نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۷ شماره ۲/ سال۱۳۹۶/ صفحات ۱۳۳ تا ۱۴۱

بررسی ناحیه HVR-III ژنوم میتوکندری گوسفندان ایرانی با روش توالی‌یابی

علی جوادمنش*[1]، محمد رضا نصیری[1] و مرجان ازغندی[2]

تاریخ دریافت: ۹۵/٤/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۵

[1] به ترتیب استادیار و استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[2] دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* مسئول مکاتبه: Email: javadmanesh@um.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: کشور ایران جزء یکی از محدود مناطقی است که کشاورزی و اهلی شدن حیوانات توسط انسان‌های اولیه در آن اتفاق افتاده است و در نتیجه باعث شده است که ایران دارای ذخایر ژنتیکی ارزشمندی در حیوانات اهلی باشد. از طرفی ایران با داشتن بیش از ۲۷ نژاد گوسفند اهلی به همراه ۵ زیرگونه گوسفند وحشی، دارای ذخیره ژنتیکی با تنوع کم نظیری در دنیا می باشد. **هدف**: هدف از انجام این تحقیق توالی‌یابی ناحیه HVR-III از ژنوم میتوکندری گوسفندان اهلی نژاد مغانی، لری‌بختیاری، سنگسری، بلوچی، کرمانی، شال، قره‌گل و کردی به منظور بررسی ارتباط فیلوژنیک بین نژادهای مذکور و همچنین مقایسه با هاپلوتایپ‌های شاخص شناسایی شده گوسفند اهلی می‌باشد. **روش کار**: برای این منظور تعداد ۸۰ نمونه خون جمع‌آوری و پس از استخراج DNA، ناحیه موردنظر توسط پرایمرهای اختصاصی به روش PCR تکثیر و سپس توالی‌یابی شدند. **نتایج**: با تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تعیین توالی و مقایسه توالی HVR-III گوسفندان ایرانی با یکدیگر و با توالی ناحیه مشابه از ژنوم گوسفندان سایر نژادها، مشخص شد که علیرغم تنوع فنوتیپی قابل توجه در بین نژادهای مورد مطالعه، این نژادها همگی متعلق به گروه هاپلوتایپی A می‌باشد. این امر ممکن است به دلیل نزدیکی جغرافیایی مکان زیستی آن ها و یا به دلیل روش خاص زندگی عشایر باشد که انتظار می رود نژادهای متنوع امروزی ایران از توده های محدودی با تنوع نسبتا کم مشتق شده باشند. **نتیجه گیری نهایی**: نتیجه گیری کامل تر نیازمند مطالعه بخش‌های بزرگتری از DNA میتوگندری و همچنین بر روی تعداد بیشتر نمونه از نژادهای اهلی به همراه مطالعه تنوع نژادهای وحشی گوسفند ایران است.

واژگان کلیدی: ناحیه HVR-III، گوسفند ایرانی، هاپلوتایپ A، ژنوم میتوکندری

مقدمه

استفاده از ژنتیک ملکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (قیاسی و همکاران ۲۰۰٦) همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد به طور موثری پیشرفت ژنتیکی را تسریع می‌کند (جوانمرد و همکاران ۲۰۰۸ و نصیری و همکاران ۲۰۰۸ و ۲۰۱۰). مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی لازم و ضروری است (کریمی و همکاران ۲۰۱٦). بالغ بر ۲۷ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده‌اند. در حال حاضر، تولید گوشت مهمترین دلیل پرورش گوسفند در ایران است و تولیدات

دیگر مانند پشم، شیر و پوست در درجات بعدی اهمیت قرار دارند (ستایی مختاری و همکاران ۲۰۰۹). گوسفند اهلی از زمان انقلاب نوسنگی به بعد (حدود ۸۰۰۰ تا ۹۰۰۰ سال پیش) به عنوان یک منبع تامین کننده غذا و پشم، نقش بسیار مهمی را در تامین مایحتاج زندگی مردم داشته‌است (رایدر ۱۹۸٤).

مطالعات مختلف انجام شده بر روی ژنوم میتوکندری گوسفندان، وجود ٥ گروه هاپلوتایپی را با توجه به مناطق جغرافیای مختلف در گوسفندهای اهلی نشان داده اند (HA, HB, HC, HD و HE). هاپلوتایپ HD و HE جزو کمیاب ترین‌ها و مربوط به گوسفندان مناطق قفقاز و ترکیه می‌باشند (تاپیو و همکاران ۲۰۰٦، میدوس و همکاران ۲۰۰۷)، پس از آن‌ها، کمترین پراکنش مربوط به هاپلوگروپ HC، مربوط به مناطق آسیا، هلال حاصلخیز، قفقاز و شبه‌جزیره ایبری است (پریرا و همکاران ۲۰۰٦، تایپو و همکاران ۲۰۰٦)؛ HA و HB نیز جزو شناخته-ترین هاپلوتایپ‌ها هستند و برای اولین بار توسط وود و فوآ در سال ۱۹۹٦ ثبت و توسط هایندلدر و همکاران (۱۹۹۸) طبقه بندی شدند و امروزه در اکثر مناطق جغرافیایی وجود دارند (میدوس و همکاران ۲۰۱۱).

این پنج هاپلوتایپ، عموما بر اساس بررسی‌های انجام شده بر روی ژنوم میتوکندری گوسفندان مناطق جغرافیایی مختلف، خصوصا ناحیه کنترلی و ژن Cytb، تعریف شده‌اند (بندلت و همکاران ۲۰۰٦).

امروزه روش‌های مولکولی، مانند توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی ترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک بهم محسوب می‌شود (برفورد و همکاران ۲۰۰۳، میدواس و همکاران ۲۰۱۱). در طول بیست سال گذشته DNA میتوکندری و بخصوص ناحیه کنترلی[۱] (D-Loop) و Cytb در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته و مطالعات تکاملی گسترده‌ای بر روی گونه‌های مختلف حیوانات از قبیل گاو (اندرسون و همکاران ۱۹۸۲)، گوسفند (میدواس و همکاران ۲۰۱۱)، بز (سلطانا و مانن ۲۰۰٤)، اسب (بیجی و همکاران ۲۰۱٤) و شتر (ازغندی و همکاران ۲۰۱۷)، صورت گرفته است. به‌دلیل انتقال ژنوم میتوکندری از طرف مادری بصورت مستقیم به همه فرزندان، جهت تشخیص انساب و بررسی ارتباط خویشاوندی و اجدادی از ژنوم میتوکندری استفاده می‌شود (اندرسون و همکاران ۱۹۸۱).

DNA میتوکندری دارای یک ناحیه غیرکد شونده و نواحی کد شونده متشکل از ۳۷ ژن شامل ۱۳ پروتئین می‌باشد. ناحیه غیرکد شونده (ناحیه کنترلی) منطقه‌ای در ژنوم میتوکندری است که ژن رمز کننده پروتئین نداشته و جهش می‌تواند در آنجا تجمع یابد. این ناحیه به سه ناحیه کنترلی کاملا مشخص تقسیم می‌شود؛ ناحیه کنترلی I (HVR-I) در انتهای '۳، ناحیه کنترلی III (HVR-II) در انتهای '٥ و ناحیه کنترلی II (توالی حفاظت شده HVR-III) در بین دو ناحیه I وIII، که این نواحی دارای بالاترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی در افراد مختلف هستند (سلطانا و مانن ۲۰۰٤). میدواس و همکاران ۲۰۱۱، با محاسبه شاخص پارتیشن بندی شده بریمر[۲] (PBS) نشان دادند که استفاده از ناحیه کنترلی به منظور انجام مطالعات فیلوژنتیک در نژادهای مختلف گوسفند می‌تواند نتایج دقیقی را ارایه دهد (میدواس و همکاران ۲۰۱۱).

اگر چه پژوهش‌های مولکولی زیادی در مورد گوسفندان و بزهای ایرانی انجام شده است (هادی‌زاده و همکاران ۲۰۱٤، سوفی و همکاران ۲۰۰۹، محمدآبادی و ساتی-مختاری ۲۰۱۰، علینقی‌زاده و همکاران ۲۰۱۰)، که به تنوع نژادهای گوسفند اهلی در ایران و اهمیت نگهداری خلوص نژادهای بومی اشاره شده است، ولی اطلاعات مولکولی کافی در زمینه ژنوم میتوکندریایی وجود ندارد، بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی تنوع هاپلوتایپی نژادهای گوسفندان بومی ایران بر اساس توالی‌یابی و تجزیه و

[۱] control region

[۲] Partitioned Bremer Support

تحلیل قسمتی از ناحیه کنترلی میتوکندری (HVR-III) بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

برای انجام این مطالعه، تعداد ۸۰ نمونه خون از گوسفندان نژاد مغانی، لری‌بختیاری، سنگسری، بلوچی، کرمانی، شال، قره‌گل و کردی تهیه شد. استخراج DNA از روش گوانیدین تیوسیانات-سیلیکاژل انجام گرفت و پس از استخراج، به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA های استخراج شده، از روش الکتروفورز ژل آگارز ۸/. درصد و طیف سنجی با دستگاه نانودراپ (ترمو، آمریکا) استفاده شد.

طراحی آغازگرها و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

طراحی یک جفت آغازگر، جهت تکثیر اختصاصی ۶۰۰ جفت باز ناحیه کنترلی II از ژنوم میتوکندری، به کمک نرم‌افزار Primer Premier5 صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جهت تکثیر قطعه ۶۰۰ جفت بازی توسط دستگاه ترموسایکلر Biorad مدل PTC-200 و در ۳۵ چرخه حرارتی انجام گرفت. اجزای واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت مواد شرکت کننده در واکنش نیز به شرح زیر بود:

۵۰ نانوگرم DNA، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۵ پیکامول از مخلوط پرایمرها، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ ۲۵ میلی مولار و ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR.

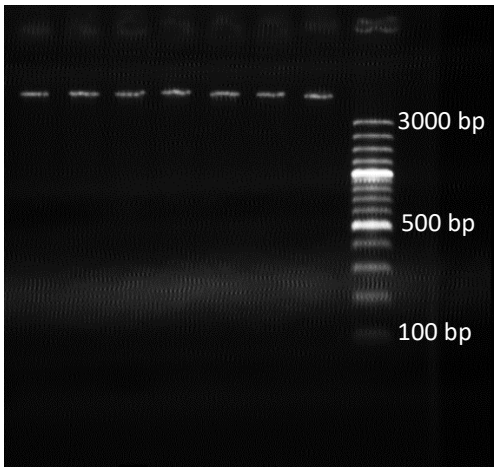
در نهایت نیز پس از حصول اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد، نمونه-ها پس از تخلیص برای توالی‌یابی ارسال شدند.

تجزیه و تحلیل توالی‌ها و رسم درخت فیلوژنتیک

در ابتدا کیفیت نتایج تعیین‌توالی به کمک برنامه CLC Main workbench 7.6.4 مورد بررسی قرار گرفت، سپس با استفاده از ابزار BLAST و رویه blastn موجود در پایگاهNCBI، صحت و میزان همولوژی توالی های بدست آمده سنجیده شد. به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نژادهای مورد مطالعه، نمودار درختی با استفاده از روش بیزین و با استفاده از نرم‌افزار MrBayes 3.1 ترسیم گردید، در این آنالیز از مدل General Time Reversible با mcmc = 1000000 ngen استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه ها با موفقیت انجام گرفت (شکل ۱). نتایج طیف سنجی نیز نشان داد که DNA استخراج شده از خلوص مناسبی برخوردار است.



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز DNA های استخراج شده از خون گوسفندان بومی ایران

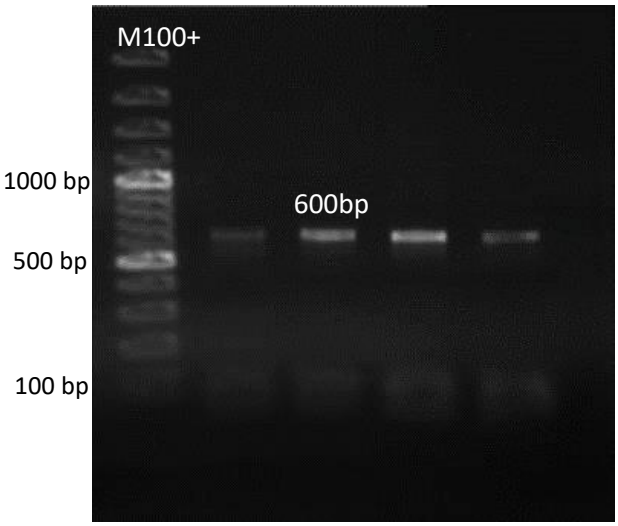
Figure 1- Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from blood samples of Iran's native sheep

الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی آگارز ۱ درصد نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعه اختصاصی را برای تمامی نمونه‌ها به خوبی تکثیر نمودند (شکل ۲).

تعیین توالی قطعات مورد مطالعه برای تمامی نمونه‌ها انجام گرفت و نتایج حاصل از توالی‌های مربوط به نمونه‌ها از لحاظ کیفیت توالی‌یابی برای هر باز، توسط نرم‌افزار CLC Main workbench 7.6.4 مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج نشان داد که خوانش‌ها برای

تمامی نمونه‌ها با کیفیت بالایی صورت گرفته است (شکل ۳).

در ادامه با استفاده از ابزار BLAST درصد تشابه توالی ناحیه مورد مطالعه در گوسفندان ایرانی با توالی های ثبت شده در پایگاه NCBI تعیین شد، که اکثریت توالی‌های ثبت شده در سطح حدود ۹۰ درصد بیشترین تشابه را با توالی‌های بدست آمده داشتند که این نتایج بر این دلالت دارد که این نواحی حفاظت شده بوده و تغییرات نوکلئوتیدی در آن‌ها به ندرت رخ می‌دهد.



شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR ناحیه HVR-III گوسفندان بومی ایران

Figure 2- Agarose gel electrophoresis of PCR products from HVR-III in Iran's native sheep

به منظور مشخص تر شدن جایگاه دقیق گوسفندان ایرانی در بین ۵ هاپلوتایپ شناسایی شد، درخت فیلوژنتیکی به روش بیزین و با استفاده از نرم‌افزار MrBayes 3.1 ترسیم شد (شکل ٤).

همانطور که در شکل شماره ٤ مشخص است، بیشترین شباهت بین توالی‌های بدست آمده از گوسفندان ایرانی و ۵ هاپلوتایپ شناسایی شده در گوسفندان اهلی ثبت شده در بانک جهانی ژن مربوط به هاپلوتایپ A می‌باشد.

اگرچه ممکن است روابط میان آرایه‌های مورد مطالعه در درخت حاصل از این آنالیز، با نتایج حاصل از سایر آنالیزهای موجود برای رسم درخت فیلوژنتیک مشابه باشد ولی به طور کلی حمایت شاخه‌ها در روش بیزین بالاتر از سایر روش‌ها (از جمله روش‌های حداقل تکامل، حداکثر پارسیمونی[۱] و ...) است. روش بیزین به خاطر سرعت بالا در محاسبه و استفاده از روش مونت *کارلو* زنیره *مارکف*[۲] (*MCMC*) به یکی از مناسب ترین روش-ها تبدیل شده است.

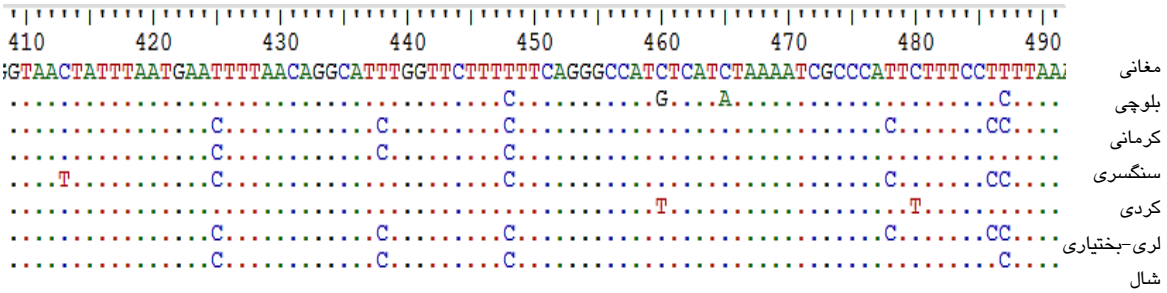
همانطور که اشاره شد، در گوسفندان اهلی تا کنون پنج گروه هاپلوتایپی A، B، C، D و E تشخیص داده شده است. با توجه به شکل ۲ مشاهده می‌شود که گروه‌های هاپلوتایپی پنج گانه فوق به‌صورت کاملاً تفکیک شده در خوشه‌های مختلف قرار گرفته‌اند، با توجه به نتایج درخت فیلوژنتیک، گوسفندان ایرانی جزء گروه هاپلوتایپی A طبقه‌بندی می‌شود. قرار داشتن گوسفند نژاد مغانی و گوسفند نژاد بلوچی که پیشتر توسط شفق (۱۳۸٦) وجود آن در گروه هاپلوتیپی A اثبات شده بود گواه دیگری در تعلق گوسفندان ایرانی به این گروه هاپلوتایپی است. علاوه بر این، محمدهاشمی و همکاران (۱۳۹۰) در مطالعه دیگری با مقایسه توالی ناحیه HVR-I بدست آمده از ژنوم گوسفند شال و سنگسری، نشان دادند که این نژادها متعلق به گروه هاپلوتایپی A می‌باشند، که این امر نیز به نوبه خود تایید کننده نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌باشد.

تاپیو و همکاران (۲۰۰٦) مطالعه‌ای را به منظور بررسی تنوع ژنوم میتوکندری در گوسفندان اروپایی، کاسکازین و آسیا انجام دادند و گزارش کردند که بیشتر گوسفندان آسیایی در گروه‌های هاپلوتیپی A (۲۲ درصد) و B (۷۱ درصد) قرار می‌گیرند که این گزارش نیز می‌تواند قرار گرفتن نژاد گوسفندان ایرانی مورد مطالعه در این پژوهش، در گروه هاپلوتایپی A را توجیه کند. البته اثبات کامل این موضوع نیاز به داده‌های بیشتر و همچنین رسم

[۱] Maximum parsimony

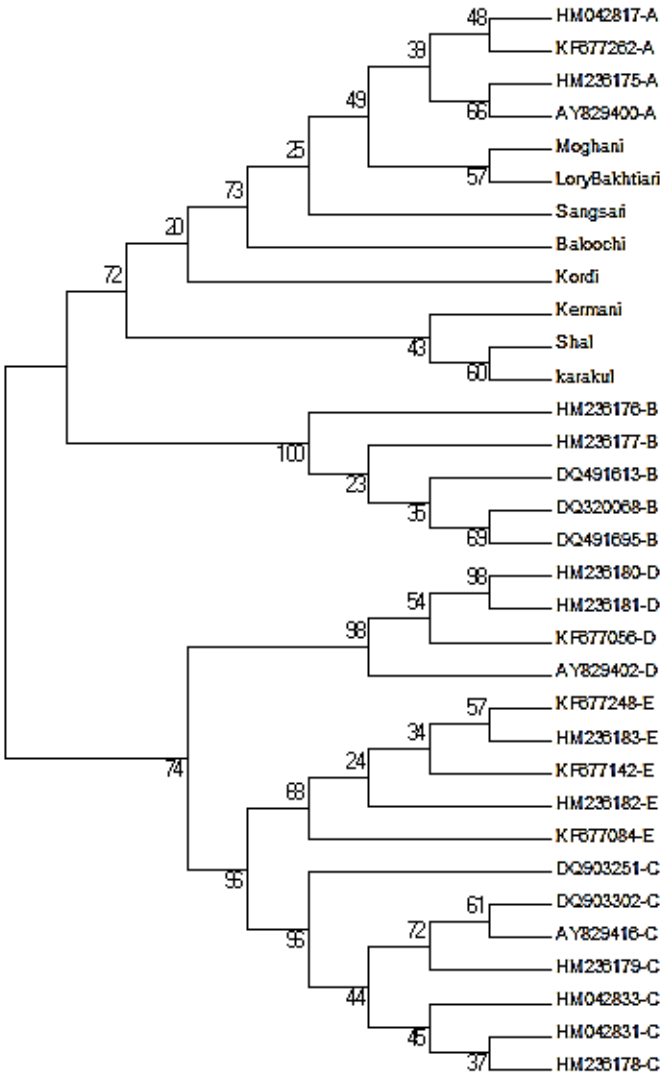
[۲] Markov chain Monte Carlo

درخت فیلوژنتیکی با استفاده از کل ناحیه کنترلی میتوکندری می‌باشد (میدوس و همکاران ۲۰۱۱ و ۲۰۰۵).



شکل ۳- قسمتی از مقایسه نتایج توالی‌یابی ناحیه HVR-III میتوکندری گوسفندان بومی ایران

Figure 3- Partial sequence comparison of HVR-III region from Iran's native sheep



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک رسم شده بر اساس توالی ناحیه HVR-III گوسفندان بومی ایران به روش بیزین مدل General Time Reversible با استفاده از نرم‌افزار MrBayes

Figure 4- Bayesian phylogenetic tree drawn based on HVR-III sequence for Iran's native sheep breeds by General Time Reversible model using software MrBayes

نتیجه‌گیری کلی

مدیریت ذخایر ژنتیکی حیوانات اهلی در سطح جهانی شروع شده است که این بحث‌ها عموما بر روی استراتژی حفظ نژادهای کمیاب متمرکز شده‌اند. مطالعات مربوط به بررسی روابط خویشاوندی و تعیین اصالت نژادی برای مدیریت جمعیت دام‌های اهلی ازجمله گوسفند و درک الگوهای آمیزشی در حیات‌وحش مفید می‌باشد. در این مطالعه با توالی‌یابی ناحیه HVR-III از ژنوم میتوکندری گوسفندان نژاد مغانی، لری‌بختیاری، سنگسری، بلوچی، کرمانی، شال، قره‌گل و کردی، نشان داده شد که گوسفندان ایرانی در گروه هاپلوتایپی A قرار دارند. اگرچه نیاز است که این تحقیقات در مقیاس وسیعتر و با تعداد نمونه بالا صورت گیرد، اما در کل اطلاعات ژنتیکی بدست آمده از این پژوهش، می‌تواند گامی موثر در جهت شناسایی منشا گوسفندان بومی ایران باشد و به ارتباط ژنتیکی منابع ارزشمند گوسفندان بومی ایران با سایر گوسفندان از کشورهای دیگر نیز کمک کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت.

منابع مورد استفاده

Alinaghizadeh R, Mohamad Abadi MR, Zakizadeh S, 2010. Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. Journal of Agricultural Biology 2 (1): 69-80

Anderson S, Bruijn MH, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F and Young IG, 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. Journal of Molecular Biology 156(4): 683-717.

Anderson S, Bankiev AT, Barrell BG and DeBruijn MHL, 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457-65.

Azghandi M, Tahmoorespour M, Javadmanesh A, 2017. Molecular study of mitochondrial electron transport chain genes in Iranian single and double humped camels. Iranian Journal of Animal Science 47(4): 539-547.

Bandelt HJ, Kong QP, Richards M, Macaulay V, 2006. Estimation of Mutation Rates and Coalescence Times: Some Caveats. In: Bandelt H-J, Macaulay V, Richards M, editors. Human Mitochondrial DNA and the Evolution of *Homo sapiens*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. Pp: 47–90.

Bigi D, Perrotta G and Zambonelli P, 2014. Genetic analysis of seven Italian horse breeds based on mitochondrial DNA D-loop variation. Animal Genetics 45(4): 593-5.

Bruford M, Bradley D and Luikart G, 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature Review Genetics 3: 900-910.

Ghiasi H, Nasiry MR, Heravi Mousavi AR, Mousavizadeh A and Javadmanesh A, 2006. Genetic polymorphism of the melatonin receptor 1A locus in Iranian Shall and Karakul sheep. Iranian Journal of Biotechnology 4(3): 201-203.

Hadizadeh M, Mohamadbadi MR, Niazi A, Esmailizadeh A, Gazooei YM (2014). Search for polymorphism in growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene in prolific beetal and tali goats (Capra hircus). Journal of Biological and Environmental Sciences 4 (4): 186-191.

Hadizadeh M, Mohamadabadi MR, Niazi A, Esmailizadeh AK, Mehdizadeh Y G, Molaei S (2013). Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetal goats. Modern Genetics Journal 8 (334): 283-288.

Hadizadeh M, Niazi A,Mohamad Abadi M, Esmailizadeh A, Mehdizadeh Gazooei Y. 2014. Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. Modern Genetic Journal 9 (1): 117-120.

Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R and 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.

Javanmard A, Mohamadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nàsiry MR, Javadmanesh A, Asadzadeh N. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). Russian Journal of Genetics 44 (4): 495-497.

Karimi MO, Shariati MM, Zerehdaran S, Moradi MH and Javadmanesh A, 2016. Study of genetic diversity of sheep breeds in Afghanistan. Biosciences Biotechnology Research Asia 13(1): 573-581.

Meadows JRS, Li K, Kantanen J, Tapio M, Sipos W, Pardeshi V, Gupta V, Calvo JH, Whan V, Norris B, Kijas JW. 2005. Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. Journal of Heredity 96(5): 494–501.

Meadows JRS, Cemal I, Karaca O, Gootwine E and Kijas JW, 2007. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East. Genetics 175: 1371–1379.

Meadows JRS, Hiendleder S and Kijas JW, 2011. Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. Heredity 106(4): 700-6

Moghadaszadeh M, Mohamadabadi MR, Esmaelizadeh AK. 2015. Association of Exon 2 of BMP15 Gene with the Litter Size in the Raini Cashmere Goat. Genetics in the 3rd Millennium 13 (3), 4062-4067.

Mohamadabadi MR, Sattayimokhtari R. 2013. Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in kermani sheep. Slovak Journal Animal Science. 46:45-51.

Mohammadhashemi A, Tahmoorespour M, Pirany N, 2011. Phylogenetic analyses of HVR1 region of mtDNA in Iranian Shall and Sangsari native sheep breeds. Proceeding of 7th National Biotechnology Congress. 12-14 September, Tehran, Iran.

Nasiry MR, Tahmorespur M, Javadmanesh A, Soltani M, Foroutani Far S, 2006. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. Iranian Journal of Biotechnology 4(3): 188-192.

Nasiry MR, Shahroudi FE, Tahmorespur and Javadmanesh A, 2007. Genetic variability and population structure in beta-lactoglobulin, calpastain and calpain loci in Iranian Kurdi sheep. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(7): 1062-1067.

Nasiry MR, Shahroudi FE, Tahmorespur and Javadmanesh A, 2008. The diversity of BoLA-DRB3 gene in Iranian native cattle. Asian-Australian Journal of Animal Sciences 21(4): 465-470.

Nasiry MR, Valezade R, Tahmorespur M, Javadmanesh A, Foroutani S, 2010. Molecular study of calpastatin, calpin and beta-lacto globulin loci in kordi sheep. Iranian Journal of Animal Science Research 2(2): 163-170.

Pereira F, Davis SJM, Pereira L, McEvoy B, Bradley DG and Amorim A, 2006. Genetic signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. Molecular Biology Evolution 23: 1420–1426.

Ryder ML, 1984. Evolution of Domesticated Animals. Longman Group Limited: London and New York pp: 63–84.

Sattai Mokhtari M, Rashidi A, Mohamadabadi MR, Moradi shahrbabak H (2009). Estimation of Genetic, Phenotypic and Environmental Trends of Growth Traits in Kermani Sheep. Iran Journal of Animal Science 4 (1): 51-58.

Shafagh Motlagh A, 2007. Study the D-loop and HVR I regions of mtDNA in some wild and domestic breeds of sheep and goat in Iran. Master of Science Thesis, Department of Animal Sciece, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Soufy B, Mohamadabadi MR, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N, Dayani O. 2009. Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. Animal Science Research 19 (1): 81-89.

Sultana S and Mannen H, 2004. Polymorphism and evolutionary profile of mitochondrial DNA control region inferred from the sequences of Pakistani goats. Animal Science Journal 75: 303-309

Tapio M, Marzanov N, Ozerov M, Inkulov M, Gonzarenko G, Kiselyova T, Murawski M, Viinalass H and Kantanen J, 2006. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. Molecular Biology Evolution 23: 1776–1783.

Wood NJ and Phua SH, 1996. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. Animal Genetics 27: 25–33.

Sequencing of HVR-III region of mtDNA in Iranian sheep breeds

A Javadmanesh[1], M R Nassiri[2] and M Azghandi[3]

Received: July 02, 2016 Accepted: January 04, 2017

[1]Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
[2]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
[3]MSc Graduate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
[*]Corresponding author: Email: javadmanesh@um.ac.ir

Introduction: Sheep are a highly adaptable domestic species, which has made them an important resource for human around the world. Archaeozoological evidence indicates that sheep were first domesticated in the Fertile Crescent (Meadows et al. 2007). Iran is located in the area of agriculture initiation and animal domestication by early humans. As a result Iran has a unique gene pool and genetic diversity in farm animals. There are more than 32 distinctive domestic sheep breeds in addition to wild sheep populations in Iran. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) molecule of the domestic sheep, *Ovis aries*, was sequenced by Hiendleder et al (1998). Sequence variation within the mitochondrial genome has proven highly informative for investigation of the origin of domestic animal species due to the extremely low rate of recombination of mtDNA, its maternal lineage heredity and its relatively faster substitution rate than nuclear DNA. Phylogenetic studies showed that there are five clades in sheep populations around the world. Clade B is dominated by animals localized to Europe, clade C by sheep from the Middle East and Asia, and clade A to be a mixture from the Middle East, Asia, and Europe (Pereira et al. 2006). A comprehensive study on a large group of Iranian sheep breeds to study the genetic relationship wthin these animals is yet missing. The present study aimed to determine the sequence of the HVR-III region from mtDNA in Iranian Moghani, Lori-Bakhtiari, Sangsari, Baluchi, Kermani, Shall, Karakul and Kordi sheep breeds and determining phylogenetic relationships between these breeds and known five haplotypes that have been identified in domestic sheep worldwide.

Material and methods: In total, blood samples from 80 sheep were collected. Genomic DNA was extracted from whole blood using guanidium thiocyanate-silicagel method (Diatom DNA Prep. 100, Isogene, Russia) following the manufacturer's instruction. The integrity of the extracted DNA was analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and the purity of the obtained DNA was verified by Nano Drop spectrophotometer (Thermo, USA). After DNA extraction, a 600bp from HVR-III region of mtDNA was amplified by a standard PCR reaction with specific primers. Sanger sequencing was done after purification of PCR products. Sequencing data was assessed and analyzed by CLC Main workbench 7.6.4 and BLAST applications. Bayesian method was employed to analyze the phylogenetic tree. Mr.Bayse version 3.1 was used with General Time Reversible (GTR) model of nucleotide substitution and Markov chain Monte Carlo (MCMC) strands, 1,000,000 generations, with trees sampled every 100 generations.

Results and discussion: PCR products were assessed by electrophoresis on 1% agarose gel and visualized under UV light after staining with GelRed^{TM} and results showed that specific fragment of mtDNA amplified successfully (Figure 2). A Bayesian method was used to generate a phylogenic tree based on the HVRIII sequencing. This method has a stronger branch support in compare to other methods such as maximum parsimony or minimum evolution methods, therefore the results of this study on Iranian indigenous sheep breeds have higher reliability than older studies. The results showed that all of studied breeds belonged to the clade A (Figure 4), despite of the notable phenotypic variation between them. This resemblance might be due to geographical vicinity (Meadows et al. 2005) and the particular way of nomad life style that suggests today's Iranian sheep breeds may have been derived from a limited number of founder population. The results of this research was in

accordance with Mohammadhashemi et al (2011) and Shafagh Motlagh (2007) who used D-loop region of mtDNA. Also Meadows et al (2005) sequenced a large fragment of mtDNA including cytb and control region reported that clade A were found mostly in breeds from Asia (Such as India, Indonesia, Mongolia, and Tibet), while type haplotype B individuals were observed at the highest frequency in breeds originated from Europe (Such as Austria, Finland, Spain, and northwestern Russia). In 1996, Wood and Phua identified two domestic ovine lineages in sheep from New Zealand, and in 1998, Hiendleder *et al*. characterized these as of Asian (clade A) or European (clade B) origin after comparing the distribution of haplotypes within multiple breeds sampled from Russia, Germany and Kazakhstan. Meadows et al (2011) demonstrated that the control region of mtDNA had the highest rate of mutation and it can be used as a better region to estimate diversity in populations. Although conserved regions would be better choice to use in divergence time estimation between different populations or species.

Conclusion: We concluded that clade A is the main haplotype in Iranian domestic sheep however, this claim needs to be verified based on experiments with more animals in addition to whole mitogenome sequencing.

Keywords: HVR-III region, Haplotype, Iranian sheep, Clade A, mtDNA