دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان نامه خانم مهسا نیکوبین بروجنی جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته علوم دامی گرایش ژنتیک و اصلاح دام با عنوان: ارزیابی تنوع ژنتیکی مرغان بومی فارس بر مبنای توالی‌یابی بخشی از ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری در تاریخ ۹۳/۱۰/۲۹ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با نمره ۱۹/۹۴ مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

استاد راهنمای پایان نامه

دکتر نصرالله پیرانی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

استاد مشاور پایان نامه

دکتر فریبا رفیعی بروجنی با مرتبه علمی استادیار امضاء

استادان داور پایان نامه

دکتر سعید کریمی دهکردی با مرتبه علمی استادیار امضاء

دکتر غلامرضا ربیعی با مرتبه علمی استادیار امضاء

دکتر محمد حسن صالحی

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده کشاورزی

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی علوم دامی گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام

ارزیابی تنوع ژنتیکی مرغان بومی فارس بر مبنای توالی‌یابی بخشی از ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری

استاد راهنما

دکتر نصرالله پیرانی

استاد مشاور

دکتر فریبا رفیعی بروجنی

پژوهشگر

مهسا نیکوبین بروجنی

دی ماه ۱۳۹۳

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول- مقدمه..... ۵

۱-۱- کلیات..... ۵

۱-۲- هدف اجرای طرح..... ۷

فصل دوم- بررسی منابع..... ۸

۲-۱- تاریخچه مطالعه روی میتوکندری..... ۸

۲-۲- منشأ میتوکندری در سلول های یوکاریوتی..... ۹

۲-۳- شکل و اندازه میتوکندری و تغییرات آن ها..... ۱۰

۲-۴- تعداد میتوکندری ها در سلول..... ۱۱

۲-۵- ساختمان میتوکندری..... ۱۱

۲-۶- نقش زیستی و فعالیت فیزیولوژیکی میتوکندری..... ۱۲

۲-۶-۱- فسفوریلاسیون اکسیداتیو (تنفس هوازی یا تنفس سلولی)..... ۱۲

۲-۶-۲- سنتز اسیدهای چرب و دخالت میتوکندری در گوارش چربی ها..... ۱۳

۲-۶-۳- سنتز پروتئین..... ۱۳

۲-۷- ساختار ژنوم میتوکندری..... ۱۳

۲-۷-۱- ناحیه D-loop..... ۱۵

۲-۷-۲- نواحی HVR-I وHVR-II..... ۱۵

۲-۸- توارث میتوکندری..... ۱۵

۲-۹- آستانه هتروپلاسمی..... ۱۷

۲-۱۰- کاربردهای ژنوم میتوکندری..... ۱۷

۲-۱۰-۱- تشخیص انساب..... ۱۷

۲-۱۰-۲- تشخیص تقلب‌ها..... ۱۸

۲-۱۰-۳- تشخیص اختصاصی گونه ها..... ۱۸

۲-۱۰-۴- اختلالات و بیماری‌های میتوکندریایی..... ۱۸

۲-۱۰-۵- بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژئوگرافیک..... ۲۱

۲-۱۱- مزایای ژنوم میتوکندری در تشخیص گونه‌ها و رسم درخت فیلوژنی..... ۱۹

۲-۱۲- هاپلوتیپ و هاپلوگروه..... ۲۰

۲-۱۳- همانند سازی ژنوم میتوکندری..... ۲۰

۲-۱۴- رونویسی ژنوم میتوکندری..... ۲۱

۲-۱۵- ترجمه ژنوم میتوکندری..... ۲۲

۲-۱۶- دلایل سرعت بالای جهش در mtDNA..... ۲۲

۲-۱۷- توده‌های مرغ خانگی بومی ایران..... ۲۲

۲-۱۷-۱- تاریخچه..... ۲۲

۲-۱۷-۲- معرفی مرغ بومی فارس..... ۲۳

۲-۱۸- تحقیقات در زمینه توالی یابی mtDNA..... ۲۴

فصل سوم- مواد و روش ها..... ۳۵

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

۳-۱- جمعیت مورد بررسی ۳۳
۳-۲- جمع آوری نمونه‌ها ۳۳
۳-۳- استخراج DNA ۳۴
۳-۳-۱- مواد مورد استفاده ۳۴
۳-۳-۲- مراحل استخراج DNA ۳۴
۳-۴- کیفیت و کمیت سنجی DNA استخراج شده ۳۵
۳-۴-۱- تعیین کیفیت و کمیت DNA با الکتروفورز ۳۶
۳-۴-۲- ابزار و مواد مورد نیاز ۳۶
۳-۴-۳- روش کار ۳۶
۳-۴-۴- آزمون DNA با اسپکتروفتومتر ۳۷
۳-۴-۵- روش کار ۳۷
۳-۵- انتخاب آغازگرها (پرایمرها) ۳۸
۳-۶- اجرای PCR ۳۸
۳-۶-۱- مواد و محلول‌های مورد نیاز ۳۸
۳-۶-۲- روش انجام کار با PCR ۳۹
۳-۶-۳- برنامه حرارتی PCR ۴۰
۳-۶-۳-۱- دمای واسرشت ۴۱
۳-۶-۳-۲- دمای اتصال ۴۱
۳-۶-۳-۳- دمای طویل شدن ۴۱
۳-۷- الکتروفورز محصولات PCR ۴۴
۳-۸- خالص سازی محصولات PCR ۴۵
۳-۸-۱- مراحل خالص سازی ۴۳
۳-۹- تعیین توالی محصولات تکثیر شده ۴۴
۳-۱۰- درخت فیلوژنی ۴۴
۳-۱۱- بانک ژن ۴۵
۳-۱۲- نرم افزارها و برنامه‌های مورد استفاده ۴۵
۳-۱۲-۱- BioEdit7 ۴۵
۳-۱۲-۲- MEGA5 ۴۵
۳-۱۲-۳- Clustal W ۴۵
۳-۱۲-۴- Arlequin3.5 ۴۶
۳-۱۲-۵- Sequin ۴۶
۳-۱۳- تجزیه و تحلیل توالی ها ۴۶
فصل چهارم- نتایج و بحث ۴۷
۴-۱- استخراج DNA ۴۷
۴-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۴۷

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

۴-۳- PCR (تکثیر ناحیه D-loop) ۵۰
۴-۴- توالی یابی محصولات PCR ۴۹
۴-۵- آنالیز نمونه های توالی یابی شده ۴۹
۴-۶- ثبت توالی در بانک ژن ۵۰
۴-۷- بررسی تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی ۵۱
۴-۸- تعیین توالی جامع ۵۲
۴-۹- رسم درخت فیلوژنی ۵۲
۴-۱۰- نتیجه گیری کلی ۵۴
۴-۱۱- پیشنهادات ۵۵
منابع ۵۸

فهرست شکل ها

عنوان **شماره صفحه**

شکل ۲-۱- ورود DNA سلول های پروکاریوتی به سلول های یوکاریوتی ۱۰
شکل ۲-۲- میکروگراف الکترونی از اندازه میتوکندری در سلول های مختلف ۱۰
شکل ۲-۳- دیاگرام سه بعدی از یک میتوکندری در برش طولی ۱۱
شکل ۲-۴- نقش میتوکندری در فسفوریلاسیون اکسیداتیو ۱۲
شکل ۲-۵- نقش میتوکندری در تولید پروتئین ۱۳
شکل ۲-۶- ژنوم میتوکندری، جایگاه ژن ها و ناحیه D-loop ۱۴
شکل ۲-۷- نواحی HVR-I و HVR-II ۱۵
شکل ۲-۸- شجره توارث مادری DNA میتوکندری ۱۶
شکل ۲-۹- میتوکندری های اسپرم و تخمک و نحوه توارث مادری ۱۶
شکل ۲-۱۰- هتروپلاسمی در سلول های مختلف ۱۷
شکل ۲-۱۱- همانندسازی DNA میتوکندری ۲۱
شکل ۲-۱۲- مرغ بومی فارس ۲۳
شکل ۲-۱۳- ژنوم میتوکندری در پرندگان و پستانداران ۲۴
شکل ۲-۱۴- درخت فیلوژنی مرغ های بومی ژاپنی ۲۶
شکل ۲-۱۵- هاپلوتیپ های به دست آمده برای مرغ نیجریه ۲۸
شکل ۲-۱۶- درخت فیلوژنی رسم شده برای مرغ نیجریه ۲۸
شکل ۲-۱۷- زیر شاخه های به دست آمده برای مرغ بومی کره ای ۳۰
شکل ۳-۱- مرغان بومی فارس ۳۳
شکل ۳-۲- میکروتیوب مورد استفاده در آزمایش ۳۹
شکل ۳-۳- دستگاه PCR ۴۰
شکل ۳-۴- مراحل حرارتی مختلف در PCR ۴۲
شکل ۳-۵- مراحل مختلف خالص سازی محصولات PCR توسط کیت ExoSAP-IT ۴۴
شکل ۴-۱- باند های تولید شده از الکتروفورز DNA استخراج شده از نمونه های خون ۴۸
شکل ۴-۲- الکتروفورز محصولات PCR ۴۸
شکل ۴-۳- یک نمونه توالی ثبت شده مرغ بومی فارس در بانک ژن با کد دسترسی KF973203 ۵۱
شکل ۴-۴- توالی Consensus به دست آمده برای نمونه های مرغ بومی فارس ۵۲
شکل ۴-۵- درخت فیلوژنی رسم شده برای نمونه های مرغ بومی فارس ۵۲
شکل ۴-۶- درخت فیلوژنی رسم شده برای نژاد مرغ بومی فارس و سایر نژادهای دریافتی از بانک ژن ۵۳

فهرست جدول ها

عنوان **شماره صفحه**

جدول ۳-۱- ترکیب محلول های مورد استفاده در استخراج DNA ۳۴
جدول ۳-۲- برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش PCR ۴۰
جدول ۴-۱- موقعیت SNP و هاپلوتیپ‌های به دست آمده برای نمونه‌های مرغ بومی فارس ۴۹
جدول ۴-۲- تعداد هاپلوتیپ، درصد فراوانی نسبی نوکلئوتیدها، تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی ناحیه HVR-I ۵۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کلیات

مرغ‌های بومی با نگهداری در سیستم‌های پرورش باز روستایی، مصرف ضایعات کشاورزی و پس‌مانده سفره خانوارهای روستایی بدون هیچ سرمایه گذاری عمده‌ای و با تحمیل حداقل هزینه بر مالک خود بخشی از پروتئین جوامع روستایی را تامین می‌کند. پرورش مرغ بومی با توجه به خصوصیات منحصر به فرد آن از جمله مقاومت در مقابل شرایط سخت محیطی، استفاده از مواد زراعی موجود در روستا، هزینه پایین نگهداری و پرورش، بازار پسندی و کیفیت مطلوب تولیدات از دیر باز مورد توجه بوده است. مرغان بومی علاوه بر آن‌که به عنوان یکی از ذخایر مخزن ژنتیکی با ارزش کشور محسوب شده، قادرند نقش بسزایی در طرح‌های به‌نژادی ایفا کنند (نوراللهی و کمالی، ۱۳۹۱).

تنوع نژادی مرغ‌های محلی عمدتاً بر اساس فنوتیپ از جمله رنگ پر، شکل تاج، وزن بلوغ، وزن تخم‌مرغ و قابلیت تولیدمثلی گزارش می‌شود. این نوع دسته‌بندی، اطلاعات بسیار محدودی در مطالعه واریانس ژنتیکی و تنوع نژادی در اختیار می‌گذارد. ژنوم میتوکندری (mtDNA)[1] به طور موفقیت آمیزی برای تخمین تنوع ژنتیکی در مرغان آسیایی استفاده شده است (نیو و همکاران، ۲۰۰۲؛ لیو، ۲۰۰۴).

به طور عموم پذیرفته شده که مرغ خانگی از یک جد واحد منشعب شده است. مرغ جنگلی قرمز گالوس گالوس که در جنوب شرقی آسیا زیست می‌کند، منشأ مرغ اهلی محسوب می‌شود (آدبامبو، ۲۰۰۹).

سال‌های زیادی متخصصین ژنتیک و اصلاح نژاد ساختار ژنتیکی حیوانات را از طریق انتخاب فنوتیپی و بدون اینکه اطلاعاتی در مورد ژن‌های انفرادی داشته باشند تغییر داده‌اند (علیجانی، ۱۳۸۸).

پیشرفت‌های ایجاد شده در حوزه بیولوژی مولکولی این امکان را به وجود آورده که از طریق نشانگرهای ژنتیکی در سطح مولکول DNA ژن‌های مسئول ایجاد تفاوت ژنتیکی ما بین افراد و جمعیت‌ها تعیین شوند. در بین نشانگرهای ژنتیکی، توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از بهترین و رایج‌ترین روش‌ها برای طبقه بندی

[1] Mitochondrial DNA

ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم، بررسی امکان اشتقاق گونه‌های مختلف از یک جد مشترک، مطالعه رابطه فیلوژنی هر موجود با سایر گونه‌ها و نژادها و دستیابی به راهکارهایی برای حفظ ذخایر ژنتیکی می‌باشد (ولی زاده، ۱۳۹۰).

امروزه توالی‌یابی بخش‌های مختلف ژنوم میتوکندری به دلیل فراوانی میزان جهش در حدود ۱۰ برابر DNA هسته‌ای و داشتن نواحی حفاظت نشده که هیچ پروتئینی را کد نمی‌کنند، مانند ناحیه بسیار متغیر D-loop[1] و تکثیر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها در بررسی‌های تنوع زیستی و ارزیابی بین گونه‌ها و نژادها تبدیل شده است. اساس تحقیقات بر روی میتوکندری بر پایه استخراج DNA، انجام PCR[2] و خالص‌سازی محصولات آن و توالی‌یابی است. بررسی شباهت توالی‌ها به کمک تعیین توالی کل ژنوم به پیش بینی محل و عملکرد نواحی کدکننده پروتئین‌ها و نواحی تنظیم رونویسی و دیگر نواحی در DNA ژنومی منجر خواهد شد. بخشی از ژنوم میتوکندری، منطقه D-loop منطقه آغاز همانندسازی ژنوم میتوکندری است و دارای دو ناحیه بسیارمتغیر(HVR-I)[3] و (HVR-II)[4] است. این دو منطقه کدکننده هیچ پروتئینی نیستند و در شروع رونویسی نقشی ندارند و جهش‌های ایجاد شده در آن‌ها بدون تغییر به نسل بعد منتقل می‌شود (سلطانا و مانان، ۲۰۰۴).

میتوکندری اندامکی سیتوپلاسمی است که در بیشتر سلول‌های بدن وجود دارد و طول تقریبی آن در طیور، ۱۶ کیلو جفت باز می‌باشد. این اندامک که قادر به تولید انرژی برای سلول است، دارای DNA حلقوی اختصاصی و مستقل از DNA هسته‌ای است و در گونه‌های جانوری ۳۷ ژن را کد می‌کند که شامل ۱۳ ژن کدکننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کدکننده tRNA و ۲ ژن کدکننده rRNA است (والس، ۱۹۹۲).

ژنوم میتوکندری دارای ناحیه‌ای به نام D-loop یا ناحیه کنترلی است که فاقد هر گونه ژن رمز کننده‌ای بوده و بنابراین وقوع هر نوع جهش می‌تواند در آن‌جا تثبیت شود و میزان جهش نوکلئوتیدها در این منطقه حدود ۱۰ برابر DNA هسته‌ای است (اندرسون و همکاران، ۱۹۸۱).

تمامی تفاوت‌های ژنتیکی موجود میان افراد، لاین‌ها، جمعیت‌ها، گونه‌ها، نژادها و یا سویه‌های مختلف را که باعث تمایز بین آن‌ها می‌شود را می‌توان به عنوان نشانگر ژنتیکی در نظر گرفت. تاکنون انواع متعددی از نشانگرها شناسایی و به کار گرفته شده‌اند و کاربردهای متنوعی برای آن‌ها پیشنهاد شده است. پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک ملکولی نشانگرهای جدیدی را معرفی کرده که سطوح بالایی از چندشکلی را نشان می‌دهند و به خوبی برای آنالیز تنوع ژنتیکی در داخل و بین جمعیت‌ها مناسب می‌باشند (نصیری، ۱۳۹۱).

در حال حاضر نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR کاربرد بسیار بیشتری دارند. از انواع این نشانگرها می‌توان به چندشکلی طول قطعات حاصل از هضم آنزیم‌های محدودگر (PCR-RFLP)، تکثیر تصادفی DNA چند شکل (RAPD)، چند شکلی طول قطعات تکثیر شده (AFLP)، چندشکلی شکل فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)، تکرارهای متوالی کوتاه (STR) و چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) اشاره کرد. نشانگر SNP یکی از بهترین و پرکاربردترین مارکرهای ملکولی می‌باشد که در تحقیقات حوزه ژنومی انسانی و حیوانی به خوبی در

[1] Displacement-loop
[2] Polymerase Chain Reaction
[3] Hypervariable-one
[4] Hypervariable-two

حال استفاده است. امروزه مباحث ژنومیک و مطالعه ارتباط ژنومی مرتبط با مارکر چند شکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی می‌باشد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴).

شناسایی توالی این مناطق به عنوان مشخصه ژنتیکی ثابت محسوب می‌شود و می‌تواند به تهیه شناسنامه ژنتیکی و نگهداری خلوص نژادهای بومی کمک زیادی نماید. در ضمن با مقایسه توالی یک گونه یا نژاد با گونه‌ها و نژادهای دیگر که توالی آن‌ها در بانک ژن موجود است امکان مطالعات فیلوژنیکی، بررسی اشتقاق گونه‌ها و محاسبه فاصله نسلی وجود دارد. از طرفی توالی‌یابی این مناطق شاخص مناسبی را از میزان تنوع موجود در جمعیت ارائه می‌دهد و امکان تشخیص گونه‌ها و نژادها را نیز فراهم می‌کند و می‌تواند نقش مهمی در جهت حفظ گونه‌های بومی از خطر انقراض و اختلاط ژنتیکی با سایر نژادها داشته باشد (هایندلدر و همکاران، ۱۹۹۸).

۲-۱- هدف اجرای طرح

با توجه به موارد ذکر شده فوق در خصوص mtDNA، چنین به نظر می‌رسد که تجزیه و تحلیل ژنوم این اندامک به ویژه ناحیه D-loop آن می‌تواند کمک بسیاری در مطالعه ساختار ژنتیکی یک گونه و همچنین تمایز آن با سایر نژادهای همان گونه ایفا نماید. در همین راستا و از آن‌جا که جمعیت مرغان بومی از نظر این نشانگر ژنتیکی با ارزش مطالعه شده‌اند، این پژوهش به این منظور مطرح می‌گردد.

فصل دوم

بررسی منابع

۱-۲- تاریخچه مطالعه روی میتوکندری

اولین بررسی‌های انجام شده بر روی میتوکندری، به عنوان یک اندامک درون سلولی بیش از ۱۰۰ سال پیش توسط دانشمندی آلمانی به نام ریچارد آلتمن در سال ۱۸۹۰ صورت گرفت و بیوبلاست[1] یا جایگاه‌های زنده نام گرفت. او تصور می‌کرد که این ارگان‌های شبیه باکتری، موجودات ریز اولیه‌ای هستند که درون سلول‌ها زندگی می‌کنند. وی همچنین بیان کرد که بین واکنش‌های اکسایش و کاهش سلول و میتوکندری وابستگی وجود دارد. سپس بندا در سال ۱۸۹۷ با بررسی‌های بیشتر اجزای اصلی آن را توصیف کرد، وی در هنگام اسپرماتوژنز اجسام رشته مانند درون سلولی را میتوکندری که ترکیبی از دو واژه یونانی میتو[2] به معنای رشته و کوندریون[3] به معنای دانه نام نهاد. چون این اندامک اغلب رشته ای یا به صورت دانه‌های کوچک در سیتوپلاسم همه سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد. از سال ۱۸۹۷ به بعد میتوکندری‌ها به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفت، به تدریج روش‌هایی برای جداسازی میتوکندری‌های سالم و دست نخورده ابداع شد. در سال ۱۹۰۰، میکائیلیس به کمک معرف رنگی سبز ژانوس میتوکندری را در سلول‌های زنده مشاهده کرد. واربورگ در سال ۱۹۱۳ آنزیم‌های تنفسی را در این اندامک نشان داد. سرانجام برای اولین بار در سال ۱۹۳۴، بنسلی و هر، توانستند آن‌ها را از سلول‌های کبدی جدا کنند (یوسفی، ۱۳۸۵).

کندی و لنینگر در سال ۱۹۴۹ نشان دادند که میتوکندری آنزیم‌های فسفریلاسیون اکسیداتیو چرخه اسید سیتریک و اکسیداسیون اسیدهای چرب را در بر دارد. پیشرفت غیرمنتظره زمانی اتفاق افتاد که ناس در سال

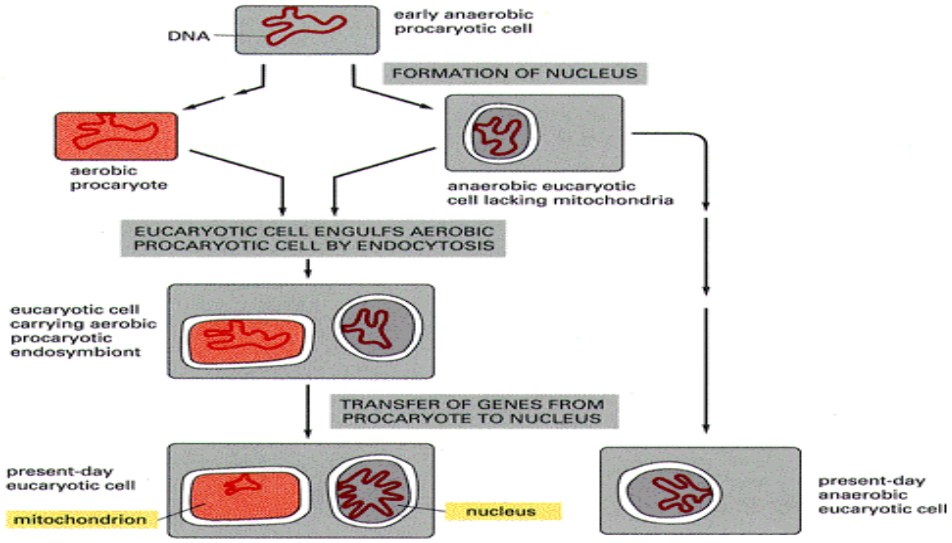
---

[1] Bioblast
[2] Mito
[3] Chondrion

۱۹۶۳ وجود DNA در میتوکندری را توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد. از اواخر دهه ۱۹۸۰ تاکنون، بر شمار بیماری‌های مرتبط با اختلال در ژنوم میتوکندریایی افزوده می‌شود (مهدوی و همکاران، ۱۳۸۵).
توالی‌یابی ژنوم میتوکندری انسان در سال ۱۹۸۱ توسط اندرسون و همکاران که به طول ۱۶۵۶۷جفت باز بود، انجام گرفت.
امروزه برای بسیاری از گونه‌ها و نژادهای مختلف جانوری، توالی کامل DNA میتوکندری شناخته شده است که بر مبنای آن فاصله ژنتیکی و سرعت تکامل قابل محاسبه است (نیو و همکاران، ۲۰۰۲).

۲-۲- منشأ میتوکندری در سلول های یوکاریوتی

شواهد فسیلی نشان می‌دهد موجودات تک سلولی در دوران اولیه حیات بر روی زمین فاقد اندامک‌های درون سلولی بوده‌اند و یا اندامک‌های بسیار کوچک داشتند. مرگ جلبک‌های سبز- آبی که در ابتدای حیات در کره زمین وجود داشته‌اند پس از ۱/۵ بیلیون سال با آزاد سازی مقدار زیادی اکسیژن باعث افزایش اکسیژن اقیانوس‌ها و اتمسفر شد و امکان زندگی در محیط‌های اکسیژن‌دار را برای سایر موجودات سلولی فراهم آورد.
بر اساس تئوری خانم لین مارگولیس که در کتاب خود با عنوان"همزیستی در تکامل سلولی" در سال ۱۹۸۱ به چاپ رسید، مراحل سیر تکاملی یوکاریوت‌ها به شرح زیر است:
۱- اکسیژن تولید شده توسط جلبک‌های سبز- آبی که محصول فرایند فتوسنتز بود، اکسیژن موجود در جو را فراهم نمود.
۲- هم‌زمان با جلبک‌های سبز- آبی، باکتری‌ها (سلول‌های پروکاریوتی) رشد و گسترش پیدا کردند که بعضی از آن‌ها توانایی زندگی هوازی را به دست آوردند.
۳- سلول‌های بی‌هوازی و هتروتروف، باکتری‌های هوازی را در برگرفتند و به داخل سلول خود بردند و همزیستی دو طرفه را آغاز کردند.
در این همزیستی دوطرفه از یک سو مواد غذایی مورد نیاز باکتری هوازی در بر گرفته شده توسط سلول میزبان تأمین می‌شد و از طرف دیگر سلول میزبان انرژی مورد نیاز خود را از فعالیت هوازی آن باکتری به دست می‌آورد که این همزیستی سرآغاز فعالیت میتوکندری‌ها در سلول محسوب می‌شود.
در این تئوری باکتری هوازی در بر گرفته شده، میتوکندری اولیه نام داشت که در نهایت با گذشت زمان و سیر تکاملی میتوکندری اولیه به یک اندامک درون سلولی تخصص یافته در سلول‌های یوکاریوتی تبدیل شد (شکل ۲-۱).
شواهدی که تئوری همزیستی درون سلولی را تأیید می‌کنند عبارتند از:
۱- میتوکندری‌ها تنها اندامک درون سلولی هستند که اندازه آن‌ها به باکتری‌ها نزدیک‌تر است.
۲- میتوکندری‌ها همانند بسیاری از باکتری‌ها، دارای غشای سلولی دو لایه حاوی مولکول‌های چربی هستند.
۳- مولکول‌های rRNA میتوکندری به مولکول‌های rRNA باکتری‌ها شباهت بیشتری دارند.
۴- تقسیم و تکثیر میتوکندری در فرایند مشابه تولیدمثل باکتری‌ها انجام می‌گیرد.
۵- مولکول DNA مستقل میتوکندری، نشان دهنده زندگی مستقل آن در گذشته است (محمدی، ۱۳۸۷).

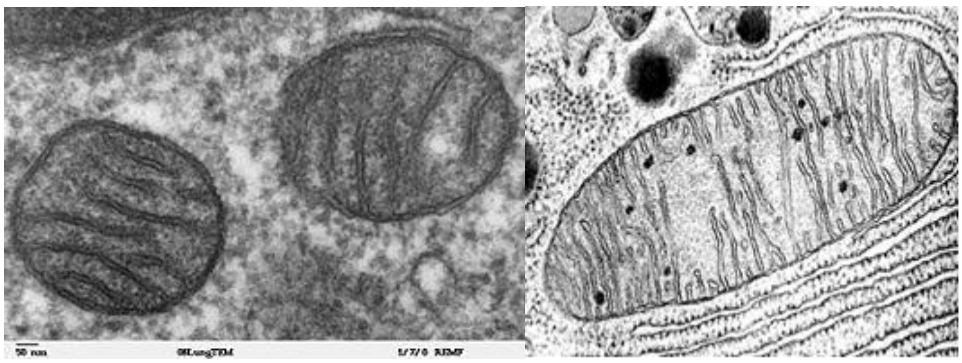


شکل ۲-۱- ورود DNA سلول های پروکاریوتی به سلول های یوکاریوتی (محمدی،۱۳۸۷).

۲-۳- شکل و اندازه میتوکندری و تغییرات آن ها

مطالعات بر روی سلول‌های زنده نشان داده که میتوکندری‌ها ساختمان‌های پویایی هستند که به طور مداوم شکل خود را تغییر داده و در داخل سیتوپلاسم سلول حرکت می‌کنند. شکل میتوکندری‌ها متغیر اما اغلب رشته‌ای یا دانه‌ای می‌باشند. همچنین ممکن است کاملاً کروی یا بیضی شکل باشند (شکل ۲-۲) (مهدوی و همکاران، ۱۳۸۵). میتوکندری‌ها در برخی مراحل عمل خود می‌توانند به شکل‌های دیگری در آیند به عنوان مثال یک میتوکندری طویل ممکن است در یک انتهای خود متورم شده و به صورتی شبیه گرز در آید (مثلاً در سلول‌های کبدی چند ساعت بعد از ورود غذا) یا ممکن است میان تهی شده و شکلی شبیه راکت تنیس به خود بگیرد. گاهی میتوکندری‌ها حفره مانند شده و دارای بخش مرکزی روشنی می‌شود، اما بعد از مدتی تمام این تغییرات به حالت اول برمی‌گردد.

اندازه میتوکندری‌ها نیز متغیر است و در بیشتر سلول‌ها ضخامت آن‌ها ۵۰ میکرون و طولشان به ۷ میکرون می‌رسد. اما متناسب با شرایط محیطی و نیز مرحله عمل سلول فرق خواهد کرد. در سلول‌هایی که هم نوع هستند یا دارای عمل مشترک می‌باشند دارای اندازه ثابت می‌باشند (یوسفی، ۱۳۸۵).



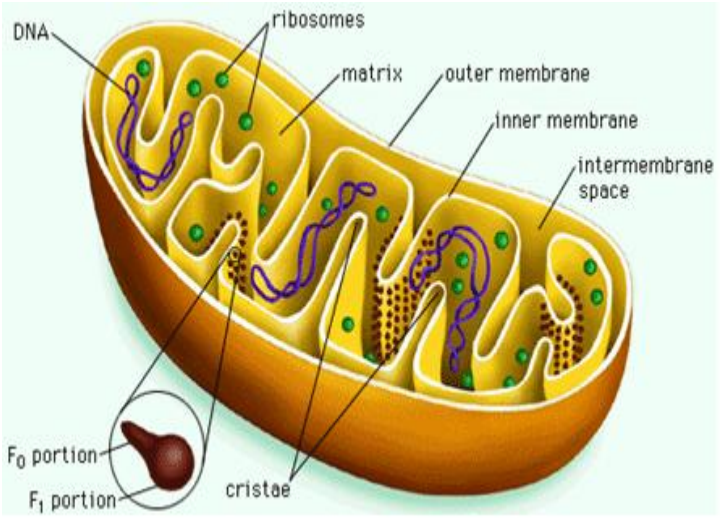
شکل ۲-۲- میکروگراف الکترونی از اندازه میتوکندری در سلول های مختلف (امتیازی، ۱۳۸۶).

۲-۴- تعداد میتوکندری ها در سلول

هر سلول ممکن است شامل صدها تا هزاران میتوکندری باشد که در سیتوپلاسم سلول وجود دارد. تعداد میتوکندری در سلول بر حسب نوع سلول و مرحله عمل سلول ممکن است متفاوت باشد. به طور کلی کبد، تخمدان و ماهیچه، بافت‌های غنی از میتوکندری هستند. در یک سلول معمولی کبد، بیشترین تعداد و در حدود ۱۰۰۰ تا ۱۶۰۰ میتوکندری وجود دارد. کم‌ترین تعداد میتوکندری در بافت لنفی است و نیز گلبول قرمز بالغ فاقد این اندامک می‌باشد. در سلول‌های گیاهی تعداد میتوکندری کمتر از جانوری است زیرا بسیاری از اعمال میتوکندری به وسیله کلروپلاست انجام می‌شود (چینری و همکاران، ۲۰۰۰).

۲-۵- ساختمان میتوکندری

میتوکندری دارای یک غشاء خارجی[۱] ، فضای بین دو غشاء[۲] و یک غشاء داخلی[۳] است (شکل ۲-۳). فضای درون میتوکندری را ماتریکس[۴] اشغال کرده که توسط غشاء داخلی احاطه شده است. غشاء داخلی فرورفتگی-هایی را در ماتریکس ایجاد می‌کند که کریستا[۵] نامیده می‌شوند. این فرورفتگی‌ها توسط یک یا دو ساقه[۶] به غشاء داخلی متصل می‌شوند (امتیازی، ۱۳۸۶).



شکل ۲-۳- دیاگرام سه بعدی از یک میتوکندری در برش طولی (برگرفته از امتیازی، ۱۳۸۶).

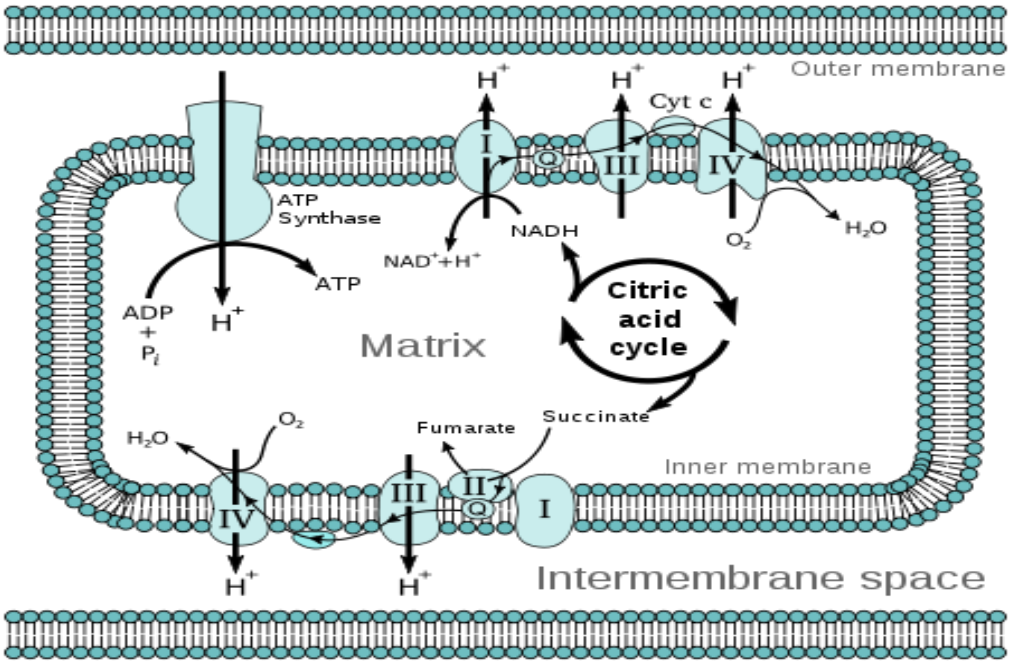
[1] Outer membrane
[2] Inner membrane
[3] Inter membrane
[4] Matrix
[5] Crista
[6] Peduncle

۲-۶- نقش زیستی و فعالیت فیزیولوژیکی میتوکندری

۲-۶-۱- فسفوریلاسیون اکسیداتیو (تنفس هوازی یا تنفس سلولی)

مهمترین عمل میتوکندری‌ها در سلول‌های یوکاریوتی امروزی، تنفس هوازی فسفوریلاسیون اکسیداتیو[1] است که شامل تولید انرژی به فرم آدنوزین تری فسفات (ATP) می‌باشد.

غشاهای میتوکندری در واقع جایگاه انتقال الکترون و سنتز ATP می‌باشند. پیرووات دهیدروژناز در ماتریکس میتوکندری پیرووات را به استیل COA و دی اکسید کربن (CO_2) تبدیل می‌کند. در هر دور از چرخه اسید سیتریک، استیل COA با سیترات چهار کربنی به اگزالواستات تبدیل شده، طی یک سری واکنش‌هایی که دو مولکول CO_2 آزاد کرده و سه مولکول NADH و یک مولکول $FADH_2$ تولید می‌کند. الکترون‌ها از NADH و $FADH_2$ از طریق حاملین الکترون در غشای داخلی میتوکندری به اکسیژن (O_2) منتقل شده و دوباره NADH و $FADH_2$ تولید می‌کنند. مرحله بعدی حرکت الکترون‌ها مربوط می‌شود به پمپ پروتون‌ها در عرض غشای داخلی که نتیجه آن تولید بیشتر ATP از اکسیداسیون هوازی گلوکز است. در شکل ۲-۴ نقش میتوکندری در فسفوریلاسیون نشان داده شده است (مهدوی و همکاران، ۱۳۸۵).



شکل ۲-۴- نقش میتوکندری در فسفوریلاسیون اکسیداتیو (برگرفته از امتیازی، ۱۳۸۶).

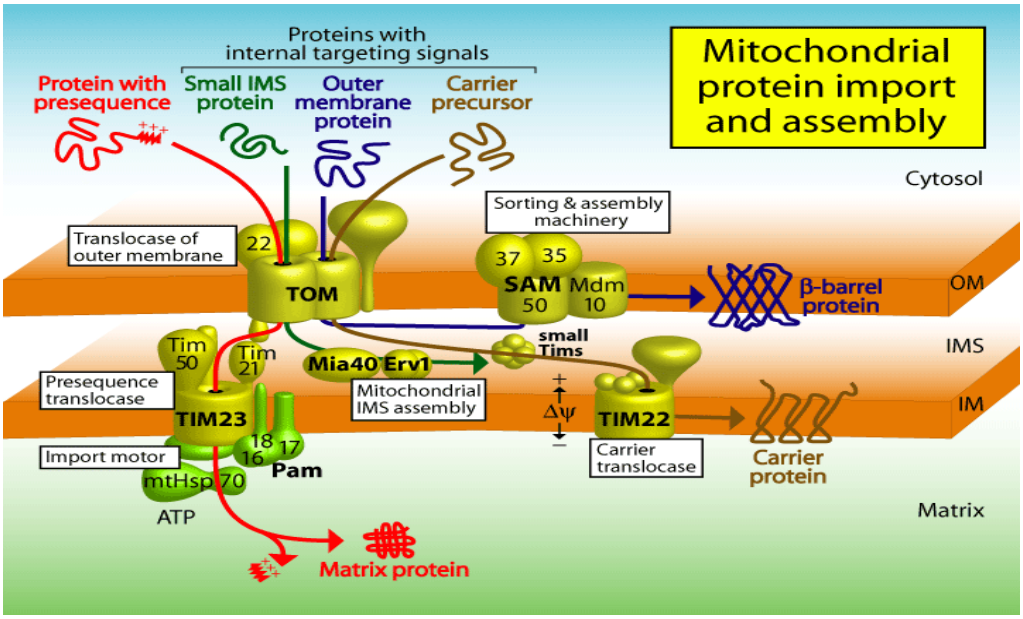
[1] Oxidative phosphorylation

۲-۶-۲- سنتز اسید های چرب و دخالت میتوکندری در گوارش چربی ها

یکی از راه‌های تولید اسید چرب، سیستم میتوکندریایی است که عکس اکسیداسیون یا تجزیه آن‌ها می‌باشد. در هنگام گرسنگی، میتوکندری‌ها به طرف ذرات چربی حرکت کرده و روی ذرات چربی خم شده و آنزیم‌های میتوکندریایی، شروع به هضم چربی و آزادسازی انرژی می‌کنند.

۲-۶-۳- سنتز پروتئین

مطالعات گوناگون نشان می‌دهد که صدها پروتئین در یک میتوکندری وجود دارد. این پروتئین‌ها در تعداد زیادی از واکنش‌های شیمیایی غیر از فسفوریلاسیون اکسیداتیو شرکت می‌کنند. به عنوان مثال در سنتز اسیدهای آمینه، نوکلئوتیدها، کوآنزیم‌های فولات، آهن و غیره دخالت می‌کنند (شکل ۲-۵) (یوسفی، ۱۳۸۵).



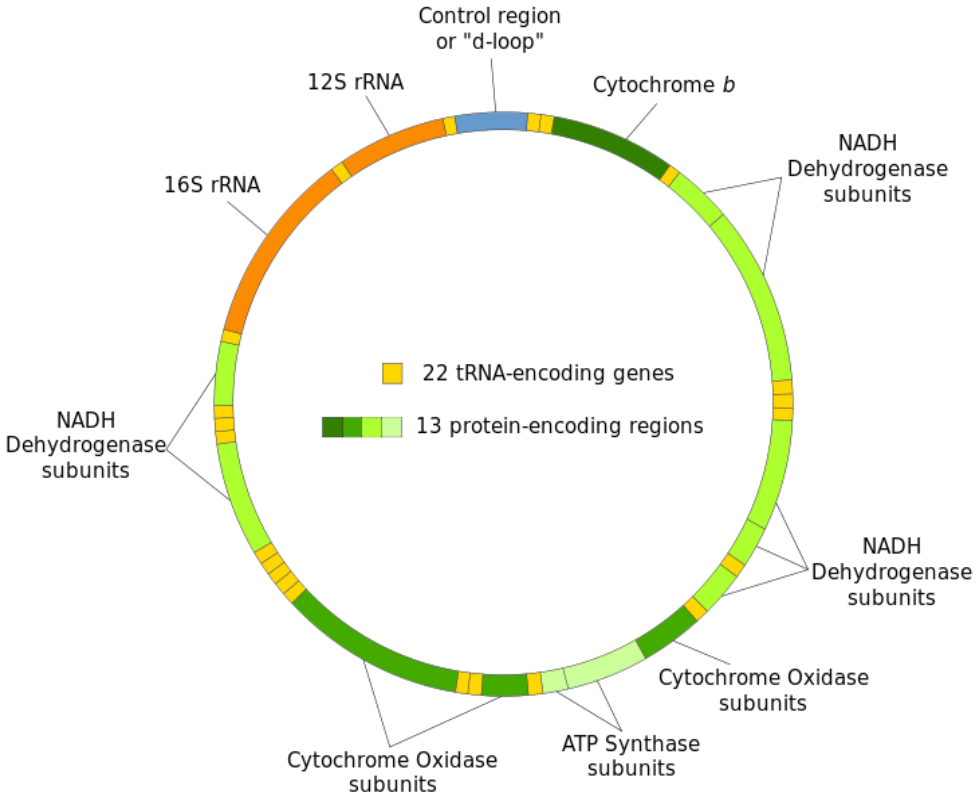
شکل ۲-۵- نقش میتوکندری در تولید پروتئین (برگرفته از رضازاده، ۱۳۹۰).

۲-۷- ساختار ژنوم میتوکندری

میتوکندری تنها اندامک درون سلولی دارای DNA است. جایگاه ژنوم میتوکندری در ماده زمینه‌ای میتوکندری و گاهی چسبیده غشای داخلی آن است که از نظر بسیاری از خصوصیات شبیه به ژنوم باکتری-ها می‌باشد. این ژنوم‌ها نیز به صورت DNA حلقوی فراپیچیده[1] هستند. اندازه ژنوم آن در جانوران مختلف در محدوده ۱۴ تا ۲۶ کیلو باز است. کم‌ترین طول حدود ۵۹۶۷ جفت باز در پارازیت مالاریای انسانی[2] و بیشترین طول در گیاهان خشکی حدود ۲۰۰ کیلو باز می‌باشد. اندازه عمومی آن در اکثر مهره‌داران ۵۰۰ ± ۱۶۵۰۰ جفت باز است. ژنوم میتوکندری در مهره‌داران نقش‌های متابولیکی مهمی دارد. محصول بعضی از ژن‌های آن در زنجیره انتقال الکترون که در غشای داخلی میتوکندری جای گرفته است شرکت دارند. گرچه

[1] Supercoli
[2] Plasmodium falciparum

در بعضی از رده‌ها فعالیت‌های دیگری نیز دارد. تعداد نسخه‌های ملکول mtDNA بسته به نوع بافت و سلول فرق می‌کند (امتیازی، ۱۳۸۶). تعداد ژنوم میتوکندری در پستانداران حدود 10^{5} - 10^{10} برابر کوچک‌تر از ژنوم هسته‌ای اما جهش پذیری آن ۱۵ بار بیشتر از ژنوم هسته‌ای است. به این دلیل که DNA پلیمراز میتوکندریایی فاقد خاصیت تصحیح کردن[1] می‌باشد. سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در ژنوم میتوکندری حیوانات عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته است. ژنوم میتوکندری اغلب موجودات، حلقوی دو رشته است و همانند سازی در آن به دلیل حلقوی بودن آن از یک نقطه شروع و در دو جهت ادامه می‌یابد. این ژنوم فاقد پروتئین‌های هیستونی می‌باشد، بسیار فشرده است و ۹۴٪ آن را نواحی کدکننده تشکیل می‌دهد (چینری و همکاران، ۲۰۰۰). در ساختار ژنوم میتوکندری هیچ اینترونی بین ژن‌ها وجود ندارد و حتی در بعضی نقاط ژن‌ها روی هم افتادگی دارند. ژنوم میتوکندری دارای دو رشته شامل زنجیره سبک[2] (L) و زنجیره سنگین[3] (H) می‌باشد. تعداد ۹ ژن توسط رشته سبک و تعداد ۲۸ ژن توسط رشته سنگین حمل می‌شوند (هوشمند، ۱۳۸۴). در گونه‌های جانوری ژنوم میتوکندریایی ۳۷ ژن را کد می‌کند که شامل ۲۲ ژن کد کننده tRNA، ۱۳ ژن کد کننده زنجیره تنفسی و ۲ ژن کد کننده rRNA می‌باشد (هوشمند، ۱۳۸۴؛ والس، ۱۹۹۲). شکل ۲-۶ ژنوم میتوکندری، جایگاه ژن‌ها و ناحیه D-loop را نشان می‌دهد.



شکل ۲-۶- ژنوم میتوکندری، جایگاه ژن ها و ناحیه D-loop (برگرفته از رضازاده، ۱۳۹۰)

[1] Proof-Reading
[2] Light
[3] Heavy

۲-۷-۱- ناحیه D-loop

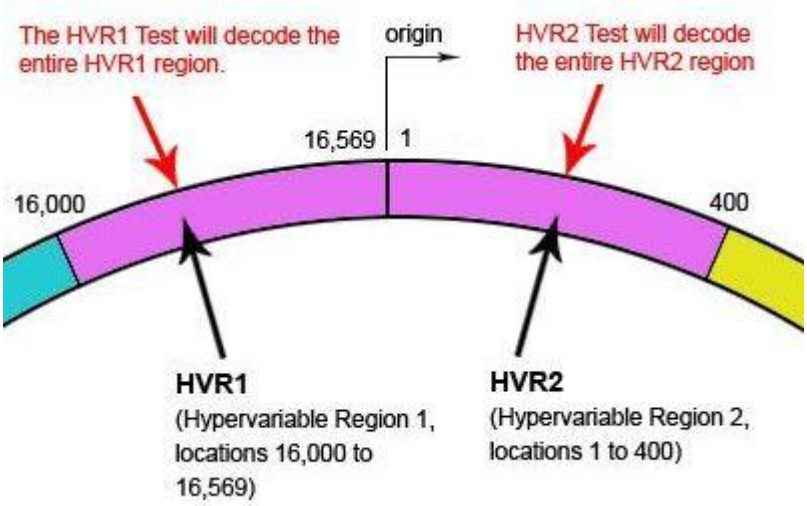
منطقه‌ای در ژنوم میتوکندری وجود دارد که ژن رمز کننده پروتئین ندارد و جهش می‌تواند در آن‌جا تجمع یابد. این منطقه، ناحیه D-loop نام دارد (اندرسون و همکاران، ۱۹۸۱).

ناحیه D-loop شروع همانند سازی را به وسیله تنظیم فعالیت پروتئین‌ها و آنزیم‌های مختلف که به وسیله ژن‌های هسته کد می‌شوند، کنترل می‌کند (بوور و همکاران، ۱۹۹۹).

توالی ناحیه کنترل در گونه‌های مختلف حیوانات بسیار متفاوت است و دارای دو ناحیه متغیر HVR-I و HVR-II است. این ناحیه دارای پروموتورهایی برای همانند سازی رشته L و H است. به خاطر تکامل سریع آن، توالی ناحیه کنترل برای بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط میان گونه‌ها بسیار ارزشمند است (سلطانا و مانن، ۲۰۰۴).

۲-۷-۲- نواحی HVR-I و HVR-II

شکل۲-۷ نشان‌دهنده دو ناحیه بسیار متغیر HVR-I و HVR-II در D-loop است. به دلیل این که این دو ناحیه کد کننده هیچ پروتئینی نیستند و در شروع رونویسی هم نقشی ندارند، جهش‌های ایجاد شده در آن‌ها بدون تغییر و ایجاد مشکل ابقا شده و به نسل بعد منتقل می‌شود (اندرسون و همکاران، ۱۹۸۱).



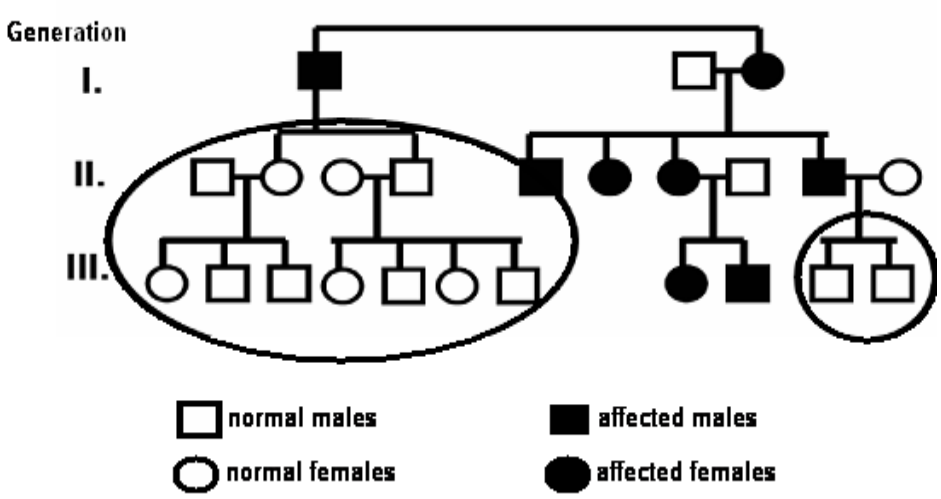
شکل ۲-۷- نواحی HVR-I و HVR-II (برگرفته از رضازاده، ۱۳۹۰).

۲-۸- توارث میتوکندری

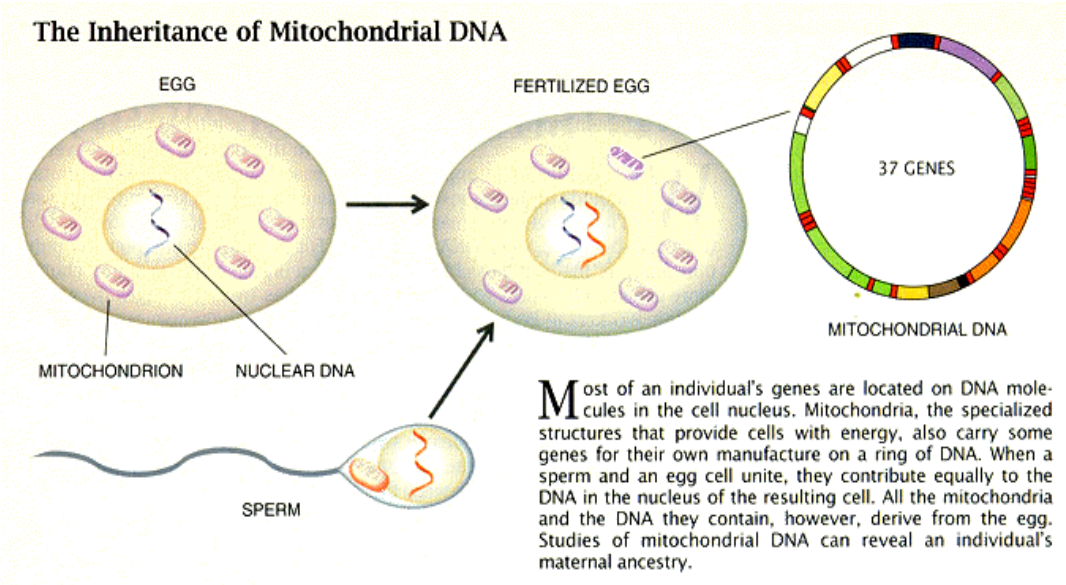
ژنوم میتوکندری در بیشتر جانوران منشأ مادری دارد و توارث اکثراً به صورت تک والدی می‌باشد. البته منشأ پدری هم در برخی جانوران مانند درزوفیلا و موش گزارش شده است (دنور و همکاران، ۲۰۰۰؛ بروفورد و همکاران، ۲۰۰۳). در موجودات با تولید مثل جنسی، میتوکندری منحصراً از مادر به ارث می‌رسد. میتوکندری موجود در اسپرم بعد از لقاح در طول تشکیل جنین[1] از بین می‌رود، همچنین بیشتر میتوکندری اسپرم در دم

[1] Embryogenesis

اسپرم قرار دارد که برای جلو راندن اسپرم استفاده می‌شود، بعضی مواقع دم در طول لقاح از بین می‌رود. یک تخم شامل ۱۰۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰۰ میتوکندری است در حالی که یک اسپرم شامل فقط ۱۰ تا ۱۰۰ میتوکندری است. اما در هنگام لقاح میتوکندری اسپرم وارد تخمک نمی‌شود و این تنها هسته اسپرم است که وارد تخمک می‌شود در نتیجه DNA هسته زیگوت از هر دو والد است در حالی که mtDNA فقط از طرف مادر است (شکل۲-۸) و (شکل ۲-۹) (گراف، ۱۹۹۹).



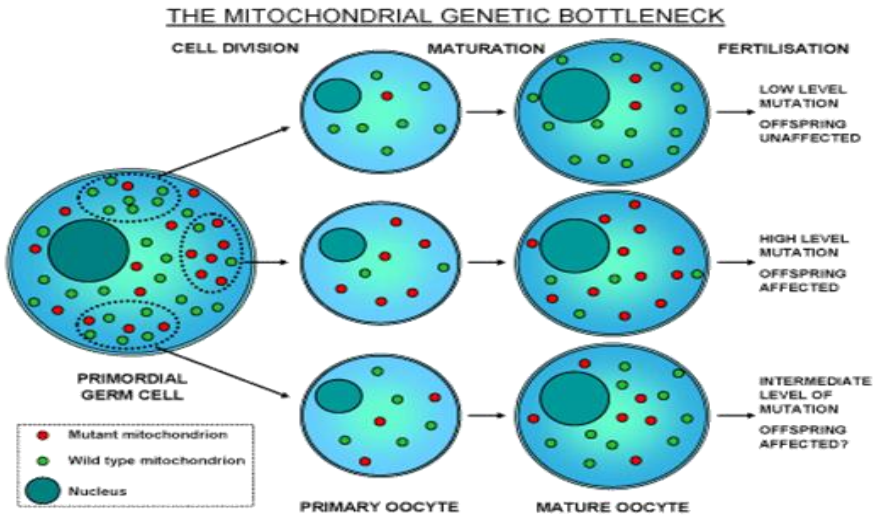
شکل ۲-۸- شجره توارث مادری DNA میتوکندری (برگرفته از گراف، ۱۹۹۹).



شکل۲-۹- میتوکندری های اسپرم و تخمک و نحوه توارث مادری (محمدهاشمی، ۱۳۸۸).

۲-۹- آستانه هتروپلاسمی

هر سلول ممکن است بر حسب نوع سلول و فاز سلولی دارای چندین میتوکندری باشد. این امر باعث می شود امکان حضور هم‌زمان بیش از یک نوع ژنوم میتوکندری در یک سلول وجود داشته باشد. اگر بیش از ۹۹/۹ درصد میتوکندری‌ها در یک سلول دارای ژنوم یکسان باشند به آن هوموپلاسمی گویند. در غیر این صورت حضور هم زمان بیش از یک نوع ژنوتیپ mtDNA (یعنی ترکیبی از ژنوتیپ‌های جهش یافته و غیر جهش یافته) باعث هتروپلاسمی می‌شود. در حالت عادی مولکول‌های mtDNA یک رده همگی یکسان هستند اگر جهشی در سلول اتفاق بیفتد در هنگام میتوز به طور تصادفی mtDNA ها به سلول های دختر به ارث می‌رسند در حالی که نسخه‌های یکسانی از ژنوم هسته به ارث می‌رسند. بعد از چندین تقسیم، نسبت مولکول های mtDNA نرمال و جهش یافته می تواند به سمت هوموپلاسمی در جهت نرمال خالص و یا جهش یافته خالص تغییر یابد که به این حالت اثر گلوگاه ژنتیکی می‌گویند. برای ظهور علائم و اختلالات بافتی میزان ژنوم میتوکندری جهش یافته در سلول‌های یک بافت بایستی از یک حد آستانه عبور کند که به آن آستانه هتروپلاسمی می‌گویند (داویدزون و دیمارو، ۲۰۰۵). شکل ۲-۱۰ هتروپلاسمی در سلول‌های مختلف و ایجاد ترکیبات جدید به سمت پیدایش هموپلاسمی را نشان می‌دهد.



شکل ۲-۱۰- هتروپلاسمی در سلول های مختلف (برگرفته از محمدهاشمی، ۱۳۸۸).

۲-۱۰- کاربردهای ژنوم میتوکندری

۲-۱۰-۱- تشخیص انساب

مطالعه ژنوم میتوکندری در تشخیص هویت در تحقیقات نظامی و پزشکی قانونی بسیار پر اهمیت است (لاتس و همکاران، ۱۹۹۸).

برای تعیین هویت از نواحی استاندارد HVR-I و HVR-II ژنوم میتوکندری استفاده می‌شود. در اکثر سیستم‌های تعیین هویت از DNA هسته‌ای استفاده می‌شود، اما در مواردی که مقدار DNA استخراج شده از

بافت‌هایی نظیر استخوان، دندان و مو بسیار کم باشد یا در مواردی کـه نمونـه قـدیمی باشـد بـه دلیـل وجـود هزاران نسخه از ژنوم میتوکندری در یک سلول احتمال به دست آوردن مقـدار کـافی از ژنـوم میتوکنـدری در مقایسه با ژنوم هسته بسیار بیشتر است. صفات اجدادی پدری را توسـط شـاخص‌هـای کرومـوزوم Y و صـفات اجدادی مادری را از طریق ژنوم میتوکندری ردیابی می‌کنند. چرا که کروموزوم Y از پدر به پسر انتقال می‌یابد و وراثت ژن‌های میتوکندری نیز منحصراً از طریق مادر است. این خصوصیت ژنـوم میتوکنـدری کـه در طـول نسل‌های متمادی کم و بیش دست نخورده به ارث رسیده، در ردیابی خانواده‌ها و نسل‌هـای خویشـاوند مفیـد است. اگر چه جهش در ژنوم میتوکندری می‌تواند اختلاف جدیدی را در میان اعضای یـک خـانواده بـه وجـود آورد اما مقدار این تفاوت‌ها در چند نسل زیاد نیست (مروتی و مدرسی، ۱۳۸۴).

۲-۱۰-۲- تشخیص تقلب ها

هروی و همکاران (۱۳۸۵) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی میتوکندریایی اسب سانان، طیـور و آغازگرهـای عمومی CBU و CB71 و استفاده از روش PCR موفق شـدند وجـود بقایـای طیـور و نشـخوار کننـدگان را در نمونه‌هایی از پودر ماهی اثبات نمایند. همچنین می‌توان به تشخیص همزمان گوشت گونه‌هـای مختلـف مثـل: گاو، گاو میش، گوسفند و بز در مخلوط گوشت توسط الیاسـی و همکـاران (۲۰۱۱)، تشـخیص هویـت لـوتز و همکاران (۱۹۹۸)، تشخیص تنوع ژنتیکی و تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هـم توسط هایندلدر و همکاران (۱۹۹۸) اشاره کرد.

۲-۱۰-۳- تشخیص اختصاصی گونه ها

در بین مارکرهای ژنتیکی توالی یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی ترین روش‌ها برای تشـخیص گونـه‌هـا می‌باشد (هایندلدر و همکاران، ۱۹۹۸). از بین نـواحی مختلـف ژنـوم میتوکنـدری، سـیتوکروم‌b، sRNA 12 و sRNA 16 به عنوان نشانگرهای تشخیص گونه مطرح هستند (گوها و همکاران، ۲۰۰۶). همچنـین فاجـاردو و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از روش PCR-RFLP و به کمک آنزیم‌های محدودالاثر توانستند گونـه‌هـای گـاو، گوسفند، بز و آهو را به خوبی از هم تشخیص دهند.

۲-۱۰-۴- اختلالات و بیماری های میتوکندریایی

انواع جهش و عملکرد غیر طبیعی میتوکندری سبب بروز اختلالات میتوکندریایی می‌شود. تقریباً تمام نقـایص mtDNA به نحوی با متابولیسم اکسیداتیو و تولید ATP همراه هستند. اکثر بیماری‌های میتوکندریایی از نـوع میوپاتی و نوروپاتی (عصبی- عضلانی) هستند که بیشتر عضوهایی که مصرف ATP در آن‌ها بالاست مثل مغز، کلیه‌ها، کبد و عضلات را درگیر می‌کند. از جمله این بیماری‌ها مـی‌تـوان بـه چـاقی، دیابـت و پیـری (گـراف، ۱۹۹۹)، اخـتلالات عصـبی و بیمـاری آلزایمـر (زویـانی و دونـاتو، ۲۰۰۴)، مـرگ نکـروزی سـلولی و آپوپتـوز (داویدزون و دیمارو، ۲۰۰۵) اشاره کرد. پیشرفت در زمینه بیولوژی مولکولی و ژنتیـک میتوکنـدری در آینـده ممکن است باعث کشف ارتباط اختلالات میتوکندری با بیماری‌های دیگری نیز شود (روزوودوسکا و همکـاران، ۲۰۰۰).