نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۶، بهـار ۱۳۹۹
ص‌ص: ۳۱~۴۰

تجزیه تحلیل فیلوژنتیک ژن ND6 ژنوم میتوکندری در مرغ بومی سیستان و بلوچستان

- **احمد ابراهیم‌زاده آله‌آباد**
کارشناس ارشد اصلاح نژاد دام، پژوهشکده دامهای خاص، پژوهشگاه دانشگاه زابل.
- **خدیجه نصیری**
استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.
- **زهرا رودباری** (نویسنده مسئول)
استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت.

تاریخ دریافت : آذر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش : اسفند ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۲۴۸۳۳۴۳
Email: Roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2019.124521.1836

چکیده

امروزه ژن‌های موجود در ژنوم میتوکندریایی به عنوان نشانگر ژنتیکی قوی به صورت گسترده کاربرد دارند. هدف از این مطالعه، توالی‌یابی ناحیه ND6 ژنوم میتوکندری مرغ خزک و بررسی رابطه فیلوژنتیکی این ناحیه از مرغ بومی خزک با دیگر نژادهای مرغ و برخی از ماکیان بود. برای این منظور نمونه خون از ورید بال ۲۰ قطعه مرغ خزک از پژوهشکده دام‌های خاص استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد. استخراج DNA از خون کامل انجام گرفت. سپس ژن ND6 به همراه بخشی از tRNA بالادست و پایین دست (۸۵٤ جفت باز) توسط آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد. نمونه‌ها پس از خالص‌سازی توالی‌یابی شدند و تنوع ژنتیکی درون جمعیتی مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، پس از گرفتن ۱۹ توالی مشابه ژنوم میتوکندریایی مربوط به سایر نژادهای مرغ و برخی از ماکیان از بانک جهانی ژن، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک انجام گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که هیچ تفاوت نوکلئوتیدی بین توالی‌های نوکلئوتیدی ND6 مرغ‌های بومی خزک وجود نداشت. نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنتیک مرغ بومی خزک با دیگر نژادها نشان داد که بیشترین تشابه ژنتیکی این ناحیه از ژنوم میتوکندری مرغ خزک با نژاد مرغ‌های هوانگ لانگ، ژوسیانگ، فیجی، فلیپین، هانگشان زرد، جینو ووفنگ، مرغ جنگلی قرمز و مرغ اهلی مشاهده می‌شود. نتایج نشان دهنده قرابت ژنتیکی زیاد بین مرغ بومی خزک با مرغ‌های ژاپن و چین (جنوب شرقی آسیا) می‌باشد. کمترین تشابه ژنتیکی این ناحیه از مرغ بومی خزک با پرنده ماهی خوار تاج قرمز مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: مرغ خزک، درخت فیلوژنتیک، تنوع ژنتیکی، ژن ND6

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 126 pp: 31-40

Phylogenetic analysis of ND6 gene of mitochondria genome in native chickens of Sistan and Baluchestan.

By: Ahmad Ebrahimzadeh-Alahabad1, Khadijeh Nasiri2, Zahra Roudbari3*
1: Master graduate of Animal breeding, Special livestock Institute, Research center of the University of Zabol,Zabol, Iran.
2: Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
3*: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

Received: December 2018 **Accepted: March 2019**

Today, genes in the mitochondrial genome are widely used as a strong genetic marker.The purpose of this study was to determine sequence of ND6 gene of the mitochondrial genome of Khazak chicken and investigate the phylogenetic relationship of this region of the genome with other chicken breeds and some fowls of around the world. 20 blood samples of wing vein were collected from Khazak chicken of Research Center of specific livestock of Sistan and Baluchestan province. DNA was extracted from whole blood. Then, the ND6 gene along with a portion of upstream and downstream tRNA (854 bp) was amplified from mitochondrial genome by specific primers in Polymerase Chain Reaction. Samples were sequenced after purification and genetic diversity was investigated within the population. After Download similar sequences of the other mitochondrial genome from the chicken breeds and some fowls of the NCBI, phylogenetic analysis was carried out. The results showed that there was no nucleotide difference between ND6 sequences of native Khazak chicken. The results of the phylogenetic tree from native Khazak chicken with other breeds showed that the highest genetic similarity was observed from this region of the mitochondrial genome of native Khazak chicken with HuangLang, Zhuxiang, Fiji, Philippines, Hengshan Yellow, Jinhu Wufeng and Red jungle fowl breeds which indicates that there are a high genetic relationship between the native Khazak chicken with the Japanese and Chinese (southeastern Asia) chicken breeds. The least genetic similarity of ND6 sequence from native Khazak chicken was observed with the Grus japonesis.

Key words: Khazak Chicken, Phylogenetic tree, Genetic diversity, ND6 gene.

مقدمه

شناسایی توالی ژن‌های میتوکندری به عنوان مشخصه ژنتیکی ثابت محسوب می‌شود و به تهیه شناسنامه ژنتیکی و نگهداری خلوص نژادهای بومی کمک می‌کند. با مقایسه گونه‌ها و نژادهایی که در سالهای مختلف مطالعه شده است و توالی آنها در بانک ژن موجود است امکان مطالعات فیلوژنتیکی، بررسی انشقاق گونه‌ها و فاصله نسلی فراهم می‌شود. (Hiendleder و همکاران، ۱۹۹۸). چندشکلی DNA میتوکندریایی به طور وسیعی در تشخیص گونه‌ها، ترسیم روابط فیلوژنتیکی و ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد(Meadows و همکاران، ۲۰۱۱). ژنوم میتوکندری دارای مشخصه‌هایی از قبیل تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول، اندازه کوچک آن نسبت به DNA ژنومی، وراثت‌پدیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی درآن، وجود نواحی حفاظت شده در آن و وجود نواحی حفاظت نشده‌ای مانند ناحیه کنترل[1] می‌باشد (Bellagamba و همکاران، ۲۰۰۳). DiMauro و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که بیان ژن‌های میتوکندری به منظور سوخت وساز بدن، تولید انرژی و

[1] D-loop Region

تعادل و مرگ سلولی در مهره‌داران از اهمیت بسزایی برخوردار است. این ژن‌ها در گونه‌های پرندگان ۳۷ ژن را کد می‌کنند که شامل ۱۳ ژن کد کننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کد کننده tRNA و ۲ ژن کدکننده rRNA می‌باشند. پروتئین‌های کد شونده از ژنوم میتوکندری زیرواحدهایی از کمپلکس‌های فسفریلاسیون اکسیداتیو بوده و نقش آن‌ها در فرایندهای تنفس سلولی و تولید انرژی می‌باشد (Smeitink و همکاران، ۲۰۰۱). همچنین میتوکندری دارای یک ناحیه غیرکدشونده[2] نیز می‌باشد(Bao و همکاران، ۲۰۰۸).

ژن ND6[3] از ژنوم میتوکندری دستورالعمل‌ها برای ساخت یک پروتئین به نام NADH دهیدروژناز 6 را فراهم می‌کند(Bai and Attardi، ۱۹۹۸). این پروتئین بخشی از یک کمپلکس آنزیمی به نام کمپلکس I می‌باشد که در میتوکندری فعالیت می‌کند. سازه‌های میتوکندری در درون سلول مسئول تبدیل انرژی از مواد غذایی برای سلول‌ها می‌باشند. این ساختارهای سلولی را از طریق یک فرآیند به نام فسفوریلاسیون اکسیداتیو و با استفاده از قندهای ساده و اکسیژن، تولید آدنوزین تری فسفات (ATP) کرده که منبع اصلی انرژی سلول است. کمپلکس I یکی از چندین کمپلکس لازم برای فسفوریلاسیون اکسیداتیو است(Bai and Attardi، ۱۹۹۸). در طی فسفوریلاسیون اکسیداتیو، کمپلکس‌های آنزیم‌های میتوکندری با انجام واکنش‌های شیمیایی موجب تولید ATP می‌شود. کمپلکس I مسئول مرحله اول در فرآیند انتقال الکترون بوده که در انتقال الکترون از یک مولکول به نام فرم کاهش یافته نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید[4] به مولکول دیگری به نام یوبی‌کوئینون[5] نقش دارد. سپس از طریق چندین کمپلکس آنزیمی ATP تولید می‌شود (Bai and Attardi، ۱۹۹۸). ژن ND6 در مرغ دارای طولی به اندازه ۵۲۲ جفت‌باز با کدون آغازین ATG و کدون پایانی AGG می‌باشد.

حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بومی کشور به دلیل اندازه جمعیت کم در برنامه‌های محافظتی نژادهای در معرض خطر ضروری است (Mohammadi و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین جهت اطمینان از پاسخ به انتخاب در درازمدت حفظ تنوع ژنتیکی گام مهم و از ضروریات برنامه‌های اصلاح‌نژادی به منظور بهبود تولید می‌باشد (Khodabakhshzadeh و همکاران، ۲۰۱۵) که در این بین مرغ خزک که یک نژاد بومی منطقه سیستان در شمال استان سیستان و بلوچستان می‌باشد و بیشتر تیپ مرغان تخم‌گذارمی‌باشد و مقاومت بالایی در برابر شرایط نامناسب محیطی دارد (اصغری مقدم و همکاران ، ۱۳۹۳) دارای اهمیت می‌باشد. تاکنون دو مطالعه در ارتباط با ژنوم میتوکندری مرغ خزک انجام شده است. یک مطالعه در ارتباط با تعیین ساختار ژنتیکی سیتوکروم b مرغ خزک انجام شده است و نتایج آن ۵ هاپلوتایپ مختلف براساس ۳ نوکلئوتید چندشکل موجود در توالی‌های مرغ خزک را نشان داد (ابراهیم‌زاده اله‌آباد و همکاران، ۱۳۹۵). مطالعه دیگر در ارتباط با ژن گلوتاتیون پراکسیداز-۱ ژنوم میتوکندری مرغ خزک سیستان انجام شد و نتایج ۹ هاپلوتایپ و۱۳ ناحیه چندشکل را نمایان ساخت (نجم الدینی و همکاران، ۱۳۹۷). تاکنون تحقیقانی در مورد توالی‌یابی ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک ژن ND6 در مرغ بومی خزک سیستان انجام نشده است. بنابراین مبنای انجام این پژوهش با توجه به نقش ژن ND6 در زنجیره تنفسی (فرایند فسفریلاسیون اکسیداتیو) و اهمیت آن در شرایط استرس اکسیداتیو، توالی‌یابی آن از ژنوم میتوکندری در این مرغ بومی و بررسی روابط تبارزایی این ژن با دیگر نژادها از سراسر جهان می‌باشد.

مواد و روش

نمونه‌گیری و استخراج DNA

برای انجام این مطالعه، تعداد ۲۰ نمونه خون به طور تصادفی از ورید بال مرغ‌های بومی خزک از پژوهشکده دام‌های خاص دانشگاه زابل استان سیستان و بلوچستان تهیه شد. استخراج DNA از خون کامل با استفاده از کیتThermo Scientific (امریکا) صورت گرفت. برای بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی از روش الکترفورز ژل آگارز ۱ درصد و از دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ (مدل ND 2000 ساخت شرکت Thermo امریکا) میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد.

[2] **Control region (**D-Loop)
[3] NADH dehydrogenase subunit 6
[4] Nicotinamide adenine dinucleotide (the reduced form)
[5] Ubiquinone

طراحی آغازگرهای اختصاصی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن ND6

طراحی یک جفت آغازگر برای تکثیر اختصاصی ژن ND6 به همراه بخشی از توالی tRNA بالادست و پایین دست (۸۵۴ جفت باز) از ژنوم میتوکندری با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 5 انجام گرفت. توالی آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن ND6 به شرح زیر بود (جدول ۱).

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر جایگاه ژنی ND6.

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه
آغازگر رفت	CCCTCTCTTACTTCACCATC	۸۵۴ جفت باز
آغازگر برگشت	TACACTTAGTAGGGGAGTTAGG	

برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن ND6 به ترتیب دمای واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل دمای واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و یک سیکل تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. اجزای واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۲ میکرولیتر از $dNTP_s$ ۱۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۱۰ پیکومول از هر یک از جفت آغازگرها (۱ میکرولیتر)، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی (۱ میکرولیتر) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و مابقی تا رسیدن به ۲۵ میکرولیتر از آب مقطر بود.

محصولات حاصل از تکثیر ژن ND6 از ژنوم میتوکندریایی بر روی ژل آگارز ۱ درصد با رنگ‌آمیزی DNA safe stain الکتروفورز شدند و در ادامه پس از اطمینان از تکثیر قطعات ۲۰ میکرولیتر از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از کیت Reaction recovery (دنازیست، ایران) تخلیص شدند و همراه با آغازگرهای اختصاصی جهت توالی‌یابی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شدند.

تجزیه و تحلیل توالی‌ها و رسم دخت فیلوژنتیک ژن ND6

به منظور بررسی کیفیت نتایج تعیین توالی از نرم‌افزار CLC Main workbench 7.6.4 (Knudsen و همکاران، ۲۰۰۷) استفاده شد. در ادامه از ابزار Blast و رویه BLASTN موجود در پایگاه NCBI به منظور تعیین همولوژی و همپوشانی توالی‌ها استفاده شد. از نرم افزار DnaSP v.5.10.05 برای جستجوی تنوع نوکلئوتیدی و تعداد هاپلوتایپ درون نژادی مرغ بومی خزک استفاده شد. توالی Consensus از ژن ND6 مرغ‌های بومی خزک در این مطالعه به همراه توالی‌های انتخاب شده از بانک جهانی ژن در یک فایل ادغام و همردیف سازی چندگانه[6] با برنامه BioEdit 7 (Hall، ۱۹۹۹) انجام شد. بررسی رابطه فیلوژنتیکی مرغ خزک سیستان با دیگر نژادها از نمودار درختی با استفاده از روش اتصال مجاور[7] (NJ) با بوت استرپ ۱۰۰۰ و مدل تانورا-نئی به کمک نرم‌افزار MEGA 7 (Kumar و همکاران، ۲۰۱۶) انجام شد. فواصل ژنتیکی بین توالی‌های گونه‌های مورد بررسی در این پژوهش توسط نرم افزار megAlign محاسبه شد.

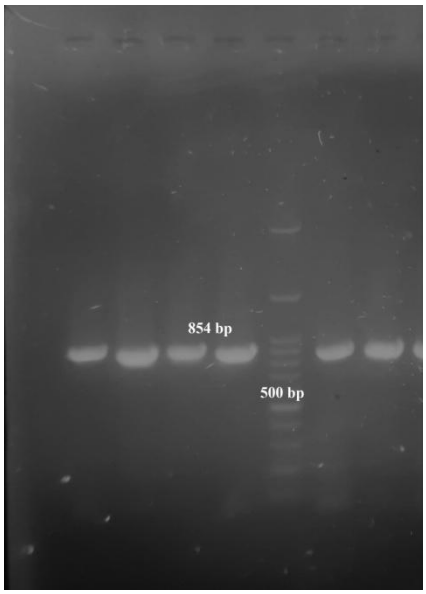
نتایج و بحث

نتایج سنجش تعیین کمیت و کیفیت استخراج DNA نشان داد که استخراج DNA از همه نمونه‌ها با موفقیت انجام گرفت. نسبت جذب در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر به طور میانگین ۱/۹۲ بود. لذا می‌توان گفت DNA استخراج شده از کیفیت و خلوص مناسبی برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز برخوردار بود.

[6] Multiple Alignmennt
[7] Neighbor-Joining

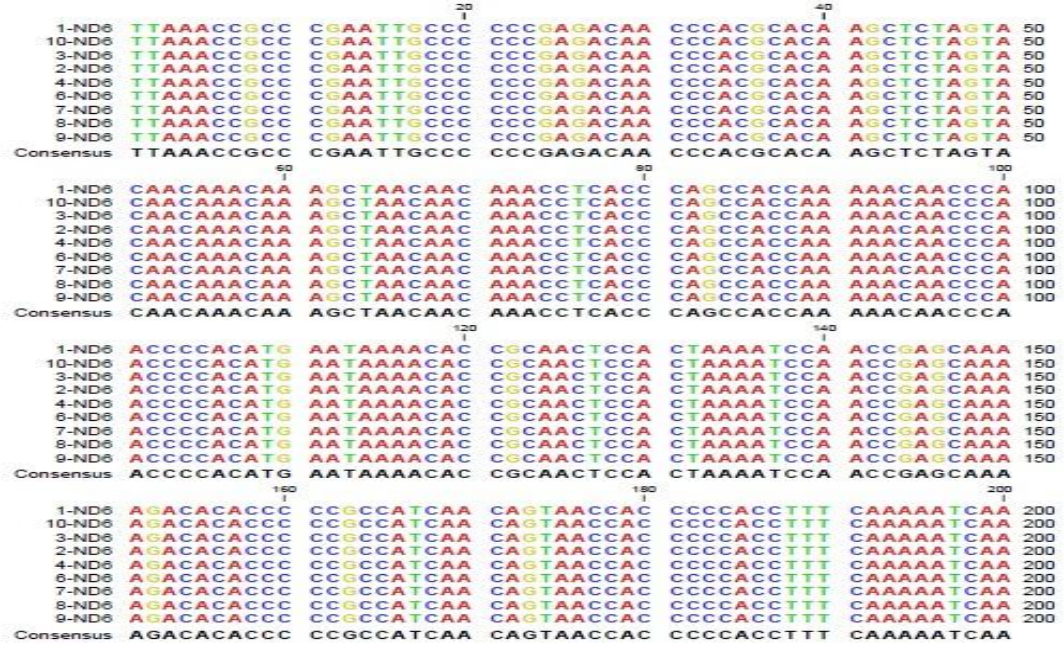
نتایج نشان دادند که تکثیر قطعه ۸۵۴ جفت بازی (ژن tRNA+ND6) از ژنوم میتوکندری مرغ خزک با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره ای پلیمراز به خوبی صورت گرفت (شکل ۱).

شکل۱. الکتروفورز قطعه ۸۵٤ جفت بازی از ژنوم میتوکندری(ND6+tRNA) بر روی ژل آگارز ۱ درصد.



توالی‌های نهایی بدست آمده به طول ۷۹۰ (tRNA+ND6) جفت باز شامل ۳۲/۲۴ درصد آدنین، ۱۰/۷۶ درصد گوانین، ۱۵/۹۵ درصد تیمین و ۳۰/۰۵ درصد سیتورین بود. نتایج بدست آمده از آنالیز همردیف‌سازی چندگانه نمونه‌های توالی‌یابی شده نشان دادکه هیچ تفاوت نوکلئوتیدی بین ۲۰ توالی ND6 مرغ بومی خزک وجود نداشته و جمعیت مورد مطالعه فقط دارای یک هاپلوتایپ بود (شکل ۲) .

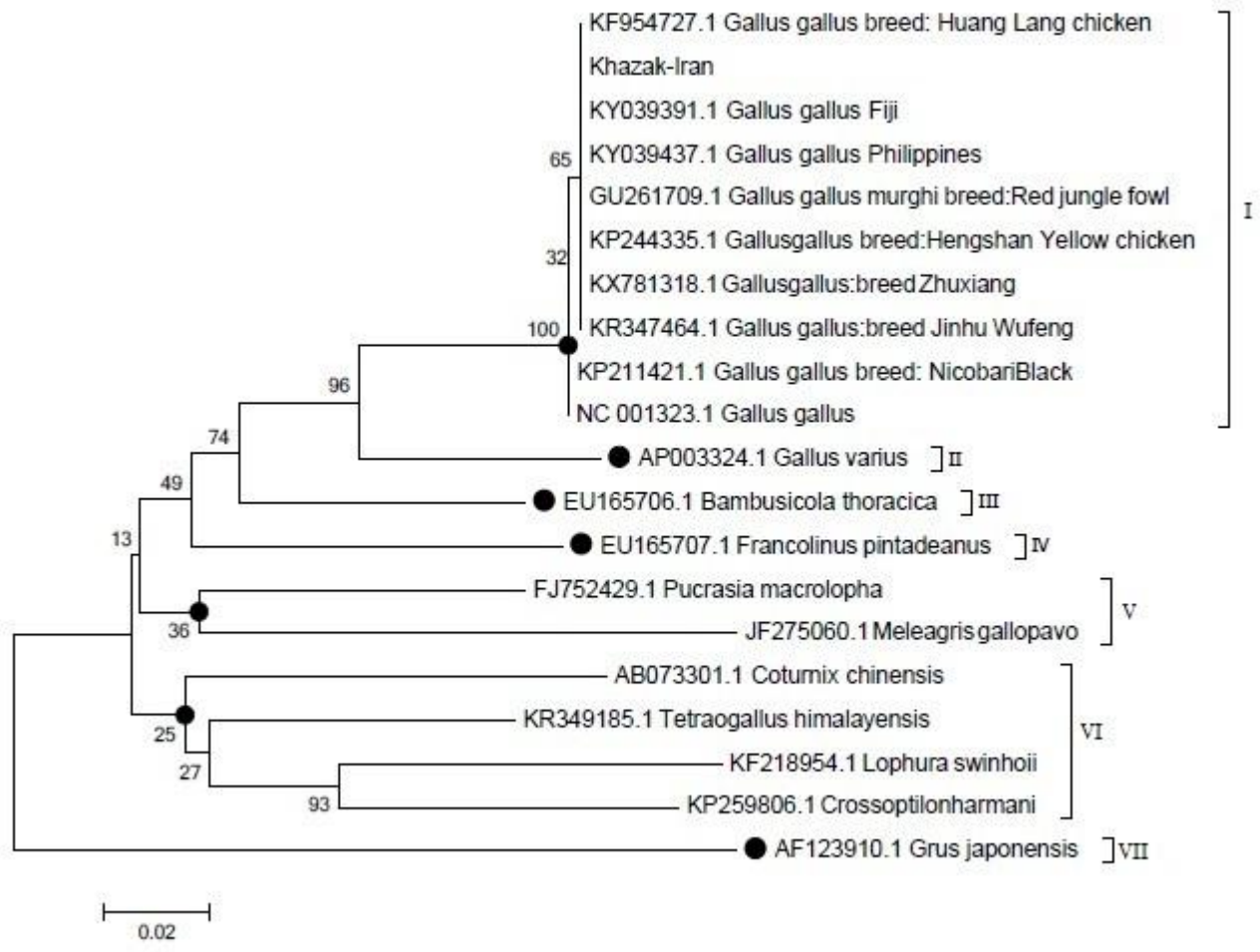
شکل۲. توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن ND6 حاصل از همردیف سازی چندگانه تعدادی از نمونه‌های توالی‌یابی شده ژنوم میتوکندری مرغ خزک.



علت پایین بودن تعداد هاپلوتایپ در نمونه‌های مورد مطالعه، ممکن است اولاً به دلیل کوچکی اندازه نمونه باشد، به نحوی که ممکن است نمونه مطالعه شده بیانگر سطح تنوع ژنتیکی واقعی در جمعیت اصلی مرغ‌های خزک سیستان نباشد و دوماً به نظر می‌رسد از آنجائیکه اندازه موثر جمعیت این مرغ بومی در کشور کم است، ایستگاههای تحقیقاتی به منظور حفظ این گونه‌ها از انقراض، مجبور به تلاقی مرغ‌های خویشاوند با هم هستند که این خود می تواند باعث کاهش چشمگیر تنوع ژنتیکی شود. بعلاوه لازم به ذکر است که نمونه‌های بدست آمده جهت انجام این مطالعه همگی از یک مرکز تحقیقاتی جمع‌آوری شده بودند که خود می تواند دلیلی برای کم بودن تعداد هاپلوتایپ در نمونه‌های مورد مطالعه باشد. همچنین در رابطه با عدم تنوع ژنتیکی این ناحیه از ژنوم می‌توان گفت ژنوم نواحی میتوکندری معمولاً محافظت شده هستند و نواحی محافظت نشده آن در ناحیه D-loop می‌باشد که این خود دلیلی بر عدم وجود تنوع ژنتیکی ناحیه ND6 از این مرغ بومی می‌باشد.

توالی نوکلئوتیدی مورد توافق ژن ND6 ژنوم میتوکندری مرغ بومی خزک با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI تحت فرایند BLAST و رویه BLASTN مورد مقایسه قرار گرفتند. در این پژوهش نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیک ژن ND6 مرغ بومی خزک با ۱۹ توالی ژنی ND6 از ژنوم میتوکندری نژاد مرغ‌ها و برخی از ماکیان در ۷ گروه نمایش داده شده است(شکل ۳).

شکل ۳. درخت فیلوژنتیک ژن ND6 از ژنوم میتوکندری مرغ بومی خزک و دیگر نژادها براساس روش Neighbor-Joining (اعداد روی شاخه‌ها نشان دهنده درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰۰ مرتبه نمونه‌گیری می‌باشد).



همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در گروه I مرغ بومی خزک در یک شاخه به همراه مرغ‌های هوانگ لانگ[8]، ژوسیانگ[9]، فیجی[10]، فلیپین[11]، هانگشان زرد[12]، جینو ووفنگ[13]، مرغ جنگلی قرمز[14] و مرغ اهلی قرار گرفت. Gallus Varius (پرنده سبز جنگلی) درگروه II، Bambusicola (پرنده کبک) درگروهIII،Francolinus pintadeanus (قرقاول) در گروه IV، pucrasia Macrolopha (بوقلمون) و Meleagris gallopavo (بوقلمون وحشی) در گروه V، chinensis Coturnix (بلدرچین)، himalayensis Tetrogallus (پرنده اسکیمو همیالیا)، Lophura swinhoil (پرنده قرقاول) و Crossoptilonharmani (قرقاول گوش تبتی) در گروه VII و Grus japonesis (پرنده ماهی خوار تاج قرمز) در گروه VIII به عنوان شاخه مجزا قرار گرفت.

با توجه به این که درصد تشابه نوکلئوتیدی با فاصله ژنتیکی بین دو حیوان رابطه عکس دارند. در نتیجه از شاخص فاصله ژنتیکی هم می‌توان برای تعیین دوری و نزدیکی ژنتیکی گونه‌های مختلف استفاده کرد. اعداد حاصل از فواصل ژنتیکی بین گونه‌های مختلف به صورت دو به دو است، در نتیجه این اعداد نمایانگر میزان جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی‌های گونه‌های مورد بررسی می-باشند و فاصله ژنتیکی بین دو گونه، با همبستگی فیلوژنتیکی بین گونه‌ها مرتبط خواهد بود. ماتریس فواصل ژنتیکی ژن ND6 ژنوم میتوکندری مرغ بومی خزک با دیگر نژادها نشان داد که مرغ بومی خزک ایران کمترین فاصله ژنتیکی را که معادل صفر است با نژادهای مرغ هوانگ لانگ، ژوسیانگ، فیجی، فلیپین، هانگشان زرد[15]، جینو ووفنگ[16]، مرغ جنگلی قرمز دارد و بیشترین فاصله ژنتیکی را که معادل ۲۲ می‌باشد با پرنده ماهی خوار تاج قرمز دارد (جدول ۲).

[8] Huang Lang
[9] Zhuxiang
[10] Fiji
[11] Philippines
[12] Hengshan Yellow
[13] Jinhu Wufeng
[14] Red jungle fowl
[15] Hengshan Yellow
[16] Jinhu Wufeng

جدول ۲. فواصل ژنتیکی و درصد تشابه نوکلئوتیدی ژن ND6 از مرغ بومی خزک با دیگر نژادها.

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	92.2	89.8	100.0	100.0	81.3	87.0	87.8	86.5	83.9	85.4	84.1	83.9	99.8	1
2	0.0		100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	92.2	89.8	100.0	100.0	81.3	87.0	87.8	86.5	83.9	85.4	84.1	83.9	99.8	2
3	0.0	0.0		100.0	100.0	100.0	99.8	92.2	89.8	100.0	100.0	81.3	87.0	87.8	86.5	83.9	85.4	84.1	83.9	99.8	3
4	0.0	0.0	0.0		100.0	100.0	99.8	92.2	89.8	100.0	100.0	81.3	87.0	87.8	86.5	83.9	85.4	84.1	83.9	99.8	4
5	0.0	0.0	0.0	0.0		100.0	99.8	92.2	89.8	100.0	100.0	81.3	87.0	87.8	86.5	83.9	85.4	84.1	83.9	99.8	5
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.8	92.2	89.8	100.0	100.0	81.3	87.0	87.8	86.5	83.9	85.4	84.1	83.9	99.8	6
7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		92.4	90.0	99.8	99.8	81.5	87.2	88.0	86.7	84.1	85.2	83.9	84.1	100.0	7
8	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.2		88.9	92.2	92.2	82.0	87.2	88.0	87.0	83.5	86.1	83.0	83.7	92.4	8
9	11.2	11.2	11.2	11.2	11.2	11.2	11.0	12.2		89.8	89.8	82.2	87.6	88.7	87.4	84.3	86.1	85.6	84.8	90.0	9
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	8.4	11.2		100.0	81.3	87.0	87.8	86.5	83.9	85.4	84.1	83.9	99.8	10
11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	8.4	11.2	0.0		81.3	87.0	87.8	86.5	83.9	85.4	84.1	83.9	99.8	11
12	22.0	22.0	22.0	22.0	22.0	22.0	21.7	21.4	21.4	22.0	22.0		80.7	80.4	82.6	79.3	79.7	81.0	78.9	81.1	12
13	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.3	14.2	13.6	14.5	14.5	22.0		86.1	88.9	86.3	86.5	86.3	86.3	87.2	13
14	13.6	13.6	13.6	13.6	13.6	13.6	13.3	13.2	12.4	13.6	13.6	22.9	15.6		87.8	84.8	86.7	85.2	85.2	88.0	14
15	15.1	15.1	15.1	15.1	15.1	15.1	14.8	14.5	13.9	15.1	15.1	19.7	12.2	13.4		87.0	88.0	87.4	83.9	86.7	15
16	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5	18.2	19.0	17.8	18.5	18.5	24.8	15.4	17.4	14.5		84.3	88.2	83.7	84.1	16
17	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.8	15.6	15.6	16.5	16.5	23.6	15.0	14.8	13.2	17.8		85.4	82.1	85.2	17
18	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.5	19.5	16.1	18.2	18.2	22.3	15.5	16.8	14.1	13.2	16.4		83.9	83.9	18
19	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5	18.2	18.7	17.2	18.5	18.5	24.2	15.3	16.7	18.5	18.7	20.7	18.5		84.1	19
20	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	8.2	11.0	0.2	0.2	21.7	14.3	13.3	14.8	18.2	16.8	18.5	18.2		20
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	

1	KX781318.1
2	KR347464.1
3	KP244335.1
4	GU261709.1
5	KY039437.1
6	KY039391.1
7	KP211421.1
8	AP003324.1
9	EU165706.1
10	KF954727.1
11	Khazak-Iran
12	AF123910.1
13	FJ752429.1
14	EU165707.1
15	KR349185.1
16	KF218954.1
17	AB073301.1
18	KP259806.1
19	JF275060.1
20	NC_001323.1

نتایج پژوهش Oka و همکاران (۲۰۰۷) بر روی توالی ژنوم میتوکندری مرغ‌های بومی ژاپن نشان داده شد که مرغ‌های کره‌ای و چینی از جنوب شرق آسیا منشأ یافته‌اند. به دنبال اهلی شدن مرغ جنگلی قرمز یک نوع مرغ غیر جنگی توسعه یافت و به چین گسترش یافت. هر دو نوع مرغ غیر جنگی و جنگی پایه و اساس جوجه های بومی ژاپن را تشکیل می دهند.

در مطالعه‌ای که توسط Hu و همکاران (۲۰۱۶) بر روی DNA کامل میتوکندری مرغ بومی سیاه qionglai چین انجام شد نتایج نشان داد که این مرغ بومی با مرغ جنگلی قرمز و لگهورن سفید بیشترین قرابت ژنتیکی را دارد . این محققان اظهار داشتند که این نژاد بومی برای تولید تخم مرغ مناسب است. در مطالعه‌ای دیگر که توسط Osman و همکاران (۲۰۱۶) بر روی تنوع ژنتیکی مرغ‌های بومی مصر بر مبنای توالی‌یابی ناحیه D-loop از ژنوم میتوکندری انجام شد نتایج درخت فیلوژنتیک نشان داد که مرغ-های افریقای مرکزی (کامرون و سودان) با مرغ‌های شرق و مرکز آسیا و اروپایی بیشترین قرابت ژنتیکی و مرغ‌های افریقای غربی (کنیا، مالاوی و زیمبابوه) با مرغ‌های منطقه اقیانوس آرام بیشترین قرابت ژنتیکی را دارند.

نتایج حاصل از مطالعه تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنتیک که بر روی ژنوم میتوکندری نژاد مرغ بومی زرد ژنگیانگ[17] (چین) انجام شد حاکی از آن بود که این مرغ بیشترین قرابت را با مرغ-های هوانگ لانگ ، لگهورن و پلیموت راک سفید و کمترین قرابت را با بلدرچین دارد (Liu و همکاران، ۲۰۱۸).

نتایج پژوهش حاضر با نتایج Hu و همکاران (۲۰۱۶)، Liu و همکاران (۲۰۱۸) و همچنین با مطالعه ابراهیم زاده و همکاران (۱۳۹۵) که نشان دادند ژنوم میتوکندری مرغ بومی خزک با نژادهای مرغ اهلی و نژادهای مرغ در کشور چین و ژاپن قرابت بیشتری دارد مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

در این مقاله برای اولین بار ژن ND6 از ژنوم میتوکندری مرغ خزک توالی‌یابی شد و توالی این ژن با توالی‌های نوکلئوتیدی ND6 از دیگر پرندگان مورد مورد مقایسه قرار گرفت. مطالعه بر روی این گونه نژادهای بومی که دارای خصوصیات ژنتیکی باارزش و پایداری می‌باشد دارای اهمیت می‌باشد و می‌توانند به عنوان یک بانک ژن برای پرورش و ایجاد نژادهای جدید مورد استفاده قرار گیرد. فقدان تنوع ژنتیکی در مرغ‌های بومی خزک در

[17] Zhengyang yellow chicken

این مطالعه می‌تواند نشان دهد که نیاز به استفاده از برنامه اصلاح نژادی باشد که به کنترل مسئله خویشاوندی و هم خونی در این مرغ بومی کمک کند . برای تأئید نتایج این مطالعه استفاده از تعداد نمونه بیشتر، جمع‌آوری نمونه از ایستگاه‌های تحقیقاتی مختلف و یا توالی‌یابی قسمت محافظت نشده ژنوم میتوکندری (ناحیه D-Loop) از این جمعیت بومی پیشنهاد می‌شود. همچنین می‌توان شرایط پرورشی متفاوتی را اعمال کرد و بیان ژن مورد نظر را در این جمعیت بومی اندازه‌گیری کرد.

منابع

ابراهیم‌زاده اله آباد ا، شهابی ا، پزشکیان ز. (۱۳۹۵). تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه سیتوکروم b در مرغ خزک سیستان. مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. شماره ۵، ص ص. ۱۸۶-۱۷۹.

اصغری مقدم م (۱۳۹۳) بررسی خصوصیات چند نژاد دامی سیستان نسبت به سایر نژادهای دامی ایران. اولین کنفرانس بین المللی یافته‌های نوین در علوم کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست، ایران، تهران.

نجم الدینی ر، داشاب غ، وفای واله م، مرادی کر. (۱۳۹۷). مطالعه روابط تکاملی و فیلوژنتیکی ژن گلوتاتیون پراکسیداز - ۱ در جمعیت‌های مرغ خزک و راس ۳۰۸، مجله تولیدات دامی. شماره ۲۰، ص ص. ۲۴۱-۲۲۵.

Bai, Y. and Attardi, G. (1998). The mtDNA-encoded ND6 subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase is essential for the assembly of the membrane arm and the respiratory function of the enzyme. *The EMBO Journal*.17:4848–4858.

Bao, H., Zhao, C., Li, J., Wu, C. (2008) Sequencing and alignment of mitochondrial genomes of Tibetan chicken and two lowland chicken breeds. *Science China Life Sciences*. 51: 47-51.

Bellagamba, F., Moretti, V.M., 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.

DiMauro, S. (2004). Mitochondrial diseases. *BiochimicaetBiophysicaActa*.1658:80-88.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *In Nucleic acids symposium series.* 41: 95-98. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.

Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R., Janke, A. (1998). The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *Journal of Molecular Evolution*. 47:441-448.

Hu, Y., Zhu, Y., Pang, H. and Lan, D. (2016). Complete mitochondrial DNA and phylogenetic study of qionglai native black chicken. *In MATEC Web of Conferences*.62: 03004. EDP Sciences.

Khodabakhshzadeh, R., Mohammadabadi, M.R., Esmailizadeh Koshkoieh, A., Moradi-Shahrebabak, H., Ansari Namin, S. (2015). Study of mutations available in first-halfexon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep born from crossing of Romanov rams with Kermani ewes. *Iranian Journal of Animal Science Research.* 6: 395-403.

Knudsen, B., Knudsen, T., Flensborg, M., Sandmann, H., Heltzen, M., Andersen, A., Dickenson, M., Bardram, J., Steffensen, P., Mønsted, S., Lauritzen, T., Forsberg, R., Thanbichler, A., Jannick, D., Görlitz, L., Rasmussen, J., Tordrup, D., Værum, M., Nygaard, M., Hachenberg, C., Fisker, E., Dekker, P., Schultz, J., Hein, MK., Sinding, J.(2007). CLC Main Workbench. Version 5.5.Aarhus, Denmark, CLC bio.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*. *33*:1870-1874.

Liu, L.L., Yang Y.Q., Liu Y.T., Yang, N., Xie, D., Zhen, H. (2018). Complete mitochondrial genome sequence of Zhuxiang chicken (*Gallusgallus*. *domesticus*) and its phylogenetic analysis from D-loop region. *Mitochondrial DNA Part B*. 3: 874-875.

Meadows, J.R.S., Hiendleder, S. and Kijas, J.W. (2011). Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. *Heredity*. 106: 700-706.

Mohammadi, A., Nassiry, M.R., Mosafer, J., Mohammadabadi, M.R., Sulimova, G.E. (2009). Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (Bosindicus). *Russian Journal of Genetics*. 45: 198-202.

Oka, T., Ino, Y., Nomura, K., Kawashima, S., Kuwayama, T., Hanada, H., Amano, T., Takada, 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.

Osman, S.A.M., Yonezawa, T. and Nishibori, M. (2016). Origin and genetic diversity of Egyptian native chickens based on complete sequence of mitochondrial DNA D-loop region. *Poultry science*. *95*:1248-1256.

Smeitink, J., van den Heuvel, L., DiMauro, S. (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nature Reviews Genetics*. 2: 342-352.