Archive of SID

بررسی مارکرهای ژنتیکی OarFCB304، OarAE64 و MAF64 درگوسفندان نژاد لری بختیاری

عباس دوستی*[1]، مهدی دیانی نیا[1]، سعادت مشکلانی[1]

۱- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

* **نویسنده مسئول :** *abbasdoosti@yahoo.com*

خلاصه

با پیشرفت تکنیک‌های ژنتیک مولکولی، امروزه تعیین هویت موجودات و بررسی روابط خویشاوندی آنها از طریق مارکرهای ژنتیکی امکان‌پذیر است. ریزماهواره‌ها، توالی‌های ساده‌ای از DNA هستند که به صورت پشت سر هم تکرار شده و بر حسب اندازه از چند شکلی بالایی برخوردارند و به همین جهت به عنوان ابزار تشخیص هویت به کار رفته و در مطالعه تکامل گونه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند اما تا کنون وظیفه خاصی در سطح ژنوم برای آنها شناسایی نشده است. هدف ازاین تحقیق بررسی حضور سه مارکر ریز ماهواره‌ایMAF64، OarFCB304، OarAE64 در ژنوم گوسفندان نژاد لری بختیاری و تعیین تنوع ژنتیکی در این گونه می‌باشد. به منظور انجام این تحقیق، نمونه خون از گوسفندان نژاد مذکور استحصال و سپس استخراج DNA صورت پذیرفت. واکنش های زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای این دو مارکر، تنظیم و محصولات PCR روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ ارزیابی گردید. برای مارکر OarFCB304، باندهایی در اندازه بین ۱۳۰ تا ۱۷۰ جفت باز مشاهده گردید. همچنین برای دو مارکر OarAE64 و MAF64 به ترتیب قطعاتی از DNA با اندازه‌های ۱۵۰-۱۲۰ و ۱۵۰ -۱۳۰ جفت باز بدست آمد. از آنجا که مارکرهای ژنتیکی مذکور دارای تنوع اندازه در گوسفندان مختلف هستند، لذا به نظر می‌رسد از این سه مارکر می‌توان در راستای شناخت و تعیین هویت گوسفندان نژاد لری بختیاری بهره برد.

واژه‌های کلیدی: گوسفند لری بختیاری، مارکرهای ژنتیکی، میکروستلایت

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

حیوانات و گیاهان بومی به عنوان سرمایهٔ ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب می‌شوند و حفظ و تکثیر آنها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. این موجودات پس از هزاران سال انتخاب طبیعی و مصنوعی و نیز گذر از موانع بسیار و با غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند (۱). گوسفند نژاد لری بختیاری از جمله گوسفندان بزرگ جثه و دنبه دار ایران است که بیشتر در مناطق جنوب غربی کشور پراکنده است. این نژاد مهمترین نژادی است که در استان چهارمحال و بختیاری پرورش داده می‌شود و هدف اصلی از پرورش این گوسفند تولید گوشت می‌باشد. امروزه جهت برآورد تنوع ژنتیکی و تعیین فواصل ژنتیکی درون جمعیت‌ها، از تکنیک‌های پیشرفته مولکولی که براساس تفاوت‌ها در سطح DNA می‌باشد استفاده می‌گردد. زیرا استفاده از نشانگرهای DNA در بررسی و تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان و حیوانات نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی کارائی بیشتری از خود نشان داده‌اند(۲). توالی‌های تکراری پشت سر هم کوتاه یا STRها مارکرهائی هستند که اطلاعات مفیدی در زمینهٔ تعیین هویت به کمک DNA در اختیار می گذارند، به طوری که تمایز بین نژادهای مختلف یک حیوان (موجود زنده) را ارائه می‌دهند. استفاده از این روش ها از دقت بسیار بالائی برخوردار است به طوری که در مورد حیوانات اهلی می‌توان با کمک آن در شناخت نژاد های اصیل و برتر از نظر سطح تولید، تحقیق و بررسی نمود. STRها توالی‌های تکراری 2-6 bp کوچکی هستند که بسیار تکرار پذیرند و تقریبا در هر 5-3 Kbp از ژنوم جانداران تکرار می شوند و براساس تعداد نوکلئوتیدها در واحد های تکراری آن، دی نوکلئوتیدی، تری نوکلئوتیدی، تترا، پنتا و هگزا نوکلئوتیدی نامیده می‌شوند. این تکرارها در ژنوم گیاهان، بی‌مهرگان، حشرات، خزندگان، دوزیستان و پستانداران وجود دارند (۳و۴). ریز ماهواره‌ها به سبب مزایای ویژه‌ای چون چند شکلی بسیار زیاد، گستردگی و توزیع تصادفی در سرتاسر ژنوم، هم بارز بودن، عدم تاثیر انتخاب طبیعی و مصنوعی بر آنها، کم هزینه بودن و ژنوتیپ‌یابی آسان، برای مطالعات ژنتیک جمعیت مناسب‌تراند. دیده شده که محصول PCR این توالی‌های تکراری برحسب تعداد تکرارها، قطعات DNAبا طول‌های متفاوت ایجاد می‌نماید. این توالی‌ها در مجموع ۲۰٪کل ژنوم پستانداران را تشکیل می‌دهند (۵). هدف از این تحقیق بررسی‌حضور سه مارکر MAF64،OarFCB304،OarAE64 در گوسفندان نژاد لری بختیاری و تعیین تنوع ژنتیکی این سه مارکر در نژاد مذکور می باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی ۵۷ رأس گوسفند نژاد لری بختیاری که در ایستگاه اصلاح نژاد شولی واقع در شهرستان شهرکرد نگهداری می‌شوند، انجام شد. نمونه‌های خون از ورید وداجی به میزان ۵ میلی‌لیتر توسط لوله های ونوجکت حاوی مادهٔ ضد انعقاد EDTA تهیه گردید. سپس خون‌های استحصالی در دمای پائین بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجهٔ سانتیگراد نگهداری شد. به منظور استخراج DNA، از کیت استخراج DNA ژنومی ساخت شرکت سیناژن ایران (DNP^{TM} KIT) استفاده شد و مراحل مطابق دستورالعمل کیت صورت پذیرفت. برای ارزیابی کیفیت DNAهای استخراج شده از ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم برماید بهره گرفته شد. غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش PCR، در حجم کل ۲۵ میکرولیتر به صورت ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq و ۲۰۰ میکرو مولار dNTP Mix تعیین گردید. همچنین ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل برای جلوگیری از تبخیر شدن مخلوط PCR اضافه گردید. برنامه دمایی واکنش PCR برای سه جفت پرایمر مورد استفاده به ترتیب یک مرحله به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۲ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴ درجه

www.SID.ir

Archive of SID

سانتی‌گراد ۱ دقیقه،۶۰ درجه سانتی‌گراد۱ دقیقه و۷۲ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه تنظیم گردید. به منظور بررسی و تکثیر توالی‌های مورد نظر از سه جفت پرایمر که در جدول ۱ آمده است استفاده شد.

جدول۱. توالی پرایمر های مورد استفاده جهت تکثیر مارکرهای ژنتیکی MAF64 , OarFCB304, OarAE64

نام مارکر ژنتیکی	توالی مارکر ژنتیکی
MAF64	F : 5-CTCATGGAATCAGACAAAAGGTAGG -3 R: 5-AATAGACCATTCAGAGAAACGTTGAC -3
OarFCB304	F: 5-CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG -3 R: 5-CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG-3
OarAE64	F: 5-CAGACCACTCTCTTCCCTCCACG -3 R: 5- TGCAAGAAGGGCAGACCTTGGAG-3

محصولات PCR بدست آمده ابتدا برروی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز و مشاهده گردید، سپس به منظور مشخص شدن اندازه دقیق باندها، برروی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ در ولتاژ ۲۵۰v به مدت ۳- ۲ ساعت الکتروفورز انجام شد و رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید واسرشته با نیترات نقره صورت پذیرفت.

نتایج

DNA ژنومی استخراج شده از نمونه های خون گوسفندان نژاد لری بختیاری با استفاده از ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت و کیفیت و کمیت آن از شرایط مطلوبی برای انجام PCR برخوردار بود. PCR بر روی DNAهای استخراج شده از خون ۵۷ گوسفند نژاد لری بختیاری انجام گردید. در مجموع ۱۰۱ باند از PCR جایگاهای مورد مطالعه مشاهده گردید که به ترتیب مارکرهای OarAE64،OarFCB304, MAF64 دارای۳۱ باند،۳۶ باند و۳۴ باند می‌باشند. از مجموع ۳۴ باند بدست آمده از مارکر OarAE64 به صورت ۱۵ مورد باند ۱۵۰bp، ۱۰ مورد باند ۱۴۰bp، ۶ مورد باند ۱۳۰bp و۳ مورد باند ۱۲۰bp مشاهده گردید. فراوانی باندهای مارکر MAF64 به صورت باند ۱۵۰bp، باند ۱۴۰bpو باند ۱۳۰bp، به ترتیب در ۱۶، ۹ و۶ مورد مشاهده گردید. اما بیشترین تعداد باند و وسعت محدوده باندی مربوط به مارکر OarFCB304 بود که فراوانی باندهای مشاهده شده در۱۰ مورد مربوط به باند ۱۷۰bp، در ۵ مورد مربوط به باند ۱۶۰bp، در۱۲ مورد مربوط به باند ۱۵۰ bp، در۳ مورد مربوط به باند ۱۴۰bp، در ۶ مورد مربوط به باند ۱۳۰bp بود. در هر سه مارکر مذکور محدوده باندی ۱۵۰bp-۱۲۰ جفت بازی مشترک است و در بیشتر موارد باند ۱۵۰ و۱۴۰ جفت بازی با هم مشاهده گردید که مواردی از این دست در شمارش باندها مورد لحاظ قرار گرفت. توالی میکروستلایت‌های مورد استفاده دراین بررسی همگی منو مورف بود. مقایسه محدوده باندی مشاهده شده با مقادیر گزارش شده در منابع خارجی و داخلی از اندازه‌های اللی جدیدی برای جایگاهای مذکور در جمعیت گوسفند نژاد لری بختیاری حکایت می کند.

بحث

سه مارکر مورد استفاده در این تحقیق می توانند به عنوان مارکر مناسب برای شناسائی گوسفند نژاد لری بختیاری بکار روند و ارتباط بین این سه مارکر و صفات تولیدی نیز می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. مارکر MAF64 اولین بار توسط Swarbrick و همکاران در سال۱۹۹۱ بکار برده شد آنها نشان دادند که این مارکر ۱۱ آلل مختلف دارد (۶). همچنین Arranz و همکاران در سال ۲۰۰۱ برای تعیین تنوع ژنتیکی گوسفندهای اسپانیایی از روش میکروستلایت استفاده کردند که مارکر MAF64 نیز یکی از مارکرهای مورد استفاده در تحقیق فوق بود (۷). مارکر OarFCB304 در سال ۱۹۹۳ توسط Buchanan و Crawford معرفی گردید و در همان سال Ede و همکاران نخستین بار مارکر ۱۵ آللی OarAE64 را شناسایی و مورد استفاده قرار دادند (۸). همچنین Buduram و همکاران در سال ۲۰۰۴ برای تعیین تنوع ژنتیکی نژادهای مرینوی آفریقای شمالی نیز از روش میکروستلایت استفاده کردند (۹). محققین دیگری از جمله Miika Tapio در ۲۰۰۶ سال و Arranz و همکاران در سال ۲۰۰۱ برای بررسی روی نژادهای اروپائی، اسپانیائی و مرینوی آفریقای شمالی از مارکرهای ژنتیکی استفاده کردند (۱۰و ۱۱).

www.SID.ir

Archive of SID

در این تحقیق نیز از مارکرهای مذکور جهت تکثیر جایگاههای مربوطه در گوسفند نژاد لری بختیاری استفاده گردید که به دلیل آمیزش‌های خویشاوندی زیاد و کوچک بودن گله پرورشی قطعات تکثیر شده تنوع زیادی را نشان نمی‌دهند. همچنین به دلیل انتخاب در این گله تعادل هاردی- واینبرگ در جایگاها بر قرار نمی‌باشد. البته وجود باندهای یک شکل در همه گله نشان از آمیزش خویشاندی زیاد بین گوسفندان دارد. در پایان می توان چنین نتیجه گیری نمود که استفاده از یک گله با آمیزش‌های خویشاوندی نمی‌توان انتظار بالایی از تعیین دقیق هتروزیگوتی در بین نمونه‌های مورد بررسی داشت در نتیجه پیشنهاد می‌شود جایگاه‌های ریزماهواره‌ای بیشتری درسایر نژادها نیز بررسی شوند تا ساختار ژنتیکی جمعیت گوسفندان ایران شناسایی شود که این امر می تواند بر شناسایی ذخایر ژنتیکی و حفظ تنوع ژنی دام‌های کشور موثر باشد.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از کلیه همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Mirhosseni, S., 1377. Evaluation of silkworm genetic diversity using DNA markers and protein. Ph.D thesis. Tarbiat Modarres University.
2. Banabazi, M.H., 1381. Evaluation of genetic diversity within and between five Iranian sheep populations using microsatellites markers. Senior Thesis: Genetic and Animal Breeding, Faculty of Agriculture, Tehran University.
3. Kimpton, C., Fisher, D., Watson, S., Adams, M., Urquhart, A., Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. International Journal of Legal Medicine 106, 302-311.
4. Lins, A., Sprecher, C., 1996. Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci-silver stain and fluorescence detection. Biotechnology Techniques 20, 882-889.
5. Puers, C., Hammond, H., Caskey, C., Lins, A., Sprecher, C., Brinkmann, B., 1994. Allelic ladder characterization of the short tandem repeat polymorphism located in the 5' flanking region to the human coagulation factor XIII A subunit gene. Genomics 23, 260-264.
6. Swarbrick, P.A., Buchanan, F.C., Crawford, A.M., 1991. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF64 locus. Animal Gnentic 22, 375-376.
7. Miller, M., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1978. A simple salting out precedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16, 121-125.
8. Buchanan, F.C., Crawford, A.M., 1993. Ovine micros atellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB 193, OarFCB 266, and OarFCB 304 loci. Animal Genetic 24, 145.
9. Buduram, P., 2004. Genetic characterization of southern African sheep breeds using DNA markers. Depa Anim, Wildlife and Grassland Sciences University of the Free State 12, 34-45.
10. Arranz, J.J., Bayón, Y., San Primitivo, F., 1998. Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. Animal Genetic 29, 435-440.
11. Tapio, M., 2006. Origin and maintenance of genetic diversity in northern European sheep. Acta University of Oulu A 473.

www.SID.ir