسید آمینه شدند. همچنین، Nishibori *et al.* (2003) توالی کامل DNA میتوکندریایی در مرغان لگهورن سفید و پلیموت راک را توالی یابی کردند و گزارش کردند که توالی DNA میتوکندریایی مرغ لگهورن در مقایسه با توالی مرغ اهلی ثبت شده در NCBI 42 جایگاه چند شکل جانشینی و 15 جایگاه چند شکل حذف و جایگزینی نشان داد، که این تغییرات نوکلئوتیدی منجر به جانشینی 20 اسید آمینه شده است و هیچ حذف و جایگزینی اسید آمینه ای رخ نداده بود. همچنین، در مقایسه توالی مرغ لگهورن در این مطالعه با توالی مرغ لگهورن (شماره دسترسی AP003580) در دو جایگاه چندشکلی جانشینی و در دو جایگاه حذف و جایگزینی رخ داده است، که این تغییرات سبب تغییر اسیدآمینه ای نشده بودند و در مقایسه توالی مرغ لگهورن با پلیموت راک سفید 3 جایگاه چندشکل جانشینی و 3 جایگاه حذف و جایگزینی مشاهده گردید، که این تغییرات سبب تغییر جایگزینی در توالی اسیدآمینه شدند.

مقایسه توالی نوکلئوتید های 4 نمونه مرغ بومی خراسان با استفاده از ابزار Disparity Index Analysis نرم افزار MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) وجود 2 هاپلوتیپ در جمعیت را نشان داد (شکل 3).

با توجه به هاپلوتیپ های به دست آمده می توان توالی مورد توافق را محاسبه نمود. از آنجائیکه تعداد جایگاههای چند شکل وابسته به تعداد نمونه هستند، لذا از پارامتر دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی(π) یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید استفاده گردید، که تحت تاثیر طول DNA و اندازه نمونه نیست و عبارت از متوسط تفاوت نوکلئوتیدی بین دو توالی در هر جایگاه می باشد (Nei and Kumar., 2000).

[1] transversion
[2] Insertions



شکل2- مقایسه توالی اسید آمینه ای ناحیه سیتوکروم b در مرغ بومی خراسان و مرغ اهلی.

Figure 2- Comparison of the amino acid sequence of cytochrome b region in native chicken of Khorasan and domestic chicken.

شکل 3-توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b، به طول 780 نوکلئوتید، برای چهار نمونه مرغ بومی خراسان.

Figure 3- The nucleotide sequences of cytochrome b for four native chicken of khorasan samples with length of 780.

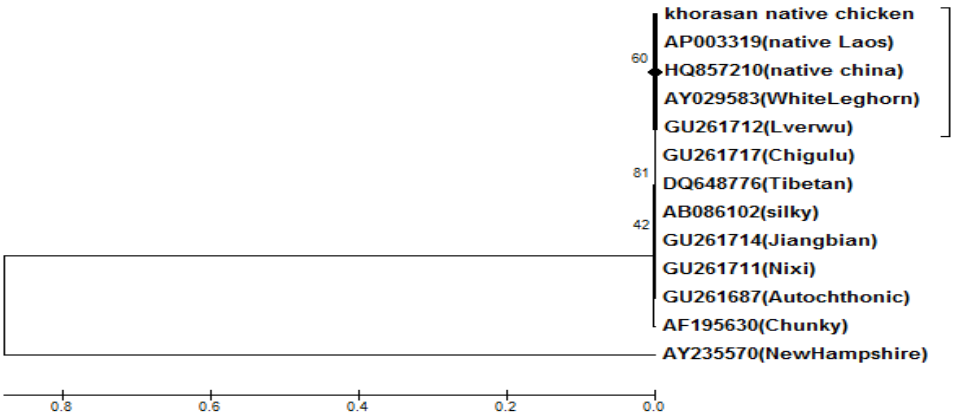
مقدار تنوع هاپلوتیپی در جمعیت حاضر 0/5برآورد گردید، که بیانگر سطح تنوع پایین در جمعیت مرغ بوی خراسان می باشد. نتایج مطالعه اخیر دلالت بر این دارد، که ناحیه سیتوکروم b یک ناحیه کد کننده می باشد و میزان جهش و تنوع در آن پایین است (Eyre-walker & Awadalla., 2001). فراوانی نسبی نوکلئوتیدها در توالی مورد توافق سیتوکروم b مرغ بومی خراسان به طول 780 نوکلئوتید در جدول 1 آورده شده است با درصد نوکلئوتیدها در این ناحیه از mtDNA مرغ اهلی ثبت شده در NCBI با شماره دسترسی X52392.1 توسط Desjardins & Morais که به عنوان اجداد مرغان اهلی امروزی مطرح می باشند، بسیار نزدیک است.

جدول-1- درصد فراوانی نسبی نوکلئوتیدها درناحیه سیتوکروم b در مرغ بومی خراسان و مرغ اهلی

Table 1- Nucleotides relative frequency percentage in cytochrome b region in native chicken of khorasan and Domestic Chicken.

جمعیت Population	A+T	G+C	A	T	G	C
	درصد فراوانی نوکلئوتیدی Nucleotides frequency percentage					
مرغ بومی خراسان Khorasan Native Chicken	50.06	49.94	(205) 26.25	(186) 23.82	(106) 13.57	(284) 36.36
مرغ اهلی Domestic Chicken	50.13	49.87	(205) 26.28	(186) 23.85	(105) 13.46	(284) 36.41

در ادامه با استفاده از ابزار BLAST درصد تشابه توالی ناحیه سیتوکروم b مرغ بومی خراسان با توالی های ثبت شده در پایگاه NCBI تعیین شد. که اکثریت توالی ها در سطح 100 درصد بیشترین تشابه را با توالی ناحیه سیتوکروم مرغ بومی خراسان داشتند که این نتایج بر این دلالت دارد که این ناحیه سیتوکروم b یک ناحیه حفاظت شده است و تغییرات نوکلئوتیدی در آن به ندرت رخ می دهد(Eyre-walker and Awadalla., 2001). در پژوهش (Nishibori et al., 2001) به منظور بررسی منشأ مادری و تعیین روابط فیلوژنتیک 20 نژاد بومی ژاپنی و مرغهای اندونزیایی چنین شباهت هایی وجود دارد، آنها نتیجه گرفتند که بعضی از نژادهای بومی ژاپن از داخل ژاپن نشأت نگرفته اند و نژادهای سایر کشورها پایه مرغ های بومی ژاپنی را تشکیل دادند. نمودار فیلوژنی توالی ناحیه سیتوکروم b مرغ بومی خراسان و نژادهای مرغ موجود در NCBI نشان می دهد که توالی ناحیه سیتوکروم b در مرغ بومی خراسان با مرغ بومی چین، بومی لاوس و لگهورن سفید نزدیکی بیشتری دارد، که این امر ممکن است به دلیل قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک مرغ بومی خراسان با نژادهای آسیایی باشد، اما با مرغ نیوهمشایر هیچ شباهتی ندارند و در شاخه مجزا قرار گرفته است و بیشترین فاصله ژنتیکی را با نژاد نیوهمشایردارد.



شکل 4- نمودار فیلوژنی براساس توالی کلی مرغ بومی خراسان و برخی نژادهای مرغ موجود در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آنها.

Figure 4- Phylogenetic tree based on consensus sequences of Khorasan native chicken and other chicken breeds are taken from GenBank along with their accession numbers.

منابع

Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, Valfare F (2001). Identification of species in animal Feedstuffs by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of Mitochondrial DNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 3775-3781.

Crowe TM, Harley EH, Jakutowicz MB, Komen J, Crowe AA (1992). Phylogenetic, taxonomic and biogeographical implications of genetic, morphological, and behavioral variation in francolins (Phasianidae: Francolinus). The Auk. 109: 24.

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.

Eyre-walker A, Awadalla P (2001). Does human mtDNA recombine Journal of Molecular Evolution 53: 430- 435.

Kornegay JR, Kocher TD, Williams LA, Wilson AC (1993). Pathway of lysozyme evolution inferred from the sequence of cytochrome b in birds. Journal of Molecular Biology, 37: 367-379.

Lolai P (2001). Study of genetic diversity of Barbus capito fish in Mazandaran and Gilan Province. M.Sc. Thesis. University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran.

Mohammadabadia MR, Nikbakhtib M, Mirzaeeb HR, Shandic A, Saghid DA, Romanove MN and Moiseyevaf IG (2010). Genetic variability in three native iranian chicken Populations of the khorasan province based On microsatellite markers Russian Journal of Genetics. Vol. 46, No. 4, pp. 1–5.

Mohammadi Pestehbig F, Pirani N, shoja J, Mohammadhashemi A (2011). Determination the mtDNA D-loop Sequence in Marandi Native Chicken Population and Its Phylogenic Relationships with Other Breeds. Research Journal of Animal Sciences 21(2): 1-9.

Nei M, Kumar S (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Nishibori M, Hanazono M, Yamamoto Y, Tsudzuki M, Yasue H (2003). complete nucleotide sequence of mitochondrial DNA in White Leghorn and White Plymouth Rock chickens. Animal Science Journal. 74, 437–439.

Nishibori M, Hayashi T, Tsudzuki M, Yamamoto Y and Yasue H (2001). complete sequence of the Japanese quail (Coturnix Japonica) mitochondrial genome and its genetic relationship with related species. Animal Genetics 32: 380-385.

Pirani N, Mohammadhashemi A, Alijani S, Rezazadeh Goli R, Ghanbari S (2010). Molecular Analysis of Mazandrani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA. Journal Agriculture Biotechnology 1(2): 53- 60.

Shen XJ, Ito S, Mizutani M (2002). Phylogenetic Analysis in Chicken Breeds Inferred From Complete Cytochrome b Gene Information. Biochemical Genetics. 40(3/4), 129-141.

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.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.

Genetic analysis of cytochrome b region in native chicken of Khorasan

Nassiri M.R.[1], Roudbari Z.[2*]

[1]Associate Professor, Animal Science Department and Institute of biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad
[2]PhD Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad.

Abstract

Maintain genetic diversity in population of native chickens is very important. They are as a national investment and the small size of their populations. Studying cytochrome b region of mitochondrial genome in between or within breeds can give useful information about genetic diversity of the population to be studied. The purpose of current study was genetic and phylogenetic investigate cytochrome b region of mitochondrial genome in native chicken of Khorasan. In order to, blood samples were collected from 5 native chicken of Khorasan. After extracting DNA, fragment 858 bp of cytochrome b region genome mitochondrial amplified by primers was designed and fragment amplified after purification was sequenced. Two different haplotypes were determined based on two single nucleotide polymorphism sequence and the final sequences of each haplotype with length approximate 780 bp which includes 26/25 % adenine, 13/57 % guanine, 36/36 % cytosine and 23/82 % thymine. Using the UPGM phylogenetic test results showed that the native chicken of Khorasan is in group of Asia chicken and has the lowest genetic distance with native chicken of china.

Keyword: *Phylogeny, Cytochrome b, native chicken of Khorasan, Genome Mitochondrial.*

* Corresponding Author: Roudbari.Z. Tel: 03482410841 Email: rodbari.zahra@gmail.com