

تجزیه و تحلیل مولکولی جمعیتی از مرغ لاری با استفاده از توالی ناحیه HVR-I ژنوم میتوکندری

- زهرا کرمی
دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه شهرکرد
- نصراله پیرانی (نویسنده مسئول)
دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد.
- بهروز شیران
استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۰۵۷۳۹۷۱

Email: napirany@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.116209.1568

چکیده

مرغ‌های بومی ایرانی مواد ژنتیکی پایه برای برنامه‌های اصلاح نژاد محسوب میشوند. جهت حفظ و حمایت از این ذخایر ژنتیکی نیاز به شناسایی تنوع ژنتیکی آنها می‌باشد. از جمله مکانهای ژنومی که جهت مشخص شدن تنوع ژنتیکی و تکاملی گونه‌ها استفاده می‌شود ژنوم میتوکندری می‌باشد. در مطالعه حاضر، به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی مرغان لاری ایران، تعداد ۲۳ قطعه مرغ از منطقه لارستان فارس به‌عنوان نمونه آزمایشی انتخاب و پس از عمل خون-گیری، استخراج دی‌ان‌ای انجام شد. بخش HVR-I ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و قطعات تکثیر شده پس از خالص‌سازی توالی یابی شدند. در کل تعداد ۲۱ توالی با کیفیت بدست آمد که از این میان تعداد ۵ SNP شناسایی شد. از تجزیه و تحلیل توالی‌های بدست آمده تعداد ۳ هاپلو تیپ بدست آمد که با کد دسترسی KF957610 و KF957611 و KF957612 در بانک جهانی ژن ثبت گردید. پس از اخذ توالی‌های مشابه ژنوم میتوکندری دیگر نژادهای موجود در بانک ژن و مرغ مرنندی و مازندرانی ایران درخت فیلوژنی مربوطه رسم گردید. نتایج فیلوژنی مشخص کرد که مرغان بومی لاری ایران به احتمال زیاد واجد برخی شباهت‌های ژنتیکی با مرغ مرنندی، مازندرانی، مرغ بومی کشور آذربایجان، پلیموت راک پرخطدار، مرغ ابریشمی و مرغ جنگلی خاکستری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ناحیه D-loop، هاپلو تیپ، درخت فیلوژنتیکی

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 120 pp: 187-196

Molecular Analysis of LARI chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA.

By: Z Karami¹, N Pirany^{2*}, B Shiran³

¹MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Iran.

²Associated professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Iran.

³Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Iran

Received: October 2017

Accepted: December 2017

Iranian native chickens are considered as the basic genetic material for breeding programs. Breeding programs principally require identification and conservation of genetic diversity of these populations. Assessment of mitochondrial genome in one breed and comparing it with other breeds can give a good indicator of diversity in that population. In order to assess the genetic diversity among Iranian Lari chickens, 23 chickens were selected from Larestan county in Fars Province as the sample of the study. Then, DNA was extracted after blood sampling. The HVR-I section of D-loop region of mitochondrial genome was amplified using specific primers and then the amplified fragments were sequenced after purification. A total of 21 high quality sequences was obtained, among which 5SNPs were identified. Three haplotypes were found from the analysis of the obtained sequences. They were recorded in GenBank under access codes of KF957610, KF957611, and kF957612. Similar mitochondrial genome sequences of other breeds existing in GenBank and Iranian Marandi and Mazandarani chickens were obtained and then the corresponding phylogenetic tree was drawn. Phylogenetic results indicated that Iranian Lari chickens are more similar to Marandi and Mazandarani, Azerbaijan native, barred Plymouth Rock, and Silky and Sonerati chicken breeds. Then it can be concluded that Iranian Lari native chickens breed may have genetic similarities with these breed.

Key words: genetic diversity, D-loop region, haplotype, phylogenetic tree.

مقدمه

گرفته‌اند و آن هم گونه جنگلی قرمز (گالوس گالوس) است که به ناحیه جنوب غرب آسیا بر می‌گردد (Adebambo و همکاران، ۲۰۰۹). تنوع بین گونه‌ای هم در یک کشور و هم در بین کشورهای مختلف وجود دارد که در حال حاضر به موضوع مورد علاقه‌ی انجمن‌های علمی مبدل گشته است (Silva و همکاران، ۲۰۰۸). امروزه جهت برآورد تنوع ژنتیکی و تعیین فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها از تکنیک‌های پیشرفته مولکولی بر اساس تفاوت‌های موجود در سطح مولکول DNA استفاده می‌شود. یکی از این

از اوایل قرن بیستم جمعیت جهان روندی رو به افزایش داشته و تأمین نیازهای خوراکی بخصوص پروتئین حیوانی از چالش‌های اساسی در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۰). افزایش جمعیت جهان و افزایش روز بروز تقاضا برای محصولات دامی، باعث فرسایش منابع ژنتیکی می‌شود و این مشکل در مورد کشورهای در حال توسعه به دلیل تنوع ژنتیکی بالاتر، بیشتر است (Silva و همکاران، ۲۰۰۸). به طور عموم پذیرفته شده که تمام مرغ‌ها از یک جد مشترک منشأ

به طول ۱۲۳۱-۱۲۳۲ جفت باز بررسی و روابط فیلوژنتیک و مسیر و منشأ مادریشان مورد بررسی قرار گرفت که در این مطالعه ۴۲ هاپلو تیپ در ۷ هاپلو گروه A-G مشخص شد. در نهایت نتیجه گرفته شد که برخی از نژادها از داخل ژاپن منشأ نگرفته‌اند و مرغان نشأت گرفته از جنوب شرق آسیا پایه مرغ های بومی ژاپن را تشکیل داده‌اند (Oka و همکاران، ۲۰۰۷). در تحقیقی که به منظور تجزیه و تحلیل ناحیه HVR-I میتو کندری مرغ بومی مردی ایران انجام گرفت، تعداد ۶ هاپلو تیپ مشخص شد. نتایج فیلوژنی مشخص کرد که مرغ بومی مردی ایران با مرغ بومی کشور آذربایجان پلیموت راک پرخطدار لگهورن سفید، مرغ ابریشمی، مرغ جنگلی خاکستری نزدیکی بیشتری دارد که ممکن است به دلیل نزدیکی جغرافیایی زیستگاه نژاد مردی و بومی کشور آذربایجان و همچنین مشابهت ژنتیکی مرغ مردی ایران به نژادهای مدیترانه‌ای باشد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۰). در مطالعه دیگری تنوع ژنتیکی ۲۰ مرغ مازندرانی با استفاده از توالی یابی HVR-I ناحیه میتو کندریایی مورد بررسی و در نهایت ۶ هاپلو تیپ در ۱۰ جایگاه تک شکل شناسایی شد. نتایج فیلوژنی مشخص کرد که مرغان بومی مازندران با مرغ مردی ایران، بومی کشور آذربایجان، لگهورن سفید، پلیموت راک پرخطدار، مرغ ابریشمی، جنگلی، خاکستری (سونراتی) در یک دسته قرار دارند بنابراین آنها چنین نتیجه گرفتند که مرغ مازندرانی احتمالاً با این نژاد شباهت‌های ژنتیکی دارد (پیرانی و همکاران، ۱۳۸۸). در تحقیقی که توسط Yacoub و فتحی (۲۰۱۳) انجام گرفت، ۵۰۰ جفت باز از ناحیه D-loop میتو کندریایی مرغان بومی سودان توالی یابی شد و مشخص گردید که مرغان بومی و گونه گالوس گالوس یک جفت توالی تکراری با ۱۴ واحد باز در دو رونوشت دارند و ۲ هاپلو تیپ C و T در این مرغ‌ها پیدا شد. این نتایج نشان داد که نژادهای مرغان بومی به *Gallus gallus* و هم چنین *G. g. bankiva* و *g. spadice* ربط دارند. در تحقیقی دیگری که روی ۵۰۶ جفت باز از ناحیه D-loop میتو کندریایی ۵ گونه مرغ ایتالیایی صورت گرفت، ۱۸ جایگاه تک شکل در ۱۲ هاپلو تیپ شناسایی شد و نتایج نشان داد که ۹۰٪ هاپلو تیپ ها به

روش‌ها، استفاده از ژنوم میتو کندریایی^۱ است که به عنوان یک منبع مهم از اطلاعات ژنتیکی برای پی گیری جد نژادها تا صدها نسل قبل مطرح شده است (Cuc و همکاران، ۲۰۱۱). میتو کندری اندامکی سیتوپلاسمی است که در بیشتر سلول‌های بدن وجود دارد. این اندامک قادر به تولید انرژی برای سلول‌هاست و دارای DNA حلقوی اختصاصی و مستقل از DNA هسته‌ای است و در گونه‌های جانوری ۳۷ ژن را کد می‌کند و طول تقریبی آن در طیور ۱۶ هزار جفت باز است (Wallace، ۱۹۹۲). ژنوم میتو کندری دارای ناحیه‌ای به نام D-loop است که فاقد هرگونه ژن رمز کننده‌ای بوده و بنابراین وقوع هر نوع جهش در این منطقه برای نسل های متمادی باقی می ماند (Anderson و همکاران، ۱۹۸۱).

ژنوم میتو کندری توسط تخمک و لذا از مادر به فرزندان منتقل می شود. از این رو میتوان شجره مادری در هر گونه ای را بررسی و تعیین کرد (Hallerman، ۲۰۰۳). ناحیه D-loop به سه ناحیه کنترل^۲ کاملاً^۳ مشخص تقسیم می‌شود قطعه HVR-I در انتهای ۳' و قطعه HVR-III در انتهای ۵' و قطعه میانی HVR-II است نواحی I و III دارای بالاترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی در افراد مختلف هستند و بخاطر تکامل سریع، مطالعه این نواحی در بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط میان گونه‌ها بسیار ارزشمند است (Mannen و Sultana، ۲۰۰۴). اولین توالی کامل ژنوم میتو کندری مرغ به طول ۱۶۷۷۵ جفت باز و همچنین طول ژن‌های مختلف واقع بر آن و ناحیه D-loop به طول ۱۲۲۷ جفت باز با کد دسترسی X ۵۲۳۹۲ گزارش شده است (Desjardins و Morais، ۱۹۹۰). استفاده از نواحی کنترل میتو کندری در آنالیزهای مولکولی اولین بار با مطالعه ناحیه کنترل غیر کد کننده mtDNA پرندگان مختلف به روش RFLP صورت گرفت و زیر گونه مرغ جنگلی قرمز (گالوس گالوس) به عنوان جد مادری تمام نژادهای مرغ اهلی معرفی شد (Fumihito و همکاران، ۱۹۹۴). از آن زمان تاکنون مطالعات بر پایه توالی ژنوم میتو کندری سرعت یافته است. ناحیه D-loop میتو کندری ۲۰ نژاد مرغ بومی ژاپنی و همچنین لگهورن سفید، ردآیلند، مرغان بومی اندونزیایی

(ساخت شرکت MWG آلمان).

F (5'-GGCTTGAAAAGCCATTGTTG-3')

R (5'-CCCCAAAAGAGAAGGAACC-3')

با استفاده از مخلوط Taq شروع گرم^۴ (شرکت کبازن آلمان) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۶ پیکومول از هر آغازگر، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت. برنامه حرارتی شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه دمایی با دمای واسرشته ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت عمل واسرشته سازی صورت گرفت. جهت حصول اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر نمونه‌ها روی ژل اگارز (مرک آلمان) با غلظت ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند.

تعیین توالی

جهت افزایش دقت توالی، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در وکتور M13 که یک وکتور جهانی تعیین توالی است، کلون شده که سپس ناحیه کلون شده در هنگام تعیین توالی (ماکروژن آلمان) جهت جاگذاری نوکلئوتیدهای فلورسنس دار با پرایمرهای اختصاصی زیر تکثیر شد.

M13-F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3')

M13-R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')

پس از بررسی اولیه توالی‌های بدست آمده، چون تمامی تغییرات نوکلئوتیدی در فاصله ۱-۴۵۵ جفت باز قرارداداشتند بنابراین همین تعداد مبنای مقایسه توالی‌ها قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل توالی‌ها

ابتدا کلیه توالی‌های مربوط به مرغ لاری توسط نرم افزار Bioedit (Hall, ۱۹۹۹) در یک فایل ادغام و پس از همردیف^۶ کردن توالی‌ها، نوکلئوتیدهای جایگزین، حذف یا اضافه شده مشخص شد و در نتیجه تعداد هاپلوتیپ‌ها مشخص شد. فاصله درون هاپلوتیپی، تنوع هاپلوتیپی (هتروزیگوسیتی) و تنوع نوکلئوتیدی توسط نرم افزار Arlequin 3.5 (Excoffier و همکاران، ۲۰۰۵) محاسبه شد. سپس توالی‌های بدست آمده به همراه توالی

گروه E مربوط بودند که منشأ آنها شبه قاره هند می باشد (Lorenzo و Ceccobelli، ۲۰۱۳).

شکل عمومی بدن نژاد لاری با تمام نژادهای دیگر ایرانی متفاوت است و به طور کلی بدن بلند و کشیده، سینه پهن و عمیق و پر گوشت می‌باشد. سر کوچک و فرم سر به اصطلاح ماری شکل می‌باشد. گردن نسبتاً بلند، و رنگ پر اغلب در وارته‌های اصیل، زرد مایل به قهوه‌ای و در برخی انواع قهوه‌ای پر رنگ و حتی تیره می‌باشد. مرغان نژاد لاری از نظر کلی جزو نژادهای سنگین می‌باشند. وزن مرغان بالغ یکساله حدود ۳ تا ۴ کیلوگرم و وزن خروس‌ها در همین سن ۴ تا ۵ کیلوگرم و بیشتر می‌باشد. در خروس‌های مسن، وزن گاهی به ۶ تا ۶/۵ کیلوگرم و بیشتر هم می‌رسد. سن بلوغ جنسی و تخم گذاری اغلب در ۷ ماهگی بوده و تخم گذاری با تخم مرغ‌های ریز شروع می‌شود. تولید تخم مرغ سالیانه بین ۶۰ تا ۸۰ عدد با وزن متوسط هر تخم مرغ ۵۰ گرم می‌باشد (لطفی پور و رحیمیان، ۱۳۹۲). لذا هدف تحقیق در این پژوهش بررسی توالی ناحیه ژنوم میتوکندری نژاد لاری بود.

مواد و روش اجرا

محل آزمایش، نحوه جمع‌آوری نمونه‌های خون و استخراج DNA برای اجرای این پژوهش تعداد ۲۵ قطعه مرغ لاری و غیر خویشاوند و به تعداد تقریباً مساوی مرغ و خروس از چهار منطقه شهرستان لارستان فارس انتخاب و از آنها خون گرفته شد. استخراج DNA توسط روش (Bailes و همکاران، ۲۰۰۷) صورت گرفت. پس از آن کمیت DNA توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر و کیفیت آن توسط الکتروفورز و روی ژل ۰/۸ درصد تعیین شد.

انتخاب آغازگرها و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

در این پژوهش از دو آغازگر اختصاصی رفت و برگشت ۲۰ نوکلئوتیدی ناحیه ژنوم میتوکندری استفاده شد. آغازگر رفت در فاصله ۱۶۷۷۵-۱۶۷۵۶ بازی و آغاز برگشت هم در فاصله ۶۶۸-۶۴۹ بازی از ژنوم کامل میتوکندری (ناحیه HVR-I) مرغ اهلی با شماره دسترسی (X52392) متصل می‌شدند (Desjardins و Morais، ۱۹۹۰) که توالی این دو آغازگر به شرح زیر می‌باشد

HVR-I و حذف نقاط ناخوانا یک ناحیه به طول ۴۵۵ جفت باز که بیشترین تغییرت نوکلئوتیدی در آن ناحیه قرار داشتند مبنای مقایسه توالی های بدست آمده قرار گرفت. پس از مقایسه تعداد ۲۱ توالی حاصله، تعداد ۳ هاپلوتیپ از بین توالی های مورد بررسی تعیین شد که دارای ۵ جایگاه چندشکل (SNP) بودند (جدول ۱).

تمام جایگاههای چند شکل مشاهده شده در نتیجه تغییرات درون بازهای پورینی و پیریمیدینی به همدیگر حاصل شده بود. این تغییرات به طور عمده از شماره ۱۹۹ تا ۴۴۶ مشاهده شد. بیشترین فراوانی نسبی هاپلوئیدی مربوط به هاپلوتیپ اول بود که در حدود ۷۶/۲ درصد از موارد را شامل می شد (جدول ۱).

های حاصله از همین ناحیه از دو نژاد مازندرانی (پیرانی و همکاران، ۱۳۸۸) و مرندی (محمدی و همکاران، ۱۳۹۰) به کمک نرم افزار MEGA5 (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) توسط رویه NJ^۵ بر پایه ML^۷ همردیف شدند و درخت فیلوژنی مربوطه جهت تعیین نزدیکی هاپلوتیپ های این سه نژاد رسم شد. به همین روش توالی کلی (جامع) مرغ لاری با دیگر توالی های موجود در بانک جهانی ژن (NCBI، ۲۰۱۰) همردیف و درخت فیلوژنی مربوطه رسم شد. هاپلوتیپ های بدست آمده توسط برنامه Sequin در پایگاه اطلاعاتی (NCBI ۲۰۱۰) ثبت گردید.

نتایج و بحث

توالی یابی در ۲۱ نمونه به خوبی انجام گرفت و در مابقی نیز به دلیل کیفیت پایین توالی و یا هتروپلاسمی از مجموعه داده ها کنار گذاشته شدند. پس از همردیف کردن توالی های حاصله در منطقه

جدول ۱- هاپلوتیپ ها و موقعیت SNP های بدست آمده در نمونه های مرغ لاری به تفکیک جنسیت

شماره هاپلوتیپ	میزان فراوانی	موقعیت SNP بر حسب جفت باز						
		جمع فراوانی (درصد)	فراوانی در خروسها	فراوانی در مرغها	۱۹۹	۲۱۷	۲۸۱	۳۰۶
۱	۱۶ (۷۶/۲)	۸	۸	C	C	A	T	T
۲	۳ (۱۴/۳)	۳	۰	T	C	A	T	T
۳	۲ (۹/۵)	۰	۲	T	T	G	C	C

موجودات یوکاریوت ذکر شده است (Nei، ۱۹۸۷). مقدار تنوع هاپلوتیپی در جمعیت حاضر 0.4095 ± 0.1205 برآورد شد که این عدد در محدوده گزارش شده ($0.29-0.78$) برای لاین های گواشی تجاری است (Muchadeyi و همکاران، ۲۰۰۸). میزان تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوئیدی بدست آمده در مرغ لاری بیشتر از مقادیر بدست آمده در مرغان مازندرانی و مرندی بود (جدول ۲).

از آن جا که تعداد جایگاه چند شکل به تعداد نمونه وابسته می باشد لذا از پارامتر دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی استفاده شد که به طول DNA و اندازه نمونه بستگی ندارد و متوسط تفاوت نوکلئوتیدی بین دو توالی در هر جایگاه می باشد (Nei، ۱۹۸۷). تنوع نوکلئوتیدی در مرغ لاری 0.02433 ± 0.00185 تخمین زده شد که این مقدار در محدوده مقداری است ($0.002-0.019$) که برای

جدول ۲- مقایسه درصد نوکلئوتیدهای ناحیه کنترل HRV-I و تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هپلوئیدی مرغ لاری با سایر گزارشات

نژاد مرغ	تعداد نمونه	تعداد هاپلو تیپ	درصد نوکلئوتیدی				تعداد هاپلوئیدی \pm SD	تعداد نوکلئوتیدی \pm SD
			A	G	C	T		
مرغ اهلی	-	-	۲۶/۷	۱۳/۳	۲۶/۳	۳۳/۷	-	
مرغ لاری	۲۱	۳	۲۹/۲۲	۱۲/۹۹	۲۷/۶۵	۳۰/۱۵	۰/۰۰۲۴۳ \pm ۰/۰۰۱۸۵	
مرغ مازندرانی	۱۹	۶	۲۹/۲	۱۳/۱	۲۷/۶	۳۰/۲	۰/۰۰۵۱ \pm ۰/۰۰۳۲	
مرغ مرندی	۱۰	۵	۲۶/۴۱	۱۳/۴۳	۲۶/۷۱	۳۳/۴۳	۰/۰۱۱۵ \pm ۰/۰۰۶۸۹	

اطلاعات مربوط به مرغ اهلی (*Gallus gallus*) از (Desjardins و Morais, ۱۹۹۰)، مرغ مازندرانی از (پیرانی و همکاران، ۱۳۸۸) و مرغ مرندی از (محمدی و همکاران، ۱۳۹۰) اقتباس شده است.

دلایل این مشابهت را می توان به پراکندگی این نژاد در بیشتر مناطق کشور ایران بخاطر استفاده از ویژگیهای نمایشی و سرگرمی و احتمالاً اختلاط ژنتیکی آن با توده ها و سایر نژادهای مرغ بومی مرتبط دانست.

نتیجه گیری

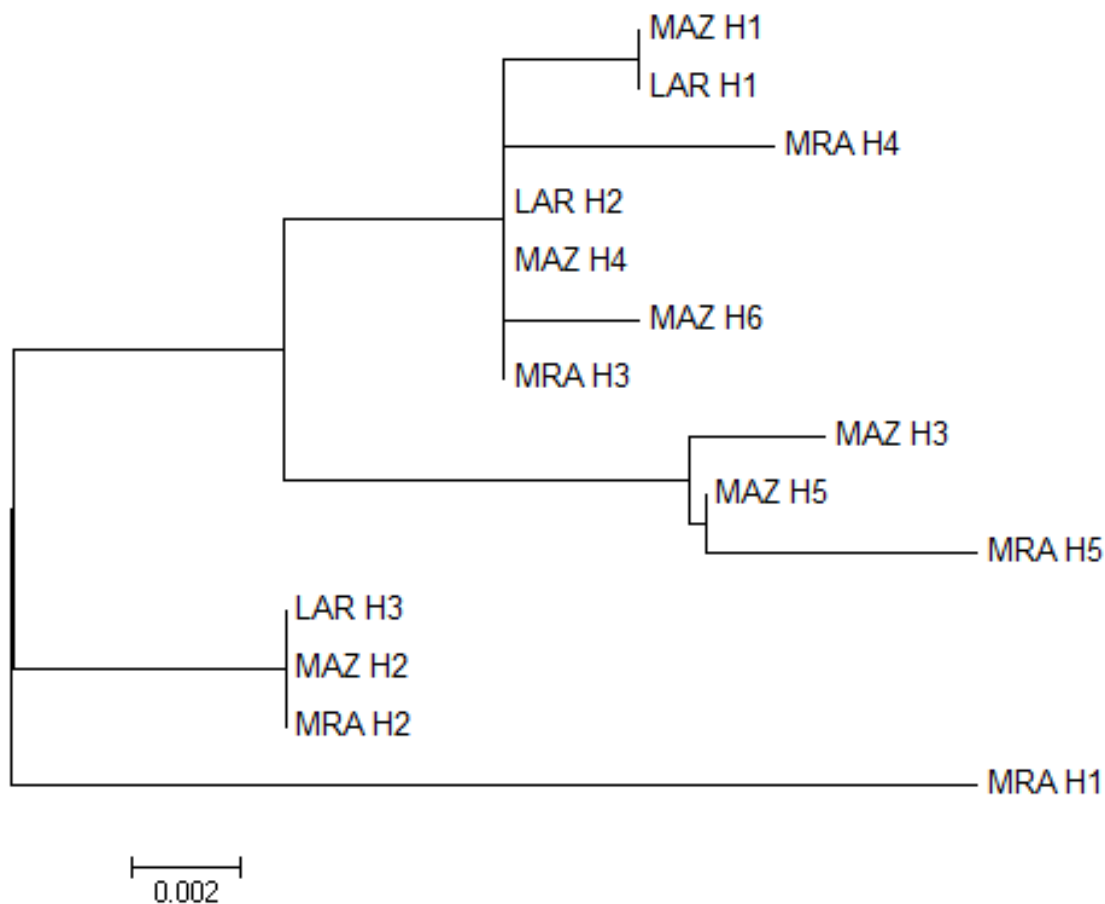
توالی ناحیه HVR-I در مرغ لاری با مرغ مازندرانی، مرغ مرندی ایران، لگهورن سفید، پلیموتراک پرخطدار، پلیموتراک سفید، نیوهمشایر و مرغ بومی آذربایجان نزدیکی بیشتری دارد که این نزدیکی ممکن است به علت تشابه ژنتیکی مرغ لاری ایران از طریق مشابهت اجدادی به این نژادها باشد. با توجه به نتایج حاصله می توان اظهار نمود که در جمعیت مرغ لاری تنوع ژنتیکی پائینی وجود دارد. از آنجایی که نژادهای پر تولید تجاری در بیشتر مناطق کشور یا جایگزین نژادهای بومی شده و یا با آنها اختلاط یافته اند لزوم توجه جدی به حفظ این ذخایر بارزش ژنتیکی بیش از پیش احساس می شود. چرا که پرورش این نژاد به دلیل سازگاری با شرایط بومی هر منطقه و همچنین به دلیل استفاده از باقیمانده سفره غذایی خانوارها و عدم نیاز به مواد خوراکی وارداتی به صرفه است. همچنین ثبت توالی نژادهای بومی می تواند در جهت شناسایی این نوع نژادها به متخصصان اصلاح نژاد کمک شایانی نماید. از طرفی به علت بالا بودن شدت انتخاب در گله

در نهایت هاپلو تیپ های بدست آمده با کد دسترسی KF957610 و KF957611 و KF957612 در بانک جهانی ژن ثبت گردید (NCBI، ۲۰۱۰) و سپس توالی کلی این نژاد با استفاده از هاپلو تیپ های بدست آمده تعیین شد. نمودار فیلوژنی توالی یخش HVR-I ناحیه D-loop مرغ لاری با دیگر توالی های مرغ مازندرانی و مرندی ثبت شده در بانک جهانی ژن رسم و مشخص شد که هاپلو تیپ شماره ۱ لاری با هاپلو تیپ شماره ۱ مازندرانی و هاپلو تیپ شماره ۲ لاری با هاپلو تیپ شماره ۳ و ۴ مرندی و هاپلو تیپ شماره ۴ و ۶ مازندرانی نزدیکی بیشتری دارد و همچنین هاپلو تیپ شماره ۳ لاری با هاپلو تیپ شماره ۲ مرندی و هاپلو تیپ شماره ۲ مازندرانی نیز نزدیکی بیشتری دارد و این نتایج نشان می دهد که هر سه هاپلو تیپ مورد مطالعه در نژاد لاری واجد شرایط ژنتیکی مشابه با دو گونه بومی ثبت شده در بانک ژن می باشند (شکل ۱).

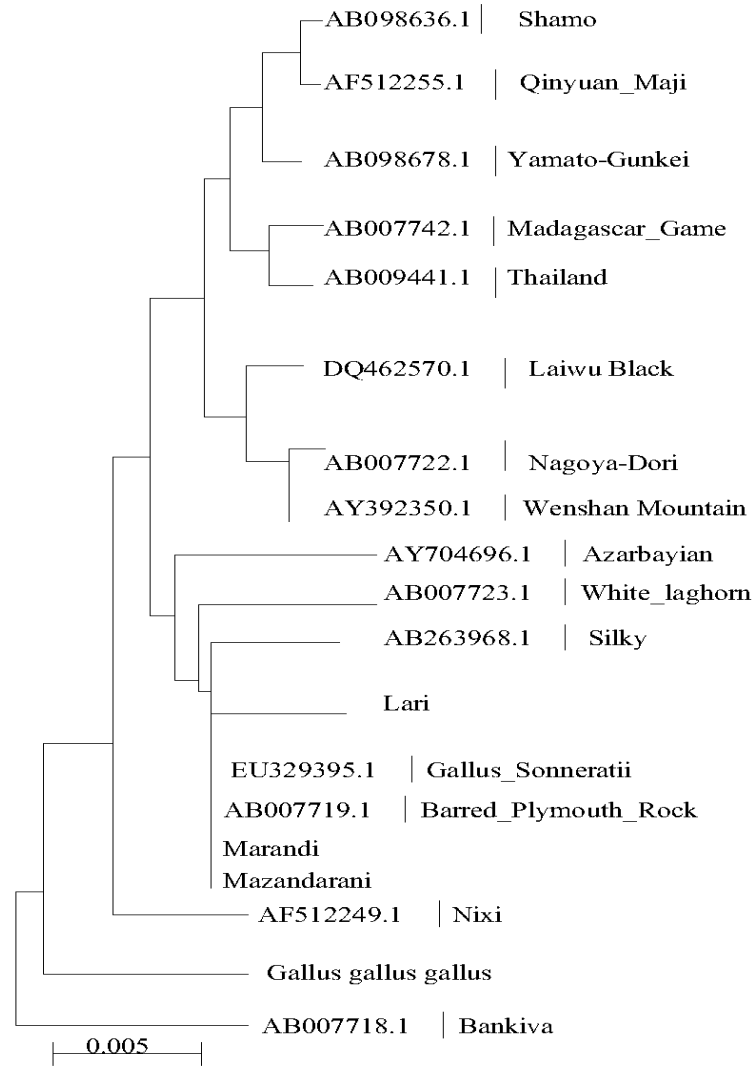
شکل ۲ نمودار فیلوژنی توالی بخش HVR-I ناحیه D-loop مرغ لاری با دیگر توالی های ثبت شده در بانک جهانی ژن را نشان می دهد و مشخص شد که توالی این ناحیه در مرغ لاری با مرغ بومی مرندی ایران، مرغ بومی مازندرانی ایران، مرغ بومی آذربایجان، پلیموت راک پر خطدار، لگهورن سفید، مرغ ابریشمی و مرغ جنگلی خاکستری (سونراتی) نزدیکی بیشتری دارد که یکی از

حاصله در این تحقیق مربوط به بخش کوچکی از ژنوم مرغ لاری می باشد بدیهی است با افزایش تعداد مکانهای ژنومی مورد مطالعه ممکن است نتایج به گونه دیگری بیان شوند.

های تجاری و خطر افزایش همخونی در آنها، مرغان بومی به عنوان یک ذخیره ژنتیکی با ارزش می تواند این نقیصه را پوشش دهد. از طرفی این نکته همواره باید در نظر گرفته شود که تمام نتایج



شکل ۱- نمودار فیلوژنی (نمودار درختی N-J) ترسیم شده با استفاده از توالی ۳ هاپلو تیپ مربوط به مرغ لاری (LAR)، ۵ هاپلو تیپ مربوط به مرغ مرنندی (MRA) و ۶ هاپلو تیپ مربوط به مرغ مازندرانی (MAZ)



شکل ۲- نمودار فیلوژنی (نمودار درختی NJ) توالی کلی مرغ لاری و برخی نژادهای مرغ موجود در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آنها

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات آقایان دکتر ترنجی پور و دکتر کیانی از شبکه های دامپزشکی لارستان و شیراز بخاطر همکاری در تهیه نمونه ها تشکر و قدردانی بعمل می آید.

پاورقی ها

- 1-Mitochondrial DNA (mtDNA)
- 2-Control Region (CR)
- 3-Hyper Variable Regions (HVR)
- 4-Hot Start Tag Master Mix
- 5-Neighbor-Joining (NJ)
- 6- Alighnment
- 7-Maximum Likelihood (ML)

منابع

- Animal Sciences*, 24:155-161.
- Ceccobelli, S. and Lorenzo, P.D. (2013). Phylogeny, genetic relationships and population structure of five Italian local chicken breeds. *Italian Journal of Animal Science*, 12:410-415.
- 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*, 212:595-634.
- Excoffier, L., Laval G and Schneider, S. (2005). Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics (Online)*, 1:47-50.
- Fumihito, A., Miyake, T., Sumi, S., Takada, M., Ohno, S. and Kondo, N. (1994). On subspecies of the red jungle fowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *National Academy of Sciences of the United States of American*, 91:12505-12509.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for windows 95/98 NT. *Nucleic acids symposium series* 4:95-98.
- Hallerman, E.M. (2003). Population Genetics: Principles and application for fisheries scientists. American Fisheries Society, Bethesda, USA.
- Muchadeyi, F.C., Edind, H., Woollny CBA., Groenereld, E. and Weigend, S (2008). Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village. *Animal Genetics*, 39:615-622.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. 1980. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2010 Apr 06]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- پیرانی، ن. محمد هاشمی، آ. علیجانی، ص. رضازاده گلی، ر. و قنبری، ص. (۱۳۸۸). تجزیه و تحلیل مولکولی جمعیتی از مرغ بومی مازندران با استفاده از توالی ناحیه HVR-I ژنوم میتوکندری. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی جلد. ۱ صفحه ۵۳ تا ۶۶.
- محمدی پسته بیگ، ف. پیرانی، ن. شجاع، ج. و محمد هاشمی آ. (۱۳۹۰). تعیین توالی بخش HVS-I ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری جمعیتی از مرغ بومی مرندی و ترسیم رابطه فیلوژنی آن با سایر مرغان اهلی. نشریه پژوهش های علوم دامی. جلد ۲۱ صفحه ۱ تا ۹.
- لطفی پور، م. ص. و رحیمیان، آ. (۱۳۹۲). مبانی پرورش نیمه صنعتی و شناخت مرغ و خروس لاری. چاپ اول، انتشارات کاج طلایی، صفحه ۱۴ تا ۴۲.
- Adebambo, A.O., Alabu, V., Mwacharo, J., Oladejo M., Adewale, M., Ilori, R., Makanjuola, L., Afolayan, B., Bjornstad, O., Jianlin, H. and Hanotte, O. (2009). Lack of phylogeographic structure in Nigerian village chickens revealed by Mitochondrial DNA D-loop sequence analysis. *Poultry Science*, 9:503-507.
- Anderson, S.A.T., Bankier, G., Barrell, M., Bruijn, A., Couson, J., Drouin, I., Nierlich, B., Roe, F. and Sanger, P.H. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457-465.
- Bailes, S.M., Devers, J.J., Kirby, J.D. and Rhoads, D.D. (2007). An expensive, simple protocol for DNA isolation from blood from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. *Poultry Science*, 86:102-106.
- Cuc, N.T.K., Simianer H., Groeneveld, L.F. and Weigend, S. (2011). Multiple maternal lineages of Vietnamese local chickens inferred by mitochondrial DNA D-loop sequences. *Asian-Australian Journal of*

- mitochondrial DNA control region inferred from the sequences of Pakistani goats. *Animal Science*, 75:303-309.
- Tamura, K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):2731-2739.
- Wallace, D.C. (1992). Mitochondrial genetics a paradigm for aging and degenerative diseases. *Science*, 256:628-632.
- Yacoub, H.A. and Fathi, M.M. (2013). Phylogenetic analysis using D-loop marker of mtDNA of Saudi native chicken strains. *Animal Science Journal*, 44:5-6.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia university press, New York.
- Oka, T.Y., Nomura, K., Kawashima, S., Kuwayama, T., Hanada, H., Amano, T., Takadam, M., Takahata, N., Hayashi, Y. and Akishinonomiya, F. (2007). Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Animal Genetics*, 38:287-293.
- Silva, P., Guan, X., Ho-Shing, O., Jones, J., Xu, J., Hui, D., Notter, D. and 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.
- Sultana, S. and Mannen, H. (2004). Polymorphism and evolutionary profile of

♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦ ♦