Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تجزیه و تحلیل تنوع و جایگاه ژنتیکی قوچ و میش‌های پناهگاه حیات‌وحش بوروئیه با کمک ژن سیتوکروم ب (Cytochrome *b*)

سید مجید حسینی*[1]، حمیدرضا رضایی[2]، حسین وارسته[3]، سعید نادری[4]، فاطمه نیکوی[1]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی ارشد محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

[2]استادیار، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

[3]استادیار، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

[4]استادیار، گروه محیط‌زیست، دانشگاه گیلان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

چکیده

قوچ و میش از خانواده گاوها (Bovidae) و جنس قوچ (*Ovis*) است، که در بیشتر مناطق ایران زیست می‌کند. به لحاظ تعیین طبقه‌بندی این گونه همواره چالش‌های زیادی در بین محققین وجود داشته است. هدف از این مطالعه، بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم *b* از DNA میتوکندری قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه به منظور تعیین طبقه‌بندی صحیح این گونه است. در این پژوهش، تعداد ۱۷ نمونه سرگین و بافت از قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه شهرستان خاتم جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، تکثیر قطعات ۱۱٤۰، ۷٤۱ و ۷٦۵ جفت بازی از ناحیه سیتوکروم *b* میتوکندری با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و پرایمرهای (Cytb R–Cytb F) و Cytb F-) Cytbin R، Cytb R-Cytbin F) انجام گردید. توالی‌یابی ناحیه تکثیر شده با استفاده از دستگاه خودکار ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر صورت گرفت و به منظور تعیین فاصله ژنتیکی با توالی‌های حاصل از مطالعات دیگر، مقایسه شد. نتایج نشان داد که در بین توالی‌های نوکلئوتیدی نمونه‌های مورد مطالعه، تفاوت هاپلوتایپی وجود نداشت. نتایج آزمون فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining نشان داد، قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه در شاخه قوچ و میش ارمنی (*Ovis orientalis*) قرار می‌گیرند و از لحاظ هاپلوتایپی با جمعیت‌های قوچ و میش ارمنی در دیگر مناطق ایران متفاوت هستند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه در حال حاضر تنوع ژنتیکی پایینی دارند، که در کارهای مدیریتی دراز مدت در آینده باید به طور جدی به آن توجه شود.

کلمات کلیدی: قوچ و میش، پناهگاه حیات وحش بوروئیه، فیلوژنی، سیتوکروم *b*.

* نویسنده مسئول: سید مجید حسینی تلفن: ۰۹۱۸۹۱٦۸۳۸۷ Email: majid.hosseini93@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

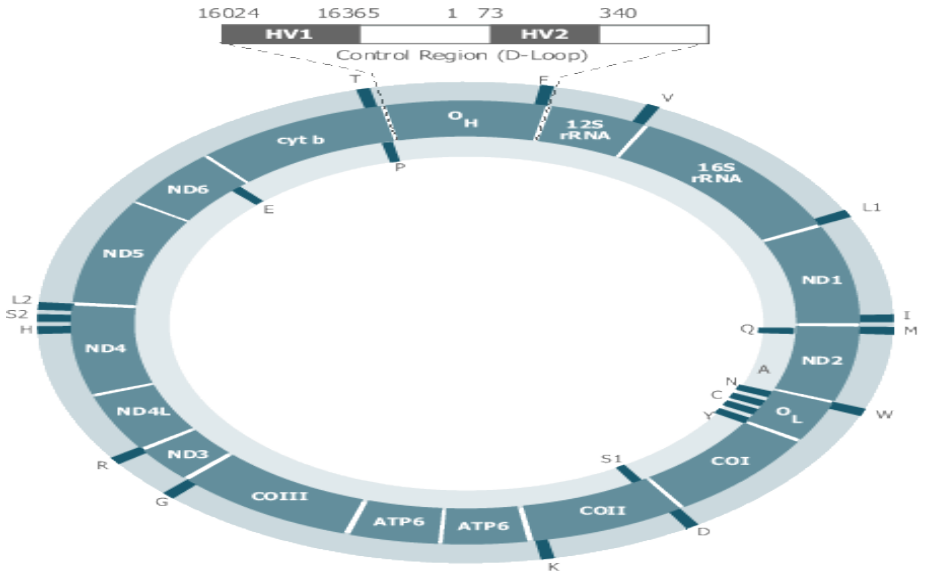
مقدمه

قوچ و میش یا همان گوسفند وحشی از جنس قوچ (*Ovis*) پراکنش وسیعی در نیم‌کره شمالی کره زمین دارند. پراکنش آن‌ها از آمریکا و کانادا تا مناطق وسیعی از آسیا و بخشی از اروپا را شامل می‌شود. در مطالعاتی که روی قوچ و میش در جهان صورت گرفته است، آن‌ها را بین یک تا ۷ گونه تقسیم نموده‌اند (Nadler *et al.*,1973). در مطالعات انجام شده مشخص شده است که قوچ و میش‌های جهان از لحاظ رده‌بندی یکی از جنس‌های پیچیده در جهان هستند. اکثر مطالعات انجام گرفته در ایران بر روی این گونه بر اساس خصوصیات مورفولوژی صورت گرفته و تنها مطالعات محدودی در زمینه سیتولوژی و ژنتیک انجام شده است. روش‌های مولکولی مانند توالی-یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش-ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (Bruford *et al.*, 2003). امروزه ژنوم میتوکندری به دلیل اندازه کوچک و آسان بودن استخراج آن و این که از طریق مادر به ارث می‌رسد، به طور متداول برای مطالعات فیلوژنتیکی و تکاملی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lansman *et al.*, 1983). DNA میتوکندری (mtDNA) در تشخیص گونه-ها و ترسیم رابطه فیلوژنتیکی دارای مزایایی از جمله تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول، اندازه کوچک‌تر آن از DNA ژنومی، وراثت‌پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی در آن‌ها و وجود نواحی حفاظت‌شده می‌باشد (Bellagamba *et al.*, 2001). همچنین DNA میتوکندریایی دارای محدودیت‌های خاصی نیز است (Funk & Omland, 2003). اندامک میتوکندری تقریباً در همه یوکاریوت‌ها یافت می‌شود، تعدادشان بسته به نوع ارگانیسم و نوع بافت متفاوت است. بسیاری از سلول‌ها تنها یک میتوکندری دارند در حالی که سلول‌های دیگر می‌توانند شامل چندین هزار میتوکندری باشند (Johanson *et al.*, 2001). تصور می‌شود که DNA میتوکندری و هسته منشأ تکاملی مجزایی داشته باشند، به طوری که DNA میتوکندری از ژنوم‌های حلقوی باکتری‌ها مشتق شده است (Wiesner *et al.*, 1992). ژنوم میتوکندری پستانداران DNA حلقوی دو رشته‌ای به طول ۱۷–۱٦ کیلوباز، با وزن مولکولی کم، ساختار ساده، سرعت تکاملی بالا و وراثت مادری است. این DNA فاقد اینترون بوده و بر خلاف DNA هسته فاقد حدود ۷٪ توالی‌های غیر کد کننده است. DNA میتوکندری ۳۷ ژن را کد می‌کند که ۱۳ ژن آن کد کننده پروتئین هستند (شکل ۱). درون این ۳۷ ژن ۲۲ ژن tRNA وجود دارد. دو ژن آخر هم ژن‌های rRNA می‌باشند و بالاخره D-loop یا ناحیه کنترل که ناحیه غیر کد کننده است (Schlick *et al.*, 2006). به دلیل این که تمام DNA میتوکندریایی به صورت یک واحد خاص یا

www.SID.ir

Archive of SID

هاپلوتایپ به ارث می‌رسد خویشاوندی‌های بین DNA میتوکندری افراد متفاوت را می‌تواند به صورت یک درخت ژنی نشان داد. الگوهای این درخت‌های ژنی برای پی بردن به تاریخچه تکاملی جمعیت‌ها استفاده می‌شود (Cann *et al.*, 1987; Torroni *et al.*, 2006). ژن‌های میتوکندری ابزاری مهم در مطالعات مختلف در زمینه‌های تکامل جانوران، فیلوجغرافیایی و فیلوژنتیک می‌باشند (Rokas *et al.*, 2003). تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان 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 رقیب‌ها نیست (Askari *et al.*, 2011). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei *et al.*, 2010).



شکل ۱- ساختار حلقوی DNA میتوکندری.

Figure 1- Structure of circular mitochondrial DNA.

ژن سیتوکروم *b*[1]، ژن میتوکندری کدینه است که تاکنون برای تاکسون‌های گوناگون تعیین توالی شده است و اطلاعات کاملی در مورد این ژن در دسترس است (Aliabadian *et al.*, 2009). این ژن نشانگری مناسب در سطح جنس و گونه است و تغییرات درون و بین گونه‌ای را نشان می‌دهد (Wink *et al.*, 2000) و فاقد تغییرات حذف، الحاق و واژگونی است. این ژن توانایی نشان دادن واگرایی‌های قدیمی‌تر از ۲۰ میلیون سال را ندارد (Konig *et al.*, 2008). دیدگاه‌های جدیدی برای تکامل گوسفند وحشی توسط تکامل نژادی مولکولی با استفاده از روش‌های صرفه‌جویی

[1] cytochrome *b*

www.SID.ir

Archive of SID

حداکثر[1]، بیزین[2]، تشابه حداکثر[3] و اتصال همسایگی[4] به دست آمده است (Rezaei *et al.*, 2010). بر اساس آخرین رده‌بندی، قوچ و میش-های جهان را شش گونه معرفی کرده‌اند که دو گونه از این قوچ و میش‌ها در ایران یافت می-شود. قوچ و میش اوریال (*Ovis vignei*) که بیشتر در شمال شرقی، شرق و جنوب شرقی ایران و ارمنی (*Ovis orientalis*)، که محدوده پراکنش آن بیشتر در شمال غربی، غرب و جنوب غرب ایران است (شکل ۲). در برخورد این دو گونه با هم در مرکز ایران و مناطق مجاور هم در یک منطقه، احتمال حضور دو گونه افزایش می-یابد (Rezaei *et al.*, 2010). هشت جمعیت قوچ و میش در سراسر ایران بر اساس الگوی کروموزوم، شکل شاخ، ویژگی‌های پوست و نرخ جنین آنالیز شدند و بر اساس تعداد کروموزوم تقسیم بندی شده‌اند (Valdez *et al.*,1978). قوچ و میش لارستان در جنوب ایران به عنوان زیرگونه‌ای از موفلون آسیایی (*O. Orientalis laristanica*) مطرح و اشاره شده است که موفلون‌های آسیایی اجداد گوسفندان اهلی هستند (Corbet and Hill, 1991). قوچ و میش‌های ایران جزء گونه‌هایی هستند که با توجه به هیبرید بین آن‌ها نیاز به مطالعات ژنتیکی و مولکولی گسترده‌ای دارند (Hosseini *et al.*, 2013). قوچ و میش‌های استان یزد در منطقه آمیزشی بین دو گونه قوچ و میش اوریال و ارمنی قرار دارند. پناهگاه حیات وحش بوروئیه در جنوبی‌ترین قسمت استان یزد از جمله مناطقی است که می-تواند قوچ و میش‌های متفاوتی از لحاظ ژنتیکی، با توجه به همسایگی این شهرستان با استان‌های فارس و کرمان نسبت به دیگر مناطق این استان داشته باشد. هدف از این پژوهش تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه Cyt-*b* از ژنوم میتوکندریایی در قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه و تعیین جایگاه قوچ و میش‌های پناهگاه حیات-وحش بوروئیه در بین قوچ و میش‌های ایران و استان یزد است.

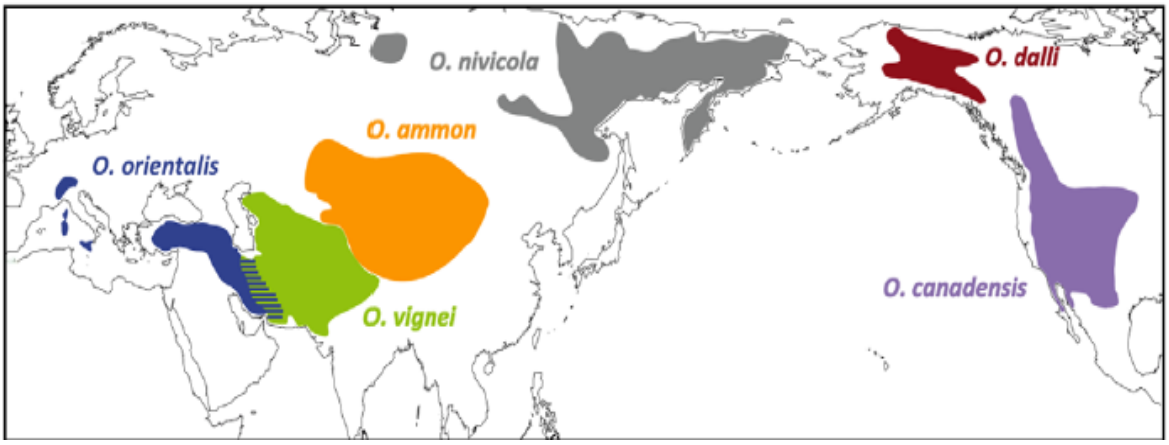
مواد و روش‌ها

قوچ و میش[5] از خانواده گاوسانان[6] و از راسته زوج سمان[7] است. زیستگاه آن‌ها بیشتر در تپه و ماهورها و دامنه کوهستان‌های مرتفع در مناطق استپی است. بیشتر روزگرد است و به صورت اجتماعی زندگی می‌کنند. از علوفه، بوته-ها و برگ درختان تغذیه می‌کنند. دشمن طبیعی این گونه گرگ، پلنگ، یوز و سگ‌های اهلی هستند. در سال‌های اخیر به دلیل اشغال زیستگاه و آبشخورها، شکار بی‌رویه و گرفتن بره‌ها، نسل آن‌ها به شدت رو به کاهش نهاده و در بعضی از مناطق به کلی نابود شده‌اند (Ziaie, 2008).

[1] Maximum parsimony
[2] Bayesian
[3] Maximum likelihood
[4] Neighbor-Joining
[5] Wild Sheep
[6] Bovidae
[7] Artiodactyla

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- توزیع جغرافیایی گونه‌های قوچ وحشی (Rezaei *et al.*, 2010).

Figure 2- Phylogeography of the wild Ovis species (Rezaei *et al.*, 2010).

پناهگاه حیات‌وحش بوروئیه در جنوب استان یزد، در شهرستان خاتم واقع شده است. این محدوده در حد فاصل ٥٤ درجه و ۱۲ دقیقه تا ٥٤ درجه و ٥۹ دقیقه طول شرقی و ۳۰ درجه و ۲ دقیقه تا ۳۰ درجه و ۱۱ دقیقه عرض شمالی قرار گرفته است. این منطقه با مساحت حدود ۷۸٥۹۰ هکتار در تاریخ ۲۱ خرداد ۱۳۸۱ با مصوبه شورای عالی حفاظت محیط زیست، به مناطق چهارگانه محیط زیست پیوست. بخش عمده پناهگاه را ارتفاعات تشکیل می‌دهد. دامنه ارتفاعی منطقه بین ۱٦۰۰ تا ۲۸۰۰ متر متغیر است. عمده‌ترین تعارضات پناهگاه، چرای دام و معدودی مزرعه است. بر اساس طبقه‌بندی اقلیمی دومارتن، اقلیم پناهگاه خشک و نیمه خشک است. میانگین سالانه دما بین ۱۰ تا ۱۸ سانتی‌گراد و میزان بارندگی بین ۲۰۰ تا ۳۳۰ میلی‌لیتر در بخش‌های مختلف منطقه در نوسان است (Entekhabi, 2009).

برای انجام این مطالعه به دو شیوه مختلف نمونه‌برداری انجام شد. این نمونه‌ها شامل نمونه-های سرگین و بافت بود. نمونه‌های سرگین در فصل پاییز سال ۱۳۹۱ از پناهگاه حیات‌وحش بوروئیه جمع‌آوری شد. ۱٥ نمونه سرگین از این منطقه جمع‌آوری شد. جمع‌آوری نمونه‌های سرگین به صورت تصادفی صورت گرفت. نمونه‌ها در الکل ۹٦ درصد و در تیوب‌های نمونه‌برداری بی‌رنگ ۱٥ میلی‌لیتری نگهداری شدند. موقعیت جغرافیایی کلیه نمونه‌ها توسط GPS ثبت شد. شیوه دوم نمونه‌برداری از بافت بود که در این شیوه از نمونه‌هایی که در طبیعت تلف شده بود یا به صورت قانونی برای آن‌ها پروانه شکار صادر شده بود و همچنین نمونه‌هایی که از متخلفین بدست آمده بود، در اداره کل محیط زیست استان یزد وجود داشت تهیه شد. در کل دو نمونه بافت از این منطقه توانستیم جمع‌آوری کنیم. این نمونه‌ها نیز پس از ثبت

www.SID.ir

Archive of SID

موقعیت جغرافیایی و تعیین جمعیت در الکل ۹٦ درصد نگهداری شد.

استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA از سرگین و بافت توسط کیت شرکت بیونیر بر اساس پروتکل انجام شد. برای انجام PCR در این تحقیق از سه جفت پرایمر استفاده شد (Pedrosa *et al*., 2005; Rezaei *et al*., 2010). ابتدا نمونه‌ها توسط پرایمری که ۱۱٤۰ جفت باز به عنوان نتیجه در اختیار ما قرار می‌دهد، تکثیر شد و داده‌های آن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و چون تعداد کمی از نمونه‌ها با این جفت پرایمر جواب دادند و بقیه باند واضح و خوبی نشان ندادند. از دو جفت پرایمر دیگر با طول قطعه ۷٤۱ و ۷٦۵ جفت بازی استفاده شد (جدول ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه ترموسایکلر در ۳۵ سیکل انجام شد. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای آن شامل ۱۱ میکرولیتر Master KIT، ۸ میکرولیتر آب، ۲ میکرولیتر پرایمر رفت[1]، ۲ میکرولیتر پرایمر برگشت[2] و ۲ میکرولیتر DNA بود. برنامه حرارتی واکنش PCR به شرح جدول (۲) می‌باشد (Bunch *et al*., 2006).

به منظور تأیید تکثیر ناحیه مورد نظر، طی واکنش‌های PCR الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد صورت گرفت. از روی شدت وضوح باندها می‌توان به کیفیت و تا حدودی کمیت DNA پی برد. مقدار ۲۰ میکرو لیتر از محصولات PCR خالص‌سازی شد و به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شدند. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی گردید.

برای تجزیه و تحلیل نتایج از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI[3] جهت تعیین همولوژی توالی‌ها استفاده گردید. از نرم‌افزار Seqscape به منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌ها استفاده شد. برای بررسی جایگاه قوچ و میش در بین سایر قوچ و میش‌های ایران و بررسی ارتباطات بین آن‌ها از توالی ناحیه سیتوکروم *b* ثبت شده سایر قوچ و میش در ژن بانک (NCBI) بدست آمدند و ردیف آرایی توالی‌ها در نرم افزار MEGA.5 صورت گرفت. در نهایت درخت فیلوژنی بر اساس روش اتصال مجاور با استفاده از نرم افزار MEGA.5 ترسیم گردید (Fadakar, 2012).

[1] Forward Primer
[2] Reverse Primer
[3] National Center for Biotechnology Information

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده برای PCR و توالی‌یابی.

Table 1- Primers used for PCR and sequencing.

لوکوس Locus	نام پرایمر Primer name	توالی پرایمر Primer sequence (5´-3´)	طول قطعه Fragment L	درجه حرارت Tm (℃)
cytochrome *b* (part 1)	CYTB_F CYTB_R	CCCCACAAAACCTATCACAAA AGGGAGGTTGGTTGTTCTCC	1140	55℃
cytochrome *b* (part 2)	CYTB_F CYTB_IN_R	CCCCACAAAACCTATCACAAA CCTGTTTCGTGGAGGAAGAG	741	55℃
cytochrome *b* (part 3)	CYTB_IN_F CYTB_R	ACCTCCTTTCAGCAATTCCA AGGGAGGTTGGTTGTTCTCC	765	60℃

جدول ۲- برنامه حرارتی برای چرخه PCR.

Table 2- Thermal program for cycle PCR.

مراحل PCR PCR Stage	درجه حرارت Tm (^{0}C)	زمان (ثانیه) Time (Second)	مرحله Stage	
واسرشته‌سازی اولیه Predenature	95	600	1	
واسرشته‌سازی Denature	95	30	2	
اتصال آغازگرها Annealing	55	45	1140 bp، 741 bp	3
اتصال آغازگرها Annealing	60	45	765 bp	
تکثیر Extension	72	60	4	
تکثیر نهایی Final extension	72	540	**5**	
نگهداری Retention	4	∞	**6**	

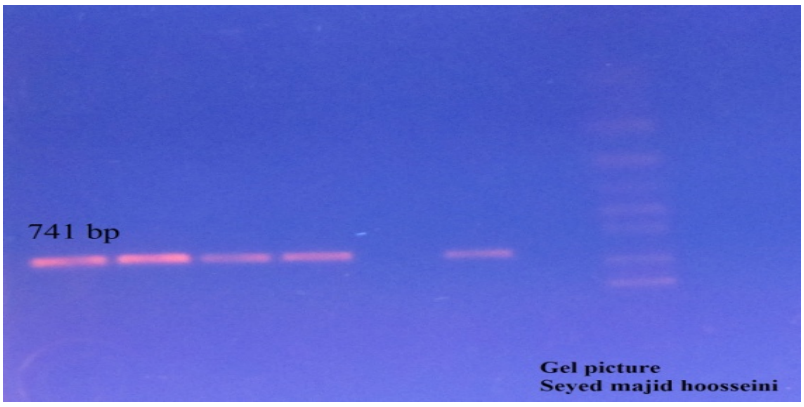
*مراحل دو تا چهار ۳۵ بار تکرار می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

نتایج طیف‌سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از دو نمونه بافت موجود و ۵ نمونه سرگین از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار است و بقیه نمونه‌ها فاقد DNA بودند. این نمونه‌ها (۲ نمونه بافت و ۵ نمونه سرگین) با استفاده از یک جفت پرایمر (Cytb F, Cytb R) در دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR تکثیر شد. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ نشان داد که قطعه اختصاصی برای سیتوکروم *b* به طول ۱۱٤۰ جفت باز به خوبی برای نمونه‌های بافت تکثیر شده است. اما، نمونه‌های سرگین PCR شده داری کیفیت خوبی برای فرستادن به توالی‌یابی نبودند. برای تکثیر بهتر DNA نمونه‌های سرگین از دو جفت پرایمر (Cytb F-Cytbin R ، Cytb R-Cytbin F) استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR شده نشان داد که پنج نمونه سرگین که با این دو جفت پرایمر آزمایش شدند داری باند خوب و واضحی برای فرستادن به توالی‌یابی بودند (شکل ٤).



شکل ٤- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز به طول ۷٤۱ جفت باز روی ژل آگارز ۲٪.

Figure 4 – Electrophoresis of 741bp PCR products on 2% agarose gel.

نتایج حاصل از توالی‌یابی برای همه نمونه-ها با توجه به کیفیت خوب آن‌ها مورد آنالیز قرار گرفت. با استفاده از ابزار BLAST تعیین همولوژی توالی نمونه‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه با توالی‌های گرفته شده از GenBank که شامل قوچ و میش‌های اوریال و ارمنی بود صورت پذیرفت. حدود ۲۱ توالی از این دو گونه و ۷ نمونه از منطقه مورد مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. در ترسیم درخت فیلوژنی از توالی کل و بز (*Capra aegagrus*) ثبت شده در ژن بانک به عنوان گروه خارجی استفاده شد. (جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- تعداد توالی‌های مورد استفاده برای رسم درخت فیلوژنتیک.

Table 3- The number of sequence used to draw phylogenetic tree.

گونه Species	تعداد توالی No. sequence
پناهگاه حیات‌وحش بوروئیه	7
قوچ اوریال *Ovis vignei*	4
قوچ ارمنی *Ovis orientalis*	5
قوچ منطقه البرز مرکزی *Ovis orientalis* vignei*	3
قوچ منطقه اصفهان *Ovis orientalis Isphahanica*	3
قوچ منطقه لارستان *Ovis orientalis laristanica*	3
قوچ منطقه کرمان *Ovis orientalis laristanica* cycleceros*	3

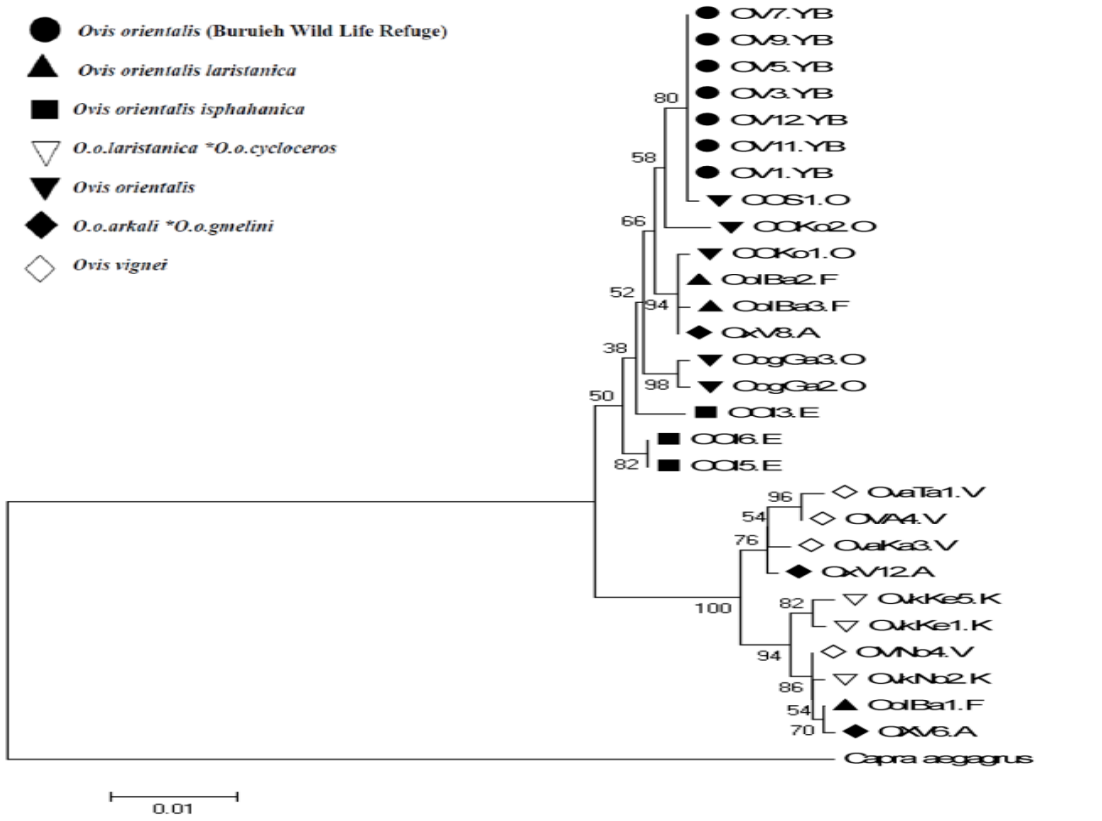
مقایسه بین هفت توالی قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه با استفاده از ابزار Disparity Index Analysis، در نرم‌افزار MEGA، نشان دهنده عدم وجود اختلاف بین آنها بود. در نتیجه می‌توان گفت جمعیت مورد مطالعه فاقد تنوع هاپلوتیپی بود.

نتایج حاصل از آزمون فیلوژنتیکی بر اساس Neighbor-Joining به صورت درخت رسم شد (شکل ٤). ترسیم درخت فیلوژنتیک برای قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه با استفاده از توالی‌های سیتوکرومی ثبت شده در Gen Bank تشابه قوچ و میش‌های این منطقه را با قوچ و میش ارمنی تأیید می‌نماید. با مقایسه توالی‌های مورد مطالعه با توالی‌های برگرفته از GenBank مشخص شد که قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه فاصله ژنتیکی چندانی با قوچ و میش‌های منطقه اصفهان و لارستان ندارند. فراوانی هر یک از نوکلئوتیدها در نرم‌افزار MEGA.5 محاسبه شد (Tamura *et al.*, 2007). باز آدنین بیشترین فراوانی و باز گوانین کم‌ترین فراوانی را داشت (جدول ٤).

میزان جانشینی نوع اول (جانشینی بازهای پورین A-G با یکدیگر و جانشینی بازهای پیریمیدین C-T با یکدیگر) و جانشینی نوع دوم (جانشینی بازهای پورین و پریمیدین با یکدیگر) در نمونه‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه محاسبه شده است (جدول ٥). در این جدول اعدادی که به صورت پررنگ نشان داده شده‌اند نرخ جانشینی نوع اول را بیان می‌کنند و سایر اعداد نشان‌دهنده نرخ جانشینی نوع دوم هستند. الگوهای جانشینی و نرخ‌ها بر اساس مدل تامورا- نئی در نرم‌افزار مگا برآورد شده است (Tamura and Nei, 1993).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- درخت فیلوژنتیک قوچ و میش بر اساس توالی‌های سیتوکروم *b*

Figure 4- Phylogram of the Ovis based on cytochrome *b* sequences.

جدول ٤- فراوانی نوکلئوتیدها حاصل از توالی‌های قوچ و میش پناهگاه حیات وحش بوورئیه.

Table 4- Nucleotide abundance of wild sheep of Buruieh Wildlife Refuge sequences.

G	C	T/U	A	نوکلئوتید nucleotide
12.98	28.68	26.93	31.40	فراوانی abundance

جدول ٥- تخمین الگوهای جانشینی نوکلئوتیدی.

Tabale 5- Estimate of substitution pattern nucleotide.

نوکلئوتید nucleotide	A	T/U	C	G
A	-	8.98	9.56	4.32
T/U	10.47	-	9.56	4.33
C	10.47	8.97	-	4.33
G	10.46	8.98	9.56	-

www.SID.ir

Archive of SID

ماتریس فواصل ژنتیکی بین گونه‌ها بر اساس مقایسه توالی‌های هر گروه با بقیه گروه‌ها به صورت دو به دو و با استفاده از مدل حداکثر درست‌نمایی ترکیبی (Tamura *et al*., 2004) به دست آمده است. از آنجا که اعداد حاصله نمایان‌گر میزان جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی‌های گونه‌های مورد بررسی می‌باشند، فاصله ژنتیکی بین دو گونه مرتبط با همبستگی فیلوژنتیکی بین آن گونه‌ها خواهد بود. در نتیجه از این شاخص می‌توان برای مشخص کردن دوری یا نزدیکی گونه‌ها از هم استفاده نمود. محاسبه ماتریس فواصل ژنتیکی بین توالی‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه (هفت نمونه یک هاپلوتیپ مشترک)، یک توالی از منطقه حفاظت‌شده کوه بافق حاصل از مطالعه Rezaei *et al*. (2010) و دو توالی از قوچ و میش‌های اوریال و ارمنی نشان‌دهنده تعلق گونه مورد مطالعه، به گونه قوچ ارمنی *Ovis orientalis* می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود کم‌ترین فاصله ژنتیکی گونه مورد مطالعه با گونه قوچ ارمنی می‌باشد که معادل ۰/۰۰۰۹ است. ترسیم درخت فیلوژنتیک نیز صحت این گفته‌ها را تأیید می‌کند (جدول ٦).

جدول ٦- فواصل ژنتیکی بین توالی‌ها.

Table 6- Genetic distances between sequences.

	1	2	3	4
1. IR281.Bafgh PA				
2.OV9.Buruieh WR	0.0240			
3.OOS1.O Orientalis	0.0250	0.0009		
4.OVNo4.O Vignei	0.0045	0.0250	0.0260	

بحث و نتیجه‌گیری

نمونه‌های سرگین با توجه به اینکه دارای DNA کمی در خود هستند و یا اینکه DNA آن‌ها می‌تواند در منطقه در مجاورت عوامل محیطی تخریب یا از بین برود داری باند ضعیف‌تر یا فاقد باند به نسبت بافت هستند، بنابراین برای تکثیر بهتر DNA نمونه‌های سرگین از همان ابتدا پیشنهاد می‌شود از دو جفت پرایمر Cytb F-Cytb R) ،Cytbin R-Cytbin F) استفاده شود و نمونه‌های بافت که DNA کافی را دارا هستند برای تکثیر DNA آن‌ها از یک جفت پرایمر Cytb (Cytb R،F) استفاده کرد. قوچ و میش‌های شمال شرق و جنوب شرق ایران قوچ و میش اوریال هستند. قوچ و میش‌های شمال‌غرب ایران،

www.SID.ir

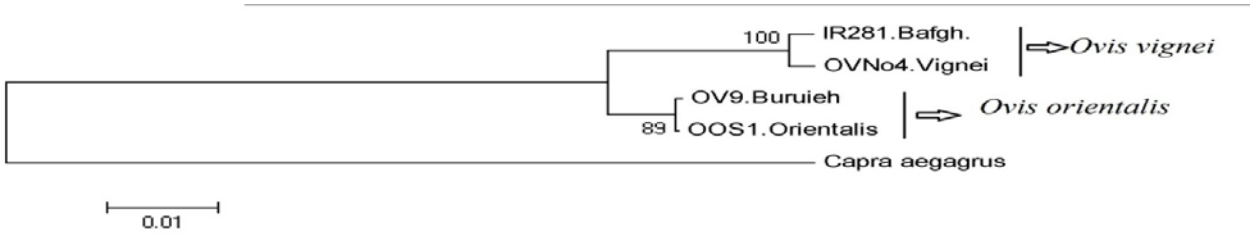
Archive of SID

اصفهان، لارستان قوچ و میش ارمنی هستند (Valdez *et al*., 1978 Nadler *et al*., 1971). حتی مناطقی مانند پارک ملی خبر، بمو، خجیر و شهر بابک دارای دو گونه قوچ و میش اوریال و ارمنی هستند (rezaei *et al*., 2010)، که نشان-دهنده پیچیدگی ژنتیکی و هیبرید بین قوچ و میش‌های مناطق مختلف ایران است. قوچ و میش‌های منطقه بوروئیه از لحاظ ژنتیکی قرابت زیادی با گونه قوچ و میش ارمنی دارند و می‌توان آن را قوچ و میش ارمنی نامید. قوچ و میش‌های منطقه مورد مطالعه با قوچ و میش‌های ارمنی، اصفهان و لارستان در یک شاخه از درخت فیلوژنتیک قرار گرفتند. قوچ و میش‌های اوریال منطقه کرمان در شاخه دیگر قرار گرفتند.

به طور کلی به جز در مناطق شرق ایران که قوچ‌های اوریال خالص و غرب ایران که قوچ‌های ارمنی خالص زندگی می‌کنند، در بسیاری از دیگر مناطق کشور، قوچ و میش‌ها از نظر فرم شاخ، اندازه جثه، رنگ و حتی تعداد کروموزوم‌ها با یکدیگر متفاوت هستند (Ziaie, 2008). از لحاظ طبقه‌بندی مشکل اساسی در مناطق مرکزی ایران وجود دارد که هر یک از جمعیت‌ها از لحاظ خصوصیات 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 و محل تلاقی دو گونه قوچ اوریال و قوچ ارمنی امکان تولید مثل بین این دو گونه وجود دارد و افراد این جمعیت‌ها می‌توانند دارای ٥٤ الی ٥٨ کروموزم باشند (Valdez *et al*.,1978). نتایج این پژوهش با نتایج Ziaie (2008) که قوچ‌های ایران را یک گونه با اسم علمی *Ovis orientalis* می‌نامید و قوچ و میش-های مناطق مختلف ایران را به عنوان زیرگونه‌ای از این گونه نام می‌برد کاملاً متفاوت بود. در آخرین پژوهشی که بر اساس مطالعات مولکولی در سطح جهان انجام شد، قوچ و میش‌های ایران به دو گونه اوریال و ارمنی تقسیم می‌شوند و همه قوچ و میش‌هایی که در تحقیقات قبلی به عنوان زیرگونه در ایران مطرح بودند، به عنوان قوچ اوریال یا ارمنی نام‌گذاری شده‌اند (Rezaei *et al*., 2010)، در این مطالعه که بیشتر مناطق ایران را پوشش داده بود، قوچ و میش‌های منطقه حفاظت‌شده کوه بافق استان یزد نیز در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته بودند و نتایج به دست آمده نشان داده بود که قوچ و میش‌های کوه بافق، در رده‌بندی قوچ و میش‌های ایران جز قوچ و میش اوریال است و گونه‌ای متفاوت از پناهگاه حیات وحش بوروئیه در استان یزد است که تحقیقات ما نشان داد. درخت فیلوژنتیکی حاصل از رسم توالی قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه با توالی‌های منطقه حفاظت‌شده کوه بافق، جدایی این قوچ‌ها را از نظر گونه نشان می‌دهد (شکل ٥).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- درخت فیلوژنتیک قوچ بر اساس توالی‌های سیتوکروم *b*

Figure 5- Phylogram of the Ovis based on cytochrome b sequences.

درخت فیلوژنتیکی حاصل از قوچ و میش-های پناهگاه حیات وحش بوروئیه و نقاط دیگر نشان می‌دهد که قوچ و میش‌های منطقه بوروئیه از لحاظ ژنتیکی تفاوت کمی با قوچ و میش‌های ارمنی دارند. قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش بوروئیه را نمی‌توان به عنوان زیرگونه‌ای از قوچ ارمنی معرفی کرد، بلکه باید آن را به عنوان قوچ ارمنی نام‌گذاری کرد. نتایج ما با نتایج Nadler *et al*. (1971) و در آخرین مطالعه‌ای که Rezaei *et al*. (2010) که قوچ و میش‌های جهان را طبقه‌بندی کردند همخوانی دارد و نشان می‌دهد که قوچ و میش‌های ایران را اوریال و ارمنی تشکیل می‌دهند و هیبریدهایی از این دو گونه در مناطق مختلف کشور وجود دارد. تحقیقات Rezaei *et al.* (2010) نشان داد که در یک منطقه حفاظتی از هر دو گونه قوچ و میش اوریال و ارمنی می‌توانند حضور داشته باشد که در مطالعات قبلی به اشتباه زیرگونه در نظر گرفته می‌شدند، مناطقی مانند پارک ملی خبر، بمو، خجیر و شهر بابک دارای دو گونه قوچ و میش اوریال و ارمنی بودند.

نتیجه‌گیری کلی

قوچ و میش‌های منطقه بوروئیه که در جنوبی‌ترین قسمت استان یزد قرار دارند جزء قوچ و میش‌های ارمنی (*Ovis orientalis*) هستند و از لحاظ ژنتیکی تفاوت کمی با قوچ و میش-های ارمنی دارند و با قوچ و میش‌های اوریال کاملا متفاوت‌اند. این قوچ و میش‌ها دارای یک هاپلوتایپ مشترک هستند، این مسئله تنوع ژنتیکی پایینی را در این منطقه نشان می‌دهد، که در کارهای مدیریتی دراز مدت در آینده باید به طور جدی به آن توجه شود. تعداد نمونه پایین و همچنین عدم استفاده از چند جایگاه می‌تواند محدودیت‌هایی باشد که با مرتفع نمودن آن‌ها در مطالعات بعدی می‌توان با یقین بیشتری در این مورد سخن گفت. انتقال قوچ و میش‌های ارمنی از دیگر نقاط کشور به این منطقه یکی از راهکارهایی است که برای افزایش تنوع ژنتیکی این منطقه پیشنهاد می‌شود که این انتقال نیاز به مطالعات فراوان دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از مساعدت‌های اداره کل محیط‌زیست استان یزد به خصوص جناب آقای دکتر حسن اکبری معاون محیط طبیعی اداره کل محیط زیست استان یزد و آقای مهندس حیدری رئیس اداره محیط زیست شهرستان خاتم سپاس‌گزاری می‌شود. از محیط‌بان تلاش‌گر و علاقه‌مند پناهگاه حیات وحش بوروئیه جناب آقای مهندس حجت تیموری که در مطالعات میدانی و جمع‌آوری نمونه‌ها همکاری نمودند تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

Aliabadian M, Kaboli, M, Nijman V, Vences M (2009). Molecular Identification of Birds: Performance of Distance-Based DNA Barcoding in Three Genes to Delimit Parapatric Species. Plos One 4:4119.

Askari N, Abadi MM, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian Journal of Biotechnology 9: 222-9.

Bellagamba F, Moretti VM, 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 49:75-81.

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

Bunch TD, Wu C, Zhang YP, Wang S (2006). Phylogenetic analysis of snow sheep (*Ovis nivicola*) and closely related taxa. Journal of Heredity 97:21–30.

Cann RL, Stoneking M, Wilson AC (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. Nature 325:31–36.

Corbet GB, and Hill JE (1991). A world list of mammalian species. 3rd ed. Brithish museum (Natural History); London. 243 pp.

Entekhabi H (2009). Yazd Province Atlas of Natural Features. edn 1. NAQSH-E MANA Press Pp:181.

Fadakar D (2013) Genetic diversity of gazzela in central part of Iran using cytochrome b equencing. M.Sc. thesis. Environmental Sciences, College of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan. Iran.

Funk DJ, Omland KE (2003). Species-level Paraphyly and Polyphyly: Frequency,Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 34:397-423.

Hosseini SM, Rezaei HR, Varasteh H, Naderi S (2013). The importance of Molecular studies in Taxonomy and Phylogeny of Wild Sheep in the world and Iran. First National Conference on Environmental Protection and Planning.

Johanson KP, De Kort S, Dinwoodey K, Mateman AC, Ten Cate C, Lessells CM, Clayton DH (2001). A molecular phylogeny of the Dove genera Streptopelia and Columba. The Auk 118:874-887.

König C, Weick F, Becking JH (2008). Owls of the World, 2nd edition. Christopher Helm.

www.SID.ir

Archive of SID

Lonsman RA, Avise JC, Aquadro CF, Shapira JF (1983). Extensive genetic variation in mitochondrial DNAs among geographic populations of the deer mouse (*Perromyscus maniculatus*). Evolution 37:1-16.

Nadler CF, Hoffmann RS, Woolf A (1973). G-band patterns as chromosomal markers, and the interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (*Ovis*). Experientia 29:117–119.

Nadler CF, Lay DM, Hassinger JD (1971). Cytogenetic analyses of wild sheep populations in northern Iran. Cytogenetics 10, 137–152.

Pedrosa S, Uzun M, Arranz JJ, Gutierrez-Gil B, San Primitivo F, Bayon Y (2005). Evidence of three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. Proceeding of the Royal Society of London Serie BBiological Sciences 272:2211–2217.

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.

Schlick N, Jensen-Seaman M, Orlebeke K, Kwitek A, Jacob H, Lazar J (2006). Sequence analysis of the complete mitochondrial DNA in 10 commonly used inbred rat strains. American Journal of Physiology-Cell Physiology 291:1183-1192.

Shojaei M, Mohammad Abadi M, Asadi Fozi M, Dayani O, Khezri A, Akhondi M (2010). 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.

Tamura K, Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10:512-526.

Tamura K, Nei M, Kumar S (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.

Torroni A, Achilli A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ (2006). Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. Trends Gene 22:339–345.

Valdez R, Nadler CF, Bunch TD (1978). Evolution of wild sheep in Iran. Evolution 32:56–72.

Wiesner RJ, Ruegg JC, Morano I (1992). Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction, copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. Biochemical and Biophysical Resaerch Communication 183:553–559.

Wink M, Heidrich P (2000). Molecular systematic of owls based on DNA sequences of mitochondrial cytochrome b gene. Proceedings of the World Conference on Birds of Prey and Owls 819-828.

Ziaie H (2008). A field guide to the mammals of Iran, 2 edn. Iran wildlife center.

www.SID.ir

Archive of SID

Genetic and Phylogenetic Analysis of Cytochrome *b* region in Wild Sheep of Buruieh Wildlife Refuge

Hosseini S.M.*[1], Rezaei H.R.[2], Varasteh H.[3], Naderi S.[4], Nikooy F.[1]

[1]MSc, Environmental Sciences Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, I.R. Iran.
[2]Assist Prof., College of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, I.R. Iran.
[3]Assist Prof., College of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, I.R. Iran.
[4]Assist Prof., College of Environmental Sciences, Guilan University, I.R. Iran.

Abstract

Wild sheep is belonging to Bovidae family and genus *ovis* which living in the most regions of Iran. There are many challenges between researchers about Wild Sheep species taxonomy. This study aims to investigate genetic and phylogenetic analysis of cytochrome *b* region of *ovis orientalis*'s mtDNA in the Buruieh wildlife refuge in order to determine the correct taxonomy. With this regard, 17 samples of *ovis orientalis* stool and tissue were collected from Buruieh Wildlife Refuge in Khatam Township. After DNA extraction 1140, 741, 765 bp fragment of the mitochondrial cytochrome *b* was amplified with primers Cytb F–Cytb R, Cytb F- Cytbin R and Cytb R-Cytbin F under polymerase chain reaction .Amplified fragments were sequenced by ABI 3130 automated device with Sanger method. The results were compared with sequences from other studies to determine the genetic distances. Hoplotype variations were not observed in the nucleotide sequences obtained in this study. Using the Neighbor-Joining phylogenetic test results showed that the Buruieh Wildlife Refuge wild sheep is placed in the group of *ovis orientalis* and is different from other *ovis orientalis* populations all around Iran in the terms of Hoplotype. Our results demonstrated that the Buruieh Refuge Wildlife Sheeps have low genetic diversity which should be considered at the long-time managment activities in the future.

Keywords: Wild Sheep, Buruieh Wildlife Refuge, Phylogeny, Cytochrome *b*.

* Corresponding Author: Hosseini S.M. Tel: 09189168387 Email: majid.hosseini93@yahoo.com

www.SID.ir