نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۰، پاییز ۱۳۹۷
ص‌ص: ۱۸۷~۱۹۶

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

- **زهرا کرمی**
دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک واصلاح 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 برنامه های اصلاح نژاد محسوب میشوند. جهت حفظ و حمایت از این ذخایر ژنتیکی نیاز به شناسایی تنوع ژنتیکی انها می باشد. از جمله مکانهای ژنومی که جهت مشخص شدن تنوع ژنتیکی و تکاملی گونه ها استفاده می شود ژنوم میتوکندری می باشد. 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 خالص سازی 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 هاپلوتیپ بدست آمد که با کد دسترسی KF957610 وKF957611 و kF957612 در بانک جهانی ژن ثبت گردید. پس از اخذ توالی‌های مشابه ژنوم میتوکندری دیگر نژادهای موجود در بانک ژن و مرغ مرندی 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 مرندی، مازندرانی، مرغ بومی کشور آذربایجان، پلیموت راک پرخطدار، مرغ ابریشمی و مرغ جنگلی خاکستری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ناحیه D-loop، هاپلوتیپ، 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 Karami[1], N Pirany[2*], B Shiran[3]
[1]MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Iran.
[2]Associated professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Iran.
[3]Professor, 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 phylogenic tree was drawn. Phylogenic 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

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 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 تفاوت-های موجود در سطح مولکولDNA استفاده می‌شود. یکی از این

روش‌ها، استفاده از ژنوم میتوکندریایی[1] است که به عنوان یک منبع مهم از اطلاعات ژنتیکی برای پی‌گیری جد نژادها تا صدها نسل قبل مطرح شده است (Cuc و همکاران، ۲۰۱۱). میتوکندری 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 (Wallce ، ۱۹۹۲). ژنوم میتوکندری 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 وهمکاران، ۱۹۸۱).

ژنوم میتوکندری 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 کنترلی[2] کاملا" مشخص تقسیم می‌شود قطعه HVR-I[3] 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 (Sultana و Mannen ، ۲۰۰۴). اولین توالی کامل ژنوم میتوکندری 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 وMorais، ۱۹۹۰). استفاده از نواحی کنترلی میتوکندری 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 وهمکاران، ۱۹۹۴). از آن زمان تاکنون مطالعات بر پایه توالی ژنوم میتوکندری سرعت یافته است. ناحیه D-loop میتوکندری ۲۰ نژاد مرغ بومی ژاپنی و همچنین لگهورن سفید، ردآیلند، مرغان بومی اندونزیایی به طول ۱۲۳۲-۱۲۳۱ جفت باز بررسی و روابط فیلوژنتیک و مسیر و منشأ مادریشان مورد بررسی قرار گرفت که در این مطالعه ۴۲ هاپلوتیپ در ۷ هاپلوگروه 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 راتشکیل داده‌اند (Oka و همکاران، ۲۰۰۷). در تحقیقی که به منظور تجزیه و تحلیل ناحیه HVR-I میتوکندری مرغ بومی مرندی ایران انجام گرفت، تعداد ۶ هاپلوتیپ مشخص شد. نتایج فیلوژنی مشخص کرد که مرغ بومی مرندی 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 مرندی و بومی کشور آذربایجان و همچنین مشابهت ژنتیکی مرغ مرندی 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 میتوکندریایی مورد بررسی و در نهایت ۶ هاپلوتیپ در ۱۰ جایگاه تک شکل شناسایی شد. نتایج فیلوژنی مشخص کرد که مرغان بومی مازندران با مرغ مرندی 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 احتمالا" 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 میتوکندریایی مرغان بومی سودان توالی یابی شد ومشخص گردید که مرغان بومی و گونه گالوس گالوس یک جفت توالی تکراری با ۱۴ واحد باز در دو رونوشت دارند و ۲ هاپلوتیپ C و T در این مرغ‌ها پیدا شد. این نتایج نشان داد که نژادهای مرغان بومی به *Gallus gallus* و هم چنین *G. g. spadice* و *G. g. bankiva* ربط دارند. در تحقیقی دیگری که روی۵۰۶ جفت باز از ناحیه D-loop میتوکندریایی ۵ گونه مرغ ایتالیایی صورت گرفت، ۱۸ جایگاه تک شکل در ۱۲ هاپلوتیپ شناسایی شد و نتایج نشان داد که ۹۰٪ هاپلوتیپ ها به

گروه E مربوط بودند که منشأ آنها شبه قاره هند می باشد (Ceccobelli و Lorenzo، 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 نسبتا بلند، و رنگ پر اغلب در واریته های 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 می-باشند. 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 می باشد (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 اسپکتوفتومتر و کیفیت آن توسط الکتروفورز و روی ژل ۰/۸درصد تعیین شد.

انتخاب آغازگرها و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

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 (ساخت شرکت MWG آلمان).

F (5'-GGCTTGAAAAGCCATTGTTG-3')
R (5'-CCCCAAAAAGAGAAGGAACC-3')

با استفاده ازمخلوط Taq شروع گرم[۴] (شرکت کیاژن آلمان) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۶ پیکومول از هر آغازگر، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت. برنامه حرارتی شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه دمایی با دمای واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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 پلیمراز 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 ۴۵۵-۱ جفت باز قرارداشتند بنابراین همین تعداد مبنای مقایسه توالی‌ها قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل توالی ها

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 هاپلوتیپ ها 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

هـای حاصـله از همـین ناحیـه از دو نـژاد مازنـدرانی (پیرانـی و همکاران، ۱۳۸۸) و مرندی (محمدی و همکاران، ۱۳۹۰) به کمک نرم افزار MEGA5 (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) توسط رویه NJ[۵] بـر پایـه ML[۷] همردیـف شـدند و درخـت فیلـوژنی مربوطـه جهت تعیین نزدیکی هاپلوتیپ های این سه نژاد رسم شد. به همین روش توالی کلی (جامع) مرغ لاری با دیگر توالی های موجـود در بانک جهـانی ژن (NCBI، ۲۰۱۰) همردیـف و درخـت فیلـوژنی مربوطـه رسـم شـد. هاپلوتیـپ هـای بدسـت آمـده توسـط برنامـه Sequin در پایگاه اطلاعاتی (۲۰۱۰) NCBI ثبت گردید.

نتایج و بحث

توالی یابی در ۲۱ نمونه به خوبی انجام گرفـت و در مـابقی نیـز بـه دلیل کیفیت پایین توالی و یا هتروپلاسمی از مجموعه داده‌ها کنـار گذاشته شدند. پس از همردیف کردن توالی‌های حاصله در منطقه HVR-I و حذف نقاط ناخوانا یک ناحیه به طول ۴۵۵ جفت بـاز که بیشترین تغییرت نوکلئوتیدی در آن ناحیـه قـرار داشـتند مبنـای مقایسه توالی های بدست آمده قرار گرفت. پـس از مقایسـه تعـداد ۲۱ توالی حاصله، تعداد ۳ هاپلوتیپ از بین توالی‌های مورد بررسی تعیین شد که دارای ۵ جایگـاه چندشـکل (SNP) بودنـد (جـدول ۱).

تمام جایگاههای چند شکل مشاهده شده در نتیجـه تغییـرات درون بازهای پـورینی و پیریمیـدنی بـه همـدیگر حاصـل شـده بـود. ایـن تغییرات به طور عمده از شماره ۱۹۹ تا ۴۴۶ مشاهده شـد. بیشـترین فراوانی نسبی هاپلوئیدی مربوط به هاپلوتیپ اول بود که در حدود ۷۶/۲ درصـد از مـوارد را شـامل مـی‌شـد (جـدول ۱).

جدول۱- هاپلوتیپ ها و موقعیت SNP های بدست آمده در نمونه های مرغ لاری به تفکیک جنسیت

موقعیت SNP بر حسب جفت باز					میزان فراوانی		
۴۴۶	۳۰۶	۲۸۱	۲۱۷	۱۹۹	فراوانی در مرغها	فراوانی در خروسها	جمع فراوانی (درصد)	شماره هاپلوتیپ
T	T	A	C	C	۸	۸	۱۶ (۷۶/۲)	۱
T	T	A	C	T	۰	۳	۳ (۱۴/۳)	۲
C	C	G	T	T	۲	۰	۲ (۹/۵)	۳

از آن‌جا که تعداد جایگاه چند شکل به تعداد نمونه وابسته می‌باشد لذا از پارامتر دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی استفاده شد که به طـول DNA و اندازه نمونه بستگی ندارد و متوسط تفاوت نوکلئوتیـدی بـین دو تـوالی در هـر جایگـاه مـی‌باشـد (Nei، ۱۹۸۷). تنـوع نوکلئوتیدی در مرغ لاری ۰/۰۰۱۸۵±۰/۰۰۲۴۳۳ تخمـین زده شـد که این مقدار در محدوده مقداری است (۰/۰۱۹-۰/۰۰۲) که برای موجودات یوکاریوت ذکر شده است (Nei ، ۱۹۸۷). مقدار تنـوع هاپلوتیپی در جمعیت حاضر ۰/۱۲۰۵±۰/۴۰۹۵ برآورد شد که این عـدد در محـدوده گـزارش شـده (۰/۷۸-۰/۲۹) بـرای لاینـهـای گوشتی تجاری است (Muchadeyi و همکـاران، ۲۰۰۸). میـزان تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوئیدی بدست آمده در مرغ لاری بیشـتر از مقادیر بدست آمده در مرغان مازندرانی و مرندی بود (جدول ۲).

جدول۲- مقایسه درصد نوکلئوتیدهای ناحیه کنترل HRV-I و تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هپلوئیدی مرغ لاری با سایر گزارشات

نژاد مرغ	تعداد نمونه	تعداد هاپلوتیپ	درصد نوکلئوتیدی A	G	C	T	تنوع نوکلئوتیدی±SD	تنوع هاپلوئیدی±SD
مرغ اهلی	–	–	۲۶/۷	۱۳/۳	۲۶/۳	۳۳/۷	–	–
مرغ لاری	۲۱	۳	۲۹/۲۲	۱۲/۹۹	۲۷/۶۵	۳۰/۱۵	۰/۰۰۲۴۳±۰/۰۰۱۸۵	۰/۴۰۹۵±۰/۱۲۰۵
مرغ مازندرانی	۱۹	۶	۲۹/۲	۱۳/۱	۲۷/۶	۳۰/۲	۰/۰۰۵۱±۰/۰۰۳۲	۰/۷۴۰۰±۰/۰۰۸۵
مرغ مرندی	۱۰	۵	۲۶/ ۴۱	۱۳/۴۳	۲۶/ ۷۱	۳۳/۴۳	۰/۰۱۱۵±۰/۰۰۶۸۹	۰/۸۲۰۰±۰/۰۹۶۹

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.

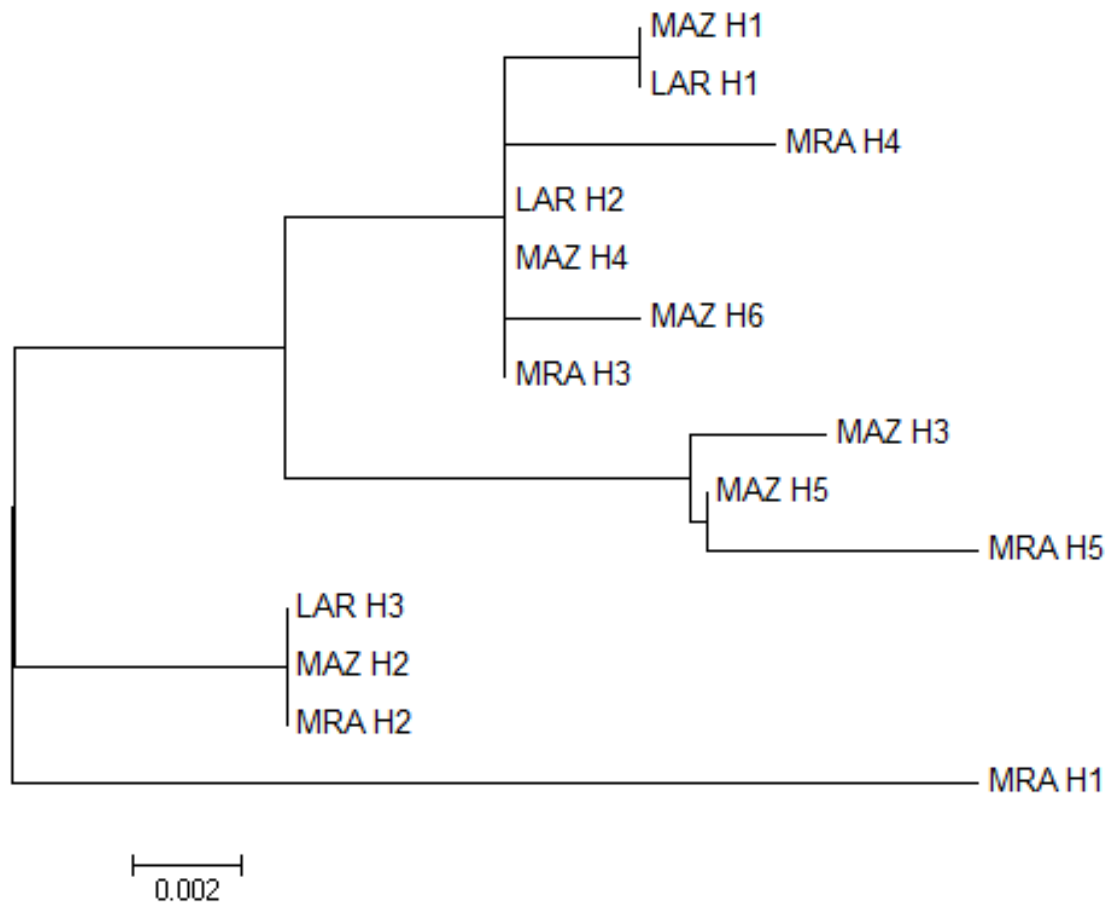
در نهایت هاپلوتیپ‌های بدست آمده با کد دسترسی KF957610و KF957611 وKF957612 در بانک جهانی ژن ثبت گردید (NCBI،۲۰۱۰) و سپس توالی کلی این نژاد با استفاده از هاپلوتیپ‌های بدست آمده تعیین شد. نمودار فیلوژنی توالی یخش HVR-I ناحیه D-loop مرغ لاری با دیگر توالی-های مرغ مازندرانی و مرندی ثبت شده در بانک جهانی ژن رسم و مشخص شد که هاپلوتیپ شماره ۱ لاری با هاپلوتیپ شماره ۱ مازندرانی و هاپلوتیپ شماره ۲ لاری با هاپلوتیپ شماره ۳ و ۴ مرندی و هاپلوتیپ شماره ۴ و ۶ مازندرانی نزدیکی بیشتری دارد و همچنین هاپلوتیپ شماره ۳ لاری با هاپلوتیپ شماره ۲ مرندی و هاپلوتیپ شماره ۲ مازندرانی نیز نزدیکی بیشتری دارد و این نتایج نشان می‌دهد که هر سه هاپلوتیپ مورد مطالعه در نژاد لاری واجد شرایط ژنتیکی مشابه با دو گونه بومی ثبت شده در بانک ژن می-باشند (شکل ۱).

شکل۲ نمودار فیلوژنی توالی بخش HVR-I ناحیه D-loop مرغ لاری با دیگر توالی‌های 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 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.

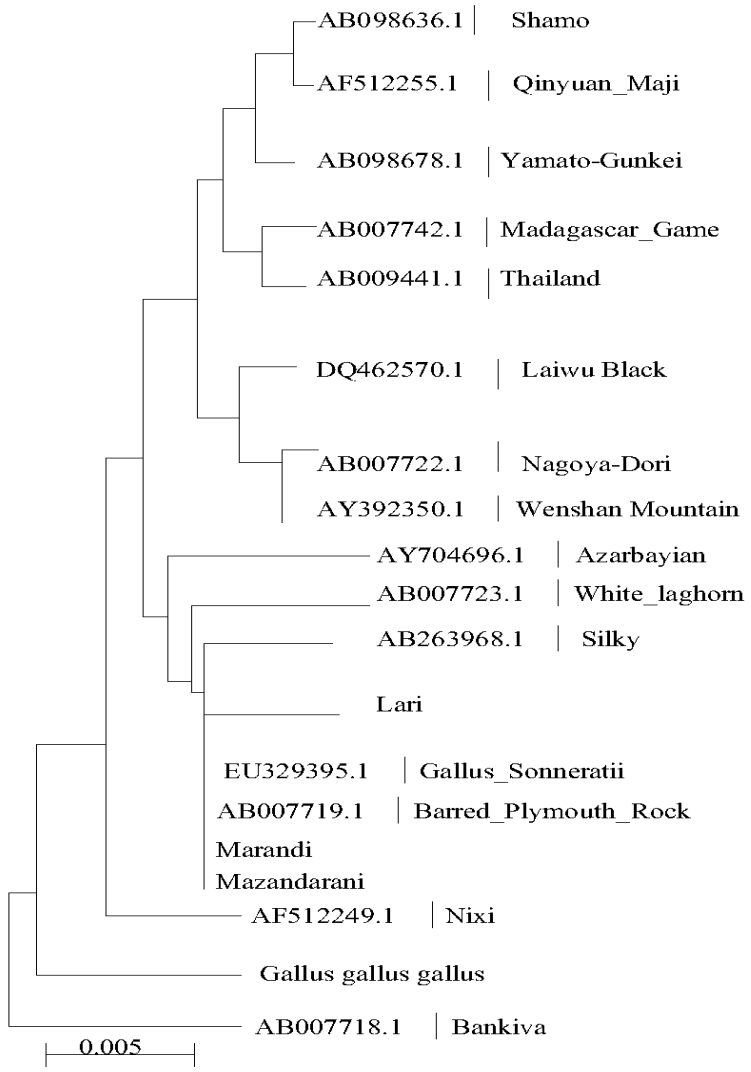
نتیجه‌گیری

توالی ناحیه HVR-I در مرغ لاری با مرغ مازندرانی، مرغ مرندی ایران، لگهورن سفید، پلیموتراک پرخط‌دار، پلیموتراک سفید، نیوهمپشایر 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 می‌توان 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 می‌تواند در جهت شناسایی این نوع نژادها به متخصصان اصلاح نژاد کمک شایانی نماید. از طرفی به علت بالا بودن شدت انتخاب در گله

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



شکل۱- نمودار فیلوژنی (نمودار درختی N-J) ترسیم شده با استفاده از توالی ۳ هاپلوتیپ مربوط به مرغ لاری (LAR)، ۵ هاپلوتیپ مربوط به مرغ مرندی (MRA) و ۶ هاپلوتیپ مربوط به مرغ مازندرانی (MAZ)



شکل۲- 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 می‌آید.

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

پیرانی، ن. محمد هاشمی، آ. علیجانی، ص. رضازاده گلی، ر. و قنبری، ص. (۱۳۸۸). تجزیه و تحلیل ملکولی 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 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/.

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.

Wallce, 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