بررسی تنوع نوکلئوتیدی موجود در جمعیت‌های قوچ و میش دو منطقه حفاظت‌شده تنگ‌صیاد و کرایی خوزستان با استفاده از توالی‌یابی ناحیه D-loop و ژن Cyt-b میتوکندری

- **سیامک یوسفی‌سیاهکلرودی*:** دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا
- **صابر خدرزاده:** دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا
- **شهاب الدین منتظمی:** دفتر موزه تاریخ طبیعی و ذخایر ژنتیکی، سازمان حفاظت محیط زیست

تاریخ دریافت: تیر ١٣٨٩ تاریخ پذیرش: آذر ١٣٨٩

چکیده

به منظور مطالعهٔ تنوع نوکلئوتیدی موجود در جمعیت‌های قوچ و میش دو منطقه حفاظت شده تنگ صیاد استان چهار محال و بختیاری و کرایی خوزستان، از سرگین افراد موجود در دو جمعیت بطور تصادفی نمونه‌گیری بعمل آمد. سپس DNA نمونه‌ها استخراج و جهت بررسی و مقایسه ژنتیکی دو جمعیت مذکور از ناحیه D-loop و ژن Cyt-b ژنوم میتوکندری استفاده شد. پس از تکثیر هر جایگاه بوسیلهٔ PCR، نمونه‌ها مورد توالی‌یابی قرار گرفت. سپس، بررسی توالی‌ها در راستای وجود یا عدم وجود هاپلوتیپ، با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 انجام پذیرفت. نتاب، در نتایج نشان داد که جمعیت مذکور ناحیه D-loop دارای ٥٥٢ جفت نوکلئوتید و ژن Cyt-b نیز واجد ٥٨٩ جفت نوکلئوتید بوده و هیچ تفاوت ژنتیکی معنی‌داری در بین دو جمعیت قوچ و میش مورد مطالعه وجود نداشت.

کلمات کلیدی: گوسفند وحشی، تنوع نوکلئوتیدی، ژنوم میتوکندری

مقدمه

در سال‌های اخیر، تکنیک‌های پیشرفتهٔ مولکولی که تفاوت بین افراد را در سطح مولکول DNA مشخص می‌نمایند، جهت مطالعهٔ تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و نژادهای مختلف، به یاری متخصصان آمده و به ابزار قابل اعتمادی در این راستا تبدیل گردیده‌اند زیرا با توجه به اطلاعات دقیقی که بدست می‌آید، می‌توانند نتایج تجزیه و تحلیل رکوردها که با روش‌های پیشرفتهٔ آماری تعیین شده‌اند را تأیید و تکمیل نمایند (٣). از ابزارهای ژنتیکی کارآمد، که برای تعیین هویت حیوانات اهلی و غیراهلی، مشخص نمودن والدین آنها، روابط شجره‌ای بین افراد جمعیت، بررسی ساختار و تمایز جمعیت‌ها بکارگیری شده، می‌توان به نشانگرهای ریزماهواره و جایگاه‌های موجود در DNA میتوکندری (mtDNA) اشاره نمود که امروزه بطور گسترده از این جایگاه‌ها در راستای تعیین تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی موجودات مختلف استفاده

*پست الکترونیکی نویسندهٔ مسئول: Siamak_Yousefi1@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

می‌شود (۶، ۷ و ۸). با توجه به غنای زیستگاه‌های کشور از لحاظ تنوع جانوری و در معرض خطر انقراض قرارگرفتن تعدادی از گونه‌های موجود، بررسی‌های جمعیتی و حفظ این ذخایر ژنتیکی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (۵). متأسفانه در ایران بررسی ساختار ژنتیکی و تعیین قرابت جمعیت‌های مختلف جانوران در سالهای اخیر آغاز شده و حتی تاکنون هیچ مطالعه مدونی در راستای تعیین ساختار برخی از گونه‌های جانوری حائز اهمیت، بخصوص در حال انقراض انجام نپذیرفته است. بعنوان مثال از خانواده Bovidae، گوسفندان وحشی، آهو و جبیر بدلیل شکار بی‌رویه از گونه‌های جانوری در معرض خطر تهدید بشمار آمده ولی مطالعات اندکی روی تنوع ژنتیکی و تعیین قرابت درون گونه‌ای این جانوران انجام نپذیرفته است. در کشور، بیشتر مطالعات روی بعضی از نژادهای گوسفند اهلی انجام شده است (۲)، در حالیکه در بعضی از کشورهای آسیایی، آفریقایی، اروپایی و آمریکایی تحقیقات گسترده‌ای روی تعیین ساختار ژنتیکی گوسفندان بومی و وحشی هر کشور صورت گرفته و حتی در کشورهای پیشرفته، بیشترین توجه به نژادهای نادر معطوف بوده است. در مدیریت جهانی، منابع ژنتیکی حیوانی، نژادهای در معرض خطر و سایر نژادها تفاوتی اساسی نداشته و منظور نمودن حفظ حداکثر تنوع ژنتیکی در مخزن ژنی هر گونه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۵). Arrana و همکاران (۱۹۹۸) با تحقیقی روی ۵ نژاد گوسفند بومی اسپانیا و گوسفند آواسی با استفاده از ۱۶ نشانگر ریزماهواره، نتیجه گرفتند که بیشترین تنوع ژنتیکی در گوسفند مرینوس و کمترین در گوسفند آواسی می‌باشد. Tapio (۲۰۰۶) نیز تحقیقی را در رابطه با تعیین قرابت و فیلوژنی گوسفندان اروپایی، قفقازی و آسیای مرکزی با استفاده از انگشت‌نگاری mtDNA انجام داده که در این بین هاپلوگروه‌های متعددی تعیین گردید.

مواد و روشها

در این تحقیق براساس میزان پراکنش، از سرگین ۴۱ رأس قوچ و میش، در دو منطقه حفاظت شده تنگ صیاد استان چهارمحال و بختیاری و کرایی خوزستان، بطور تصادفی نمونه‌گیری بعمل آمد (نمونه‌گیری با در نظر گرفتن گله‌های موجود و اطمینان از تعلق پلیت‌های سرگین به افراد مختلف و حصول اطمینان از اینکه هر نمونه سرگین متعلق به یک فرد باشد، توسط کارشناسان ادارات محیط زیست مناطق مذکور انجام گردید) و در درون ظروف حاوی اتانول مطلق قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه ژنتیک سازمان حفاظت محیط زیست منتقل و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند.

سپس، DNA نمونه‌ها به روش خدرزاده و همکاران (۱۳۸۹) استخراج و پس از ارزیابی‌های کمی و کیفی، با استفاده از نانودراپ ۱۰۰۰ ارزیابی گردید. بمنظور بررسی تنوع نوکلئوتیدی موجود در جمعیت‌ها، برای ناحیه D-loop و ژن Cyt-b میتوکندری قوچ و میش با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 پرایمر طراحی گردید (جدول ۱).

پس از بهینه‌سازی شرایط PCR حاکم بر هر نشانگر از لحاظ غلظت مواد شرکت‌کننده در واکنش (جدول ۲) و چرخه‌های حرارتی (جدول۳)، محصولات PCR هر کدام بطور مجزا روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و حصول اطمینان از خلوص باندی، نمونه‌ها توسط شرکت میلاژن فرانسه توالی‌یابی گردیدند و کلیه توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA 4.0 آنالیز شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ١: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای قوچ و میش

جایگاه	توالی نوکلئوتیدی آغازگرها	
D-loop	F:	5'– ACAACACGGACTTCCCACTC –3'
	R:	5'– CATGGTGAACAAGCTCGTGA –3'
Cyt b	F:	5'– AACGCATTCATTGATCTCCC –3'
	R:	5'– GAATTCCTGTGGGGTTGTTG –3'

جدول ٢: غلظت اجزای واکنش PCR

اجزای واکنش	غلظت مورد نیاز	غلظت مورد نیاز
	D-loop	**Cyt-b**
PCR بافر	١٠X	١٠X
$MgCl_2$	٢٥mM	٢٥mM
پرایمر **F**	١٠٠ pmol	٥ pmol
پرایمر**R**	١٠٠ pmol	٥ pmol
dNTPs	١٠mM	١٠mM
Taq	٥unit/µl	٥unit/µl
ddH_2O	–	–
DNA	٥٠ng/µl	٥٠ng/µl

جدول ٣: دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR

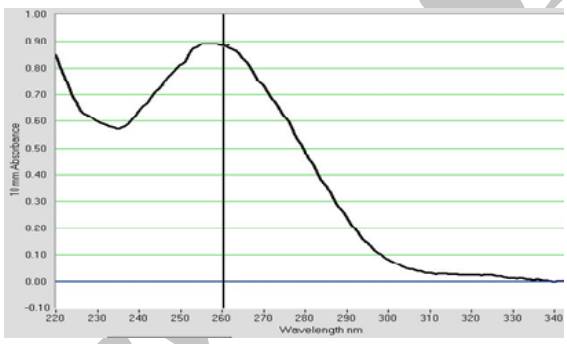
	شرایط PCR	حرارت (درجه سانتیگراد)		زمان	
		D-loop	**Cyt-b**	**D-loop**	**Cyt-b**
١	واسرشته‌سازی اولیه	٩٤	٩٤	٩ دقیقه	٩ دقیقه
٢	واسرشته‌سازی	٩٤	٩٤	٣٠ ثانیه	٣٠ ثانیه
٣	اتصال آغازگر	٥٥–٥٨	٥٥–٥٨	٣٠ ثانیه	٣٠ ثانیه
٤	بسط آغازگر	٧٢	٧٢	٣٠ ثانیه	٣٠ ثانیه
٥	تکرار مرحلهٔ ٢ تا ٤ (٣٥ مرتبه)	----	----	----	----
٦	بسط نهایی آغازگر	٧٢	٧٢	٥ دقیقه	٥ دقیقه
٧	نگهداری محصول در دستگاه PCR	٤	٤	-----	------

Archive of SID
www.SID.ir

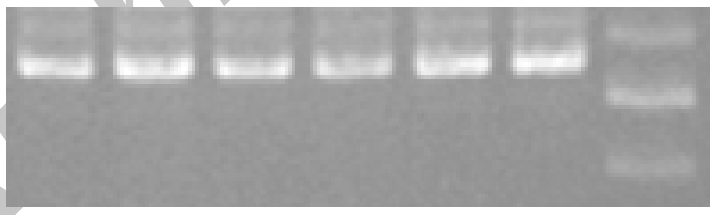
نتایج

ارزیابی‌های کمی و کیفی DNA حاصله با استفاده از دستگاه نانودراپ نشان داد که OD نمونه‌های DNA در هر دو منطقه حفاظت شده تنگ صیاد استان چهارمحال و بختیاری و کرایی خوزستان بین ۲-۱/۸ و غلظت آن بطور میانگین در حدود ۱۲۰-۷۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود (حصول DNA با غلظت‌های بالاتر از سرگین امکان‌پذیر بود و ارتباط مستقیمی با رعایت صحیح شرایط نمونه‌برداری دارد). همچنین ارزیابی‌های کیفی DNA حکایت از عدم آلودگی پروتئینی نمونه‌ها دارد (نمودار ۱).

مشاهدات روی ژل آگارز ۲ درصد نیز، نتایج حاصله از فقدان آلودگی پروتئینی نمونه‌ها که توسط دستگاه نانودراپ ارزیابی شده بود را تأیید نمود. حصول DNA مناسب و ایده‌آل، بیانگر کارآمدی افزون دستورالعمل ابداع شده در این پژوهش است که در مقایسه با نمونه‌هایDNA استخراج شده از خون قابل رقابت است. در این مطالعه، جایگاه D-loop در دو جمعیت قوچ و میش دارای ۱ هاپلوتیپ با تعداد نوکلئوتید حدود ۵۵۲bp بود. ژن سیتوکروم b در کلیهٔ جمعیت‌ها دارای ۱ هاپلوتیپ با تعداد نوکلئوتید حدود ۵۸۹bp بود.



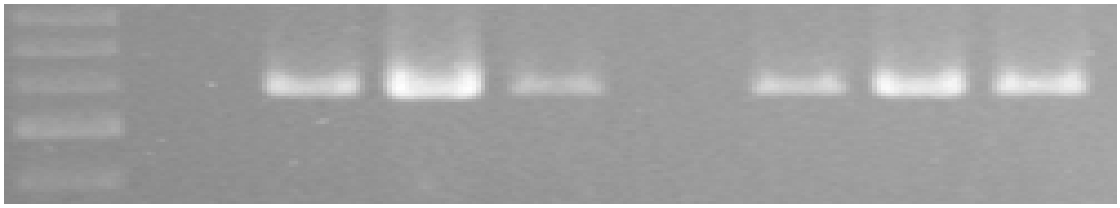
نمودار ۱: نمودار کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده توسط نانودراپ



شکل ۱: اُلگوی آللی ناحیه D-loop

5′ACAACACGGACTTCCCACTCCACAAACCCACATAACAACCCATACAGAAGCACAACCATCCACC
CACGGACACGAGCGTTCACAAACCCAACATATCTTATGTCCGTCTTGAACATGCTAAACGAGTACA
TAGTATTAATGTAATATAGACATTATATGTATAAAGTACATTAAATGATTTACCCCATGCATATAAG
CACGTATATTAGTATTAATGTAATATAGACATTATATGTATAAAGTACATTAAATGATTTACCCCAT
GCATATAAGCACGTATATTAGTATTAATGTAATATAGACATTATATGTATAGAGTACATTAAGTGA
TTTACCCCATGCATATAAGCACGTATATTAGTATTAATGTAATATAGACATTATATGTATAAAGTAC
ATTAAATGATTTACCCCATGCGTATAAGCATGTATATTTGTTTCACTGAGGCATATAGGACATTAAA
CTGCTTGACCGTACATAGCACATAAAGTCAAATCTGTTCTAGCCAACATGCGTATCCCGTCCACTA
GATCACGAGCTTGTTCACCATG3′

www.SID.ir



شکل ۲: اُلگوی آللی ژن سیتوکروم b

5′AACGCATTCATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATTTCATCACATGATGACTTTGGCTCTCTCCTA
GGCATTTGCTTAATTTTACAGATTCTAACAGGCCTATTCCTAGCAATACACTATACACCTGACACAA
CAACAGCATTCTCCTCTGTAACCCACATCTGCCGAGACGTAAACTATGGCTGAATTATCCGATATAT
ACACGCAAACGGGGCATCAATATTTTTTATCTGCCTATTTATGCATGTAGGACGAGGCCTATATTAT
GGATCATATACCTTCCTAGAAACATGAAACATCGGAGTAATCCTCCTATTTGCGACAATAGCCACA
GCATTCATAGGCTATGTTTTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTTATTACCAAC
CTCCTTTCAGCAATTCCATATATTGGCACAAGCCTAGTCGAATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTA
GACAAAGCTACCCTCACCCGATTTTTCGCCTTTCACTTTATTTTCCCATTCATCATCGCAGCCCTCGC
CATAGTTCACCTACTCTTCCTCCACGAAACAGGATCCAACAACCCCACAGGAATTC3′

با توجه به اینکه در جمعیت‌های قوچ و میش دو منطقه تنگ صیاد چهارمحال و بختیاری و کرابی خوزستان، تنها یک هاپلوتیپ مشاهده گردید، لذا میزان خلوص ژنتیکی در جمعیت‌های ذکر شده، بالا می‌باشد و دو جمعیت از نظر ژنتیکی بطور معنی‌داری به یکدیگر شباهت دارند.

بحث

از دیدگاه متخصصین ژنتیک جمعیت، تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها همزمان با یک تعادل و توازن بین رانش و جریان ژنی شروع شده و هر جمعیت متحمل نرخ جهش و رانش ژنتیکی خود خواهد شد که تمایل به متمایز کردن جمعیت‌ها از یکدیگر داشته و بالعکس جریان ژنی جمعیت‌ها را به یکدیگر شبیه‌تر می‌نماید (۸). همانطوری که اشاره گردید جایگاه‌های مورد بررسی در گونه تحت مطالعه مونومورف بوده و با توجه به میزان *Fst* که گویای تشابه و تفاوت جمعیتی است، ظاهر امر حکایت از عدم تفاوت جمعیت‌های مذکور و شباهت ژنتیکی بالای آنها به یکدیگر داشته و این مهم در هر گونه، با استناد به نتایج حاصله و فرض بر نمونه‌گیری تصادفی از افراد مختلف هر جمعیت قابل بحث است.

با توجه به همجواری زیستگاه دو جمعیت قوچ و میش تنگ صیاد چهارمحال و بختیاری و کرابی خوزستان، این امکان وجود دارد که جریان ژنی در این دو جمعیت بطور متعادل در سالهای متوالی برقرار بوده یا اینکه دو جمعیت مذکور دارای زیستگاه مشترک می‌باشد بنابراین، شباهت ژنتیکی این دو جمعیت قابل توجیه است.

منابع

۱- خدرزاده، ص.، یوسفی‌سیاهکلرودی، س. و منتظمی، ش.، ۱۳۸۹. ابداع مناسبترین پروتوکل استخراج DNA ژنومی از سرگین در راستای مطالعات ژنتیکی گونه‌های وحشی و در خطر انقراض. یازدهمین کنگره ژنتیک ایران، ۱ تا ۳ خرداد ۱۳۸۹، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

۲-عصفوری، ر.، ۱۳۷۶. مارکرهای ژنتیکی در ده نژاد از گوسفندان بومی ایران. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۳۴، صفحه ۱۵۴.

۳- نقوی، م. ر.، قره‌یاضی، ب. و حسینی‌سالکده، ق.، ۱۳۸۶. نشانگرهای مولکولی، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۳۴ صفحه.

4-Arranz, J.J., Bayon, Y. and Primitivo, F.S., 1998. Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. Anim. Genet. 29:435-440.

5- Frankham, R., Ballou, J.D. and Brisco, D.A., 2002. Introduction to conservation genetics. First published, Cambridge University Press.

6- Goldstein, D.B. and Schlotterer, C., 2000. Microsatellite evolution and applications. Oxford University Press, Oxford, UK. 76:368-369.

Archive of SID

www.SID.ir

7- Litt, M. and Lutty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *invitro* amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44:397-401.

8- Schlotterer, C. and Pemberton, J., 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. A critical review. pp.71-86.

9-Tapio, M., 2006. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. Mol. Biol. Evol, 23(9):1776-1783.

Archive of SID

www.SID.ir