

بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه d-loop میتوکندری در نژاد گوسفند وحشی و گوسفند کرمانی

The study of d-loop mitochondrial region with the objective of
investigating the genetic and phylogenetic diversity in wild sheep
and comparing it with Kermani sheep

مصطفی دهقانی فئاتغستانی^۱، احمد آیت‌اللهی مهرگردی^{۱*}، علی اسماعیلی‌زاده کشکویی^۱

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، استاد، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید
باهنر کرمان، کرمان، ایران

Dehghani G. M¹, Ayatollahi Mehrgardi A^{*1}, Esmailizadeh K. A¹

1- MSc Graduate Student, Assistant professor, Professor, Department of Animal
Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mehrgardi@uk.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

خلوص ژنتیکی در گوسفندان به دلیل طاقی‌های کنترل نشده دستخوش تغییر شده است. یکی از روش‌های متداول جهت بررسی این موضوع بررسی توالی ژنوم میتوکندریایی است. هدف از انجام این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ناحیه d-loop ژنوم میتوکندری قوچ و میش‌های وحشی و نژاد گوسفند کرمانی به منظور تعیین فاصله ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی آن‌ها بود. تعداد ۱۵ نمونه خون از نژاد گوسفند کرمانی و تعداد ۱۲ نمونه خون از نژاد گوسفند وحشی از ۳ منطقه‌ی کرمان، شیراز و تهران جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، تکثیر قطعه ۷۴۹ جفت‌بازی از ناحیه d-loop میتوکندری با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز توسط یک جفت پرایمر اختصاصی انجام شد، به منظور تعیین فاصله ژنتیکی با توالی‌های حاصل از مطالعات دیگر مورد مقایسه قرار گرفت. بررسی هاپلوگروهی نشان داد به‌طور کامل نژاد گوسفند کرمانی در هاپلوگروه B، ۷۵ درصد از نژاد وحشی در هاپلوگروه B و ۲۵ درصد باقی‌مانده از نژاد وحشی در هاپلوگروه A قرار می‌گیرند. هم‌چنین نتایج آزمون فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining نشان داد که، نژاد قوچ و میش‌های وحشی ۳ منطقه ذکر شده و نژاد گوسفند کرمانی در شاخه نژاد وحشی اورپال (*Ovis vignei uralis*) قرار می‌گیرند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که گوسفند نژاد کرمانی در شاخه قوچ وحشی شیراز قرار می‌گیرد و دارای تنوع ژنتیکی پایینی است، که در کارهای مدیریتی و اصلاحی به‌عنوان یک نژاد مقاوم به بیماری در دراز مدت می‌توان بهره کافی را برد.

واژه‌های کلیدی

ناحیه d-loop میتوکندری
گوسفند کرمانی
گوسفند وحشی
هاپلوگروه

Loop یا ناحیه‌ی کنترل که یک ناحیه‌ی غیر کدکننده به‌شمار می‌آید دارای دو بخش بسیار متغیر به نام‌های HVR1 و HVR2 است که به‌میزان زیادی دارای جهش هستند که این جهش‌ها در این نواحی ذخیره شده و به نسل بعد انتقال می‌یابند. ژن‌های میتوکندری ابزارهای مناسب و مهم در مطالعات مختلف در زمینه‌های تکامل جانوری، فیلوجغرافیایی و فیلوژنتیکی می‌باشند (Bruford et al. 2003; Rokas et al. 2003). تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به‌عنوان یکی از اجزای مهم پروژه‌های اصلاحی می‌باشند، چرا که یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی، قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل‌ها و بیماری‌ها نیست. حفاظت باید براساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد. لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محیطی بسیار اهمیت دارد (Cann et al. 1987; Kijas et al. 2009). لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی قوچ و میش‌های وحشی و نژاد گوسفند اهلی کرمان با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری آن‌ها بود.

گوسفند وحشی از خانواده گاو (Bovidae) و جنس قوچ (Ovis) است، که در بیش‌تر مناطق ایران زیست می‌کند (PETER et al. 2007) و اهلی شده‌ی آن، نقش مهمی را در تغذیه بشر ایفا نموده و همراه با جابجایی و یا کوچ انسان در کل دنیا توزیع شده‌است اولین شواهد بیان شده اهلیت این گونه را مربوط به ۸ تا ۱۱ هزار سال پیش می‌دانند (Colledge et al. 2005).

داده‌های ریخت‌شناسی و جمعیت‌شناسی، نشان داده است که اهلی‌سازی گوسفند از مناطقی از شمال زاگرس و جنوب شرقی ترکیه، تقریباً بین ۱۰ تا ۱۱ هزار سال پیش رخ داده است (Peters et al. 2005). تحقیقات اخیر توسط توالی‌یابی ژنوم میتوکندری، توسعه و گسترش قابل توجه گوسفندان اهلی را از ناحیه جنوب غربی آسیا آشکار نموده است (Tapio et al. 2006). آنالیز DNA میتوکندریایی (mtDNA) محققین را قادر به شناسایی لاین‌های متعدد گوسفند، که شامل پنج هاپلوگروه (یعنی A, B, C, D, E)، کرده است (Tapio et al. 2006). بعضی از این هاپلوگروه‌ها با محدوده‌ی جغرافیایی مشخص، بیان‌کننده‌ی زیستگاه‌ها و خاستگاه‌های متعدد و وقایع امکان‌پذیر مستقل در گوسفندان اهلی است (Wood and Phua 1996; Hiendleder et al. 1998).

آنالیز تمام و یا قسمتی از (mtDNA) می‌تواند زمان انشعاب گوسفندان اهلی از وحشی را آشکار سازد. در حالت کلی تخمین زمان انشعاب را می‌توان از هاپلوگروه‌های موجود مادری به‌دست آورد (Meadows et al. 2007). برای مثال، زمان انشعاب بین دو نسل مادری A و B ۶/۱ تا ۷/۱ میلیون سال پیش، با استفاده از آنالیز توالی ناحیه سیتوکروم b تخمین زده شده‌است (Hiendleder et al. 1998). علاوه بر این، زمان جدایی هاپلوگروه C از هاپلوگروه‌های A از B را ۰/۴۲ و ۰/۷۶ میلیون سال، که توسط آنالیز توالی‌های ناحیه کنترل محاسبه شده بودند را گزارش کردند (Meadows et al. 2007). روش‌های مولکولی مانند توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود. امروزه ژنوم میتوکندری به‌دلیل اندازه کوچک و آسان بودن استخراج و اینکه از طریق مادر به ارث می‌رسد، به‌طور متداول برای مطالعات فیلوژنتیکی و تکاملی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lansman et al. 1983; Wiesner et al. 1992). D-

جدول ۱- اجزا تشکیل دهنده واکنش PCR

مرحله	زمان (ثانیه)	درجه حرارت (C)	مراحل PCR
۱		۹۵	واسرشته سازی اولیه
۲	۳۰	۹۵	واسرشته سازی
۷۴۹ bp	۴۵	۵۷	اتصال آغازگرها
۴	۶۰	۷۲	تکثیر
۵	۵۴۰	۷۲	تکثیر نهایی
۶	∞	۴	نگهداری

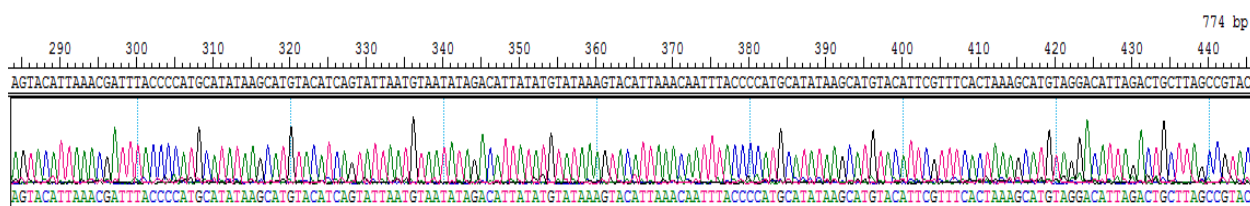
* مراحل دو تا چهار ۳۳ بار تکرار می‌شود.

برای انجام این تحقیق ۱۵ نمونه خون از نژاد گوسفند کرمانی غیرخویشاوند موجود در ایستگاه تحقیقاتی بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ۱۲ نمونه خون از گوسفند نژاد وحشی موجود در باغ وحش‌های استان‌های کرمان (از این ۱۲ راس، زیستگاه دو رأس رشته کوه‌های جویبار واقع در جنوب شرقی کرمان، زیستگاه پنج رأس از کوه سفید واقع در شمال شرقی استان فارس و زیستگاه پنج رأس از رشته کوه‌های زاگرس در شمال ایران بود) با استفاده از سیاه رگ و داج جمع‌آوری شد و

شماره مرجع (KF938359, KF938360, KF 938361,)
 O. aries breed (KF938317) که به ترتیب مربوط به نژادهای (O. aries breed Oxford down, O. aries breed Asian mouflon, O. vignei breed Urial, O. aries breed Sunite) هستند مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج طیف‌سنجی و الکتروفورز در ژل آگارز نشان داد که DNA استخراج شده از ۲۷ نمونه خون دارای کیفیت و کمیت مناسب جهت انجام PCR داشته و سپس، با توجه به کیفیت خوب نمونه‌ها، توالی بازهای قطعه‌ی مذکور، مورد آنالیز قرار گرفت (شکل ۱). الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز دو درصد نشان داد که قطعه مورد نظر با طول ۷۴۹ جفت‌باز به خوبی تکثیر شده‌است (شکل ۲). شکل شماره ۳، درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از روش بوت استراپ با ۱۰۰۰ تکرار، را نشان می‌دهد. درخت فیلوژنتیکی که نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی بین نژادها، اشتقاق گونه‌ها از جد مشترک، زمان انشعاب گونه‌ها و نژادها از هم بود، نشان داد که نژادهای مورد مطالعه به‌طور کلی در یک گروه و نزدیک به هم قرار می‌گیرند و دارای فاصله ژنتیکی کم و جد مشترک هستند. با آنالیزهای انجام شده مشخص شد که نژاد گوسفند کرمانی به‌طور کامل در هاپلوگروه B با توالی مرجع KF938359 قرار می‌گیرد، علاوه بر این، ۷۵ درصد از نژاد وحشی نیز در همین گروه قرار گرفت، اما ۲۵ درصد باقی‌مانده از نژاد گوسفند وحشی در هاپلوگروه A با توالی مرجع KF938317 قرار گرفت. فراوانی هر یک از نوکلئوتیدهای دو نژاد وحشی و کرمانی توسط نرم‌افزار MEGA.6 محاسبه شد (Tamura et al. 2007). باز آدنین بیش‌ترین فراوانی و باز گوانین کم‌ترین فراوانی را داشت (جدول ۲).

جهت جلوگیری از لخته شدن خون به لوله‌های حاوی EDTA و دمای ۲۰- درجه انتقال داده شدند. این نمونه‌گیری با تأیید اداره کل محیط زیست کشور با شماره مجوز ۹۳۲۶۹۵۱ و در تاریخ ۱۰/۶/۹۳ صورت پذیرفت. سپس با روش نمکی استخراج DNA با کیفیت و کمیت مناسب صورت پذیرفت (Miller et al. 1988). جهت تکثیر ناحیه *D-Loop* از یک جفت پرایمر اختصاصی (5'- ACAACACCCACTTCCCCTC-3' و 5'- CCAACCATCCCAAATTA-3' که توسط Bowling et al. (2000) مورد استفاده قرار گرفته بود، استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از کیت PCR-201xs شرکت تکاپوزیست تهران استفاده شد. نمونه‌ها پس از تکثیر بر روی ژل آگارز، با غلظت ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند، سپس استخراج خالص‌سازی قطعات مورد نظر از محصولات PCR، توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) صورت پذیرفت. توالی‌یابی قطعه ۷۴۹ جفت‌بازی توسط همان شرکت با استفاده از دستگاه اتوماتیک ABI 3130 با روش سانگر انجام شد. اجزا تشکیل دهنده واکنش PCR را می‌توان در جدول ۱ مشاهده نمود. به‌منظور تجزیه و تحلیل نتایج، از ابزار BLAST و رویه‌ی BLASTN جهت تعیین همولوژی توالی‌ها و از نرم‌افزار Seqman به‌منظور اصلاح نوکلئوتیدی حیوانات توالی‌یابی شده استفاده شد. برای بررسی جایگاه قوچ و میش در بین قوچ و میش‌های اورپال، ارمنی، آکسفورد و سوناتی بررسی ارتباطات بین آن‌ها از توالی ناحیه *D-Loop* میتوکندری ثبت شده سایر قوچ و میش‌ها در ژن بانک (NCBI) به‌دست آمدند و ردیف‌آرایی توالی‌ها و فراوانی نوکلئوتیدی در نرم‌افزار MEGA.6 صورت گرفت (Tamura et al. 2007) و در نهایت درخت فیلوژنی براساس روش اتصال مجاور با استفاده از این نرم‌افزار ترسیم شد. نژادهای بررسی شده با

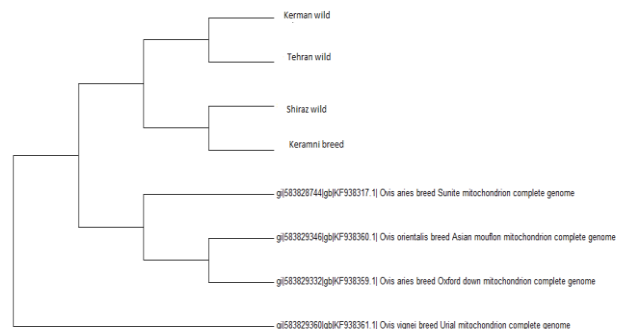


شکل ۱- استفاده از نرم‌افزار SeqMan (DNASTAR, Inc., Madison) جهت تصحیح توالی

بود، قوچ و میش‌های وحشی نواحی شمال شرق، شرق و جنوب شرق ایران در شاخه اورپال (*Ovis vignie Urial*) و قوچ و میش‌های ناحیه جنوب غرب و جنوب را در شاخه قوچ ارمنی (*Ovis orientalis*) (قرار می‌دهند (Valdez et al. 1978). حتی مناطقی مانند پارک ملی خبر، بمو، خجیر و شهربابک دارای دو گونه‌ی قوچ و میش اورپال و ارمنی هستند (Rezaei et al. 2010)، که نشان دهنده‌ی پیچیده‌گی ژنتیکی و هیبرید بالای بین قوچ و میش‌های مناطق مختلف ایران است. قوچ و میش‌های دو نژاد مورد بررسی قرابت بالای ژنتیکی با یکدیگر و همچنین قوچ اورپال را داشتند. به‌طور کلی به‌جز مناطق شرقی ایران که قوچ اورپال و در مناطق غربی ایران که قوچ ارمنی به‌طور خالص زیست می‌کنند، بسیاری از مناطق ایران دارای نوعی از هیبرید این دو نژاد قوچ و میش با فرم‌های متفاوت شاخ، رنگ، جثه و کروموزم هستند (Shojaei et al. 2011). از لحاظ طبقه‌بندی مشکل اساسی در مناطق مرکزی ایران وجود دارد که هر یک از جمعیت‌ها از لحاظ خصوصیت ظاهری و ژنتیکی با جمعیت دیگر کاملاً متفاوت می‌باشند که وابسته به میزان آمیزش دو گونه شرقی و غربی در آن زیستگاه است. در مناطق مرکزی ایران دو گونه وجود دارد و افراد این جمعیت‌ها می‌توانند دارای ۵۴ الی ۵۸ کروموزم باشند (Valdez et al. 1978). قوچ و میش‌های ایران به دلیل هیبرید بالا نیاز به مطالعات ژنتیکی زیادی دارند. در این تحقیق، که شامل بررسی دو نژاد از سه منطقه ایران می‌شد و با عدم وجود شباهت فنوتیپی بالا که به دلیل هیبرید زیاد و تنوع زیستگاه جغرافیایی بین این گونه‌ها بود توانستیم نژادهای وحشی مناطق کرمان، شیراز و تهران را طبقه‌بندی کنیم که این گونه در زیر گونه قوچ وحشی اورپال قرار گرفت و با مقایسه ژنتیکی نژاد گوسفند کرمانی و وحشی این نژاد اهلی در گروه قوچ وحشی شیراز قرار گرفت. که نشان دهنده فاصله ژنتیکی کم و قرابت ژنتیکی بالا است. قوچ و میش لارستان در جنوب ایران به‌عنوان زیر گونه‌ای از قوچ موفلون آسیایی (*O. Orientalis laridtanic*) مطرح و اشاره شده‌است که موفلون آسیایی را به‌عنوان اجداد گوسفندان اهلی به‌شمار می‌آورند (Colledge et al. 2005). با توجه به عدم بررسی کافی در باب طبقه‌بندی گوسفندان نژاد ایرانی هنوز به‌طور کامل این نژادها طبقه‌بندی نشده‌اند و دارای



شکل ۲- تکثیر قطعه ۷۴۹ جفت‌بازی از ژنوم میتوکندری



شکل ۳- قرار گرفتن نژاد گوسفند کرمانی در گروه گوسفند وحشی شیراز و قوچ وحشی تهران در گروه نژاد گوسفند کرمانی

جدول ۲- فراوانی نوکلوتیدی دو نژاد گوسفند وحشی و کرمانی

Nucleotide	A	T/U	C	G
Abundance فراوانی	٪۳۵/۷۵	٪۲۴/۶۲	٪۲۳/۰۶	٪۱۶/۵۷

برای بررسی تنوع ژنتیکی و تنوع آلی، فاصله ژنتیکی بین دو نژاد مورد بررسی از نرم‌افزار MEGA.6 بهره گرفته شد که بیش‌ترین فاصله ژنتیکی مربوط به نژادهای وحشی و اهلی که برابر با ۰/۰۴ و کم‌ترین فاصله ژنتیکی بین نژاد گوسفند کرمانی که برابر با صفر بود محاسبه شد. با قرار گرفتن نژاد گوسفند کرمانی با نژاد گوسفند وحشی شیراز و گوسفند وحشی کرمان با تهران در یک شاخه که توالی آن‌ها از طریق Consensus و یا توافق عام توالی‌ها به‌دست آمده بود نشان داد که، فاصله ژنتیکی کم و شباهت بالای آلی و ژنی بین توالی نژادها وجود دارد. در نهایت نژادهای مورد بررسی در شاخه‌ی گوسفند وحشی اورپال با توالی مرجع KF938361 قرار گرفتند. با بررسی‌های انجام شده که در ارتباط با طبقه‌بندی قوچ و میش‌های وحشی که به‌طور گسترده در ایران

بود و نشان می‌داد که این نژاد وحشی نیز از زیر گونه‌ی قوچ وحشی اورپال است (شکل ۳).

این تحقیق با نتیجه تحقیق (Rezaei et al. 2010) مغایرت داشت. زیرا آن‌ها گوسفندان نژاد وحشی ایران را در گروه گوسفند وحشی ارمنی (*ovis orientalis*) قرار دادند و بیان کردند که تمام نژادهای دیگر در زیر گونه‌ی گوسفند نژاد ارمنی قرار می‌گیرند، اما تحقیقات گسترده که در سطح جهان انجام شد، نشان داد که قوچ و میش‌های ایران در دو گروه ارمنی و اورپال قرار می‌گیرند (Valdez et al. 1978)

شناسنامه ژنتیکی نیستند. تحقیق‌هایی که در باب طبقه‌بندی گوسفندان وحشی ایران صورت گرفت نژاد وحشی شیراز هنوز ناشناخته است و آن را به‌عنوان قوچ لارستان معرفی می‌کنند، هم‌چنین قوچ وحشی کرمان را به دو گروه قوچ اورپال افغانی و یا موفلون آسیایی تقسیم و معرفی می‌کنند. همان‌طور که گفته شد قوچ لارستان را به‌عنوان زیر گونه‌ای از قوچ ارمنی معرفی می‌کنند اما این تحقیق نشان داد که نژاد وحشی شیراز به‌دلیل قرابت ژنتیکی با قوچ اورپال در زیر گروه قوچ اورپال قرار می‌گیرد و به‌دلیل وجود آمیختگی ژنتیکی نمی‌توان آن را به‌عنوان قوچ اورپال خالص دانست. این موضوع برای قوچ وحشی کرمان نیز صادق

منابع

- Bowling A, Del Valle A, Bowling M (2000) A pedigree-based study of mitochondrial d-loop DNA sequence variation among Arabian horses. *Animal Genetics* 31:1-7.
- Bruford MW, Bradley DG, Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 4: 900.
- Cann RL, Stoneking M, Wilson AC (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325:31-36.
- Colledge S, Conolly J, Shennan S (2005) The evolution of Neolithic farming from SW Asian origins to NW European limits. *European Journal of Archaeology* 8:137-156.
- Hiedler 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* 89:113-120.
- Kijas JW, Townley D, Dalrymple BP, Heaton MP, Maddox JF, McGrath A, Wilson P, Ingersoll RG, McCulloch R, McWilliam S, Tang D, McEwan J, Cockett N, Oddy VH, Nicholas FW, Raadsma H (2009) A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. *Plos One* 4:e4668.
- Lansman RA, Avise JC, Aquadro CF, Shapira JF, Daniel SW (1983) Extensive genetic variation in mitochondrial DNA's among geographic populations of the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. *Evolution* 37:1-16.
- Meadows JR, Cemal I, Karaca O, Gootwine E, Kijas JW (2007) Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East. *Genetics* 175:1371-1379.
- Miller S, Dykes D, Polesky H (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215.
- Peter C, Bruford M, Perez T, Dalamitra S, Hewitt G, Erhardt G (2007) Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Animal Genetics* 38:37-44.
- Peters J, von den Dreisch A, Helmer D (2005) The upper Euphrates-Tigris basin: cradle of agro-pastoralism? The first steps of animal domestication: new archaeozoological techniques pp.96-124.
- Rezaei HR, Naderi S, Chintauan-Marquier IC, Taberlet P, Virk AT, Naghash HR, Rioux D, Kaboli M, Pompanon F (2010) Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54:315-326.
- Rokas A, Ladoukakis E, Zouros E (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution* 18:411-417.
- Shojaei M, Mohammad Abadi M, Asadi Fozzi M, Dayani, A Khezri O (2011) Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research* 2:67-73.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tapio M, Marzanov N, Ozerov M, Činkulov 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* 23:1776-1783.
- Valdez R, Nadler C, Bunch T (1978) Evolution of wild sheep in Iran. *Evolution* 32:56-72.
- Wiesner RJ, Rüegg JC, Morano I (1992) Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 183:553-559.
- Wood N, Phua S (1996) Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Animal Genetics* 27:25-33.