International Conference on Promotion of Scientific & Regional Cooperation On Food and Agricultural Sciences.
August 24, 2018 – Mashhad, Iran
Research Institute of food Science and Technology
AgroConf.com

مقایسه قرابت ژنتیکی برخی از نژادهای گوسفند اهلی ایرانی با برخی از نژادهای خاورمیانه با استفاده از توالی یابی DNA

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.ir

چکیده

گوسفند به عنوان حیوان اهلی برای قرن‌ها نقش مهمی در تامین منابع غذایی مردمان سرزمین فلات ایران برعهده داشته است و این ناحیه جغرافیایی به عنوان محل اهلی شدن این گونه به شمار می‌رود. مطالعه رابطه فیلوژنتیکی هر موجود با سایر گونه‌ها و نژادها جهت شناخت بیشتر و دستیابی به راهکارهایی برای حفاظت ذخایر ژنتیکی موثر می‌باشد. مقایسه توالی‌های مناطق ژنوم میتوکندری به دلیل سرعت بالای تکامل ژنوم میتوکندری در مقایسه با ژنوم هسته، شواهد قابل اعتمادتری را در مورد تنوع ژنتیکی و منشا تکاملی گونه‌ها فراهم می-کند. هدف از انجام این تحقیق استفاده از توالی ناحیه کنترلی ژنوم میتوکندری به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی و فاصله ژنتیکی بین برخی از نژادهای گوسفند اهلی ایران و برخی از نژادهای اهلی گوسفند در خاورمیانه می‌باشد. بدین منظور نمونه خون از گوسفندان زل، دالاق و مهربان جمع‌آوری شد و پس از استخراج DNA ناحیه مورد نظر با استفاده از پرایمر اختصاصی توسط واکنش زنجیره ای پلمیراز تکثیر شد. تعیین توالی پس از خالص سازی محصولات PCR انجام شد. با مقایسه توالی‌های به دست آمده و توالی نژادهای خاورمیانه ثبت شده در بانک جهانی ژن به همراه توالی‌های هاپلوتایپ‌های اصلی گوسفند مشخص شد که نژاد زل به همراه سایر نژادهای بدون دنبه از قبیل کارایاکا و سکیز در هاپلوتایپ B قرار گرفت که بطور کلی اکثر نژادهای بدون دنبه اروپایی نیز متعلق به همین هاپلوتایپ هستند. گوسفند نژاد مهربانی نیز مطابق با گزارشات قبلی در هاپلوتایپ A و در کنار سایر نژادهای دنبه‌دار خاورمیانه از قبیل نعیمی و سعیدی قرار گرفت. این تحقیق نشان داد که استفاده از ناحیه کنترلی می تواند با دقت بالا فواصل ژنتیکی در نژادهای گوسفند را برآورد کند.

واژه کلیدی: ژنوم میتوکندری، ناحیه کنترلی، فاصله ژنتیکی، گوسفند ایرانی، گوسفند خاورمیانه

مقدمه

سهم گوسفند در ایران را می‌توان به عنوان منبع گوشت، پشم، پوست و شیر طبقه‌بندی کرد. خصوصیات ژنتیکی نژادهای گوسفند 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 خوب برای مطالعه ژنتیک و تکامل

جمعیت نشان داده است (Rafia et al., 2016). کشور ایران مهد اولیه پرورش گوسفند در جهان بوده و به لحاظ جمعیت بالای گوسفند و تنوع نژادی (۲۷ نژاد مختلف) بخش وسیعی از ذخایر ژنتیکی گوسفندان جهان را دارا می‌باشد (توکلیان، ۱۳۷۸). در ایران بیش از ۵۰ میلیون رأس گوسفند، شامل ۲۷ نژاد و اکوتیپ وجود دارد (Zamani et al., 2013). اهلی کردن گوسفند حدود ۱۰۰۰۰ تا ۱۱۰۰۰ سال پیش در منطقه‌ای گسترده از شمال کوه‌های زاگرس ایران تا جنوب شرق آناتولی در ترکیه رخ داده‌است. مناطق آسیای صغیر و مناطق خاورمیانه یک اتصال جغرافیایی مهم بین قاره آسیا و اروپا را ایجاد کردند. به همین دلیل، گونه‌های این منطقه سطح بالای جریان ژن، مخلوط کردن و تمایز را از زمان اهلی شدن منعکس کرده‌اند (Meadows et al., 2011). برخلاف سایر حیوانات، در مورد منشاء گوسفندان اهلی اختلاف نظر زیادی بین متخصصین علوم حیوانی وجود دارد که به دلیل فراوانی نژادهای گوسفند و تغیرات قابل ملاحظه‌ای است که در گوسفند در اثر اهلی کردن آن بوجود آمده است. چنانکه در حال حاضر پیش از دویست نوع نژاد مشخص گوسفند در سراسر دنیا پراکنده است و چنین تنوع نژادی کمتر در سایر حیوانات دیده می‌شود. برخی از دانشمندان علوم حیوانی معتقدند که گوسفند اهلی از گوسفند وحشی اروپا واسیا منشاء گرفته است (سعادت نوری وسیاه منصور،۱۳۷۵).

نژادهای بومی در هر کشور به عنوان یک سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد و رونق آن کشور محسوب می‌شوند و نیز به دلیل شدت انتخاب پایین، تعداد زیاد پرورش دهندگان و محدودیت استفاده از تلقیح مصنوعی، معمولا از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند. 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 ذخیره ژنی دام‌های بومی استفاده نمایند. این مسئله، بخصوص با افزایش تولید محصولات دامی و تولید محصولات پیش‌بینی نشده در آینده، حفظ تنوع ژنتیکی در دام‌های بومی را الزامی ساخته است (Frankham,1994). چرا که یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل‌ها نیست (Askari et al.,.2011). باید تنوع ژنتیکی آنها محاسبه شده و سپس در حفظ این نژادهای بومی تلاش شود. حفاظت باید بر اساس دانش عمیق از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد(Shojaei et al., 2010).

ژنوم میتوکندری پستانداران یک مولکول حلقوی است که حاوی ژن‌هایی حدود kb۱۶ است که RNA های ریبوزومی، انتقال دهنده و پیامبر را بین دو رشته DNA توزیع می‌کنند. در گوسفند، ژنوم میتوکندری شامل ۱۶,۵۸ kb است و طرح‌بندی و سازماندهی ژن‌های آن مشابه پستانداران دیگر است(Villalta et al., 1992) .

DNA میتوکندریایی (mtDNA) به دلایل مختلف به طور گسترده‌ای برای مطالعات فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌است. نرخ تکامل mtDNA به اندازه ۱۰ برابر سریعتر از DNA هسته‌ای است (Brown et al. 1979) .

mtDNA مادری به ارث می‌رسد، هاپلوئید و غیر نوترکیب است (Avise 1994). با این ویژگی ها، استفاده از mtDNA را به عنوان یک ابزار برای تعیین روابط بین افراد داخل گونهها و در میان گونههای ارتباط نزدیک دارند با اختلافات زمانهای اخیر کمک میکند (Avise et al., 1979; Brown et al., 1979) .

باتوجه به اینکه میتوکندری منشاء مادری دارد، این خاصیت باعث تشخیص بهتر اختلافات ژنتیکی درژنوم میتوکندریایی نسبت به ژنوم هسته شده است.از این روmtDNA نشانگر بسیار خوبی برای تشخیص بین گونه‌ای در بین گروه‌های که برای ۱۰۰–۱۰۰۰سال ازهم جدا بوده اند (لولائی،۱۳۷۹).

مواد و روش ها

طراحی پرایمر جهت تکثیر ناحیه کنترلی با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 انجام شد و با توجه به توالی مرجع انجام شد (شماره دسترس های NC_001941.1) (جدول۱). سپس با استفاده از BLAST در پایگاه NCBI پرایمرهای طراحی شده با توالی های موجود در این پایگاه بررسی شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده وطول قطعه تکثیر شده

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

نمونه خون از ۳ نژاد گوسفند ایرانی (زل، دالاق و مهربانی) و از هر نژاد ۵ نمونه جمع آوری شد. استخراج DNA ازخون کامل، با استفاده از روش گوانیدین تیوسیانات (NEXpreptm 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.
واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra (مدل TPersonal) در ۳۸ چرخه حرارتی انجام پذیرفت. برنامه حرارتی براساس جدول(۲) انجام شد.

جدول۲ برنامه حراراتی که در PCR استفاده شد

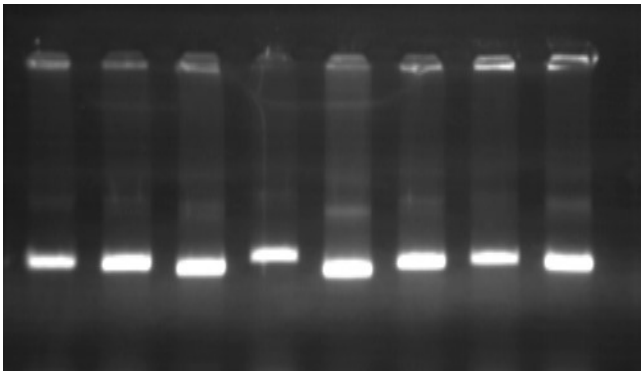
مرحله	دما (سانتیگراد)	زمان
واسرشت شدن اولیه	۹۵	۶۰۰
واسرشت شدن	۹۴	۴۵
اتصال	۵۸	۳۰
تکثیر	۷۲	۹۰
تکثیر نهایی	۷۲	۶۰۰

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) خالص سازی شدند و ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR خالص‌سازی شده، جهت تعیین توالی دو طرفه ارسال شدند. سپس با استفاده از نرم افزار

BioEdit 7.2.5 کیفیت توالی‌های به دست آمده بررسی شده و توالی بعض نژادهای خاورمیانه از بانک ژن جهانی گرفته شد سپس رسم درخت فیلوژنتیکی و برآورد فواصل ژنتیکی با استفاده از نرم افزار CLC Sequence Viewer 7.6 انجام شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA در تمامی نمونه ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار است. پس از انجامPCR، الکتروفورز محصول واکنش روی ژل آگاروز ۱٪ نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعه اختصاصی با ناحیه کنترلی به خوبی تکثیر شده است (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز به طول قطعه ۱۰۷۵ روی ژل آگاروز ۱٪

تعیین توالی قطعات مورد مطالعه برای تمامی نمونه‌ها انجام گرفت و نتایج حاصل از توالی‌های مربوط به نمونه‌ها از لحاظ کیفیت توالی‌یابی برای هر باز، توسط نرم افزار CLC Sequence Viewer 7.6 انجام شد. صحت توالی نوکلئیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Chromas بررسی شدند که نشان داد کیفیت توالی یابی مناسب بود (شکل۲) و نوکلئیوتیدهایی که دارای کیفیت پایینی بودند از دو انتهای قطعه مورد نظر حذف شدند.

توالی‌های نهایی در بانک جهانی ژن با شماره (زل:MH699973، دالاق:MH699967 ومهربانی:MH553570) ثبت شدند. برای تعیین روابط فیلوژنتیکی و انجام همپوشانی، همه‌ی توالی‌های مورد مطالعه با توالی هاپلوتایپ‌های مرجع (E:HM236183، D:HM236180، C:903302، B:HM236176، A:AY829400) وتوالی‌های برخی گوسفندان خاورمیانه (ترکیه: هریک، ساکیز و کاریاکا، عربستان: نعیمی، مصر: سعیدی و اوسیمی، عراق: کرادی، نعیمی، همدانی و سوریه: آواسی) که از بانک جهانی گرفته شد، هم تراز شدند. سپس درخت فیلوژنتیکی رسم شد و نشان داد که نژاد مهربان در کنار نژادهای دیگر (سعیدی، نعیمی و هریک) که دنبه‌دار هستند در هاپلوتایپ A قرار گرفتند. و نژاد زل در کنار نژادهای اروپایی که بیشتر نیم دنبه هستند در هاپلوتایپ B واقع شدند. که بیشتر محققین ایرانی که بر روی نژادهای اهلی گوسفند ایرانی بررسی کردن که بیشتر انها در هاپلوتایپ A قرار دارند. در نژادهای مغانی، لری بختیاری، سنگسری، بلوچی، کرمانی، شال، قرهگل و کردی (جوادمنش و همکاران، ۲۰۱۷) ، در

نژادهای شال و سنگسری (Mohamadhashemi et. al., 2011) و در نژاد بلوچی (Shafaq et al., 2008) می باشد. نتایج فیلوژنتیکی نشان داد که نژاد دالاق نزدیک با نژاد زل واقع شد و احتمالاً به دلیل نزدیک بودن محل پراکنش آنها می باشد که هردو نژاد در استان های مازنداران و گلستان زیست می کنند.

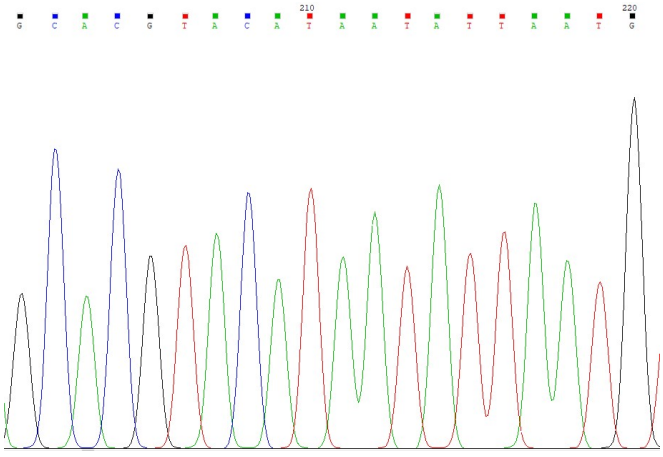
نژاد آواسی در هاپلوتایپ E واقع شد که با نتایج میدواس وهمکاران مطابقت دارد که(Meadows et al., 2011) با بررسی کامل ژنوم میتوکندری نژاد آواسی نتیجه گرفت که نژاد آواسی در هاپلوتایپ E قرار دارد.

همچنین مشخص شد که نژادهای ایرانی با نژادهای کشورهای همسایه (عراق، سوریه) نزدیک‌تر اند در مقایسه با نژادهای ترکیه، مصر وعربستان که فاصله بیشتر دارند که احتمالا به علت نزدیک جغرافیایی مکان زیستی آن‌ها می-باشد.

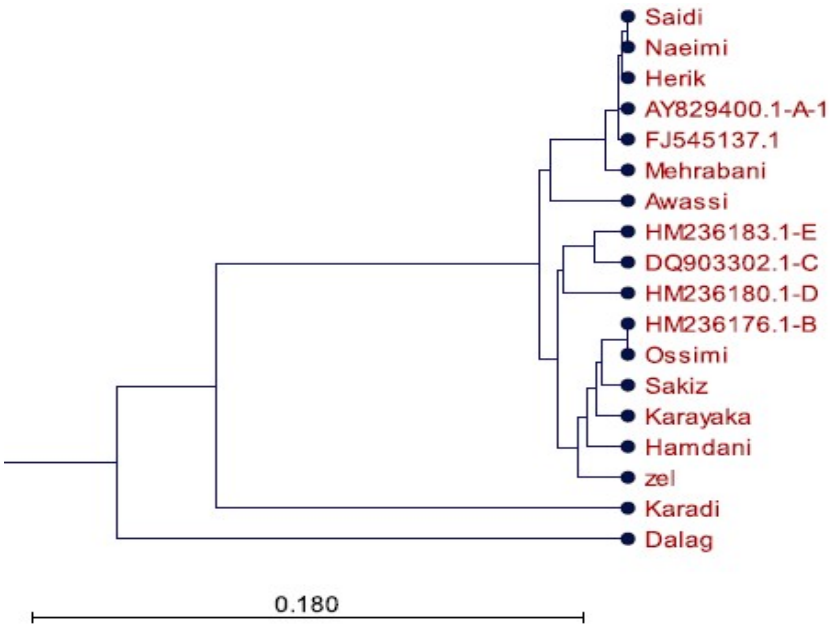
(Tapio et al., 2006) در بررسی تنوع ژنوم میتوکندری نژاد اروپایی، قفقاز و آسیا گزارش دادند که بیشتر گوسفندان آسیا در هاپلوتیپ A (۲۲ درصد) و B (۷۱ درصد) قرار گرفته است.

تاکنون پنج گروه هاپلوتیپی در گونه گوسفند تشخیص داده شده است (A-E) (Othman et al., 2015) تنوع ژنتیکی را در نژادهای گوسفندان مصری و ایتالیایی مورد مطالعه قرار دادند. آنها ۵ گروه هاپلوتیپی را برای گوسفندان مطالعه شده در نظر گرفتند. گروه‌های هاپلوتیپی A و B در آسیا و اروپا، گروه هاپلوتیپی C درکشورهای چین، قفقاز، ترکیه و پرتغال، گروه هاپلوتیپی D در قفقاز، کراچی و رومانی و گروه هاپلوتیپیE در ترکیه، اسرائیل، سوریه و شرق میانه پراکندگی بیشتری دارند. تعیین گروه هاپلوتیپی A و B بر أساس مکان‌های جغرافیایی اولین بار توسط (Wood and Phua, 1996) گزارش شد.

(Hiendleder et al., 1998) در پی توالی‌یابی کامل ژنوم میتوکندری گوسفندان اهلی (Ovis aries) و مقایسه چندین نژاد مختلف اروپایی و آسیایی دریافتند دو گروه هاپلوتایپی عمده A و B در آنها دیده می‌شود که هاپلوتایپ منشأ گوسفندان آسیایی و هاپلوتایپ منشأ گوسفندان اروپایی است. همچنین آنها بیشنهاد کردند پیدایش این دو گروه ناشئ از اشتقاق گوسفندان امروز، از دو جد مادری متفاوت است و تقریبا در یک زمان در خاور نزدیک اتفاق افتاده است.



شکل ۲. بررسی کیفیت توالی یابی توسط نرم افزار Chromas



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی ناحیه کنترلی بین نژادهای مورد مطالعه و برخی از نژادهای خاورمیانه با هاپلوتیپ های مختلف گوسفندان

منابع

توکلیان، ج. ۱۳۷۸ . نگرشی بر ذخایر ژنتیکی دام و طیور ایران. موسسه تحقیقات علوم دامی کشوتهران. ایران. ص ۴۵۱.

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.

سعادت نوری، م و ص. سیاه منصور. ۱۳۷۵ . اصول نگهداری و پرورش گوسفند. انتشارات اشرفی. تهران.

لولائی، ف .۱۳۹۷ . بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Barbus capito* در استانهای مازندران و گیلان .پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس.

Askari, N., Mohammad, A. M., & Baghizadeh, A. 2011. ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations.

Avise, J. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and HALL: An International Thomson Publishing Company

Avise, J. C., Lansman, R. A., & Shade, R. O. 1979. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus Peromyscus. Genetics, 92(1), 279-295.

.Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(4), 1967-1971

Frankham R.1994. Conservation of genetic diversity for animals. 5th world congress on genetics Applied to livestock production, University of Guelph, Ontario, Canada 21: 385-392.

Hiendleder, S., Mainz, K., Plante, Y., & Lewalski, H. 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(2), 113-120

Kantanen, J. 1999. Genetic diversity of domestic cattle (Bos taurus) in North Europe: Joensuun yliopisto.

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

Othman, O. E. M., Payet-Duprat, N., Harkat, S., Laoun, A., Maftah, A., Lafri, M., & Da Silva, A. 2016. Sheep diversity of five Egyptian breeds: Genetic proximity revealed between desert breeds: Local sheep breeds diversity in Egypt. Small Ruminant Research, 144, 346-352

Rafia, P., & 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).

Shojaei, M., Mohammad Abadi, M., Asadi Fozi, M., Dayani, O., Khezri, A., & Akhondi, M. 2011.. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Journal of Cell and Molecular Research, 2(2), 67-73

Tapio, M. 2006. Origin and maintenance of genetic diversity in Northern European sheep: University of Oulu Oulu

Villalta, M., Fernández-Silva, P., Beltrán, B., Enguita, L., López-Pérez, M. J., & Montoya, J. 1992. Molecular characterization and cloning of sheep mitochondrial DNA. Current genetics, 21(3), 235-240

Wood, N., & Phua, S. 1996. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. Animal Genetics, 27(1), 25-33 .

Zamani, P., Akhondi, M., Mohammadabadi, M. R., Saki, A. A., Ershadi, A., Banabazi, M. H., & Abdolmohammadi, A. R. 2011. Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology, 10(10), 1812-1817 .

Comparison of genetic similarity between some Iranian and Middle Eastern sheep breeds using 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. Research Assistant, 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

Sheep as a domestic animal for centuries has played an important role in supplying food to people in plateau of Iran, and this geographic area is considered as the place of domestication of sheep. Study of the phylogenetic relationship of each species with other species and breeds is important in order to know more about evolution and to find solutions for the conservation of genetic reserves. Analyzing sequences of mitochondrial genome regions due to the high rate of mitochondrial genome evolution compared with the nucleus provides more reliable evidence about the genetic diversity and evolutionary origin of the species. The aim of this research was to use the sequence of mitochondrial control region to investigate the phylogenetic relationship and genetic distances between some domestic sheep breeds of Iran and some domestic sheep breeds from other Middle Eastern countries. For this purpose, blood samples were collected from Zel, Dalagh and Mehrabani sheep. After DNA extraction, polymerase chain reaction was carried out by using specific primers. Then standard sequencing was performed after purification of PCR products. Sequences obtained from this study were compared with sequences from Middle Eastern breeds registered in the NCBI. Analysis of phylogenetic tree of the main haplotypes of sheep revealed that the Zel breed with other thin-tailed breeds, such as Karayaka and Sakiz are grouped in the haplotype B. In general, most thin-tailed breeds also belong to the same haplotype. The Mehrabani breed sheep also placed in Haplotype A along with other Middle Eastern fat-tailed breeds such as

Naeimi and Saidi in agreement with previous reports. This study showed that the use of the control region sequence could estimate the genetic distances in sheep breeds with high precision.

Keywords: Control region, genetic distance, Iranian sheep, Middle East sheep, mitochondrial genome