



ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی مرغان بومی ایران بر مبنای توالی ناحیه D-loop از DNA میتوکندریایی

کسری احمدیان^۱، قدرت رحیمی میانجی^۲، هادی سیاح زاده^۳ و حمید دلدار^۴

۱- مدرس مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، (نویسنده مسوول: kahmadian52@gmail.com)

۲، ۳ و ۴- استاد، دانشیار و استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۵

چکیده

در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنی مرغان بومی ایران، ۳۹ نمونه خون از مرغان بومی مراکز اصلاح نژاد مرغ بومی کشور (اصفهان، مازندران، یزد، فارس، آذربایجان غربی و خراسان) جمع‌آوری گردید. به منظور مقایسه نتایج حاصل با دیگر نژادهای آسیایی، آفریقایی و اروپایی توالی ناحیه D-loop میتوکندری موجود در بانک جهانی ژن دریافت شد. DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته استخراج و به عنوان الگو برای تکثیر و تعیین توالی ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری به کار برده شدند. با مطالعه توالی ۲- ۱۲۳۱ جفت بازی ناحیه D-Loop در نمونه‌های فوق، ۱۶ هاپلوتایپ به همراه ۱۴ جایگاه متغیر تشخیص داده شد. آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از روش کیمورا انجام گرفت. مقادیر شاخص تثبیت با استفاده از روش کیمورا در دامنه‌ای بین ۰/۱۵۷۰- ۰/۳۷۷۶۳ قرار گرفت. میزان واریانس در داخل و بین جمعیت‌های مورد مطالعه به ترتیب برابر با ۸۱/۰۵ و ۱۸/۹۵ درصد برآورد شد. این آزمون نشان داد که در جمعیت‌های مورد مطالعه، جمعیت‌های آذربایجان غربی و اصفهان، اصفهان و فارس، اصفهان و خراسان، اصفهان و مازندران، اصفهان و یزد، فارس و خراسان و همچنین فارس و یزد با یکدیگر از نظر ژنتیکی متفاوت بودند ($P < ۰/۰۵$). از بین جمعیت‌های مورد مطالعه جمعیت اصفهان با تمامی جمعیت‌های دیگر از نظر ژنتیکی تفاوت معنی‌دار داشته است ($P < ۰/۰۵$). به طور کلی نتایج بدست آمده نشان داد که مرغ بومی ایران دارای تنوع ژنتیکی قابل قبول بوده و درخت فیلوژنی ترسیم شده بر مبنای هاپلوتایپ‌های حاصله مرغان بومی ایران در دسته هاپلو گروه A (مرغان بومی ژاپن، لکهورن سفید، ردآبلندرد)، هاپلوگروه E (مرغان بومی خاورمیانه و اروپا) و هاپلوگروه C (مرغان بومی آفریقا) قرار گرفتند. همچنین نتایج فیلوژنی مشخص کرد که مرغ بومی ایران همانند مرغ بومی ژاپن، چین، خاورمیانه، اروپا و آفریقا از آسیای جنوب شرقی و هندوستان منشأ گرفته و احتمالاً از طریق مسیرهای باستانی، از آسیای جنوب شرقی و هندوستان به ایران و از ایران به سمت غرب امتداد یافته و به دنیای غرب معرفی شده است.

واژه‌های کلیدی: مرغ بومی ایران، DNA میتوکندری، فیلوژنی، تنوع ژنتیکی

مقدمه

جمعیت‌ها و اطلاعات مرتبط با آنها نژادها را مطابق با شرایط اضطراب به چهار دسته شامل: ۱) منقرض شده^۱ ۲) در شرایط بحرانی^۳ ۳) در معرض خطر^۴ ۴) دور از خطر و امن^۵ تقسیم‌بندی نمودند (۲۵،۵).

تنوع ژنتیکی برای تمام موجودات زنده که در کره زمین زندگی می‌کنند از اهمیت بالایی برخوردار است. به طور کلی میزان تنوع ژنتیکی استراتژی گزینش را تعیین می‌کند. اگر گوناگونی ژنتیکی از میان برود، تفاوت‌های ناشی از عملکردهای محیطی به نسل بعدی انتقال نمی‌یابد. از این رو یک متخصص اصلاح نژاد برای دست یابی به عملکرد تجاری شایسته و باقی ماندن در میدان رقابت باید به حفظ تنوع ژنی، توجه فراوانی داشته باشد و بر این اساس کارهای اصلاحی خود را برنامه‌ریزی کند. سازگاری بهتر یک جمعیت نسبت به تغییرات شرایط محیطی، سبب بزرگتر شدن خزانه ژنی این جمعیت‌ها خواهد شد. در نتیجه، انتخاب طولانی مدت و هدفدار مخصوصاً درون جمعیت کوچک، ممکن است خزانه ژنی کاهش قابل توجهی یابد و این امر سبب کاهش سازگاری شود (۲۰). یکی از راه‌های تعیین تفاوت بین جمعیت‌ها، برآورد فاصله ژنتیکی آنها بر مبنای نشانگرهای ژنتیکی است که مهم‌ترین آنها شامل نشان‌گرهای AFLP^۶، SNP^۷ و بررسی

وجود بیش از یک صد توده ژنتیکی دام و طیور بومی در ایران که با شرایط جغرافیایی خود به خوبی سازگار شده و نسبت به بیماری‌های منطقه‌ای مقاومت نسبی پیدا نموده‌اند، از سرمایه‌های مهم و ملی کشور به شمار می‌آیند (۲۲). انتخاب برای صفات خاص و پیشرفت‌های حاصله در حوزه بیوتکنولوژی^۸ تولیدمثل به طور وسیعی نژادهای صنعتی را جایگزین نژادهای بومی که دارای راندمان تولید پایین‌تری هستند نموده و تعداد زیادی از نژادهای بومی را در معرض خطر انقراض قرار داده است. نگرانی از کاهش تنوع ژنتیکی زمینه‌ای را برای پذیرفتن تعهداتی در دهه ۱۹۶۰ به دنبال داشته است مبنی بر این که نژادهایی که در حال انقراض هستند باید حفظ شوند (۱۷). در سال ۱۹۹۵ اعضای سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO)^۹ تصمیم گرفتند تا بانک اطلاعات جهانی^۴ برای منابع ژنتیکی حیوانات مزرعه‌ای و سیستم تنوع ژنتیکی برای حیوانات اهلی^۵ را ایجاد نمایند. اطلاعات این بانک جهانی به منظور ایجاد فهرست گسترده‌ای قابل دستیابی از منابع ژنتیکی بوده و به عنوان لیست محافظت جهانی از تنوع حیوانات اهلی^۵ شناخته شده است (۱۹). در این بانک جهانی، بر اساس شناخت از

1- Biotechnology

2- Genetic diversity

3- Food and Agriculture Organization

4- Global Data Bank

5- Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS)

6- World Watch List for Domestic Animal Diversity (WWL-DAD)

7- Extinct

8- Critical

9- Endangered

10- Not at Risk

11- Amplified Fragment Length

12- Singel Nucleotide Polymorphism

شامل مرغان بومی زیمباوه سودان و شمال غرب اروپا است که شبیه با هاپلوگروه A اکا و همکاران (۱۶) بوده است که از آسیای جنوب شرقی منشا گرفته که احتمالاً ابتدا در شبه جزیره هند تکثیر و سپس به دیگر نقاط پراکنده شدند (۱۴). ویژگی‌های مولکولی جمعیت‌های مختلف ممکن است نقش اصلی را در برآورد تنوع، توصیف و ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت ایفا نمایند. همچنین می‌تواند در مدیریت ژنتیکی جمعیت‌های کوچک به منظور محدود نمودن اثرات بیش از اندازه همخونی، مفید واقع شود. آگاهی از تنوع ژنتیکی و فاصله بین جمعیت‌های مختلف برای برنامه‌های محافظتی برای نژادهای در معرض خطر ضروری است. در پژوهش حاضر با استفاده از ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری، شش جمعیت مختلف مرغ بومی ایران و دیگر جمعیت‌های مناطق مختلف جهان، از نظر تنوع و ساختار ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیکی آنها مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و استخراج توالی از بانک ژن

از هر یک از جمعیت‌های مرغ بومی موجود در ۶ ایستگاه تحقیقاتی اصلاح نژاد مرغ بومی کشور (اصفهان ۸ نمونه، یزد ۶ نمونه، آذربایجان غربی ۶ نمونه، خراسان ۶ نمونه، مازندران ۷ نمونه، فارس ۶ نمونه) در مجموع تعداد ۳۹ نمونه به صورت تصادفی انتخاب و نمونه خون تهیه شد. DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته (۱۳)^۱ از نمونه خون‌های جمع‌آوری شده استخراج شد و برای تکثیر ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری مورد استفاده قرار گرفت. برای مقایسه توالی‌های به دست آمده (شماره دسترسی kj399461-kj399476) با جمعیت‌های مرغ اهلی موجود در نواحی دیگر نقاط کره زمین، از سه هاپلوگروه^۲ مربوط به مرغ بومی آفریقا و شمال غرب اروپا موجادی و همکاران (۱۴)، هفت هاپلوگروه شامل جمعیت‌های مرغ بومی ژاپن و چند نژاد تجاری اوکا و همکاران (۱۶) و نه هاپلوگروه شامل مرغ اهلی چین و یوراسیا خاورمیانه، هند، اندونزی و مالزی لیو و همکاران (۱۲) بود از بانک اطلاعات ژن^۳ دریافت و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

ژنوم میتوکندریایی^۱ است. چندشکلی^۲ DNA میتوکندریایی به طور وسیعی در فیلوژنتیک و ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود. از مشخصه‌های مهم DNA میتوکندریایی هاپلوئید بودن، داشتن توارث مادری، دارا بودن نرخ جهش بالا در مقایسه با DNA هسته‌ای و همچنین فقدان نوترکیبی است (۲۴،۲). این مشخصه‌ها آن را به یک نشان‌گر ایده‌آل برای ارزیابی ارتباطات بین گونه‌ای و درون گونه‌ای ساخته است. ناحیه D-Loop از mtDNA^۳ برای شناسایی اجداد وحشی حیوانات اهلی، تنوع ژنتیکی و فرایند اهلی شدن دام‌ها استفاده می‌شود (۱). هاگ و همکاران (۸) با استفاده از توالی ناحیه D-Loop، DNA میتوکندریایی به همراه ژن کمپلکس بافت سازگار اصلی (MHC)، تنوع ژنتیکی را در مرغ بومی کره ارزیابی کردند. ناحیه D-Loop از mtDNA همچنین برای برآورد خویشاوندی ژنتیکی بین جمعیت‌های آسیایی (۱۷ جمعیت)، جنوب شرقی اروپا (۲۰ جمعیت) و شمال مرکزی اروپا (۲۵ جمعیت) با تجزیه و تحلیل روی ۶۴۰ پرنده مورد استفاده قرار گرفته است. ارزیابی چندشکلی mtDNA در جمعیت‌های مرغ مطالعه شده، نشان داد که بیشترین جمعیت‌های اروپایی متعلق به یک گروه از mtDNA هستند که ممکن است از هندوستان منشاء گرفته باشند (۲۵). ارزیابی توالی‌های ناحیه کنترل mtDNA نشان داد که نژادهای مرغ بومی دارای سطوح مختلفی از تنوع ژنتیکی هستند. در جمعیت مرغان زیمباوه و هندوستان مقدار تنوع ژنتیکی، متوسط (۱۸،۱۴) اما در جمعیت مرغان ژاپنی، چینی و چندین نژاد مرغ بومی آفریقا مقدار تنوع پایین گزارش شده است (۱۶،۱۵،۱۴). در مطالعه‌ای توالی ناحیه D-loop میتوکندری به طول ۱۳۳۱-۲ جفت‌باز در ۲۰ نژاد مرغ بومی ژاپنی و همچنین لگهورن سفید ردآیلند رد و مرغ‌های بومی اندونزیایی روابط فیلوژنتیک و منشا آنها مورد بررسی قرار گرفت که ۴۲ هاپلو تایپ و هفت هاپلو گروه (A-) تشخیص داده شد (۱۶). موجادی و همکاران (۱۴) روی ۲۸۳ قطعه مرغ بومی از ۱۴ جمعیت و از ۵ ناحیه زیمباوه به منظور شناسایی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت و مقایسه آنها با جمعیت‌هایی از دیگر مناطق جغرافیایی (مالاوی، آلمان) و دیگر سویه‌ها (طیور گوشتی، طیور تخم‌گذار) تحقیقی انجام دادند. همه پنج نژاد بومی زیمباوه در هاپلوگروه A و C قرار گرفتند. هاپلوگروه C

1- Mitochondrial DNA

5- Mitochondrial DNA

8- Haplogroup

2- Polymorphism

5- Major Histocompatibility Complex

9- National Center for Biotechnology Information (NCBI)

3- Phylogenetic

4- Haploid

7- Modified Salting out

جدول ۱- نام هاپلوتایپ حاصل از ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری و شماره دسترسی آنها در پایگاه NCBI

Table 1. The haplotype names resulted from D-loop of mtDNA and their accession numbers at NCBI

منبع	شماره دسترسی	هاپلوتایپ
مطالعه حاضر	KJ399461-76	H1-H16
۱۶	AB268506	OkaA1
۱۶	AB268507	Oka A2
۱۶	AB268508	OkaA3
۱۶	AB268509	OkaA4
۱۶	AB268510	OkaA5
۱۶	AB268511	OkaA6
۱۶	AB268512	OkaA7
۱۶	AB268513	OkaA8
۱۶	AB268514	OkaA9
۱۶	AB268515	OkaA10
۱۶	AB268516	Oka B1
۱۶	AB268522	OkaC1
۱۶	AB268530	OkaD1
۱۶	AB268539	OkaE1
۱۶	AB268543	OkaF1
۱۶	AB268545	Okag1
۱۲	AB114069	LiuA1
۱۲	AB007744	LiuB1
۱۲	AB114070	LiuC1
۱۲	AY588636	LiuD1
۱۲	AB114076	LiuE1
۱۲	AF512285	LiuF1
۱۲	AF512288	LiuG1
۱۲	D82904	LiuH1
۱۲	AB009434	LiuI1
۱۴	AM746024	MuchadeyiA1
۱۴	AM746033	MuchadeyiB1
۱۴	AM746036	MuchadeyiB4
۱۴	AM746042	MuchadeyiC3

انتخاب آغازگر، انجام واکنش PCR و خالص سازی محصولات PCR

جهت تکثیر یک قطعه ۲-۱۲۳۱ جفت بازی ناحیه D-Loop از ژنوم میتوکندری از یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی رفت' 5'-AGGACTACGGCTTGAAGAGC-3' و برگشت' 5'-CATCTTGGCATCTTCAGTGCC-3' استفاده شد (۱۶). واکنش زنجیره ای پلی مرار در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ترکیبات ۱۷/۱ میکرولیتر آب استریل دوبار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر پی سی آر ۱/۲x10، ۱۰ میکرولیتر ۵۰Mgcl2 میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، هر یک از آغازگرها ۱۰ پیکومول، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مرار ۵۰۰ واحد، DNA ۵۰ نانوگرم انجام گرفت. پروتکل حرارتی شامل ۳ دقیقه واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ سیکل شامل واسرشت سازی در ۹۵ درجه برای ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۲ به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. بعد از تکثیر تمامی محصولات PCR به دست آمده با استفاده از کیت QIAGEN مطابق دستورالعمل شرکت سازنده محصولات پی سی آر خالص سازی شدند. سپس، تمامی

نمونه ها به شرکت فزاپژوه و از طریق این شرکت برای تعیین توالی به کشور کره (کمپانی بایونیر) ارسال شدند.

بررسی تنوع موجود در توالی های به دست آمده

با استفاده از نرم افزار BioEdit (۶) تمامی توالی های بدست آمده در مطالعه حاضر ویرایش شده و قطعاتی به طول ۱۲۳۱ تا ۱۲۳۲ جفت باز به دست آمد. توالی ها با استفاده از نرم افزار CLUSTULW (۲۳) توسط توالی مرجع مرتب شده و جایگاه های حذف و اضافه و انواع جهش های به وقوع پیوسته شناسایی شدند. مقادیر تنوع هاپلوتایپ (h) و نوکلئوتید () با استفاده از نرم افزار DNAsp5.10 (۱۱) محاسبه شد.

ترسیم درخت فیلوژنی

جهت ترسیم درخت فیلوژنی و بررسی ارتباط هاپلوتایپ های به دست آمده در این مطالعه با هفت هاپلوتایپ اصلی (A-G) اوکا و همکاران (۱۶)، نه هاپلوتایپ (A-I) لیو و همکاران (۱۲) و سه هاپلوتایپ موجدی و همکاران (۱۴) (جدول ۱) از نرم افزار MEGA4 (۲۱) به روش Neighbour-joining با ۱۰۰۰ بار نمونه گیری مجدد برای هاپلوتایپ های مطالعه حاضر و توالی های به دست آمده از بانک ژن استفاده شد.

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها

به منظور ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه و مقایسه آنها با یکدیگر، جدول تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و همچنین مقادیر شاخص تثبیت^۲ با استفاده از رابطه (۱) توسط نرم‌افزار ARLEQUIN 3.1 (۵) و به روش کیمورا^۳ (۱۰) مورد برآورد قرار گرفت. کاهش در سطح هتروزیگوتی جمعیت‌ها و زیر جمعیت‌ها معمولاً توسط شاخصی به نام آماره‌ی F رایت^۴ که به شاخص تثبیت نیز مشهور است، اندازه‌گیری می‌شود. آماره F شاخص اندازه‌گیری تفاوت بین میانگین سطح هتروزیگوتی جمعیت‌ها و یا زیر جمعیت‌ها با سطح هتروزیگوتی جمعیت پایه با تلاقی تصادفی است (۷).

$$\text{FST} = \Phi_{ST} = \frac{\delta_a^2}{\delta_T^2} \quad \text{رابطه (۱)}$$

در رابطه فوق δ_a^2 واریانس بین جمعیت‌ها و δ_T^2 واریانس کل می‌باشد که از جدول آنالیز واریانس مولکولی بدست می‌آیند.

نتایج و بحث

مقایسه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه

جدول واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که بیشترین مقدار واریانس برآورد شده به واریانس درون جمعیت‌های مورد مطالعه (۸۱/۰۵) تعلق دارد (جدول ۲). آنالیز نتایج نشان داد که واریانس بین جمعیت‌های مورد بررسی

دارای تفات معنی‌دار بوده است ($ST = ۰/۱۸۹۵۲$ و $P = ۰/۰۰۰$). با توجه به معنی‌دار بودن این تفاوت، مقادیر شاخص تثبیت (ST) بین جفت جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از روش کیمورا (۱۰) برآورد شدند (جدول ۳). مقادیر ST با استفاده از این روش در دامنه‌ای بین $-۰/۰۱۵۷۰$ (بین جمعیت یزد و مازندران) تا $۰/۳۷۷۶۳$ (بین جمعیت فارس و اصفهان) به دست آمد. مقادیر ST با سطوح معنی‌دار مختلف نشان داد که در جمعیت‌های مورد مطالعه، جمعیت‌های آذربایجان غربی و اصفهان، اصفهان و فارس، اصفهان و خراسان، اصفهان و مازندران، اصفهان و یزد، فارس و خراسان و همچنین فارس و یزد با یکدیگر از نظر ژنتیکی متفاوت بوده و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < ۰/۰۵$). از بین جمعیت‌های مورد مطالعه جمعیت اصفهان با تمامی جمعیت‌های دیگر از نظر ژنتیکی تفاوت معنی‌دار داشته است ($P < ۰/۰۵$). نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج پژوهش انجام شده توسط شهبازی و همکاران (۲۰) که تنوع ژنتیکی در پنج جمعیت مرغ بومی مراکز اصلاح نژاد (یزد، مازندران، اصفهان، فارس، آذربایجان غربی) را با استفاده از ۵ نشانگر ریزماهواره برآورد کردند مطابقت داشته است. به طوری که این محققین نیز از نظر ژنتیکی تفاوت معنی‌داری را برای جمعیت اصفهان نسبت به چهار جمعیت دیگر (مازندران، یزد، آذربایجان غربی و فارس) گزارش کردند. در این مطالعه، آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از روش Kimura-2 parameter اختلاف معنی‌داری را بین جمعیت‌ها مشخص نمود (جدول ۲).

جدول ۲- برآورد واریانس ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) به روش کیمورا
Table 2. Estimation of genetic variance for within and between studied population using analysis of molecular variance (AMOVA) based on Kimura methode

منبع واریانس	آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) جمعیت‌ها
درون جمعیت‌ها	بین جمعیت‌ها
۳۳	۵
۸۱/۰۵	۱۸/۹۵
درصد آزادی	
درصد واریانس	

که از این جمعیت‌ها باقی مانده باشند باید با دقت هرچه بیشتر و دقیق‌تر دائماً مورد ارزیابی ژنتیکی جمعیتی قرار گرفته تا حتی‌الامکان تنوع ژنتیکی موجود در این جمعیت‌ها در حد قابل قبولی حفظ شود.

پایین بودن تعداد جمعیت اولیه و نیز به کارگیری استراتژی یکسان انتخاب در این ایستگاه‌ها احتمالاً موجب افزایش تشابه ژنتیکی درون جمعیتی شده است. بنابراین در صورتی که جمعیت‌های موجود در این ایستگاه‌ها تنها نمونه‌هایی باشند

جدول ۳- برآورد مقادیر شاخص تثبیت (ST) در جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از روش کیمورا
Table 3. Estimation of fixation index values in studied population based on kimura method

جمعیت	آذربایجان غربی	اصفهان	فارس	خراسان	مازندران
اصفهان	$-۰/۲۱۹۷۸^a$				
فارس	$-۰/۳۰۰۹۰$	$۰/۳۷۷۶۳^b$			
خراسان	$-۰/۰۹۰۷۴$	$۰/۲۴۰۱۳^c$	$-۰/۲۵۹۱۰^f$		
مازندران	$-۰/۰۰۹۰۳$	$۰/۱۷۵۲۸^d$	$-۰/۲۳۱۶۱$	$-۰/۰۱۴۵۲$	
یزد	$-۰/۰۰۰۲۴$	$۰/۲۴۵۲۶^e$	$-۰/۱۳۴۵۹$	$-۰/۰۱۵۷۰$	

$= P\text{-value}^a$ $-۰/۰۴۱۹۹$ $= P\text{-value}^b$ $-۰/۰۰۱۹۵$ $= P\text{-value}^c$ $-۰/۰۱۲۷۰$ $= P\text{-value}^d$ $-۰/۰۲۸۰۹$ $= P\text{-value}^e$ $-۰/۰۴۱۹۹$ $= P\text{-value}^f$ $-۰/۰۴۱۰۲$ $= P\text{-value}^g$ $-۰/۰۴۰۰۴$

1- Analysis of Molecular Variance (AMOVA)
3- Kimura-2-parameter

2- Fixation index (FST or ST)
4- Wright's F statistics

تنوع موجود در توالی‌ها

با بررسی قطعه ۲-۱۲۳۱ جفت بازی (شماره دسترسی kj399461-76) در ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری مرغ‌های بومی ایران ۱۴ جایگاه نوکلئوتیدی متغیر و ۱۶ هاپلوتایپ به دست آمد. از بین ۱۴ جایگاه متغیر در ۱۳ جایگاه، جانشینی^۱ با فراوانی ۰/۸ رخ داده بود (جدول ۵). هاپلوتایپ ۳ با بیشترین فراوانی به میزان ۳۰/۷ درصد برآورد شد که شامل جمعیت‌های فارس، اصفهان، یزد، آذربایجان و خراسان می‌باشد. دومین هاپلوتایپ، هاپلوتایپ ۱ با فراوانی ۲۵/۶ درصد شامل تمام جمعیت‌ها بوده است. هاپلوتایپ‌ها و جمعیت مربوط به آنها در جدول ۶ نشان داده شد.

مقادیر تنوع هاپلوتیپی دارای دامنه ای بین ۰/۳۳۳±۰/۲۱۵ در مرغان بومی یزد تا ۰/۷۱۴±۰/۱۸۱ در مرغان بومی مازندران بود. مقادیر تنوع نوکلئوتیدی دارای دامنه‌ای بین ۰/۰۰۰۲۷±۰/۰۰۰۳۶ در مرغان بومی یزد تا ۰/۰۰۱۸۴±۰/۰۰۰۸ در مرغان بومی خراسان بوده است.

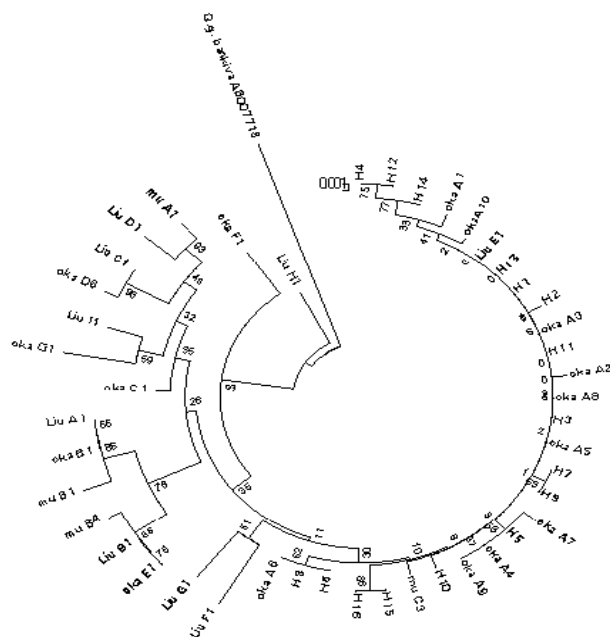
آنالیزهای فیلوژنی

درخت فیلوژنی جهت نشان دادن ارتباط میان هاپلوتایپ‌های بدست آمده مرغ بومی ایران با هاپلوتایپ‌های به دست آمده از بانک اطلاعات ژنوم ترسیم شد (شکل ۱).

جدول ۴- تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت‌های مختلف مرغ بومی ایران

Table 4. Haplotype diversity and nucleotide diversity using mitochondrial D-loop sequence for Iranian native chicken populations

جمعیت	منطقه جغرافیایی	تنوع هاپلوتیپی	تنوع نوکلئوتیدی
اصفهان	اصفهان، کهگیلویه و بویراحمد	۰/۷۱۴±۰/۱۲۳	۰/۰۰۰۸۱±۰/۰۰۰۴۴
یزد	یزد	۰/۳۳۳±۰/۲۱۵	۰/۰۰۰۲۷±۰/۰۰۰۳۶
آذربایجان غربی	آذربایجان غربی، شرقی	۰/۶±۰/۲۱۵	۰/۰۰۰۵۴±۰/۰۰۰۰۵
خراسان	خراسان رضوی، شمالی، جنوبی	۰/۶±۰/۱۲۵	۰/۰۰۱۸۴±۰/۰۰۰۰۸
مازندران	مازندران، گلستان، سمنان	۰/۷۱۴±۰/۱۸۱	۰/۰۰۱۱۶±۰/۰۰۰۷۴
فارس	فارس	۰/۶±۰/۱۲۹	۰/۰۰۰۹۷±۰/۰۰۰۰۵



شکل ۱- درخت فیلوژنی ترسیم شده با روش Neighbor-joining ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری از هاپلوتایپ‌های به دست آمده در

این مطالعه و توالی‌های لیو و همکاران (۱۲)، اوکا و همکاران (۱۶) و موچادی و همکاران (۱۴)

Figure 1. Neighbor-joining (NJ) tree constructed from mtDNA haplotype sequences obtained in this study and Liu et al. (12) , Oka et al. (16) and Mvchady et al. (14)

جدول ۵- جایگاه‌های متغیر شناسایی شده در توالی D-loop (۱۲۳۱bp) ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی ایران در مقایسه با توالی موجود در NCBI با شماره دسترسی AP003317

Table 5. The identified variable site in mitochondrial D-loop sequence (1231-2 bp) of Iranian native population compared with NCBI sequence with AP003317 accession number

Variable nucleotide position																
شماره شناسایی بانک ژن	هایپوتایپ ها	۱۹۹	۲۲۲	۲۴۶	۲۴۹	۲۵۴	۲۶۱	۲۶۰	۲۶۲	۲۵۵	۲۶۱	۴۱۷	۴۱۶	۸۵۹	۹۴۵	فراوانی نسبی
AP003317		T	A	C	A	T	T	T	C	T	C	C	G	-	G	n
	H1	C	.	۱۰
	H2	T	۱
	H3	۱۲
	H4	.	G	C	.	C	۱
	H5	C	۱
	H6	.	.	T	۳
	H7	C	۱
	H8	.	.	T	C	.	۱
	H9	C	C	.	۱
	H10	C	۱
	H11	A	C	.	۱
	H12	.	G	.	G	.	.	C	.	C	.	.	A	.	.	۱
	H13	A	۱
	H14	.	G	.	G	C	.	.	.	C	.	۱
	H15	T	T	.	.	.	۲
	H16	T	T	.	C	.	۱

شامل مرغ بومی ژاپن (Gifu-Jidori,Shokoku) و نژادهای وابسته به آنها، لگهورن سفید و ردآیلندرد می‌باشند. اوکا و همکاران (۱۶) اشاره کردند که این هایپلوگروه ابتدا در آسیای جنوب شرقی و شبه قاره هند اهلی شدند و سپس از طریق چین به ژاپن و اروپا پراکنده شدند.

هر یک از هایپوتایپ‌های به دست آمده با هفت هایپلوگروه (A-G) اوکا و همکاران (۱۶) و سه هایپلوگروه (A-C) موچادی و همکاران (۱۴) و ۹ هایپلوگروه (A-H)، لیو و همکاران (۱۲) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تمام ۱۶ هایپوتایپ به دست آمده برای مرغان بومی ایران در دسته هایپلوگروه A اوکا و همکاران (۱۶) قرار گرفتند. این هایپلوگروه

جدول ۶- انواع هایپوتایپ‌های مشاهده شده در جمعیت‌های مورد مطالعه به همراه شماره دسترسی آنها در پایگاه NCBI
Table 6. Type of Haplotype observed in the studied population with accession numbers at NCBI

هایپوتایپ	جمعیت (تعداد نمونه)	شماره دسترسی بانک جهانی ژن
H1	فارس (۱) - اصفهان (۱) - مازندران (۴) - خراسان (۲) - آذربایجان غربی (۲)	kj399461
H2	آذربایجان غربی (۱)	kj399462
H3	فارس (۲) - اصفهان (۱) - یزد (۵) - خراسان (۲) - آذربایجان غربی (۲)	kj399463
H4	خراسان (۱)	kj399464
H5	مازندران (۱)	kj399465
H6	اصفهان (۳)	kj399466
H7	اصفهان (۱)	kj399467
H8	اصفهان (۱)	kj399468
H9	اصفهان (۱)	kj399469
H10	یزد (۱)	kj399470
H11	آذربایجان غربی (۱)	kj399471
H12	خراسان (۱)	kj399472
H13	مازندران (۱)	kj399473
H14	مازندران (۱)	kj399474
H15	فارس (۳)	kj399475
H16	فارس (۱)	kj399476

*: تعداد نمونه مرغ هر جمعیت مربوط به هر هایپوتایپ

(۱۴) اشاره کردند که این هاپلوگروه (C) همانند هاپلو گروه (A)، در مطالعه اوکا و همکاران (۱۶) و هاپلوگروه (E)، در مطالعه لیو و همکاران (۱۲) از شبه قاره هند و آسیای جنوب شرقی منشأ گرفته و سپس به مناطق دیگری پراکنده شده‌اند. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که احتمالاً خط مادری مرغان بومی ایران ریشه در مناطق آسیای جنوب شرقی و شبه جزیره هند دارد (شکل ۱).

در کشورهای در حال توسعه طيور بومی به عنوان سرمایه‌ای ملی به شمار می‌رود و ارزیابی دقیق این گونه منابع ژنتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که جمعیت مرغان بومی اصفهان با تمامی جمعیت‌های مورد بررسی فاصله ژنتیکی معنی‌داری دارد. البته در بین جمعیت‌های دیگر نیز این تفاوت ژنتیکی مشاهده شده است. یکی از دلایل عمده مرتبط به این تفاوت‌های ژنتیکی می‌تواند فاصله جغرافیایی فی ما بین این جمعیت‌ها، اندازه این جمعیت‌ها در مراکز پرورشی، اندازه جمعیت موثر در شکل‌گیری این جمعیت‌ها و نیز تفاوت در شدت انتخاب در بین جمعیت‌های ایستگاه‌های مختلف باشد. در خصوص چگونگی گسترش جمعیت مرغان در جهان، شواهد باستان‌شناسی و سنگ‌واره‌های به دست آمده از نواحی آسیای جنوب شرقی، این ناحیه را به عنوان نخستین مکان اهلی شدن مرغان اهلی بیان می‌کنند. این در حالی است که اطلاعات ژنتیکی به دست آمده از تحقیقات مختلف در دیگر کشورها از جمله داده‌های حاصل از پژوهش حاضر نیز موید این فرضیه هم می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که مرغان اهلی امروزی از جمعیت مرغان اجدادی خود واقع در ناحیه آسیای جنوب شرقی منشأ گرفته و از این نقطه به دیگر نقاط جهان از جمله ایران پراکنده شدند. در ادامه از آن جایی که ایران نیز در مسیرهای باستانی قرار گرفته بود (جاده ابریشم)، نقش عمده‌ای را در پراکنده شدن آن به دیگر نقاط جهان از جمله غرب، بر عهده داشته است.

تشکر و قدردانی

از معاونت بهبود تولیدات دامی وزارت جهاد کشاورزی و ایستگاه‌های پرورش و اصلاح نژاد مرغان بومی کشور جهت فراهم نمودن نمونه‌های این پژوهش، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

لیو و همکاران (۱۲) با بررسی مرغان بومی مناطق وسیعی از چین، یوراسیا، خاورمیانه (ایران، آذربایجان، ترکمنستان) هندوستان، اندونزی، مالزی، اروپا، آن‌ها را به ۹ هاپلوگروه (A-I) تقسیم کردند. با ترسیم درخت فیلوژنی، این ۹ هاپلوگروه به طور کاملاً مشخص از گالوس بانکیوا^۱ از جاوا^۲ اندونزی جدا شده به طوری که هاپلوگروه A-I را گروه قاره‌ای^۳ و گالوس بانکس بانکیوا^۴ را گروه جزیره‌ای نامیدند. گروه قاره‌ای مرغان اهلی و زیرگونه‌های مرغان جنگلی قرمز را شامل می‌شد. فاصله میان دو گروه (قاره‌ای و جزیره‌ای) بیشتر از فاصله بین هاپلوگروه‌های (A-I) در درون گروه قاره‌ای بوده است. با توجه به درخت ترسیم شده (شکل ۱) نتایج پژوهش حاضر با پژوهش لیو و همکاران (۱۲) مطابقت دارد به طوری که مرغان بومی ایران هم به طور مشخص به همراه دیگر مرغان اهلی از گالوس بانکس بانکیوا جدا شده‌اند. هاپلوگروه E، در مطالعه لیو و همکاران (۱۲) شامل مرغان بومی خاورمیانه و اروپا بوده است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که هاپلوتا‌یپ‌های مرغان بومی ایران در این هاپلوگروه قرار گرفتند. لیو و همکاران (۱۲) اشاره کردند که این هاپلوگروه (E) از شبه قاره هند و آسیای جنوب شرقی منشأ گرفته و سپس به مناطق دیگر پراکنده شده‌اند. الخیاط و همکاران (۳) با بررسی D-loop میتوکندری ۳۶ قطعه از مرغان بومی مصر ۵ هاپلوتا‌یپ بدست آوردند که با هاپلوتا‌یپ‌های E1، لیو و همکاران (۱۲) و C3، موچادی و همکاران (۱۴) هم گروه شدند و گزارش کردند که مرغان بومی مصر ریشه در آسیای جنوب شرقی و شبه جزیره هندوستان دارد. بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲۹ مرغان بومی لاتوس و مقایسه آنها با هاپلوتا‌یپ‌های لیو و همکاران (۱۲)، اوکا و همکاران (۱۶)، ۲۹ هاپلوتا‌یپ و پنج هاپلوگروه بدست آمد و نشان دادند که مرغان بومی لاتوس از آسیای جنوب شرقی و چین منشأ گرفته است (۹). هاپلوتا‌یپ‌های مرغان بومی ایران با هاپلوتا‌یپ (C3) در مطالعه موچادی و همکاران (۱۴) نیز هم گروه بوده است. موچادی و همکاران (۱۴) با بررسی مرغان زیمباوه، سودان، مالاوی، مرغان محلی شمال غرب اروپا و شش نژاد خالص تجاری، ۳ هاپلوگروه (A-C) به دست آوردند که هاپلوتا‌یپ C3 با بیشترین فراوانی از هاپلوگروه C که شامل زیمباوه، سودان، مرغان محلی شمال غرب اروپا و شش نژاد خالص تجاری است را شامل می‌شد. موچادی و همکاران

منابع

1. Bruford, M.W., D.G. Bradley and G. Luikart. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, 4: 900-910.
2. Coble, M.D., R.S. Just, J.E. O'Callaghan, I.H. Letmanyi, C.T. Peterson, J.A. Irwin and T.J. Parsons. 2004. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increases the power of forensic testing in Caucasians. *International journal of Legal Medicine*, 118(3): 137-146.
3. Elkhayat L., K. Kawabe, K. Saleh, H. Younis, R. Nofal, S. Masuda, T. Shimogiri and S. Okamoto. 2014. Genetic diversity analysis of Egyptian native chickens using mtDNA D-loop region. *The Journal of Poultry Science*, 51: 359-363.
4. Excoffier L., G. Laval and S. Schneider. 2006. ARLEQUIN: An integrated Software package for Population Genetic (Version 3.1). Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne, Baltzerstrasse, Switzerland.
5. FAO 2007. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. Rome (Italy) (<http://www.fao.org/docrep/010/a1250e/a1250e00.htm>).
6. Hall, T.A. 1999. BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 4: 95-98.
7. Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1997. Principles of population Genetics. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. 542 pp.
8. Hoque, R., C.J. Kie, K. Bo-Seok, L. Hee-Kyong, Ch. Kang-Duk and L. Jun-Heon. 2010. Breed discrimination in chicken using mitochondrial DNA sequence and MHC polymorphisms. *Proceedings of the 32nd International Conference on Animal Genetics*, 76 pp, Edinburgh, Scotland (UK).
9. Kawabe, K., R. Worawut, S. Taura, T. Shimogiri, T. Nishida and S. Okamoto. 2014. Genetic diversity of mtDNA D-loop polymorphisms in Laotian native fowl populations. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(1): 19-23.
10. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
11. Librado, P. and J. Rozas. 2009. DNASP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
12. Liu, P., G.S. Wu, Y.G. Yao, Y.W. Miao, G. Luikart, M. Baig, A. Beja-Pereira, Z.L. Ding, M.G. Palanichamy and Y.P. Zhang. 2006. Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38: 12-19.
13. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3): 1215.
14. Muchadeyi, F.C., H. Eding, H. Simianer, C.B.A. Wollny, E. Groeneveld and S. Weigend. 2008. Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. *Animal Genetics*, 39: 615-622.
15. Niu, D., Y. Fu, J. Luo, H. Ruan, X.P. Yu, G. Chen and Y.P. Zhang. 2002. The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. *Biochem Genet*, 40: 163-174.
16. Oka, T., Y. Ino, K. Nomura, S. Kawashima, T. Kuwayama, H. Hanada, T. Amano, M. Takada, N. Takahata, Y. Hayashi and F. Akishinomiya. 2007. Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Animal Genetics*, 38: 287-293.
17. Olivier, L. 1998. Guest editorial. *Livestock Production Science*, 54: 67-70.
18. Pirany, N., M.N. Romanov, S.P. Ganpule, G. Dewagowda and D.T. Prasad. 2007. Microsatellite analysis of genetic diversity in Indian chicken population. *Journal of Poultry Science*, 44: 19-28.
19. Scherf, B.D. 2000. World Watch List for Domestic Animal Diversity, 3rd edn, FAO, Rome (Italy), 726 pp.
20. Shahbazi, S., S.Z. Mirhosseini and M.N. Romanov. 2007. Genetic diversity in five Iranian native chicken populations estimated by microsatellite markers. *Biochemical Genetics*, 45: 63-75 (In Persian).
21. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
22. Tavakolian, J. 1999. A look at livestock and chicken genetic pool of Iran. *Animal research Institute of Iran*, (In Persian).
23. Thompson, H.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
24. Vallone, P.M., R.S. Just, M.D. Coble, J.M. Butler and T.J. Parsons 2004. A multiplex allele specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *International journal of Legal Medicine*, 118: 147-157.
25. Weigend, S. and M.N. Romanov. 2002. The World Watch List for Domestic Animal Diversity in the context of conservation and utilization of poultry biodiversity. *The worlds Poultry Science Journal*, 58 (4): 411-430.
26. Weigend, S., L.F. Groeneveld and H. Eding. 2010. Mitochondrial DNA D-loop sequence variation among clusters of diverse chicken populations. *Proceedings of the 32nd International Conference on Animal Genetics*, pp: 77-79, Edinburgh, Scotland (UK).

Assessment of Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship of Iranian Indigenous Chickens Based on Mitochondrial D-Loop Sequences

Kasra Ahmadian¹, Ghodrat Rahimi Mianji², Hadi Sayahzadeh³ and Hamid Deldar⁴

1- Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center
(Corresponding author: kahmadian52@gmail.com)

2, 3 and 4- Professor Associate Professor and Assistant Professor Department of Animal Science, Sari
Agricultural Sciences and Natural Resources University

Received: 6 January 2016

Accepted: 25 Jun 2016

Abstract

In the present study for evaluation of genetic variability within and between Iranian native fowls, thirty nine blood samples were randomly collected from native fowls breeding stations of west Azarbayjan, Khorasan, Fars, Mazandaran, Yazd and Esfahan provinces. In order to compare the obtained results with other Asian, African and European breeds the D-loop sequences of mtDNA taken from GenBank. Total DNA of the samples was extracted by salting out procedure and was used as a template for amplification and sequencing of D-loop region of mtDNA. Sequence analysis of the 1231-2 bp D-loop region in all samples revealed a total of 16 haplotypes with 14 polymorphic sites. Analysis of molecular variance (AMOVA) was carried out based on Kimura method. The Fixation index values using kimura-2 parameter method ranged from -0.157 to 0.37763. The variation within and between the populations was estimate as (81.05 and 18.95, respectively). The genetic distance between Esfahan and West Azarbayejan, Esfahan and Fars, Esfahan and Khorasan, Esfahan and Mazandaran, Esfahan and Yazd, Fars and khorasan, Fars and Yazd populations were significantly different ($p < 0.05$). The genetic distance was statistically significant ($P < 0.05$) between Esfahan and all other populations. The result obtained in the present study showed an acceptable genetic variation in Iranian native chicken and according to the phylogenetic tree, based on obtained haplotypes the Iranian breeds was clustered in haplogroup A (Japanese native, white leghorn, Rhode Island Red), haplogroup E (middle east and eruption chicken) and haplogroup C (African native chicken). Also in order to these results the Iranian native fowls like China, Japan, Middle east and African local fowls originated from Southeast Asia and Indian subcontinent then from this ancient way of Iran may probably extended and introduced to the western world.

Keywords: Genetic diversity, Genetic distance, Iranian native chickens, mtDNA, Phylogenetic