بررسی ساختار ژنتیکی سنجاب بلوچی (*Funambulus pennantii*) با استفاده از آنالیز ریزماهواره

- **سیامک یوسفی‌سیاهکلرودی***: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا
- **صابر خدرزاده:** دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا
- **مریم عیدی:** دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا
- **منا ایزدیان:** دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۹

چکیده

بمنظور مطالعهٔ ساختار ژنتیکی سنجاب بلوچی، پس از صید ۵۰ نمونه از آن، نمونه‌برداری و استخراج DNA از تار مو، از ۷ نشانگر ریزماهواره استفاده گردید. پس از تکثیر جایگاه‌ها بوسیلهٔ تکنیک PCR و تعیین ژنوتیپ، با استفاده از نرم‌افزار، آنالیزهای مربوطه انجام شد. در این تحقیق از بین نشانگرهای مورد مطالعه، جایگاه Thu 50 دارای بیشترین تعداد آلل مشاهده شده (۳ آلل) و جایگاه Thu 21 دارای کمترین تعداد آلل (۲ آلل) بودند. بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی در جایگاه Thu 50 نمایان شد. بیشترین هتروزایگوسیتی مشاهده شده و هتروزایگوسیتی مورد انتظار نااُریب نی در جایگاه Thu 50 (بترتیب ۰/۲۵۰ و ۰/۵۵۹) و کمترین مقدار پارامترهای مذکور در جایگاه Thu 21 (بترتیب ۰/۰۰۰ و ۰/٤٤٤) مشاهده گردید. بیشترین و کمترین مقدار شاخص شانون نیز بترتیب در جایگاه‌های Thu 50 (۰/۹۳٤) و Thu 21 (۰/٦۳۷) دیده شد. در این جمعیت، کلیه جایگاه‌ها در تعادل هاردی- وینبرگ بودند.

لغات کلیدی: سنجاب بلوچی، ساختار ژنتیکی، چندشکلی، ریزماهواره

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 قابل‌اعتمادی در این راستا تبدیل گردیده است 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 (۱).

از ابزارهای ژنتیکی کارآمد که برای تعیین هویت حیوانات اهلی و غیراهلی، مشخص‌نمودن 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 مطالعات ژنتیکی موجودات مختلف استفاده می‌شود (۴، ۶ و ۷).

با توجه به غنای زیستگاه‌های کشور از لحاظ تنوع جانوری و در معرض خطر انقراض قرار گرفتن تعدادی از گونه‌های موجود، بررسی‌های جمعیتی و حفظ این ذخایر از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. متأسفانه در ایران بررسی ساختار ژنتیکی و تعیین قرابت جمعیت‌های مختلف جانوران در سالیان اخیر آغاز

*پست الکترونیکی نویسندهٔ مسئول: Siamak_Yousefi1@yahoo.com

شده و حتی تاکنون هیچ مطالعه ژنتیکی مدونی در برخی از گونه‌های جانوری حائز اهمیت، بخصوص در حال انقراض انجام نپذیرفته است. در کشورهای پیشرفته، بیشترین توجه به نژادهای نادر معطوف بوده است ولی 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 (۳). سنجاب بلوچی یکی از گونه‌های جانوری منحصر بفرد استان سیستان و بلوچستان بشمار می‌آید. متأسفانه اطلاعات بسیار کمی از وضعیت پراکنش این جانور در ایران در دسترس است و حتی می‌توان گفت تنها سند مدون در زمینه مطالعه سنجاب بلوچی گزارش وزیری (۱۳۷۱) می‌باشدکه وی در این گزارش، وجود پراکندگی و اهمیت سنجاب بلوچی را بعنوان آفتی برای گیاهان منطقه مورد بررسی بیان نمود. با توجه به این که کارهای مطالعاتی روی ژنتیک جمعیت سنجاب بسیار کم می‌باشد، به اهم آنها اشاره می‌گردد. Gunn و همکاران (۲۰۰۵) مطالعاتی را روی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های سنجاب قرمز آمریکای شمالی (*Tamiasciurus hudsonicus*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام دادند که نتایج حاصله نشان داد که تنوع آللی در جایگاه‌های تحت مطالعه بین ۶ تا ۱۳ آلل و هتروزایگوسیتی مشاهده شده ۰/۸۹ بود. Stephan و همکاران (۲۰۰۴) مطالعه‌ای روی فیلوژنتیک برخی از گونه‌های سنجاب مانند Flying squirrels، Tree squirrel و Terrestrial squirrels انجام دادند. این مطالعه نشان داد که رابطه خویشاوندی سنجاب‌های پرنده و درختی بسیار بهم نزدیک است ولی تا حدی با سنجاب زمینی متفاوت می‌باشد. اما از طرفی جمعیت‌های سنجاب زمینی آفریقا و مناطق شمالی کره زمین بسیار متنوع می‌باشد.

در این تحقیق، با توجه به عدم وجود اطلاعات از ساختار ژنتیکی جمعیت سنجاب بلوچی استان سیستان و بلوچستان، میزان تنوع ژنتیکی موجود در این جمعیت، با استفاده از ۷ نشانگر ریزماهواره بررسی می‌گردد.

مواد و روشها

در این تحقیق، نمونه‌برداری از سنجاب بلوچی در شهرستان چابهار صورت گرفت و علت این انتخاب، وجود جمعیت زیادی از این گونه در منطقه فوق بود. طی بازدیدهای بعمل آمده در حدود ۵۰ سنجاب بلوچی از طریق تله‌گذاری صید گردیدند که از این تعداد ۳۳ سنجاب نر و ۱۷ سنجاب ماده بودند. سپس نمونه‌برداری از تاروموی سنجاب انجام پذیرفت و سنجاب‌های صید شده رهاسازی شدند. نمونه تارهای موی گرفته شده به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا منتقل و DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت QIAamp® DNA Investigator ساخت شرکت کیاژن استخراج گردید.

در این تحقیق، به منظور بررسی ساختار ژنتیکی و پارامترهای تنوع درون جمعیتی سنجاب بلوچی، از ۷ نشانگر ریزماهوارهٔ با نامهای Thu 08، Thu 21، Thu 23، Thu 31، Thu 37، Thu 41 و Thu 50 استفاده گردید (جدول ۱) که دلیل انتخاب آنها، وجود تکثیر در گونه‌های مختلف بود. پس از بهینه‌سازی شرایط PCR حاکم بر هر نشانگر از لحاظ غلظت مواد شرکت‌کننده در واکنش (جدول ۲) و چرخه‌های حرارتی (جدول ۳)، محصولات PCR هر کدام بطور مجزا روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد الکتروفورز گردیدند. کلیهٔ الکتروفورزها در طول شب انجام پذیرفت و دو چاهک هر ژل نیز به نشانگر وزن مولکولی اختصاص داده شد.

پس از رنگ‌آمیزی و اسکن‌نمودن ژل‌ها، با استفاده از برنامهٔ Gel-Pro Analyzer 3.1، وزن مولکولی آلل‌ها براساس جفت‌باز اندازه‌گیری و سپس ژنوتیپ افراد تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در راستای تعیین فاکتورهایی مانند معیارهای چندشکلی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار نااُریب نی، شاخص شانون و تعادل هاردی-وینبرگ (توسط آزمون مربع کای و نسبت درست‌نمایی) با استفاده از نرم‌افزارهای مختلفی مانند GenAIEx 6، POPGENE 1.31 برآورد گردید (۹ و ۱۰).

جدول ۱: نام و توالی نوکلئوتیدی آغازگرها

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی آغازگر (′۳-′۵)
Thu 08-F	CTCATTCCCCTGCTGCCTTC
Thu 08-R	ACAGACCTTTCTTTGCCCTTGAA
Thu 21-F	AATGAGAGGGCTCCACAGAG
Thu 21-R	AACTCCACCTTCTCAGTCTGTTC
Thu 23-F	GCTACCCACTGTGACCCAAC
Thu 23-R	TGTGACCATGGAACAGATGC
Thu 31-F	GGCCCTTTTCCATGATGC
Thu 31-R	AAAGCAGGTGGAACTCTGAGC
Thu 37-F	CTTGGGGTTGCAGATGTAGC
Thu 37-R	AGTGGGGTGTGTAGCTCTGG
Thu 41-F	CAAACCAGCTCATTGTACAGC
Thu 41-R	TCAGAACATTTCAGACTAAAGAATTG
Thu 50-F	ATTCCCAGCCCCCGCAAA
Thu 50-R	TCCACCCCCTTTGTTACTGTTTTCAA

جدول ۲: غلظت اجزای واکنش PCR

اجزای واکنش	غلظت و مقدار مورد نیاز
بافر PCR	۱X
$MgCl_2$	۱/۵mM
آغازگرها	۰/۵µM
dNTPs	۲۰۰µM
آنزیم Taq پلی مراز	۰/۵unit
DNA الگو	۱۰ -۲۰ng
ddH_2O	متغیر

جدول ۳: دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR

	مراحل PCR	درجه حرارت (سانتیگراد)	زمان
۱	واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۵ دقیقه
۲	واسرشته‌سازی	۹۴	۳۰ ثانیه
۳	اتصال آغازگر	۶۴	۳۰ ثانیه
۴	بسط آغازگر	۷۲	۳۵ ثانیه
۵	تکرار مرحلهٔ ۲ الی ۴ (۳۵ مرتبه)	-	-
۶	بسط نهایی آغازگر	۷۲	۷ دقیقه
۷	نگهداری محصول در دستگاه PCR	۴	-

نتایج

ارزیابی‌های کمی و کیفی DNA حاصله توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، نشان داد که جذب نوری نمونه‌های DNA بین ۲-۱/۸ است که نشان‌دهندهٔ عدم آلودگی پروتئینی و RNA نمونه‌ها بوده و مشاهدات بر روی ژل آگارز نیز، نتایج حاصله از فقدان آلودگی نمونه‌ها که توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد را تأیید نمود.

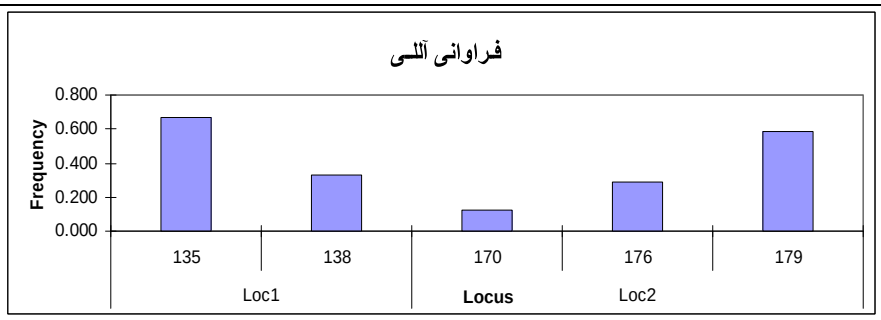
در این پژوهش، ۷ جایگاه Thu 08، Thu 21، Thu 23، Thu 31، Thu 37، Thu 41 و Thu 50 در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد آزمایش تکثیر قرار گرفت که در این میان جایگاه‌های Thu 21 و Thu 50 در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید که با نتایج گان و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت داشت. جایگاه‌های Thu 08، Thu 23، Thu 31، Thu 37 و Thu 41علیرغم تغییرات مختلف ایجادشده در بهینه‌سازی شرایط PCR آن، تکثیر نگردید که این نتیجه با نتایج گان و همکاران (۲۰۰۵) در بعضی گونه‌ها مطابقت و با تعدادی از گونه‌های مورد مطالعه مطابقت نداشت. همچنین دامنهٔ آللی در جایگاه‌های تحت بررسی دارای اختلاف زیادی با مطالعات انجام‌شده توسط گان و همکاران (۲۰۰۵) بود (جدول ۳). در بین جایگاه‌های تحت مطالعه، جایگاه Thu 50 دارای بیشترین آلل (۳ آلل) و جایگاه Thu 21 دارای کمترین آلل (۲ آلل) بود (نمودار ۱).

بیشترین هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده در جایگاه Thu 50(۰/۲۵۰) و کمترین هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده در جایگاه Thu 21 (۰/۰۰۰) بود که در تحقیقات گان و همکاران (۲۰۰۵) بترتیب در جایگاه‌های Thu 21 (۰/۷۷) و Thu 50 (۰/۶۳) مشاهده گردیده است. بیشترین هتروزایگوسیتی مورد انتظار نااُریب نی نیز در جایگاه Thu 50 (۰/۵۵۹) و کمترین هتروزایگوسیتی مورد انتظار نااُریب نی در جایگاه Thu 21 (۰/۴۴۴) مشاهده گردید که بدلیل تفاوت گونه‌ای یا خصوصیت جمعیتی، این نتیجه با نتایج سایر محققین مطابقت ندارد. در تحقیقات گان و همکاران (۲۰۰۵) بیشترین و کمترین هتروزایگوسیتی مورد انتظار نااُریب نی بترتیب در جایگاه‌های Thu 21 (۰/۷۸) و Thu 50 (۰/۶۵) مشاهده شده است. با در نظرگرفتن کلیهٔ جایگاه‌ها، بیشترین مقدار شاخص شانون در جایگاه Thu 50 (۰/۹۳۴) و کمترین مقدار آن در جایگاه Thu 21 (۰/۶۳۷) مشاهده گردید که با نتایج حاصله از مقادیر هتروزایگوسیتی نیز مطابقت دارد.

با توجه به نتایج حاصله از آماره‌های F، بطور معنی‌دار، تنوع درون جمعیتی اندکی در این گونه سنجاب مشاهده می‌گردد (جدول ۴). با آزمون مربع کای و حداکثر نسبت درست‌نمایی ($P<۰/۰۵$)، جمعیت مورد بررسی دارای تعادل هاردی- وینبرگ بود (نمودار ۲ و ۳). با توجه به نتایج حاصله (نمودار ۴)، میزان هتروزایگوسیتی در جمعیت سنجاب بلوچی معنی‌دار نبوده که این امر بیانگر تنوع ژنتیکی پایین در جمعیت مورد مطالعه است.

جدول ۳: دامنه آللی مشاهده شده و گزارش شده

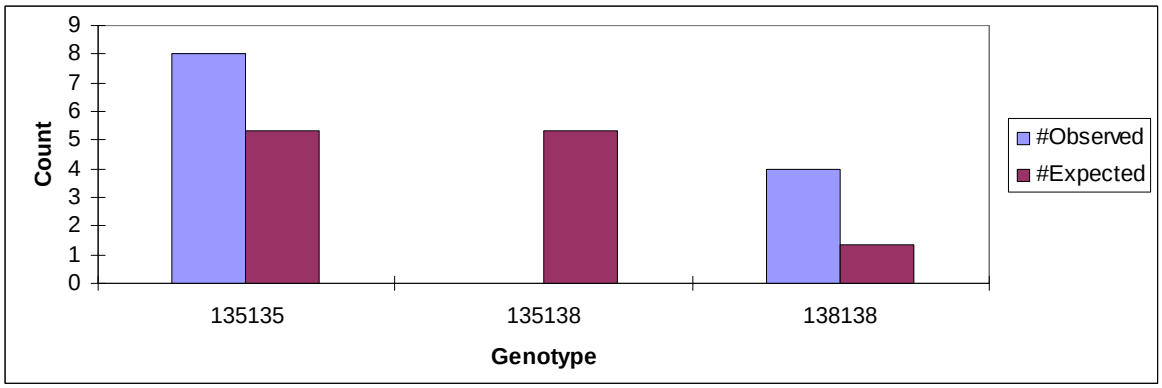
جایگاه / دامنهٔ آللی (bp)	Thu 50	Thu 21
دامنهٔ آللی مشاهده‌شده	(۱۷۰-۱۷۹)	(۱۳۵-۱۳۸)
دامنهٔ آللی گزارش‌شده (گان، ۲۰۰۵)	(۲۷۳-۲۸۹)	(۱۴۸-۱۷۹)



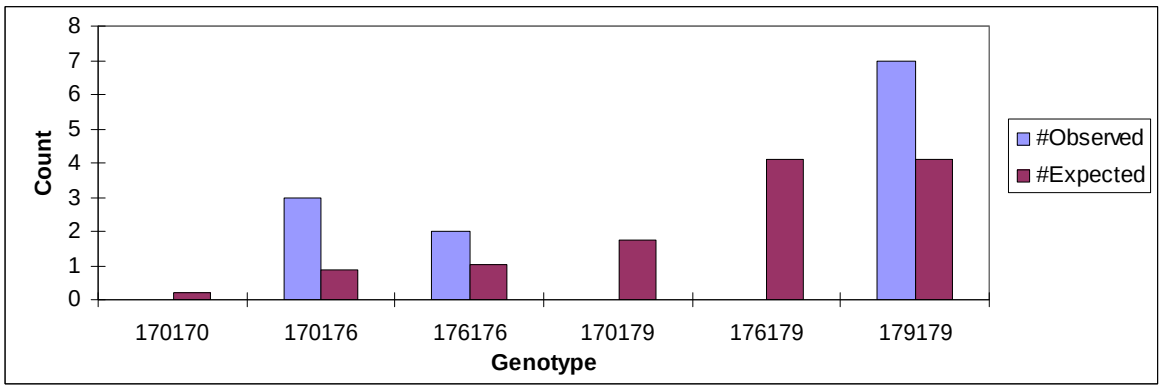
نمودار ۱: فراوانی و تعداد آلل جایگاه‌ها

جدول ٤: آماره‌های F

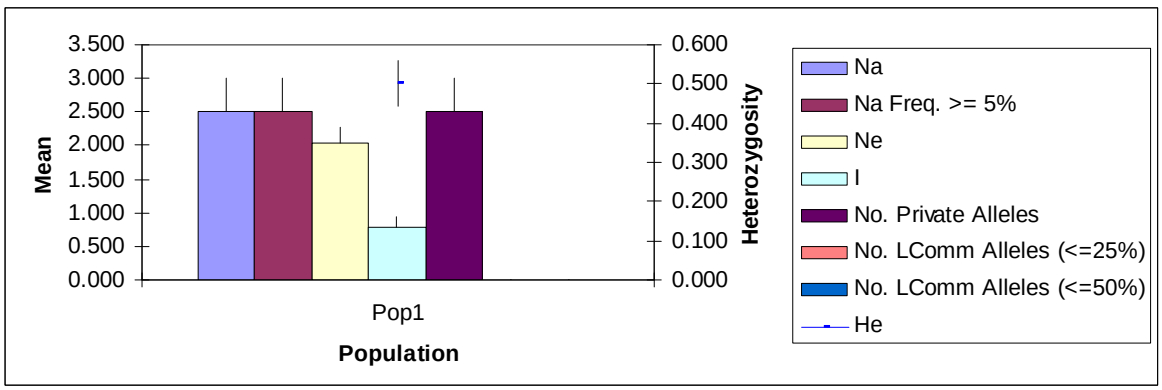
	Fis	Fit	Fst
Thu 21	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰
Thu 50	۰/۵۵۲	۰/۵۵۲	۰/۰۰۰



نمودار ۲: مقادیر مشاهده شده و مورد انتظار با توجه به ژنوتیپ در جایگاه **Thu 21**



نمودار ۳: مقادیر مشاهده شده و مورد انتظار با توجه به ژنوتیپ در جایگاه **Thu 50**



نمودار ٤: پارامترهای تنوع درون جمعیتی

بحث

در این مطالعه، عدم تکثیر جایگاه‌های مذکور نشأت‌گرفته از اختلاف گونه‌ای و حداقل حاکی از عدم تشابه توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای این گونه با توالی‌های آغازگری گونه‌های سنجاب سایر نقاط دنیا بوده که این امر بیانگر تفاوت ساختار ژنتیکی گونه سنجاب بلوچی ایران با سایرین است. همانگونه که مشاهده می‌شود هتروزایگوسیتی موجود و از طرفی تنوع ژنتیکی در مقایسه با سایر مطالعات، دارای دامنهٔ پایینی است که میزان آماره‌های F نیز مؤید این مطلب است. با استناد به نتایج فوق، مبنی بر وجود تنوع ژنتیکی پایین و خلوص بالای ژنتیکی در جمعیت مورد مطالعه، قاعدتاً در جمعیت‌های کوچک و بسته، امکان وجود همخونی و اثرات نامطلوب آن از جمله کاهش شایستگی (Fitness)، کاهش قدرت زنده‌مانی (Viability)، کاهش تولید مثل، بروز ناهنجاری‌های ژنتیکی و غیره امری محتمل به نظر رسیده و بروز این عوامل مخرب، تداوم و بقاء این گونه را در دراز مدت به مخاطره انداخته و آنها را در معرض خطر انقراض قرار خواهد داد. ولی با توجه به جمعیت نسبتاً زیاد سنجاب بلوچی، عدم تخریب زیستگاه این جانور، پراکنش مناسب این گونه جانوری در نواحی مختلف منطقه بلوچستان، وجود منابع غذایی کافی در زیستگاه، عدم وجود عوامل بر هم زننده تعادل سیستماتیک و غیرسیستماتیک، معدود بودن شکارچیان گونه مذکور و عدم تهدید جدی توسط انسان، انقراض آن بعید به نظر می‌رسد.

منابع

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

۲- وزیری، ا.ش.، ۱۳۷۱. بررسی وجود، پراکندگی و اهمیت سنجاب راه راه. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. موسسه آفات و بیماری‌های گیاهی. ۷۵صفحه.

3-Frankham, R., Ballou, J.D. and Brisco, D.A., 2002. Introduction to conservation genetics. First Published, Cambridge University Press. 617P.

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

5-Gunn, M., Dawson, D. and Leviston, A., 2005. Isolation of 18 polymorphic microsatellite loci from the North American red squirrel, *Tamiasciurus hudsonicus* (Sciuridae, Rodentia), and their cross-utility in other species. Molecular Ecology Notes, 5:650–653.

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

7-Schlotterer, C. and Pemberton, J., 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. A Critical Review. Basel, pp.71-86.

8–Steppan, S., Storz, B.L. and Hoffmannb, R.S., 2004. Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and RAG1. Molecular Phylogenetics and Evolution, 30: 703–719.

9-Peakall, R. and Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excle. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Note, 6:288-295.

10-Yeh, F.C., Yang, R. and Boyle, T., 1999. POPGENE version 1.31, Microsoft windows-based free ware for population genetic analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada. 29P.