

بررسی تنوع نوکلئوتیدی موجود در جمعیت‌های قوچ و میش دو منطقه حفاظت‌شده تنگ‌صیاد و کرایبی خوزستان با استفاده از توالی‌یابی ناحیه D-loop و

ژن Cyt-b میتوکندری

- سیامک یوسفی سیاه‌کلودی*: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا
 - صابر خدرزاده: دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا
 - شهاب‌الدین منتظمی: دفتر موزه تاریخ طبیعی و ذخایر ژنتیکی، سازمان حفاظت محیط زیست
- تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۸۹

چکیده

به منظور مطالعه تنوع نوکلئوتیدی موجود در جمعیت‌های قوچ و میش دو منطقه حفاظت‌شده تنگ صیاد استان چهارمحال و بختیاری و کرایبی 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 بوسیله PCR، نمونه‌ها مورد توالی‌یابی قرار گرفت. سپس، بررسی توالی‌ها در راستای وجود یا عدم وجود هاپلوטיפ، با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که جمعیت مذکور ناحیه D-loop دارای ۵۵۲ جفت نوکلئوتید و ژن Cyt-b نیز واجد ۵۸۹ 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

تکمیل نمایند (۳). 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

در سال‌های اخیر، تکنیک‌های پیشرفته مولکولی که تفاوت بین افراد را در سطح مولکول DNA مشخص می‌نمایند، جهت مطالعه 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 پیشرفته آماری تعیین شده‌اند را تأیید و



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 کرابی 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 درجه 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 (جدول ۳)، محصولات PCR هر کدام بطور مجزا روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردیدند. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و حصول اطمینان از خلوص باندها، نمونه‌ها توسط شرکت میلژن فرانسه توالی‌یابی گردیدند و کلیه توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA 4.0 آنالیز شدند.

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 گونه‌های 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.



جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای قوچ و میش

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

جدول ۲: غلظت اجزای واکنش PCR

اجزای واکنش	غلظت مورد نیاز	
	D-loop	Cyt-b
بافر PCR	۱۰X	۱۰X
MgCl ₂	۲۵mM	۲۵mM
پرایمر F	۱۰۰ pmol	۵ pmol
پرایمر R	۱۰۰ pmol	۵ pmol
dNTPs	۱۰mM	۱۰mM
Taq	۵unit/μl	۵unit/μl
ddH ₂ O	-	-
DNA	۵۰ng/μl	۵۰ng/μl

جدول ۳: دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR

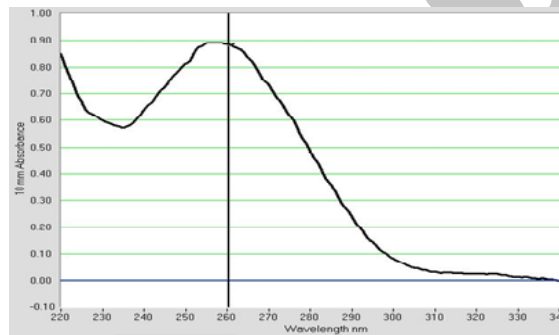
زمان	حرارت (درجه سانتیگراد)		شرایط PCR	
	Cyt-b	D-loop		
۹ دقیقه	۹۴	۹۴	واسرشته‌سازی اولیه	۱
۳۰ ثانیه	۹۴	۹۴	واسرشته‌سازی	۲
۳۰ ثانیه	۵۵-۵۸	۵۵-۵۸	اتصال آغازگر	۳
۳۰ ثانیه	۷۲	۷۲	بسط آغازگر	۴
-----	-----	-----	تکرار مرحله ۲ تا ۴ (۳۵ مرتبه)	۵
۵ دقیقه	۷۲	۷۲	بسط نهایی آغازگر	۶
-----	۴	۴	نگهداری محصول در دستگاه PCR	۷



نتایج

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 نمونه‌های DNA 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 کلیه جمعیت‌ها دارای ۱ هاپلوتیپ با تعداد نوکلئوتید حدود ۵۸۹bp بود.

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 کرایه خوزستان بین ۲-۱/۸ و غلظت آن بطور میانگین در حدود ۷۰-۱۲۰ 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).



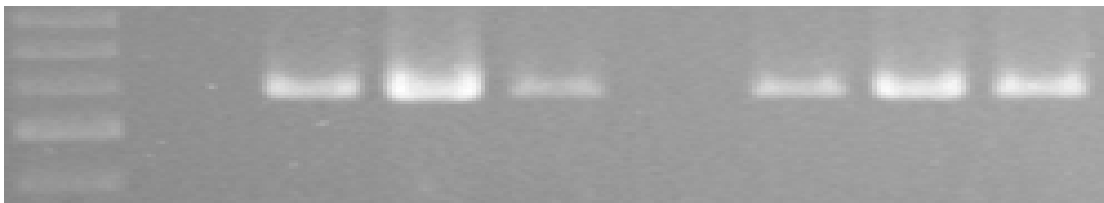
نمودار ۱: نمودار کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط نانودراپ



شکل ۱: الگوی آلی ناحیه D-loop

```
5'ACAACACGGACTTCCCCTCCACAAACCCACATAACAACCCATACAGAAGCACAACCATCCACC
CACGGACACGAGCGTTCACAAACCCAACATATCTTATGTCCGCTTGAACATGCTAAACGAGTACA
TAGTATTAATGTAATATAGACATTATATGTATAAAGTACATTAATGATTTACCCCATGCATATAAG
CACGTATATTAGTATTAATGTAATATAGACATTATATGTATAAAGTACATTAATGATTTACCCCAT
GCATATAAGCAGTATATTAGTATTAATGTAATATAGACATTATATGTATAGAGTACATTAAGTGA
TTTACCCCATGCATATAAGCAGTATATTAGTATTAATGTAATATAGACATTATATGTATAAAGTAC
ATTAATGATTTACCCCATGCGTATAAAGCATGTATATTTGTTTCACTGAGGCATATAGGACATTA
CTGCTTGACCGTACATAGCACATAAAGTCAAATCTGTTCTAGCCAACATGCGTATCCCGTCCACTA
GATCACGAGCTTGTTCCACCATG3'
```





شکل ۲: الگوی آلی ژن سیتوکروم b

5'AACGCATTTCATTGATCTCCAGCTCCATCAAATATTTTCATCACATGATGACTTTGGCTCTCTCCTA
GGCATTGCTTAATTTTACAGATTCTAACAGGCCTATTCCTAGCAATACACTATACACCTGACACAA
CAACAGCATTCTCCTCTGTAACCCACATCTGCCGAGACGTAAACTATGGCTGAATTAACCGATATAT
ACACGCAAACGGGGCATCAATATTTTTTATCTGCCTATTTATGCATGTAGGACGAGGCCTATATTAT
GGATCATATACCTTCTAGAAACATGAAACATCGGAGTAATCCTCCTATTTGCGACAATAGCCACA
GCATTCATAGGCTATGTTTTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTTATTACCAAC
CTCCTTTTCAGCAATTCCATATATTGGCACAAGCCTAGTCGAATGAATCTGAGGAGGATTCTCAGTA
GACAAAGCTACCCCTACCCGATTTTTCGCCTTTCACCTTATTTTCCCATTTCATCATCGCAGCCCTCGC
CATAGTTCACCTACTCTTCTCCACGAAACAGGATCCAACAACCCACAGGAATTC3'

مشترک می‌باشد بنابراین، شباهت ژنتیکی این دو جمعیت قابل توجیه است.

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

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.

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



7- Litt, M. and Luty, 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

