

تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندریایی در بوقلمون بومی خراسان

• مسعود علی پناه (نویسنده مسئول)

دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربت حیدریه.

• حمید رضا سیدآبادی

استادیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور.

• فائزه قراری

کارشناس ارشد، دانشگاه کشاورزی، دانشگاه تربت حیدریه.

• زهرا رودباری

دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۳

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۵۱۵۲۲۹۹۶۰۲

Email: alipanah.masoud@gmail.com

چکیده

هدف از این مطالعه، تجزیه ژنتیکی و فیلوژنتیک ناحیه D-LOOP ژنوم میتوکندری بوقلمون بومی خراسان بود. بدین منظور، از ۲۰ قطعه بوقلمون بومی خراسان نمونه خون جمع آوری گردید. پس از استخراج DNA، تکثیر قطعه ۸۵۰ 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 ۱۰ هاپلوتیپ مختلف بر اساس ۵ نوکلئوتید چند شکل موجود در توالی ها تعیین گردید. توالی های نهایی بدست آمده از هر هاپلوتیپ دارای طول تقریبی ۷۲۳ جفت باز و شامل ۲۳/۱۰ درصد آدنین، ۱۶/۰۴ درصد گوانین، ۳۰/۷۱ درصد سیتوزین و ۳۰/۱۵ درصد تیمین بودند. نتایج فیلوژنتیکی با استفاده از روش UPGM نشان داد که بوقلمون بومی خراسان با بوقلمون بومی امریکا، ایتالیا و آفریقای جنوبی نسبت به سایر نژادها شباهت ژنتیکی بیشتری دارد

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 107 pp: 119-126

Genetic and phylogenetic analysis D-Loop region of mitochondrial genome in Khorasan native turkeyMasoud Alipanah¹, Hamid Reza Seydabadi², Faezeh Gharari³ and Zahra Rodbari⁴

1*:associated professor, agriculture faculty, Torbat e Heydarieh, Email:alipanah.masoud@gmail.com

2:assistant professor, animal Science Research Institute,

3:student of PhD, agriculture faculty, Mashhad University

4:Master of science, , agriculture faculty, Torbat e Heydarieh

Received: May 2014**Accepted: December 2014**

The purpose of this study was to genetic and phylogenetic analysis of D-Loop region in Khorasan Razavi native turkey. The blood samples were collected from 20 birds. After DNA extraction, 850 bp fragment of the mitochondrial cytochrome b was amplified with specific primers. The amplified fragments were sequenced. 10 different heliotypes based on five nucleotide sequences were determined. The final sequence of each haplotype with an approximate length of 723 bp was containing 23.10 % of adenine, 16.04% guanine, 30.71% cytosine and 30.15 % of the thymine. phylogenetic results by UPGM showed that Khorasan Razavi native turkey had a closer relationship with native America , Italy and South Africa turkeys compare other than which may be due to the very close genetic affinity turkey breeds Khorasan Razavi with this turkeys.

Key words: Genetic diversity, turkey, mitochondria, genetic analysis, phylogenetic.**مقدمه**

مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی در آن ها، امکان تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و توالی یابی نواحی حفاظت شده و نواحی حفاظت نشده که برای مطالعات تکاملی گونه ها لازم می باشد، اشاره نمود (Bellagamba et al., 2001). بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت ها با استفاده از ژنوم میتوکندری از سال ۱۹۷۹ شروع شد. از آن زمان به بعد، مطالعات تئوری و تجربی ژنوم میتوکندری به دانش بشر درباره جمعیت های جانوری افزوده است و مقایسه توالی های مناطق مختلف ژنوم میتوکندری به دلیل سرعت بالای تکامل آن در مقایسه با ژنوم هسته، شواهدی را در مورد تنوع ژنتیکی و منشا تکاملی گونه ها فراهم آورده است (Lolai, 2001). اولین توالی کامل ژنوم میتوکندری بوقلمون به طول ۱۶۷۱۷ جفت باز و همچنین طول ژن های مختلف واقع بر آن و ناحیه D-Loop به طول ۱۱۶۴ با کد دسترسی EF153719.1 گزارش شده است (Guan et al., 2009). در مطالعه ای دیگر، جهت تعیین منشا نژاد بوقلمون های وحشی موجود در کوه های Huachua در جنوب شرق آریزونا و این که آیا از بوقلمون های نژاد Gould

نژادهای بومی، به عنوان یک ذخیره ژنتیکی هستند که شناخت دقیق تر و کسب اطلاعات بیشتر در مورد آن ها به جهت حفظ ذخایر ژنتیکی برای نسل های آینده نیز ضروری به نظر می رسد. یکی از کاربردی ترین راه های شناسایی این نژادها، استفاده از تکنیک مولکولی به خصوص استفاده از ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) است که اساس این گونه 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 دارد. 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 ۳۷ ژن را کد می کند که شامل ۱۳ ژن کد کننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کد کننده tRNA و ۲ ژن کد کننده rRNA است و طول تقریبی آن در طیور ۱۶ هزار جفت باز می باشد (Mohammadi Pestehbig et al., 2011). از مزایای mtDNA می توان به بیش از هزار نسخه به ازای هر سلول، کوچک بودن اندازه آن نسبت به DNA ژنومی، وراثت پذیری

شماره 9-AY037888 در بانک جهانی ژن ثبت شد. در همه نمونه ها، ۱۰ ناحیه متغیر وجود داشت که همه آن ها از نوع جایگزینی C به T بود. نتایج دو نشانگر نشان داد که کمترین تنوع ژنتیکی مربوط به جمعیت بوقلمون کوه های هوچاکا است.

مواد روش ها

نمونه های خون از ۲۰ قطعه بوقلمون بومی خراسان تهیه گردید. نمونه های خون تا زمان استخراج در لوله های حاوی EDTA در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت GenNet صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nano Drop-ND 2000 سنجیده شد. طراحی آغازگر برای تکثیر بخشی از توالی ژن D-Loop از mtDNA با استفاده از نرم افزار Primer premier 5 (Premier Biosoft, USA) و ژنوم کامل میتوکندری بوقلمون (شماره دسترسی EF153719.1) صورت گرفت. توالی آغازگرهای طراحی شده در تحقیق اخیر به صورت زیر بود:

Forward 5'-TTGTTCTCAACTACGGGAACA-3'
Reverse 5'-CAAAGTGCATCAGTGTCAAGAT-3'

سپس، با استفاده از رویه BLAST موجود در پایگاه بانک جهانی ژن (NCBI)، میزان هم پوشانی آن ها با توالی های موجود، مقایسه گردید. واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ۸۵۰ جفت بازی ناحیه ژنی D-Loop از mtDNA توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal براساس روش استاندارد انجام گرفت. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ mM Tris-HCL (pH 8.8)، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمرز، ۰/۲ mM از هر dNtp، ۱/۵ mM از $MgCl_2$ ، ۵ pmol از آغازگر اختصاصی ژن و ۱۰۰ نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه برای ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه، یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه در ۳۰

یا از بوقلمون های نژاد Merriam منشأ گرفته اند، با استفاده از تجزیه ژنتیکی ناحیه HVS-I از ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری، نشان دادند که بوقلمون های وحشی با بوقلمون های نژاد Gould در یک گروه ژنتیکی قرار گرفتند (Mock et al., 2001). همچنین در تحقیق دیگری، جهت تعیین توالی ژنوم میتوکندری و آنالیز فیلوژنتیکی مولکولی در بوقلمون، به دلیل این که توالی کامل ژنوم میتوکندری در دسترس نبود با استفاده از روشهای مبتنی بر PCR بر اساس ژنوم طیور و دیگر گونه های پرندگان، ۱۹ جفت پرایمر جهت تعیین توالی کل ژنوم میتوکندریایی بوقلمون طراحی گردید و طول کامل ژنوم میتوکندری ۱۶۷۱۷ جفت باز گزارش شد که بیشترین درصد تشابه به میزان ۸۵ درصد با مرغ بود و آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که بیشترین قرابت ژنتیکی را بوقلمون به مرغ و سپس به بلدرچین دارد (Guan et al., 2009). در تحقیقی دیگر، تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت های وحشی بوقلمون را با استفاده از تجزیه ژنتیکی ناحیه HVR-I از ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری مورد بررسی قرار دادند (Szalanski et al., 2000). برای این منظور، از ۴ سویه وحشی و از هر سویه ۲۵ قطعه نمونه گیری صورت گرفت. نتایج این تحقیق نشان دادند که جمعیت های مذکور در معرض خطر انقراض قرار دارند. همچنین (Xiaojing et al., 2007) در مطالعه خودبه منظور شناسایی تنوع ژنتیکی در ژنوم میتوکندریایی ۵۳ پرنده که شامل نواحی کد کننده و غیر کد کننده (D-Loop) بود، ۹۱ چند شکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی کردند که ۷۰ SNPs در ناحیه کد کننده و ۲۱ SNPs در ناحیه غیر کد کننده بود.

در مطالعه ای به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت بوقلمون های وحشی در آمریکا، آریزونا و کوه های هوچاکا، از سه نشانگر، توالی یابی، AFLP و ریزماهوره استفاده گردید (Mock et al., 2001)، از نشانگر توالی یابی جهت بررسی تنوع در ناحیه HVR₁ مربوط به ناحیه کنترل (D-loop) واقع در ژنوم میتوکندری استفاده شد و یک قطعه ۴۵۳ جفت باز تکثیر گردید و سپس توالی یابی انجام شد که نتایج این تحقیق با

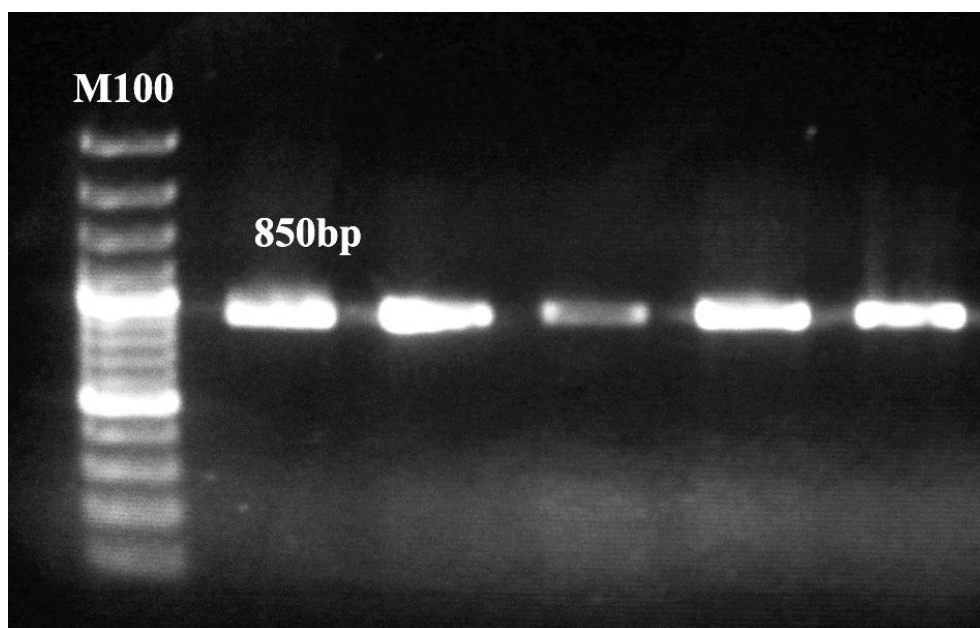
از رویه UPGMA توالی های هم ردیف شده، به کمک نرم افزار 5 MEGA (Tamura et al., 2011) ترسیم گردید. جهت تعیین هاپلو تیپ ها از رویه Disparity Index Analysis نرم افزار MEGA5 استفاده گردید.

نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه ها با موفقیت انجام گرفت. نتایج طیف سنجی نشان دادند که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار است. الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی آگارز ۱ درصد نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعه اختصاصی برای ناحیه D-Loop به طول ۸۵۰ جفت باز را تکثیر نمودند (شکل ۱).

سیکل تکثیر شدند. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز، خالص سازی شد و به همراه ۵۰ میکرو لیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده با غلظت ۱۰ پیکامول به منظور تعیین توالی به شرکت MacroGen کره جنوبی ارسال گردید.

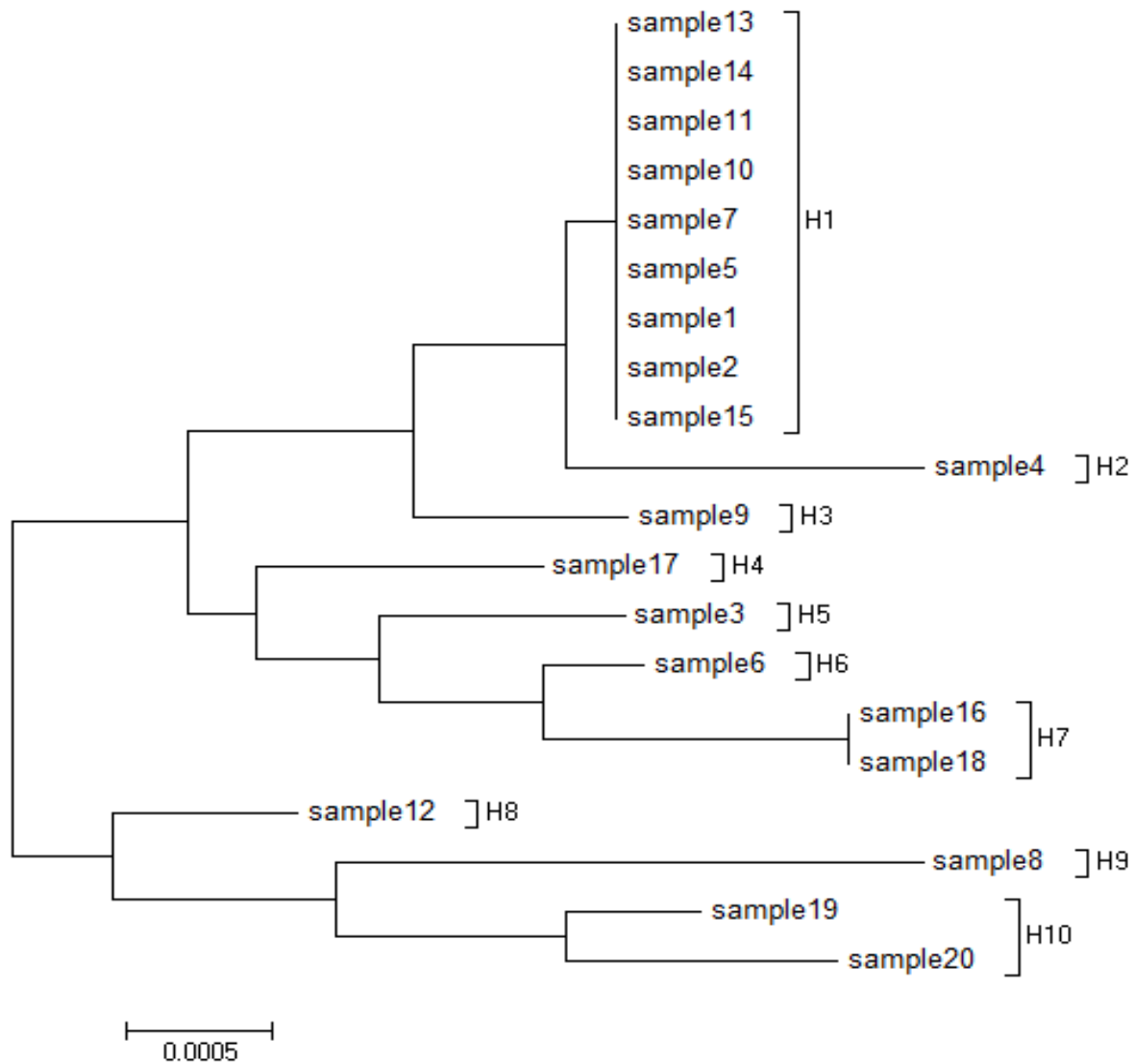
این نمونه ها، با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی یابی شدند. سپس با استفاده از ابزار قدرتمند BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی های بدست آمده سنجیده شد. به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نژادهای مورد مطالعه، نمودار درختی با استفاده



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR به طول ۸۵۰ جفت باز روی ژل آگارز ۱ درصد

خراسان با استفاده از ابزار Disparity Index Analysis نرم افزار 5 MEGA (Tamura et al., 2011)، وجود ۱۰ هاپلو تیپ در جمعیت را نشان داد (شکل ۲).

تعیین توالی قطعه ۸۵۰ جفت بازی D-Loop برای هر ۲۰ نمونه انجام گرفت. قطعه ۸۵۰ جفت بازی بدست آمده از توالی یابی، ویرایش و قطعه ۷۲۳ جفت بازی در همه نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه توالی نوکلئوتیدهای ۲۰ نمونه بوقلمون بومی



شکل ۲- نمودار فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از توالی ۱۰ هاپلوتیپ مربوط به بوقلمون بومی خراسان. هر هاپلوتیپ با استفاده از H_x نشان داده شده است.

میتوکندری استفاده شده بود و یک قطعه ۴۵۳ جفت باز تکثیر شده و سپس توالی یابی انجام گرفته بود که با شماره AY037888-9 در بانک جهانی ژن ثبت شده بود. در همه نمونه‌ها ۱۰ ناحیه متغیر وجود داشت که همه آن‌ها از نوع جایگزینی C به T بود و گزارش شده بود که کمترین تنوع ژنتیکی مربوط به جمعیت کوه-های Huachuca است.

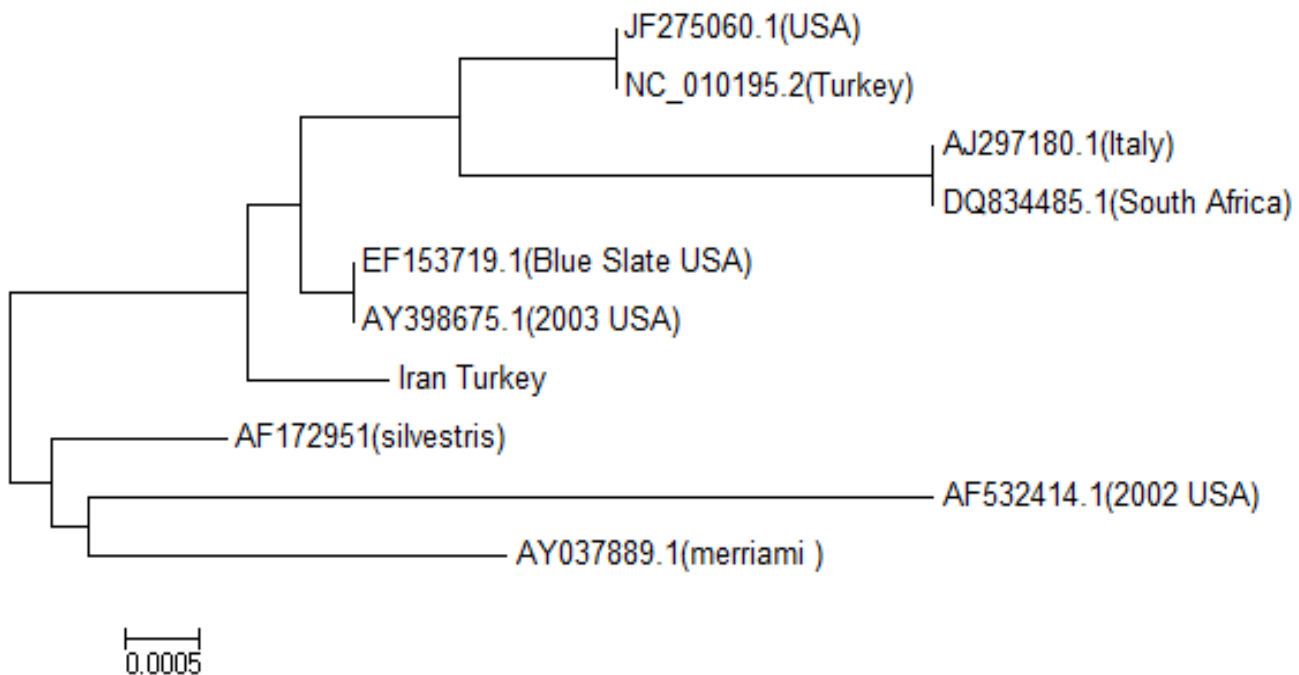
همچنین در مطالعه‌ای، ناحیه D-Loop در ۹۸ پرنده متعلق به ۱۵ نژاد بومی نیجریه مورد تجزیه و تحلیل مولکولی قرار گرفت (Adebambo, 2009). نتایج این تحقیق ۱۷ هاپلوتیپ را در این

تعداد ۱۰ هاپلوتیپ از بین توالی‌های مورد بررسی تعیین شدند که دارای ۵ جایگاه چند شکل (SNP) بودند. در سه جایگاه جهش جانشینی حاصل تبدیل نوکلئوتید تیمین به سیتوزین است و در دو جایگاه دیگر جهش جانشینی حاصل جایگزینی گوانین با آدنین است که با نتایج Mock et al., 2001 که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت بوقلمون‌های وحشی در آمریکا، آریزونا و کوه‌های Huachuca مطالعه‌ای انجام دادند، مطابقت دارد. در این مطالعه از نشانگر توالی یابی جهت بررسی تنوع در ناحیه HVR₁ مربوط به ناحیه کنترل (D-loop) واقع در ژنوم

مقایسه توالی‌های مورد مطالعه با توالی‌های ثبت شده در پایگاه NCBI مشخص نمود که میزان هم پوشانی و همولوژی بالایی بین توالی‌های مورد مطالعه و توالی‌های موجود در این پایگاه وجود دارد و نشان می‌دهد که ناحیه توالی یابی شده در این مطالعه مشابه توالی این ناحیه در مطالعات دیگر است (Guan et al., 2000; Szalanski et al., 2009 and Mock) et al., 2001). نتایج حاصل از بررسی درخت فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که توالی ناحیه D-Loop از ژنوم میتوکندری بوقلمون بومی خراسان با بوقلمون بومی آمریکا، ایتالیا و آفریقای جنوبی نزدیکی بیشتری دارد، که این امر ممکن است به دلیل قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک بوقلمون بومی خراسان با نژادهای بوقلمون در این کشورها باشد که ناشی از واردات بوده است، اما با بوقلمون‌های Merriami و Silvestris هیچ شباهتی ندارند و در شاخه مجزا قرار گرفته است و بیشترین فاصله ژنتیکی را با این نژادها دارد (شکل ۳).

نمونه‌ها نشان داد. با توجه به هاپلوتیپ‌های به دست آمده می‌توان توالی مورد توافق را محاسبه نمود. از آنجائی که 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 می‌باشد (Nei and Kumar, 2000).

تنوع نوکلئوتیدی (π) در جمعیت بوقلمون‌های بومی ایران ۰/۰۰۳ تخمین زده شد. مقدار تنوع هاپلوتیپی در جمعیت حاضر ۰/۸۳ برآورد شده است. فراوانی نسبی نوکلئوتیدها در توالی مورد توافق ناحیه D-Loop بوقلمون بومی خراسان به طول ۷۲۳ نوکلئوتید شامل ۲۳/۱۰ درصد آدنین، ۱۶/۰۴ درصد گوانین، ۳۰/۷۱ درصد سیتوزین، ۳۰/۱۵ درصد تیمین بود.



شکل ۳- نمودار فیلوژنی براساس توالی کلی بوقلمون بومی خراسان و برخی نژادهای بوقلمون موجود در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آنها.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربت حیدریه انجام شده است.

منابع

- Adebambo A.O. (2009). Mitochondrial DNA D-Loop analysis of south western Nigerian chicken, *Archivos de Zootecnia*, 58 (224): 637-643.
- 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.
- Guan X, Silva P, Gyenai KB, Xu J, Geng T, Tu Z, Samuels DC, Smith EJ.(2009). The mitochondrial genome sequence and molecular phylogeny of the turkey, *Meleagris gallopavo*, *Animal Genetics*, 40(2):134-41.
- 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.
- Mock KE, Theimer TC, Wakeling BF, Rhodes OE, Greenberg DL, Keim P.(2001). Verifying the origins of a reintroduced population of Gould's wild turkey, *Journal of Wildlife Management*, 65:871-79.
- Mohammadi Pestehbig F, Pirany 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 Science*, 21(2): 1-9.
- Nei M and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York.
- Pirani N, Mohammadhashemi A, Alijani S, Rezazadeh Goli R, Ghanbari S .(2010). Molecular Analysis of Mazandarani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA, *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1(2): 53- 60.
- Szalanski AL, Church K, Oates D, Bischof R and Powers TO. (2000). Mitochondrial DNA variation within and among wild turkey (*Meleagris gallopavo*) subspecies, *Transactions of the Nebraska Academy of Sciences*, 26: 47-53.
- 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.

