مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی مرغ‌های بومی خراسان

محمد رضا نصیری[1]، خدیجه نصیری[2]*

[1] استاد گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد. ایران.

[2] دانشجوی مقطع دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام (ژنتیک مولکولی) دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد. ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۰۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۲۲

چکیده

مطالعه بر روی مرغ‌های بومی می تواند به حفظ تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، پیاده نمودن برنامه‌های اصلاح نژادی و بدست آوردن اطلاعات در رابطه با ساختار ژنتیکی آنها کمک کند. توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی ترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی توالی نوکلئوتیدی ناحیه کنترل از DNA میتوکندریایی مرغ‌های بومی خراسان و مطالعات ژنتیکی و فیلوژنتیکی بود. در این مطالعه از ۵ قطعه مرغ بومی خراسان نمونه خون تهیه شد پس از استخراج DNA از نمونه‌های خون، تکثیر ناحیه کنترل به طول ۸٤٥ جفت باز با آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. توالی‌یابی ناحیه تکثیر شده به روش سانگر انجام گردید. با استفاده ازتوالی‌های مشابه ژنوم میتوکندریایی دیگر نژادهای مرغ موجود در پایگاه NCBI، درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد و ماتریس فواصل ژنتیکی بین مرغ بومی خراسان با دیگر نژادها برای ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی تشکیل گردید. نتایج نشان داد که در بین توالی‌های نمونه‌های مورد مطالعه، تفاوت‌های هاپلوتایپی وجود نداشت. نتایج آزمون فیلوژنتیکی نشان داد حداقل فاصله ژنتیکی بین مرغ‌های بومی خراسان با مرغ‌های مرندی از ایران، لگهورن سفید، Buff Cochin و satsuma dori از ژاپن، Lv erwu از چین، Denizli و Gerze از ترکیه، Dandarawi از مصر و هند وجود دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که قرابت زیادی بین مرغ‌های بومی خراسان از ایران با مرغ‌های آسیایی وجود دارد.

کلید واژه‌ها: *مرغ بومی خراسان، DNA میتوکندریایی، ناحیه کنترل، درخت فیلوژنتیک.*

*نویسنده مسئول: خدیجه نصیری تلفن: ۰۹۱۱۳۲۷۲۲۹۷ Email: khadijeh_nasiri@yahoo.com

مقدمه

حیوانات بومی به عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب می‌شوند و حفظ و تکثیر آن‌ها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. این موجودات پس از هزاران سال انتخاب طبیعی و مصنوعی و نیز گذر از موانع بسیار و با غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند و همچنین نسبت به بسیاری از محدودیت‌های محیطی سازگاری پیدا کرده‌اند (Mirhosseini,1998). همچنین منابع حیوانی برای تأمین خوراک و پایداری اقتصادی– اجتماعی و محیطی کشور ضروری می‌باشند. حفظ و استفاده از این منابع حیوانی و طیور در کشورهای توسعه‌یافته متفاوت از کشورهای در حال توسعه می‌باشد. در کشورهای توسعه‌یافته فقط نژادهایی با ارزش اقتصادی بالا و دورگه‌های آن‌ها پرورش داده می‌شوند اما کشورهای در حال توسعه با اینکه از نظر منابع نژادی بسیار ثروتمند هستند اما حفاظت کافی نسبت به نژادهای بومی ندارند و ورود نژادهای خارجی منجر به بدتر شدن کیفیت و کاهش تعداد نژادهای بومی گردیده است. این رفتارها هر دو موجب ایجاد بحران در منابع ژنتیکی جهانی و نقصان در مخازن ژنی طیور و حیوانات می‌شود (Wu, 2001). دو فرضیه برای خاستگاه مرغ‌های اهلی امروزی وجود دارد. یک فرضیه این است که منشأ این مرغ‌ها از مرغ جنگلی قرمز (gallus gallus) است و فرضیه دیگر بیان می‌دارد که مرغ‌های اهلی امروز از چند زیر گونه gallus منشأ یافته‌اند (Crawford, 1990). بر مبنای شواهد گزارش شده، ۱۲۰ نژاد مرغ در سرتاسر جهان زندگی می‌کند (http://www.poultrypages.com/chicken-breeds.html). اخیراً منابع ژنتیکی بومی اهلی از اهمیت فراوانی برخوردار شده‌اند و برای حفظ کردن تعداد حداقلی از این حیوانات تلاش‌هایی صورت گرفته است (http://www.fao.org/dad-is/).

امروزه روش‌های مولکولی، مانند توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی ترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (Bruford *et al.,* 2003). اندازه ژنوم میتوکندریایی در بیشتر حیوانات از جمله پرندگان حدود ۱۶–۱۷ کیلو جفت باز می‌باشد. ژنوم میتوکندری ۲۲ tRNAs ، ۲ rRNAs و ۱۳ پلی پپتید را کد می‌کند (Chinnery and Schon, 2003). بیان این ژن‌ها در مهره داران برای تولید انرژی، متابولیسم، هموستاز سلولی و مرگ سلولی ضروری می‌باشد (DiMauro, 2004).

ناحیه کنترل[1] تنوع نوکلئوتیدی نسبتاً بالایی دارد و بیشتر نسبت به سایر نواحی دیگر mtDNA پلی‌مورفیک است (Quinn and Wilson *et al.,* 1993) و اغلب برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی داخل گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Brown *et al.,* 1982). ناحیه کنترل

[1] -Control Region or D-Loop

به عنوان نقطه شروع برای همانندسازی DNA میتوکندریایی عمل می‌کند. ناحیه کنترلی به سه ناحیه کنترلی که شامل ناحیه‌ای در انتهای '۳ که ناحیه کنترل I (HVS-I) نامیده می‌شود، ناحیه کنترل II در بین ناحیه I و II (توالی حفاظت شده) و ناحیه‌ای در انتهای '۵ که ناحیه کنترلی III (HVS-II) نامیده می‌شود، تقسیم شده است. بررسی‌ها نشان داده است که نواحی کنترلی I و III بالاترین میزان تنوع نوکلئوتیدی را در بر دارند و مطالعه تنوع ژنتیکی این نواحی به علت تکامل سریع در تعیین رابطه فیلوژنتیک میان گونه‌ها از ارزش بالایی برخوردار است (Sultana *et al.,* 2004). ناحیه کنترلی هیچ پروتئینی را کد نمی‌کند و نسبت به دیگر نواحی ژنوم mtDNA سریعتر تکامل یافته، طوریکه این ناحیه یک ناحیه باارزش و دارای حساسیت بالایی در تجزیه و تحلیل ژنتیکی جمعیت، بخصوص مناسب برای تنوع ژنتیکی داخل گونه‌ها می‌باشد.

مزایای DNA میتوکندریایی در تشخیص گونه‌ها و ترسیم رابطه فیلوژنتیکی شامل مواردی چون اندازه کوچک‌تر آن، وراثت‌پذیری مادری، تعداد کپی بالاتر در هر سلول، وجود نواحی حفاظت شده و وجود نواحی حفاظت نشده‌ای همانند ناحیه کنترل یا D-Loop برای مطالعات تکاملی گونه‌های وابسته و عدم وجود نوترکیبی می‌باشد (Bellagamba *et al.,* 2001). DNA میتوکندریایی در مقایسه با DNA هسته‌ای بیشتر پلی‌مورفیک است و نرخ تکاملی آن ۵ الی ۱۰ برابر سریعتر از ژنوم هسته‌ای است (Brown *et al.,* 1982). توالی کامل mtDNA مرغ که تاکنون مشخص شده است هنگامی که با mtDNA دیگر گونه‌های مقایسه می‌شود نشان داده است که ویژگی‌های حفاظت شده بالایی را دارا می‌باشد، اگرچه بیشتر ویژگی‌ها در همه mtDNA مهره-داران یکسان هستند اما برخی تفاوت‌ها با ژنوم پرندگان دارند. ناحیه کنترل در پرندگان از دیگر مهره‌داران متفاوت است که ژن‌های $tRNA^{Glu}$ و $tRNA^{Phe}$ در جناحین واقع شده‌اند (Desjardins and Morais, 1990).

در پژوهشی Lee et al. (2007) mtDNA ۳۱ مرغ Ogol کره‌ای را به منظور بررسی ساختارهای ژنتیکی، تجزیه و تحلیل فیلوژنی و محاسبه تنوع ژنتیکی توالی‌یابی کردند و ۱۸ تغییرات نوکلئوتیدی را چهار٤ در هاپلوتایپ گروه‌بندی کردند.

Xiaojing et al (2007) به منظور شناسایی تنوعات ژنتیکی در mtGenome ۵۳ پرنده (۲۰ قطعه جوجه‌های لگهورن سفید و ۳۳ قطعه جوجه‌های گوشتی) که شامل هم نواحی کد کننده و هم ناحیه غیر کد کننده (D-Loop) بود از ابزار آزمایشگاهی و in silico بهره گرفتند و ۱۱۳ چند شکلی تک نوکلئوتیدی را شناسایی کردند و در تجزیه وتحلیل in silico، ۹۱ SNPs شناسایی شد که ۷۰ SNPs در ناحیه کد کننده و ۲۱ SNPs در ناحیه غیر کد کننده بودند.

با توجه به ضرورت ارزیابی و حفظ منابع ژنتیکی، حفظ توده مرغ‌های بومی ایران سزاوار توجه جدی است. هدف از این تحقیق تعیین و

بررسی توالی نوکلئوتیدی بخشی از ناحیه ی کنترلی ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خراسان بود تا اطلاعاتی از وضعیت توالی این ناحیه در این نژاد بومی ایرانی بدست آورده و با سایر نژادهای موجود در ایران و سایر کشورها مقایسه شود و همچنین توالی بدست آمده از این توده بومی در بانک جهانی ژن ثبت شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها، استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت آن

در این تحقیق نمونه‌های خون از تعداد ۵ قطعه مرغ بومی استان خراسان گرفته شد. مرغ-های مورد استفاده جهت خونگیری از مرکز جهاد استان خراسان رضوی تهیه شد. استخراج DNA با استفاده از کیت (GENET BIO , GeNet Bio Korea) انجام گرفت. کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND 2000 شرکت THERMO امریکا مشخص شد و کیفیت آن روی ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد.

طراحی آغازگرها و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در این تحقیق از نرم‌افزار Primer premier برای طراحی آغازگرها جهت تکثیر بخشی از ناحیه کنترل از ژنوم میتوکندریایی به طول ۸٤٥ جفت باز استفاده شد. پرایمرهای رفت در فاصله ۱٦۷٥٦-۱٦۷۷٦ و پرایمرهای برگشت در فاصله ۸٤٥-۸٦٥ از ژنوم میتوکندریایی متصل شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر بود:

Forward: 5'-TTGTTCTCAACTACGGGAACA-3'

Reverse: 5'-CAAAGTGCATCAGTGTCAAGAT -3'

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت. واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد برای ۱۰ دقیقه، ۳٤ سیکل دمایی با دمای واسرشت سازی ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦٤ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه. حجم واکنش ۲٥ میکرولیتر و اجزای واکنش شامل ۱۷/٥ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۲/٥ میکرولیتر بافر۱۰X، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ ٥۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر از مخلوط پرایمر ٥ پیکومولار و ۰/۲ واحد آنزیم Taq پلیمراز بود. محصولات PCR به منظور تأیید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند و نتیجه در دستگاه ژل داکیومنت مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین توالی محصولات تکثیر شده

مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR، با کیت Reaction recovery (Denazist, Iran) خالص سازی شد و به همراه ۲۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰

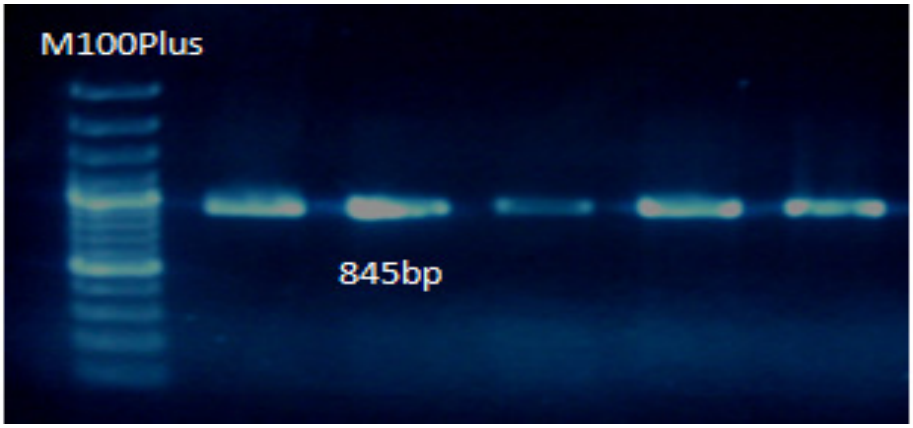
پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت MACRO GEN کره جنوبی ارسال شدند و نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند.

تجزیه و تحلیل توالی‌ها

از رویه BLASTN در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی و همپوشانی توالی‌ها استفاده شد. به منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌ها از نرم‌افزار MEGA v.5 (Tamura *et al.*, 2011) استفاده شد. جهت رسم نمودار فیلوژنی از رویه Neighbor-Joining بر پایه روش حداکثر درست‌نمایی نرم افزار MEGA v.5 استفاده شد. برای رسم ماتریس فواصل ژنتیکی و تعیین درصد شباهت توالی ناحیه کنترل از DNA میتوکندریایی مرغ بومی خراسان با توالی‌های مشابه از مرغ‌های نژادهای دیگر از نرم‌افزار MegAlign استفاده شد. برای ثبت توالی به دست آمده از نرم افزار Sequin v 10 استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از نمونه‌های خون مرغ‌های بومی خراسان با موفقیت انجام شد و نتایج طیف‌سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کمیت و کیفیت خوبی برخوردار است. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ١ درصد نشان داد که پرایمرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعات اختصاصی تولید نمود. نشانگر اندازه استفاده شده در کنار محصولات PCR صحت تکثیر قطعه مورد نظر را تأیید کرد (شکل ١).

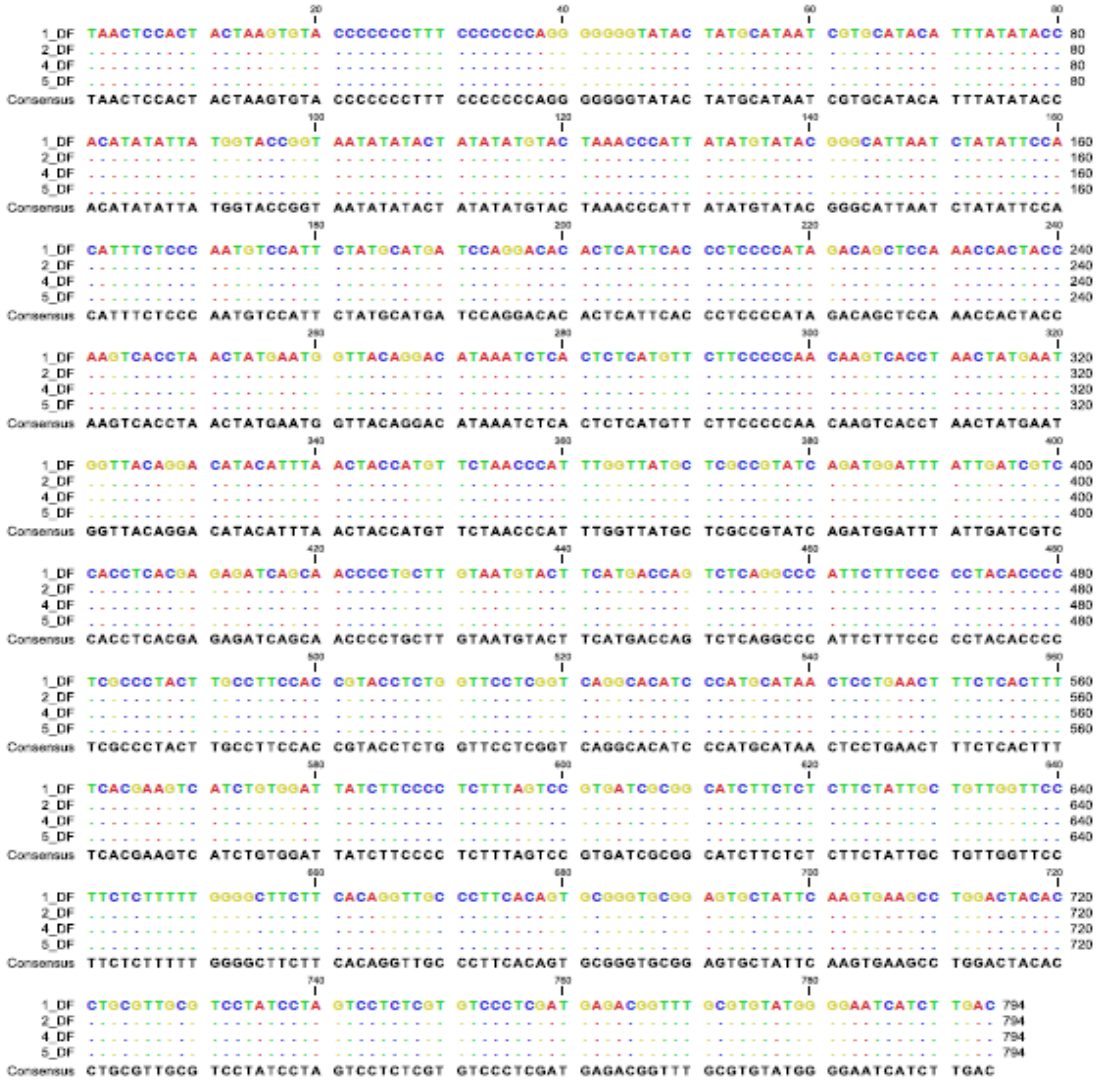


شکل ١- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به طور ٨٤٥ جفت باز روی ژل آگارز ١ درصد.

Figure 1- Electrophoresis of 845bp PCR products on 1% agarose gel.

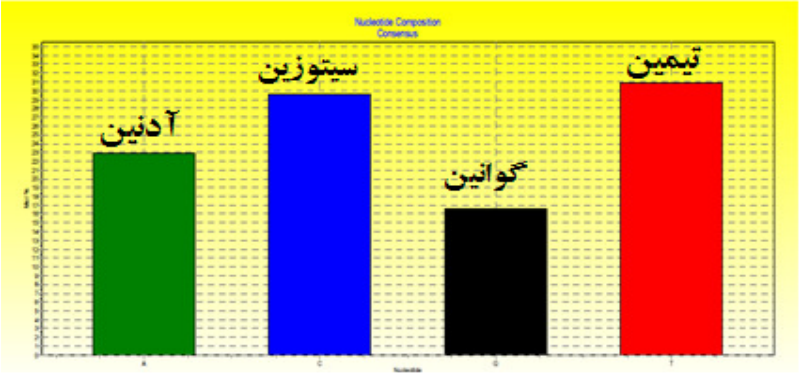
توالی‌یابی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی برای ٥ نمونه انجام شد، اما نتایج حاصل از یکی از نمونه‌ها به علت کیفیت پایین کنار گذاشته شد و در ادامه بررسی ها از آن استفاده نشد. توالی

مورد توافق برای ناحیه کنترل از ژنوم میتوکندری به طول ۷۹۳ جفت باز به عنوان توالی شاخص در مرغ بومی خراسان تعیین گردید (شکل ۲) و ترکیب نوکلئوتیدی آن در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۲- توالی‌های نوکلئوتیدی از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی در مرغ های بومی خراسان.

Figure 2- Nucleotide sequences of mitochondrial DNA control region genome in Khorasan native chicken.

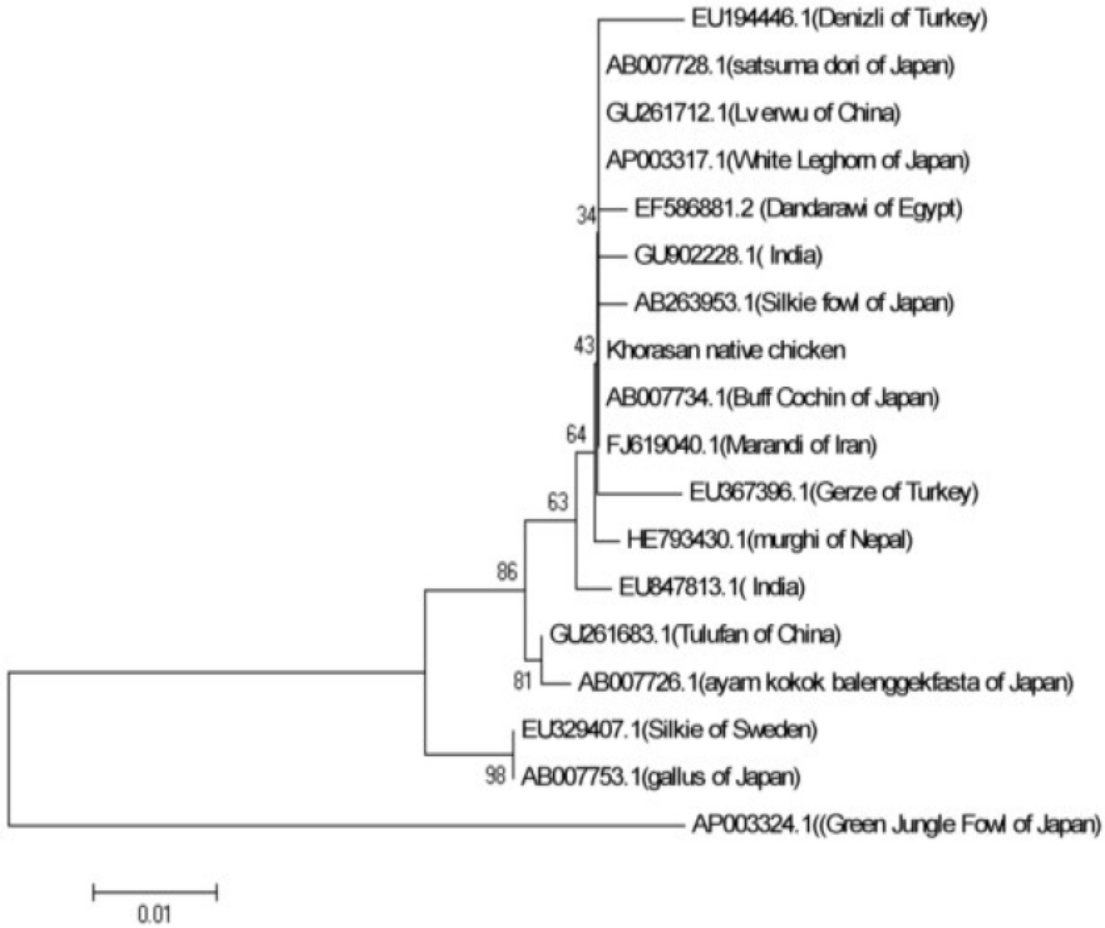


شکل ٣- درصد ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌های مورد مطالعه در مرغ‌های بومی خراسان (٢٢/٩٥٪ آدنین، ٢٩/٦٣٪ سیتوزین ، ١٦/٥٢٪ گوانین و ٣٠/٩٠٪ تیمین)

Figure 3- Nucleotide composition percent of Khorasan native chicken sequences (A 22.95%, C 29.63%, G 16.52% and T 30.90%).

ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌های مورد مطالعه مورد محاسبه قرار گرفت و نشان دهنده فراوانی ٤٦/١٥ ٪ نسبت G+C و ٥٣/٨٥ ٪ نسبت A+T می‌باشد. همچنین توالی های مورد مطالعه محتوی ٢٢/٩٥٪ آدنین، ٢٩/٦٣٪ سیتوزین، ١٦/٥٢٪ گوانین و ٣٠/٩٠٪ تیمین بودند (شکل ٣). مقایسه بین چهار توالی با استفاده از ابزار ClustalW Multiple alignment نرم افزار BioEdit (Hall, 1999) نشان دهنده عدم وجود اختلاف بین توالی‌های مورد مطالعه بوده (P=0). این پدیده می تواند ناشی از کم بودن تعداد نمونه و یا هموژن شدن توده مورد بررسی بخاطر چندین نسل انتخاب پیاپی با اهداف تجاری باشد.

مقایسه توالی‌های مورد مطالعه با توالی‌های ثبت شده در پایگاه NCBI مشخص نمود که میزان هم پوشانی و همولوژی بالایی بین توالی-های مورد مطالعه و توالی‌های موجود در این پایگاه وجود دارد و نشان می‌دهد ناحیه توالی یابی شده در این مطالعه مشابه توالی این ناحیه در مطالعات دیگر است. نتایج حاصل از بررسی درخت فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که توالی ناحیه کنترل از ژنوم میتوکندری مرغ بومی خراسان با توالی‌های مرغ‌های نژاد مرندی از ایران، لگهورن سفید، Buff Cochin و satsuma dori از ژاپن، Lv erwu از چین، Denizli و Gerze از ترکیه، Dandarawi از مصر و مرغ هندی قرابت بیشتری دارد و در یک گروه قرار می‌گیرند و با مرغ gallus از ژاپن و مرغ Silkie از سوئد فاصله دورتری دارند. همچنین نتایج درخت فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که مرغ Green Jungle Fowl از ژاپن به عنوان گروه غیر مرتبط می‌باشد (شکل ٤).



شکل٤- درخت فیلوژنی براساس رویه Neighbor-Joining از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی مرغ‌های بومی خراسان (اعداد روی گره‌ها نشان‌دهنده درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰۰ مرتبه نمونه‌گیری می‌باشد).

Figure 4- Phylogenetic tree of mitochondrial DNA control region in Khorasan native chicken based on Neighbor-Joining method. The numbers at the nodes showed the percentage bootstrap values for interior branches after 1000 replications

در بررسی ماتریس فواصل ژنتیکی بین مرغ بومی خراسان با دیگر نژادها برای ناحیه کنترل از ژنوم میتوکندریایی مشخص شد که کمترین فاصله ژنتیکی بین مرغ بومی خراسان از ایران با مرغ‌های مرندی از ایران، لگهورن سفید، Buff Cochin و satsuma dori از ژاپن، Lv erwu از چین وجود دارد که معادل صفر است و بیشترین فاصله ژنتیکی بین مرغ بومی خراسان با مرغ Green Jungle Fowl از ژاپن می‌باشد که معادل ۱۰/۵ درصد است و این نتایج صحت ترسیم درخت فیلوژنتیک را تأیید می‌کند (جدول ۱). نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر مؤید این مطلب است که قرابت زیادی بین مرغ‌های بومی خراسان از ایران با مرغ‌های آسیایی (شرق و

جنوب شرق آسیا) وجود دارد در تحقیقی که به منظور تعیین توالی ناحیه HVR-I از ژنوم میتوکندری جمعیتی از مرغ مازندرانی ایران انجام گرفت، نتایج حاکی از آن بود که مرغ بومی مازندرانی ایران با مرغ مرندی ایران، بومی کشور آذربایجان، لگهورن سفید، پلیموت راک پرخط دار، مرغ ابریشمی و جنگلی خاکستری در یک دسته قرار دارند (Pirany *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای که به منظور تعیین توالی بخش HVS-I از ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری مرغ مرندی ایران انجام گرفت نتایج فیلوژنی مشخص کرد که مرغان بومی مرندی ایران با مرغ بومی کشور آذربایجان، پلیموت راک پر خط دار، لگهورن سفید، مرغ ابریشمی و مرغ جنگلی خاکستری نزدیکی بیشتری دارند (Mohammadipestebik *et al.*, 2011). در پژوهشی Oka et al. (2007) گزارش کردند که مبدأ اولیه چندین جمعیت مرغ بومی ژاپن از جنوب شرق آسیا: چین، کره و اندونزی می‌باشد (Oka *et al.*, 2007).

Silva et al (2009) ارتباط ژنتیکی بین مرغ‌های سریلانکا با مرغ جنگلی قرمز یافتند که مبدأ اولیه آن از چین، لائوس، ویتنام و تایلند از کشورهای آسیای جنوب شرقی می‌باشد (Silva *et al.*, 2009).

با توجه به فواصل ژنتیکی کم مرغ بومی خراسان با نژادهای مرغ آسیای جنوب شرقی، نتایج حاصل از این پژوهش نتایج گزارش شده توسط چندین مطالعه دیگر (Silva *et al.*, 2009; Pirany *et al.,* 2011; Oluwabukola., 2005; Oka *et al.*, 2007) را مبنی بر فرضیه‌ی اینکه کشورهای آسیایی و از جمله آسیای جنوب شرقی به عنوان نخستین محل اهلی شدن مرغ می‌باشند را تأیید می‌کند.

نتیجه گیری کلی

نتایج مطالعات فیلوژنتیکی نشان داد که ارتباط نزدیکی بین مرغ‌های بومی خراسان با جمعیت مرغ های کشورهای آسیایی وجود دارد. اطلاعات ژنتیکی از این مطالعه می‌تواند به عنوان گامی برای توسعه استراتژی‌های آینده برای شناسایی، حفاظت و بهبود منابع ژنتیکی ارزشمند مرغ‌های بومی کمک کند. بنابراین، از آنجا که این نژادهای بومی تنها جمعیت‌هایی می‌باشند که برای حفظ ذخایر ژنتیکی مورد استفاده قرار می-گیرند باید مورد توجه و مراقبت بیشتری قرار گیرند تا تنوع ژنتیکی موجود در این نژادهای بومی کاهش نیابد. پیشنهاد می‌شود مطالعات بعدی با تعداد نمونه بیشتر و بر روی دیگر نواحی ژنوم میتوکندیایی مرغان بومی خراسان به منظور تعیین تنوع ژنتیکی درون توده ای صورت گیرد. همچنین تعیین نقشه ژنتیکی ژنوم میتوکندری در شناخت بیشتر ویژگی های ژنتیکی این توده می تواند نقش بسزایی داشته باشد.

جدول ۱- فواصل ژنتیکی بین توالی‌های مرغ بومی خراسان از ایران و دیگر توالی‌ها مشابه موجود از مرغ‌ها برای ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی.

Table 1- Genetic distances between sequences of Khorasan native chicken and other similar sequences of chickens for mitochondria DNA control region.

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
1		90.1	99.3	97.5	99.3	98.9	99.8	100.0	99.1	100.0	99.1	98.9	99.8	100.0	100.0	98.0	99.8	99.5	1	Khorasan
2	10.5		89.4	90.3	89.9	89.4	89.9	90.1	90.5	90.1	90.5	90.3	89.9	90.1	90.1	90.8	89.9	90.5	2	AP003324
3	0.7	11.2		96.8	98.6	98.2	99.1	99.3	98.4	99.3	98.4	98.2	99.1	99.3	99.3	97.3	99.1	98.9	3	EU194446
4	2.1	9.7	2.8		96.8	96.4	97.3	97.5	97.7	97.5	96.6	97.5	97.3	97.5	97.5	99.5	97.3	97.5	4	EU329407
5	0.7	10.7	1.4	2.8		98.2	99.1	99.3	98.4	99.3	98.4	98.2	99.1	99.3	99.3	97.3	99.1	98.9	5	EU367396
6	0.0	10.0	0.7	2.1	0.7		98.6	98.9	98.0	98.9	98.6	97.7	98.6	98.9	98.9	96.8	98.6	98.4	6	FJ619040
7	0.2	10.7	0.9	2.3	0.9	0.2		99.8	98.9	99.8	98.9	98.6	99.5	99.8	99.8	97.7	99.5	99.3	7	GU902228
8	0.0	10.5	0.7	2.1	0.7	0.0	0.2		99.1	100.0	99.1	98.9	99.8	100.0	100.0	98.0	99.8	99.5	8	AP003317
9	0.9	9.9	1.6	1.8	1.6	0.9	1.1	0.9		99.1	98.2	99.8	98.9	99.1	99.1	98.0	98.9	98.6	9	GU261683
10	0.0	10.5	0.7	2.1	0.7	0.0	0.2	0.0	0.9		99.1	98.9	99.8	100.0	100.0	98.0	99.8	99.5	10	GU261712
11	0.9	9.9	1.6	3.0	1.6	0.2	1.1	0.9	1.8	0.9		98.0	98.9	99.1	99.1	97.1	98.9	98.6	11	HE793430
12	1.1	10.2	1.8	2.1	1.8	1.2	1.4	1.1	0.2	1.1	2.1		98.6	98.9	98.9	97.7	98.6	98.4	12	AB007726
13	0.2	10.7	0.9	2.3	0.9	0.2	0.5	0.2	1.1	0.2	1.1	1.4		99.8	99.8	97.7	99.5	99.3	13	AB263953
14	0.0	10.5	0.7	2.1	0.7	0.0	0.2	0.0	0.9	0.0	0.9	1.1	0.2		100.0	98.0	99.8	99.5	14	AB007728
15	0.0	10.5	0.7	2.1	0.7	0.0	0.2	0.0	0.9	0.0	0.9	1.1	0.2	0.0		98.0	99.8	99.5	15	AB007734
16	2.1	9.7	2.8	0.0	2.8	2.1	2.3	2.1	2.1	2.1	3.0	2.3	2.3	2.1	2.1		97.7	98.0	16	AB007753
17	0.2	10.7	0.9	2.3	0.9	0.2	0.5	0.2	1.1	0.2	1.1	1.4	0.5	0.2	0.2	2.3		99.3	17	EF586881
18	0.5	9.9	1.1	2.1	1.1	0.5	0.7	0.5	1.4	0.5	1.4	1.6	0.7	0.5	0.5	2.1	0.7		18	EU847813
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		

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.

Brown WM, Prager EM, Wang A and Wilson AC (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. Journal of Molecular Evolution 18:225-239.

Bruford M, Bradley D and Luikart G (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature Reviews Genetcs 3:900–910.

Chinnery PF, Schon EA (2003).Mitochondria. J Neurol Neurosurg Psychiatry 74:1188–1199.

Crawford RD (1990). Origin and history of poultry species. In: Poultry Breeding and Genetics. Ed. By RD Crawford. Elsevier, Amsterdam.

Desjardins P and 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.

DiMauro S (2004). Mitochondrial diseases. Biochim Biophys Acta 1658: 80–88.

Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Hall TA (1999). BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 4:95-98.

http://www.fao.org/dad-is/

http://www.poultrypages.com/chicken-breeds.html

Lee YJ, Bhuiyan MSA, Chung HJ, Jung WY, Choi KD, Jang BG, Paek WK, Jeon JT, Park CS and JH Lee (2007). Mitochondrial DNA Diversity of Korean Ogol Chicken. Asian-Aust. Journal Animal Science 20: 477-481.

Mirhosseini SZ (1998). Study genetic diversity of Iranian Silkworm using protein and DNA markers. Thesis. Ph.D. Tarbiat Modarres University.

Mohammadipestebik F, Pirany N, Shodja J, Mohammadhashemi A (2011). Determination the mtDNA D-loop Sequence in Marandi Native Chicken Population andIts Phylogenic Relationships with Other Breeds. Animal Sceince Researches Journal 21

Pirany N, Mohammadhashemi A, Alijani S, Rezazadeh Goli R, Ghanbari S (2011). Molecular Analysis of Mazandrani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA. Journal of Agricultural Biotechnology 1:53-65

Quinn TW and Wilson AC (1993). Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. Journal of Molecular Evolution 37: 417-425.

Silva P., X. Guan, O. Ho-Shing, J. Jones, J. Xu, D. Hui, D. Notter and E. Smith (2008). Mitochondrial DNA-based analysis of genetic variation and relatedness among Sri Lankan indigenous chickens and the Ceylon junglefowl (Gallus lafayetti). International Society for Animal Genetics, Animal Genetics 40:1–9.

Sultana S and 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.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular

Troen BR. 2003. The biology of aging. Mount Sinai Journal of Medicine 70:3–28.

Wu C (2001). Chinese poultry genetic resources and utilization of native breeds in poultry production. Japanese Poultry Science 38: 91-98.

Xiaojing G, Geng T, Silva P and SMITH EJ (2007). Mitochondrial DNA Sequence and Haplotype Variation Analysis in the Chicken (Gallus gallus). Journal of Heredity 98:723–726.

Genetic and phylogenetic analysis of Mitochondrial DNA control region of Khorasan native chicken

Nassiry M.R.[1], Nasiri Kh.[2*]

[1] Professor, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad, Iran.
[2] PhD Student, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad, Iran.

Abstract

Study on native chickens could be considered as a way to maintain population genetic variation, breeding programs development and helps to obtain information on their genetic structure. Mitochondria genome Sequencing is one of the most practical methods in order to determine phylogenetic relationships among close populations and species. The aim of this study was to investigate the nucleotide sequence of the mitochondrial DNA control region of Khorasan native chickens, its genetic and phylogenetic analysis. Blood samples were supplied from 5 Khorasan native chickens. Then 845 bp fragments of extracted DNA were amplified by using specific primers. Sequencing of amplified fragments was carried out with Sanger method. Using of similar sequence of mitochondria DNA from other chicken breeds available in the NCBI database, phylogenetic tree was drawn and matrix of genetic distances was formed between Khorasan native chickens and other breeds for mitochondrial DNA control region. According to the results no variation was observed among the nucleotide sequences. Phylogenetic test results showed the least genetic distance was recognized between Khorasan native chicken with Marandi chicken of Iran, White Leghorn, Buff Cochin and satsuma dori of Japan, Lv erwu of China, Denizli and Gerze of Turkey, Dandarawi of Egypt and India. Thereby can conclude that Khorasan native chicken of Iran has a close relationship with Asian chickens.

Keywords: *Khorasan native chicken, Mitochondrial DNA, control region, Phylogenetic tree.*

[*] Corresponding Author: Nasiri Kh. Tel: 09113272297 Email: khadijeh_nasiri@yahoo.com