بررسی فاصله ژنتیکی بین سه نژاد گوسفند ایرانی بر اساس توالی یابی DNA میتوکندری

عبدالعزیز حمدالاحمد[۱]، علی جوادمنش[۲*]، داود علی ساقی[۳] و محی المزید[۴]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک واصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳. استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران
۴.استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه حلب، سوریه
* ایمیل نویسنده مسئول: javadmanesh@um.ac.i

چکیده

امروزه توالی‌یابی DNA برای تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیکی بین گروه‌های مختلف حیوانات به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. DNA میتوکندری بسیار سریعتر از DNA هسته‌ای (nc) تکامل می‌یابد و بنابراین در مقایسه با DNA هسته‌ای دارای تنوع بیشتری است و به این دلیل برای شناسایی و دسته‌بندی گونه های نزدیک کاراتر می‌باشد. علاوه بر این، mtDNA فقط از یک والد به ارث می‌رسد و به طور کلی منجر به عدم هتروزیگوستی می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی شباهت ژنتیکی بین گوسفندان کبوده، لری بختیاری و مهربانی با استفاده از توالی ناحیه کنترل (Control region) میتوکندری بود که با استفاده از رسم درخت فیلوژنتیکی و تعیین فاصله ژنتیکی بین گوسفندان ایرانی و برخی از هاپلوتایپ‌های مرجع گوسفند مورد مقایسه قرار گرفت. برای این تحقیق از هر نژاد گوسفند ایرانی ۵ نمونه خون جمع‌آوری شد. DNA استخراج شد و پرایمرها با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 به منظور تکثیر قطعه طراحی شد. پس از انجام PCR، محصولات PCR خالص‌سازی و سپس نمونه‌ها به صورت دو طرفه تعیین توالی شدند. برای توالی-های مورد مطالعه و ناحیه کنترلی از ژنوم میتوکندری گوسفندان سایر نژادها از مناطق مختلف جهان، درخت فیلوژنتیکی رسم شد. این درخت نشان داد که نژادهای مهربانی و کبوده جزء هاپلوتایپ A و نژاد لری بختیاری نیز در هاپلوتایپ B قرار گرفتند.

واژه های کلیدی: درخت فیلوژنتیکی، کبوده، لری بختیاری، مهربانی، ناحیه کنترلی، DNA میتوکندری

مقدمه

گوسفند یکی از مهمترین حیوان‌های اهلی اقتصادی در ایران و همچنین در سایر نقاط جهان است (Guo et al. 2005). اهلی کردن گوسفند حدود ۱۰۰۰۰ تا ۱۱۰۰۰ سال پیش در منطقه‌ای گسترده از شمال کوه‌های زاگرس ایران تا جنوب شرق آناتولی در ترکیه و ایران رخ داده است. به همین دلیل، درگونه‌های این منطقه سطح بالای جریان ژن، مخلوط کردن و تمایز از زمان اهلی شدن منعکس شده‌است(Meadows et al. 2011).

گوسفند دامی مهم در ایران محسوب می‌گردد و به لحاظ زیاد بودن جمعیت آن وتنوع نژاد وغیره بخش بزرگی از ذخایر ژنتیکی دام ایران را شامل می‌شود بنابراین ضرورت شناسایی تنوع ژنتیکی موجود بین جمعیت‌های گوسفند بومی ایران و تعین روابط تکاملی میان آنها وظیفه‌ای است که بر عهده متخصصین ژنتیک و اصلاح دام کشور می‌باشد (Gaouar et al. 2016). در گوسفندان اهلی ۵ گروه هاپلوتیب وجود دارد. با تعیین گروه هاپلوتیبی می‌توان موقعیت این نژاد در بین نژادهای دیگر تعیین کرد. همچنین میدواس و همکاران (۲۰۱۱) اشاره کردند که ناحیه کنترلی به عنوان جزء mtDNA است که بین قسمت های مختلف ژنوم میتوکندریایی بیشترین میزان تنوع را دارد که مجموعه ای از داده های کامل را به خود اختصاص داده‌است.

شناسایی خصوصیات ژنتیکی نژاد گوسفندان مختلف قدم اول برای جمع‌آوری اطلاعات پایه برای اصلاح کردن و طرح حفاظت به منظور حفظ و بهبود بهره‌وری تولید در این صنعت است. DNA میتوکندریایی پتانسیل خوبی برای مطالعه ژنتیک و تکامل جمعیت نشان داده است (Rafia et al. 2016).

مواد و روش ها

نمونه خون از ۳ نژاد گوسفند ایرانی (کبوده، لری بختیاری و مهربانی) و از هر نژاد ۵ نمونه جمع‌آوری شد. استخراج DNA ازخون کامل، با استفاده از روش گوانیدین تیوسیانات (NEXprep^{tm} BLOOD DNA Mini Kit) صورت گرفت. جهت بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، به ترتیب از روش الکتروفورز ژل اگاروز (ژل اگاروز ۱ درصد رنگ آمیزی شده با ژل رد) و طیف سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد.

طراحی پرایمر جهت تکثیر ناحیه کنترلی با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 5 و با توجه به توالی مرجع انجام شد (شماره دسترس های NC_001941.1) (جدول ۱). سپس با استفاده از BLAST در پایگاه NCBI پرایمرهای طراحی شده با توالی‌های موجود در این پایگاه بررسی شد.

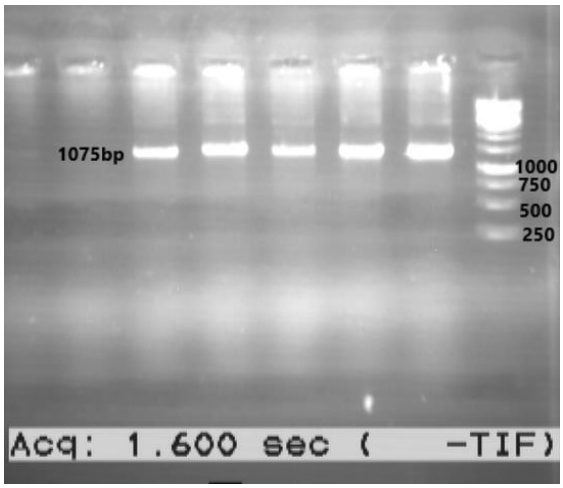
جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی منطقه کنترلی مورد استفاده

منطقه مورد نظر	توالی ها پرایمر	طول محصول PCR (bp)	دمای اتصال
ناحیه کنترلی	5' AACTTGCTAAAACTCCCAAACATAC 3' 5' GTTGGAGTATGAATTTGAGTATTGAG 3'	۱۰۷۵	۵۸

واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra (مدل TPersonal) در ۳۸ چرخه حرارتی انجام پذیرفت. برنامه حرارتی شامل دمای واسرشت شدن اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰دقیقه، دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۸ درجه سانتیگراد مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از الکترفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز و جهت حذف مواد اضافی موجود در محصولPCR ، محصولات از ژل اگاروز (کیت استخراج DNA از ژل شرکت دنا زیست) خالص‌سازی شدند و ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR خالص سازی شده، جهت تعیین توالی دو طرفه ارسال شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار BioEdit 7.2.5 کیفیت توالی‌های به دست آمده بررسی شده و سپس رسم درخت فیلوژنتیکی و برآورد فواصل ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار CLC Sequence Viewer 7.6 انجام شد.

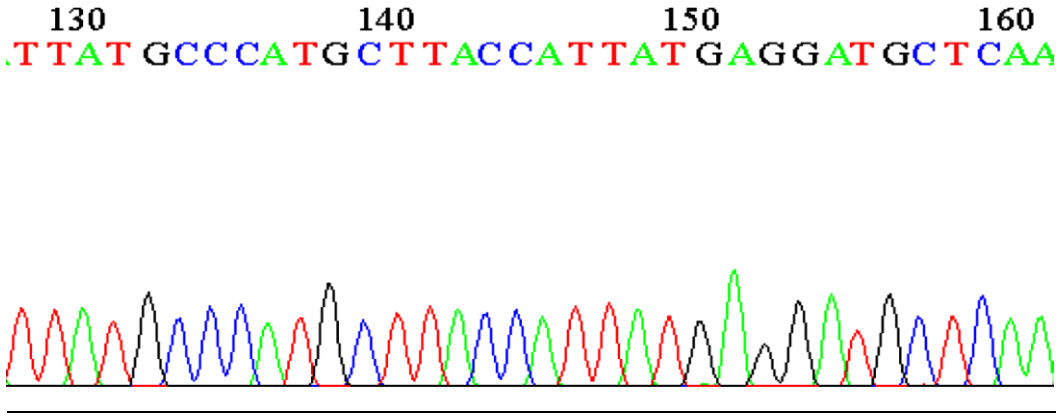
نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نژادهای مورد مطالعه با موفقیت انجام شد و نتایج الکتروفورز و اسپکتوفوتومتر نشان داد که کیفیت و غلظت DNA استخراج شده برای انجام PCR مناسب بود. الکتروفورز محصولات PCR نیز نشان داد که قطعات مورد نظر به خوبی تکثیر شده است (شکل ۱).



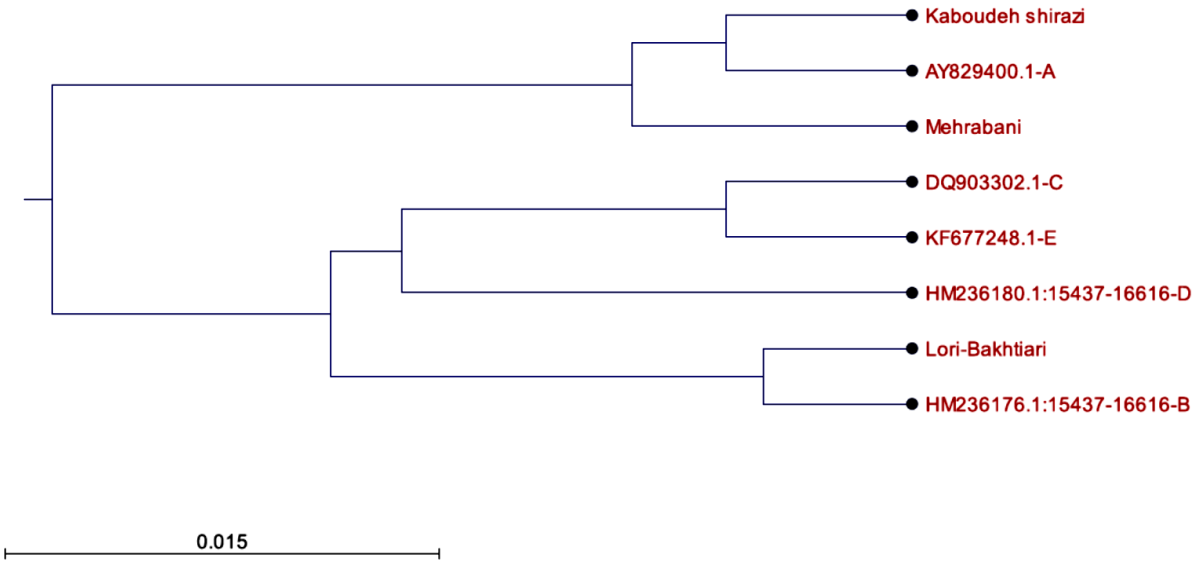
شکل ۱- الکتروفورز آگارز قطعه ۱۰۷۵ جفت باز منطقه کنترلی از میتوکندری گوسفند حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز

بررسی صحت توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Chromas 2.33 نشان داد که کیفیت توالی‌یابی مناسب بود که ناشی از خالص‌سازی قطعات تکثیری می‌باشد(شکل ۲).



شکل ۲. بررسی کیفیت وصحت تعیین توالی توسط نرم افزار Chromas

پس از ویرایش، توالی‌ها در بانک جهانی ژن با شماره ID 2128526 ثبت شدند. سپس درخت فیلوژنتیک با استفاده از هاپلوتایپ‌های ثبت شده (A، B، C، D و E) سایر نژادهای گوسفند جهت مقایسه رسم شد (شکل ۳).



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی ناحیه کنترلی بین نژادهای مورد مطالعه و هاپلوتیب های مختلف گوسفندان

شماره دسترسی توالی هاپلوتیب‌های مرجع A: AY829400، B: HM236176، C: DQ903302، D: HM236180 و E: KF677248 می‌باشد این نمودار دسته‌بندی هاپلوتیبی نمونه‌ها بر اساس همردیف شده را تایید کرد. درخت فیلوژنتیکی نشان داد که نژادهای کبوده و مهربان در گروه هاپلوتیب A واقع شدند. ولی نژاد لری بختیاری در گروه هاپلوتیب B قرار گرفت. نژاد کبوده و مهربانی نزدیک به هم بودند، و فاصله ژنتیکی بین این دو نژاد کمتر بود (شکل ۲). با توجه به نتایج فوق گوسفندان نژاد کبوده و مهربانی جزء گروه هاپلوتیب A طبقه بندی می‌شود. بیشتر محققین ایرانی گزارش دادند که نژادهای اهلی گوسفندان ایرانی در هاپلوتیب A قرار دارند. در نژادهای شال و سنگسری (Mohamadhashemi et. al., 2011) ، در نژاد افشاری (پیرخضرانیان و همکاران،۲۰۱۵)، در نژادهای مغانی، لری

بختیاری، سنگسری، بلوچی، کرمانی، شال، قرهگل و کردی (جوادمنش و همکاران، ۲۰۱۷) ، در نژاد زندی (پیرخضرانیان وهمکاران، ۲۰۱۷) و در نژاد بلوچی (Shafaq et al., 2008) این موضوع را گزارش دادند.

Tapio et al. (2006) در بررسی تنوع ژنوم میتوکندری نژاد اروپایی، قفقاز و آسیا گزارش دادند که بیشتر گوسفندان آسیا در هاپلوتیپ A (۲۲ درصد) و B (۷۱ درصد) قرار گرفته است. Chen et al. (2006) گزارش دادند که هاپلوتیپ غالب در اروپا هاپلوتایپ B است، هاپلوتایپ C مربوط به خاورمیانه و آسیا است و هاپلوتایپ A بصورت مشترک مربوط به خاورمیانه، آسیا و بخشی از اروپا می‌باشد. بیشتر نژادهای ایرانی در هاپلوتیپ A واقع شدند و هیچ نژادی در هاپلوتیپ B قرار نگرفت، جوادمنش و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که نژاد لری بختیاری در هاپلوتیپ A قرار دارد ولی احتمال دارد به این علت باشد که آن‌ها یک قسمت کوچکی از ناحیه کنترلی را بررسی کردند و در مطالعه ما تمام ناحیه کنترلی توالی‌یابی و بررسی شده‌است.

Oner and Calvo (2013) با بررسی چند شکلی در ناحیه mtDNA گوسفندان ترکیه هاپلوتایپ A را به عنوان هاپلوتایپ غالب در میان گوسفندان این کشور نشان دادند. ولی Meadows et al. (2011) نشان دادند که بعض نژادهای ترکیه در هاپلوتایپ‌های دیگر(B، C، D وE) قرار گرفتند. که احتمال دارد برای تعیین هاپلوتایپ اصلی باید کل ژنوم میتوکندری بررسی شود. Chen et al. (2006) گزارش دادند که هاپلوتایپ A در خاورمیانه و آسیا غالب است، با این حال در کشورهای سوریه، فلسطین و عراق که این کشورها در آسیا واقع شدند، مشخص می‌شود که هاپلوتایپ A در گوسفندان این کشورها غالب است، ولی Meadows et al. (2011) با بررسی کامل ژنوم میتوکندری نژاد آواسی که در این کشورها زیست می‌کند نتیجه گرفتند که نژاد آواسی در هاپلوتایپ E قرار دارد.

منابع

پیرخضرانیان، ز.، پور، ط.، محمدهاشمی.، پیرانی. و ازغندی. (۲۰۱۵). تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه HVR-I از ژنوم میتوکندری در گوسفند نژاد افشاری. دوفصلنامه فن آوری زیستی در کشاورزی (علمی-پژوهشی) ، ۶(۱) ، ۶۵-۷۱ .

پیرخضرانیان، ز.، کبیر، م، ر. و نظیفی، ن. (۲۰۱۷). تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی بخشی ازناحیه کنترلی ژنوم میتوکندری در گوسفند زندی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۹(۳) ، ۲۵-۴۰ .

جوادمنش، ع.، نصیری، م، ر.، و ازغندی، م . (۲۰۱۷). بررسی ناحیه HVR-III ژنوم میتوکندری گوسفندان ایرانی با روش توالی‌یابی. پژوهش های علوم دامی (دانش کشاورزی) ، ۲۷(۲) ، ۱۳۳-۱۴۱.

Chen, S.Y., Duan, Z.Y., Sha, T., Xiangyu, J., Wu, S.F., and Zhang, Y.P. 2006. Origin, genetic diversity, and population structure of Chinese domestic sheep. Gene, 376(2): 216-223.

Gaouar, S.B.S., Kdidi ,S., and Ouragh, L. 2016. Estimating population structure and genetic diversity of five Moroccan sheep breeds by microsatellite markers. Small Ruminant Research, 144: 23-27 .

Guo, J., Du, L. X., Ma, Y. H., Guan, W. J., Li, H. B., Zhao, Q. J., Li, X.,Rao, S. Q. 2005. A novel maternal lineage revealed in sheep (Ovis aries). Animal Genetics, 36(4): 331-336 .

Meadows, J., Hiendleder, S., and Kijas, J. 2011. Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. Heredity, 106(4): 700 .

Mohammadhashemi, A., M. Tahmoorespour, N. Pirany, and M. Nosrati. 2011. Phylogenetic analyses of HVR1 region of mtDNA in Iranian Shall and Sangsari native sheep breeds. The 7th National Biotechnology Congress of Iran, Tehran, Iran

Oner, Y., Calvo, J. H., and Elmaci, C. 2013. Investigation of the genetic diversity among native Turkish sheep breeds using mtDNA polymorphisms. Tropical animal health and production, 45(4) : 947-951 .

Rafia, P., and Tarang, A. 2016. Sequence Variations of Mitochondrial DNA Displacement-Loop in Iranian Indigenous Sheep Breeds. Iranian Journal of Applied Animal Science, 6(2): 363-368.

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).

Tapio, M., Marzanov, N., Ozerov, M., Ćinkulov, M., Gonzarenko, G., Kiselyova, T., Murawski,M., Viinalass, H., Kantanen, J. 2006. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. Molecular Biology and Evolution, 23(9):1776-1783 .

Genetic distance between populations of Iranian native sheep based on mitochondrial DNA sequencing

Abdulaziz Hamadalahmad[1], Ali Javadmanesh[2*], Davood Ali Saghi[3], Mohie Almeziad[4]
1. MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Assistant Researcher, Agricultural and Natural Resource Center, Mashhad, Iran.
4. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Aleppo, Aleppo, Syria.
* Corresponding Author's Email: javadmanesh@um.ac.ir

Abstract

Using DNA sequencing have been used widely for analysis of phylogenetic relationships between different groups of animals. The mitochondrial DNA has evolved much faster than the nuclear DNA (nc) and therefore is more diverse compared to the nucleus DNA. Therefore, it is more efficient to identify and categorize near species. In addition, maternal inheritance of mtDNA generally results in no heterozygosity. The aim of this study was to investigate the genetic similarity between Kaboudeh, Lori-Bakhtiari and Mehrabani sheep breeds by using mitochondrial control region. it was measured by using the phylogenetic tree plot, and were examined genetic diversity among Iranian sheep and some haplotypes of foreign sheep. For this study, blood samples were collected from each breed of Iranian sheep. DNA was extracted by Guanidinium-Thiocyanate method. Primers were designed using the Primer Premier 5 software. Standard PCR was performed and PCR products were purified using ethanol precipitation and then the samples were sent for two-way sequencing. The phylogenetic tree was drawn by UMPGA method using Sequence Viewer version 7.6. Our sequences and control region sequences from other sheep breeds from different regions of the world were used. This tree showed that Kaboudeh and Mehrabani breeds were located in haplotype A and Lori-Bakhtiari breed in haplotype B.

Keywords: Control region, Kabodeh, Lori-Bakhtiari, Mehrabani, Mitochondrial DNA, Phylogenetic tree