دانشکده علوم دامی و شیلات

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد علوم دامی – اصلاح نژاد دام

موضوع:

ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی مرغان بومی ایران بر مبنای توالی ناحیه D-loop از DNA میتوکندریایی

استاد راهنما:

دکتر هادی سیاح زاده

دکتر قدرت رحیمی میانجی

استاد مشاور:

دکتر حمید دلدار

نگارش:

کسری احمدیان

بهمن ۱۳۹۰

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول ۵

۱-مقدمه: ۶

فصل دوم ۷

۲-۱- توضیح مختصری از تاریخ و جانورشناسی طیور ۸

۲-۲- رده بندی واجداد وحشی مرغ ۱۰

۲-۳- آیا منشاء اصلی مرغ ، مونوفیلتیک، پلی فیلتیک یا بینابین است؟ ۱۱

۲-۴- زمان پیدایش و تکامل اجداد مرغ: ۱۲

۲-۵- ژنتیک کلاسیک: ۱۳

۲-۶- تاریخچه مطالعه میتوکندری ۱۵

۲-۷- خواستگاه میتوکندری در سلولهای یوکاریوتی ۱۵

۲-۸- شکل و اندازه میتوکندری و تغییرات آنها ۱۶

۲-۹- ساختمان میتوکندری ۱۷

۲-۹-۱- غشای خارجی ۱۷

۲-۹-۲- فضای بین غشایی ۱۷

۲-۹-۳- فضای داخلی ۱۷

۲-۹-۴- ماتریکس ۱۷

۲-۱۰- محل استقرار میتوکندری در سلول ۱۸

۲-۱۱- تعداد میتوکندری در سلول ۱۸

۲-۱۲- نقش زیستی و فعالیت فیزیولوژیکی میتوکندری ۱۸

۲-۱۲-۱- فسفریلاسیون اکسیداتیو (تنفس هوازی یا تنفس سلولی) ۱۸

۲-۱۲-۲- متابولیسم اسید های چرب ۱۹

۲-۱۲-۲-۱- سنتز اسید های چرب ۱۹

۲-۱۲-۲-۲- دخالت میتوکندری درگوارش چربیها ۱۹

۲-۱۲-۲-۳- ذخیره و تجمع مواد در میتوکندریها ۱۹

۲-۱۲-۲-۴- سنتز پروتئین ۱۹

۲-۱۳- وراثت میتوکندریایی ۱۹

۲-۱۴- ژنوم میتوکندری ۲۰

۲-۱۴-۱- ژنوم میتوکندری طیور ۲۴

۲-۱۵- نحوه توراث و عملکرد ۲۵

۲-۱۶- تفاوت DNA میتوکندری با DNA هسته ۲۶

۲-۱۷- تفاوت کدهای ژنتیکی میتوکندری با کدهای استاندارد هسته ۲۷
۲-۱۸- همانند سازی ژنوم میتوکندری ۲۷
۲-۱۹- ترجمه ژنوم میتوکندری ۲۹
۲-۲۰- جهش در ژنوم میتوکندری ۲۹
۲-۲۱- اختلالات و بیماری های میتوکندریایی ۳۰
۲-۲۲- ژنوم میتوکندری به عنوان ابزاری برای مطالعات فیلوژنیک ۳۱
۲-۲۳- اهمیت ناحیه کنترل (D-Loop) ۳۲
۲-۲۴- مروری بر پژوهش های انجام شده ژنوم میتوکندری در دام و طیور ۳۳

فصل سوم ۴۵

۳-۱-اهمیت حفظ نژاد های بومی ۴۶
۳-۲-اهداف طرح: ۴۶
۳-۲-۱-اهداف کوتاه مدت و میان مدت ۴۶
۳-۲-۲-اهداف دراز مدت ۴۶
۳-۳- نمونه برداري و خون گيري ۴۶
۳-۴- استخراج DNA ۴۷
۳-۴-۱- بافر هاي به كار رفته در استخراج دي ان اي ۴۷
۳-۴-۱-۱- بافر جدا كننده: ۴۷
۳-۴-۱-۲- بافرليزكننده: ۴۷
۳-۴-۱-۳- بافرTE: ۴۷
ازاين بافر به منظور حل كردن و ذخيره نمودن دی ان ای بعد از استخرج استفاده می شود. تركيبات اين بافر در
جدول ۳-۳ آمده است. ۴۷
۳-۴-۲- مراحل استخراج ديانای به روش نمكي بهينه يافته ۴۸
۳-۴-۳- ذخيره سازي دي ان اي استخراج شده ۴۹
۳-۴-۴- تعيين ويژگي هاي كمي و كيفي دي ان اي استخراج شده: ۵۰
۳-۴-۴-۱- تعيين كيفيت و كميت دي ان اي استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۵۰
۳-۴-۴-۲- تعيين كيفيت و كميت دي ان اي استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپكتروفتومتر ۵۱
۳-۵- واكنش زنجيره اي پليمراز (پي سي آر) ۵۱
۳-۵-۱- پروتكل و مواد استفاده شده در پي سي آر ۵۱
۳-۵-۲- مراحل انجام پيسي آر ۵۲
جدول ۳-۷- ضریب خطای استفاده شده در تهیه مخلوط MASTER ۵۲
۳-۵-۳- تنظيم سيكل هاي حرارتي پي سي آر ۵۲
۳-۵-۳-۱- واسرشته سازي قطعه الگو: ۵۲
۳-۵-۳-۲- اتصال آغازگرها: ۵۲
۳-۵-۳-۳- بسط(طويل سازي) آغازگر ها: ۵۲
جدول ۳-۸- دماهای استفاده شده در سیکلهای پیسیآر (درجه سانتیگراد) ۵۳

۳-۶- الکتروفورز محصولات PCR روي ژل آگارز ۵۳
۳-۷- تأیید اندازه موردنظر روي ژل ۵۳
۳-۸- برش آنزیمی دیانای توسط آنزیمهای برشی اختصاصی ۵۴
۳-۹- هضم آنزیمی محصولات PCR به کمک آنزیمهای برشی ۵۴
۳-۱۰-تخلیص محصول پیسیار توسط کیت خالص سازي ۵۶
۳-۱۱- تعیین توالي با استفاده از پرایمرهاي اولیه ۵۷
۳-۱۲- تجزیه و تحلیل توالي ها ۵۷
۳-۱۲-۱-شناسایی هاپلوگروههاو زیر شاخهها ۵۸
۳-۱۲-۱- بررسی ساختار ژنتیکی جمعیتهای مورد مطالعه و آنالیزهای فیلوژنی ۵۸

فصل چهارم ۶۱

۴-۱- کمیت و کیفیت DNA ۶۲
۴-۲- تکثیر محصولات PCR ۶۲
۴-۳- نتیجه هضم آنزیمی و RFLP ۶۳
۴-۳-۱- تیمار آنزیمی HinfI برای ناحیهD-loop ۶۳
۴-۴- خالص سازی محصولات PCR جهت انجام تعیین توالي ۶۴
۴-۵- تنوع موجود در توالی ها و آنالیز فیلوژنی ۶۵
۴-۵-۱-ویرایش و آماده سازی توالی ها ۶۵
۴-۵-۲- ارزیابی تنوع هاپلوتایپی و تنوع ژنتیکی ۶۵
۴-۵-۳- بررسی تنوع ژنتیکی در داخل و بین جمعیتها ۷۰
۴-۵-۴- بررسی روابط فیلوژنی ۷۲
۴-۶- نتیجه گیری کلی و پیشنهادات ۷۸

فهرست منابع ۷۹

فصل اول

مقدمه

۱ـ مقدمه:

امروزه بهره گیری از تنوع ژنتیکی و چگونگی حفظ و نگهداری آن از استراتژی‌های مهم درعرصه علم ژنتیک است. آرمان دانش ژنتیک و به نژادی بهبود بخشیدن به ارزش های بیولوژیکی در یک جمعیت از دیدگاه ژنتیکی است. برای رسیدن به این هدف دو ابزار مهم شامل، تنوع و گزینش مورد نیاز است. گوناگونی ژنتیکی درهر جمعیت بر گرفته از عوامل ژنتیکی و محیطی است. به طور کلی میزان تنوع ژنتیکی (تفاوت میان ارزش‌های ارثی) استراتژی گزینش را تعیین می کند. اگر گوناگونی ژنتیکی از میان برود، تفاوت های ناشی از عملکردهای محیطی به نسل بعدی انتقال نمی یابد. از این رو یک متخصص اصلاح نژاد برای دست یابی به عملکرد تجاری شایسته و باقی ماندن در میدان رقابت باید به حفظ تنوع ژنی، توجه فراوانی داشته باشد و بر این اساس کارهای اصلاحی خود را برنامه ریزی کند. نخستین گام در تعیین تنوع ژنتیکی و بهره گیری از ویژگی های آن در به نژادی، شناسایی آن در درون و بین جمعیت و به دست آوردن فواصل ژنتیکی در میان آنها می باشد. امروزه این کار با بهره گیری از نشانگرهای DNA که ژنوم موجودات را پویش می کنند امکان پذیر است. DNA میتوکندریایی با توجه به ویژگی های منحصربه فرد خود می تواند ما را در دست یابی به این اهداف کمک نماید.گزارشات اخیر نشان می دهد که جمعیت های مرغان بومی قادرند موقعیتی ارزشمند در برنامه های به نژادی آینده در جهان داشته باشند. بنابراین ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت های مرغ بومی با استفاده از مارکرهای مبتنی بر DNA میتوکندریایی از اهمیت ویژه ای برخودار است. لذا هدف از اجرای این پژوهش بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت های مختلف مرغ بومی ایران با استفاده از DNAبا منشاء میتوکندریایی است.

فصل دوم

بررسی منابع

۲ـ۱ - توضیح مختصری از تاریخ و جانورشناسی طیور

از زمانی که اهلی شدن پرندگان وحشی شروع شد، طیور به عنوان منابع غذایی و اهداف فرهنگی شبیه به دیگر گونه های حیوانات اهلی در خدمت بشر بوده است.

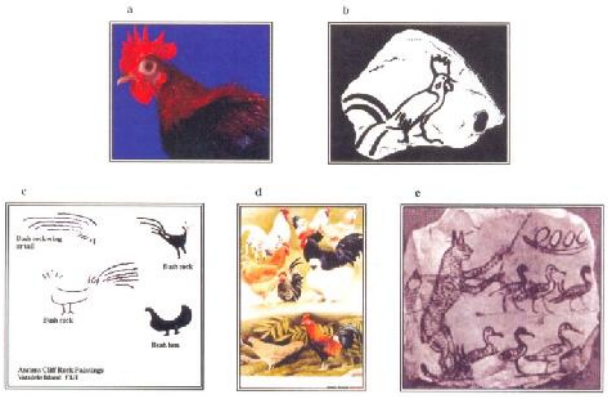
نقش تولیدات طیور در تهیه مواد غذایی رشد یکنواختی را از قرن ۱۹ داشته است. نیاز های مختلف بشر آن ها را به سوی پرورش طیور، اصلاح نژاد و استفاده از نژاد های خالص، جمعیت های بومی، لاین ها و طیور تجاری هدایت نمود. افزایش تولیدات طیور تجاری، روی انتخاب و بهبود نژاد ها و سویه ها و همچنین توسعه لاین ها و تلاقی های جدید تأکید کرده است. مطالعه عمیق در زمینه بیولوژی ماکیان که شامل وراثت پذیری، تنوع و ژنومیکس است دارای اهمیت می باشد. پیشرفت قابل توجه در تولیدات طیور را می توان با تاکید بر چندین حوزه که شامل انتخاب، دامپزشکی، تغذیه، ژنتیک و ژنومیکس ماکیان است، حاصل نمود(کوکت و کول، ۲۰۰۹).گونه های ماکیان با انسان جد مشترکی دارند، شکاف بین سیناپسید[1]و دیاپسید[2] ۳۵۰ میلیون سال پیش اتفاق افتاده است. اعتقاد بر این است که پرندگان از دایناسورها در ۱۵۰ میلیون سال پیش به وجود آمده اند. منشاء تمام راسته گالیفرم[3] در اواخر دوره کرتاسه[4] در حدود ۹۰ میلیون سال پیش مربوط می شود(کوکت و کول، ۲۰۰۹).در حالی که جنس مرغ جنگلی[5] گالوس[6]، مربوط به سرزمین های جنگلی است که در حدود ۸ میلیون سال پیش قدمت دارند.انسان اهلی کردن مرغ را در شمال شرق آسیا برای اولین بار در حدود ۸۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سال پیش شروع کرد (نگاره۲-۱) و بعد از آن گونه های جنگلی آب دوست که شامل اردک ، غاز بودند اهلی شدند. بوقلمون و اردک موسکوی در دوران معاصر اهلی شدند و دیگر پرندگان مثل مرغ گینه، بلدرچین ژاپنی و شتر مرغ جز اهداف اهلی شدن قرار گرفتند(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

امروزه نژادهای طیور در دو شاخه‌ی تولید گوشت و تخم مرغ طبقه بندی شدند. تاریخ طیور شامل ۴ مرحله است که تنوع ژنتیکی را تحت تاثیر قرار داده و منجر به تولید طیور امروزی شده است.

مرحله اول اهلی شدن است که شامل انتخاب برای اهلی شدن و ایجاد تغییر در اندازه بدن بوده است. مرحله دوم شامل انتشار از مرکز اهلی شدن به بیرون ، رانش ژنتیکی و مهاجرت بوده است که از طریق این نیرو های تاثیرگذار ژنتیکی منجر به توسعه انواع مختلفی از طیور شده اند. مرحله سوم در اواخر قرن ۱۹ اتفاق افتاده است که تقریباً تمام نژاد های امروز در این مرحله به وجود آمده اند. مرحله چهارم مربوط به زمان حاضر است که شرکت های چند ملیتی پرورش، که گله های

[1] - Synapsids
[2] - Diapsids
[3] - Galliformes
[4] - Cretaceous
[5] - Junglefowl
[6] - Gallus

گوشتی و تخمگذار را توزیع می کنندتاسیس شده اند(کوکت و کول، ۲۰۰۹).فاکتورهـایی ماننـد توسـعه شهرنشـینی ، وقایعـه تاریخی، پیشرفت تکنولوژی ، تغییرات آب و هوایی و حوادث طبیعی ناگوار تاثیر بسیار زیادی در تنوع ژنتیکـی طیـور داشـته و حتی ممکن است منجر به توسعه آن‌ها شده باشد. گونه های طیور شناخته شده مانند مرغ، اردک، غـاز، بوقلمـون، مـرغ گینـه ای، بلدرچین و کبوتر نقش مهمی را در دنیای اقتصاد و تامین منابع پروتئینی، در کشورهای توسعه یافته و یا در حـال توسـعه ایفاء می کنند. طیور و دیگر گونه های ماکیان که توسط انسان نگهداری و پرورش داده می شوند متعلق به ۱۰ دسـته هسـتند که شامل : گالیفرم ها[۷]، آنسری فرم ها[۸]، کلومبیفرم ها[۹]، پاسری فرم ها[۱۰]، سیکونی فرم ها[۱۱]، پلکانی فرم هـا[۱۲]، پسیتاسـی فـرم ها[۱۳]، استروتیونی فرم ها[۱۴]، رهیفرم ها[۱۵]، و کاسواری فرم ها[۱۶] می باشند(کوکت و کول، ۲۰۰۹).



نگاره ۲-۱- اهلی شدن گونه های ماکیان a) یک خروس از نژاد مرغ جنگلی قرمز (Gallus gallus). b) یک مرغ تخمگذار که در مقبره توتان خامن در مصر در ۱۳۳۸ سال قبل از میلاد مسیح کشیده شده است.c) نقاشی های باستانی، روی تخته سنگی در جزیره واتولل (vatulele) ،کشور فیجی. d) مرغ جنگلی قرمز (که در زیر نشان داده شده) و چندین نژاد مرغ اهلی در بالا e) یک توصیفی از غاز اهلی شده در مصر باستان(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

پرکاربردترین خانواده از پرندگان، خانواده فازیانیده[۱۷] هستند که در واقع گروهی از راسته گالی فرم‌ها می باشـند کـه بسیار هم گسترش یافته اند(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

7 - Galliformes
8 - Anseriformes
9 - Columbiformes
10 - Passeriformes
11 - Ciconiiformes
12 Pelecani forms
13 Psittaci forms
14 Struthioni forms
15 Rhei forms
16 Casuarii forms
17 Phasianidae

۲-۲- رده بندی واجداد وحشی مرغ

بـــه لحـــاظ رده بنـــدی مـــرغ از رده آوس (Aves) ،زیـــر رده نئورنیتـــه (Neornithes)، فـــوق راســـته نئوگناتـــه (Neognathae)، راســـته گـــالیفرم (Galliformes)،خـــانواده فازیانیـــده (Phasianidae)، زیـــر خـــانواده فاســـیانینه (Phasianinae)،جنس گالوس (Gallus) می باشد. مرغان اهلی از نسل مرغان جنگلی هستند که اکنون در یک منطقه هلالی شکل از پاکستان تا اندونزی که شامل هند، ایندوچین (برمه، لائوس، تایلند، ویتنام، مالزی)، شمال چین و همچنـین فیلیپـین است ساکن شده اند. چهار گونه مرغ جنگلی شناخته شده عبارتند از مرغ جنگلـی قرمـز (G. gallus نگـاره۲-۱ a , d و ۲-۲)، مرغ جنگلی خاکستری (G.sonneratii)، مرغ جنگلی سیلون (G.lafayetti)، مـرغ جنگلـی سـبز (G.varius). مـرغ جنگلـی قرمز خود به ۵ زیر گونه تقسیم می شود که این تقسیم بندی مبتنی بـر توزیـع جغرافیـایی، تنـوع تـاج، طـول و رنـگ neck heckles در نرها است کـه شـامل:کـوچین چینـی[۱۸] (G. g. gallus)، برمـه ای [۱۹] (G. g. spadiceus)، تونکیناسـه[۲۰] (G. g. jabouillei)، هندی (G. g. murghi) و جاوا (G. g. bankiva) می باشد.

محل زندگی طبیعی مرغ جنگلی قرمز متغیر است که شامل انواع جنگل های موجود در شمال شرق آسـیا و حاشـیه دشت ها، بیشه‌ها و بوته زارها می باشد. مرغ جنگلی گونه ای است با بالاترین قابلیت سازگاری که می‌تواند در بیشـتر منـاطقی که ۲۰۰۰ متر بالاتر از سطح دریامی باشد زنده بماند. اغلب مرغان جنگلی در جنگل های مرطوب، بوته زارها، دشت های بـامبو یافت می شوند. هر چند که این گونه تحت تاثیر شکار مفرط قرار دارند (کوکت و کول، ۲۰۰۹).

نگاره۲-۲- یک خروس از نژاد مرغ جنگلی قرمز (G.g.gallus) ،که در موزه داروین شهر مسکو روسیه به نمایش گذاشته شده است(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

[18] Cochin- chinese
[19] Burmese
[20] Tonkinese

۲ـ۳ـ آیا منشاء اصلی مرغ ، مونوفیلتیک[۲۱]، پلی فیلتیک[۲۲] یا بینابین[۲۳] است؟

نظرات مختلفی که بین جانورشناسان، مختصصین علوم طبیعی، علم ژنتیک و دیگر متخصصین وجود دارد، سبب شده تا علاقه زیادی در شناسایی هر چه بیشتر در بیولوژی گونه مرغ جنگلی و منشاء مرغ اهلی به وجود آید. مقایسه ۴ گونه جنس گالوس و نژاد های مرغ نشان می دهد که گالوس گالوس (مرغ جنگلی قرمز) در بیشتر صفات به مرغ شبیه است که این ممکن است مدرکی برای منشاء مونوفیلتیک مرغ باشد.گروه دیگری از پژوهشگران که به تئوری پلی فیلتیک معتقدند به این واقعیت اشاره دارند که بیشتر ویژگی های شناخته شده در مرغ ها در گالوس گالوس وجود ندارد اما در سایر گونه های وحشی و یا اجداد منقرض شده وجود دارد(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

برخی از پژوهشگران هم نظریه ای را معتقدند که بین نظریه های مونو فیلتیک وپلی فیلتیک می باشد. طوری که گالوس گالوس را جد اصلی اما سهم کوچکی از سایر گونه ها را نیز در اهلی شدن مرغ ها دخیل می دانند(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

آکیشی نونومیا[۲۴] و همکاران (۱۹۹۶-۱۹۹۴) بر مبنای مقایسه توالی های D-Loop دی ان ای میتوکندری (mtDNA)[۲۵] شرح دادند،که فقط یک زیر گونه گالوس گالوس گالوس تمام تنوع زیستی مرغان را شامل می شوند.

نیو[۲۶] و همکاران (2002) ۵۳۹ جفت باز اول ناحیه D-Loop، mtDNA را در ۶ نژاد مرغ بومی چین توالی یابی و آن ها را با توالی های ۴ گونه مرغ جنگلی موجود در بانک جهانی ژن مقایسه کردند. چهار گونه از جنس گالوس تفاوت معنی داری با دیگران داشتند وهمچنین مرغ بومی چین بیشترین نزدیکی را با مرغ جنگلی قرمز در تایلند و نواحی نزدیک آن داشت که این نشان دهنده ی این موضوع بود که مرغ بومی اهلی، شاید از مرغ جنگلی قرمز در این نواحی منتج شده باشد. پیشنهاد شده است که دو زیر گونه تایلندی، گالوس گالوس گالوس (G. g. galluss) و گالوس گالوس اسپادیکوس (G. g. spadiceus) به علت تشابه با یکدیگر از یک زیر گونه از به دلیل این که همه ۵ زیر گونه گالوس گالوس (G.gallus) بررسی و مطالعه نشده بودند و فقط یک یا دو نماینده از هر رده مقایسه شدند، این یافته‌ها دلایل کاملی را برای نظریه فوق ارایه نمی‌کرد. از طرف دیگر افرادی که منشاء پلی‌فلیتیک برای مرغان را مد نظر دارند هیچ مدرک باستان شناسی درباره‌ی اجداد منقرض شده، ارائه نکردند.

---

[21] Monophyletic
[22] Polyphyletic
[23] Intermediate
[24] Akishinonomya
[۲۵] Mitochondrial DNA
[26] Niu

به دلیل فقدان صفات مشابه در گالوس گالوس و مرغ، استدلال قطعی برای منشاء پلی‌فیلتیک وجود ندارد. گونه‌های حیوانات اهلی اغلب تنوع نژادی معنی‌داری در مقایسه با شکل‌های اجدادی شان دارند. یکی از استدلال‌های قوی در طرفداری از تئوری پلی فیلیتیک، مشاهده فرزندان تولید شده با تولید بالا به وسیله یک گونه مرغ وحشی با گالوس گالوس و مرغان اهلی یا مرغ جنگلی قرمز است. هرچند که این موضوع در گله های آمیخته اغلب در نسل‌های دوم و تلاقی برگشتی به پایان می رسد(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

در مطالعات اخیر، نیشی بوری و همکاران (۲۰۰۵) مدارکی در سطوح مولکولی برای هیبریداسیون گونه های در جنس گالوس به جز گالوس واریوس تهیه کردند. آن ها کل mtDNA را تعیین توالی کردند. مطابق با آنالیز فیلوژنتیکی که بر اساس توالی های mtDNA صورت گرفته بود، آمیخته گری درون گونه ای بین مرغ جنگلی خاکستری با مرغ جنگلی قرمز و مرغ و بین مرغ جنگلی خاکستری و مرغ جنگلی سیلون (Ceylon Jungl) را مشاهده نمودند.

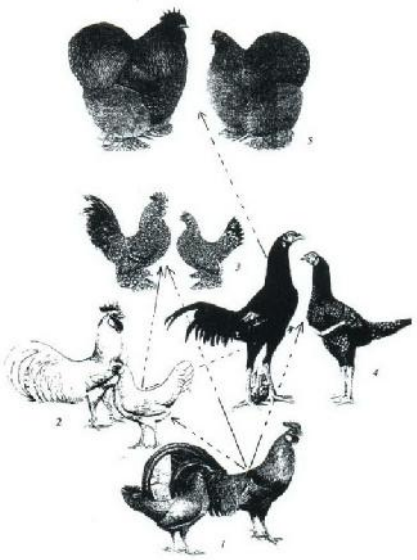
یک سئوالی که زیاد مطرح می شود این است که آیا این سه گونه گالوس واقعاً زیر گونه هستند که آزمایش از افراد بیشتری از هرگونه برای تائید این فرضیه نیاز است. یک سئوال مهم دیگر این است که چه نژاد هایی از مرغ بیشترین ارتباط نزدیک را با گالوس گالوس دارند و کدام مرغ بومی اهلی شده، قدیمی‌تر است؟ مطالعات جهت یافتن پاسخ برای این سوالات به دلایل آلودگی‌های احتمالی در جمعیت‌های وحشی با ژن های اهلی، استفاده از چندین مارکر مختلف، مطالعات روی دسته های متفاوت از نژادها، تنوع ژنتیکی درون نژادی مرغ ، آمیخته گری‌های استفاده شده برای توسعه نژادها و استفاده از چندین روش آماری مختلف برای آنالیز داده پیچیده می باشد(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

۲ـ٤ـ زمان پیدایش و تکامل اجداد مرغ:

داروین (۱۸۶۸) درباره مراکز واقعی منشاء مرغ مشکوک بود و اعتقاد داشت که همه نژاد های ما ممکن است از زادگان واریته هندی یا مالایی باشند. بعد از داروین نویسندگان متفاوتی، نواحی جغرافیایی مختلفی که شامل برمه، هندوستان ، جنوب شرق آسیا،چین و تایلند بود را به عنوان مراکز پیدایش و منشاء مرغ بومی معرفی کردند.منشاء مرغان اهلی تاریخی تقریباً به ۸۰۰۰-۶۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح می رسد. شرف پیشنهاد کرد که اولین زمان اهلی شدن مرغ در جنوب شرق آسیا تقریباً ۶۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح پیش از این که در چین معرفی شود، اتفاق افتاده است (نگاره ۲-۱ b , c). مرغ ممکن است حدود ۲۵۰۰-۲۰۰۰سال قبل از میلاد مسیح به طور جداگانه ای در روستای ایندا‌س[۲۷] پاکستان اهلی و در سراسر آسیای جنوب شرقی پراکنده شده باشد. گسترش سریع مرغ ، تخم مرغ و گوشت آن‌ها به عنوان یکی از مهمترین منابع پروتئین حیوانی چشم گیر است.مدارک معتبری وجود دارد،که مرغان موجود در آمریکا مربوط به زمان کشف این قاره توسط

[27] Indus

اسپانیائی‌ها است که به آنجا برده شده‌اند به طوری که سراسر اقیانوس آرام را طی نموده و به این قاره رسیدند. با وجـود اینکـه مرغ‌ها برای اهلی شدن در کمتر از ۱۰۰۰۰ سال است که مورد توجه قرار گرفتند اما میزان تنوع فنوتیپی ایجاد شـده در طـول زمان بسیار شگفت آور است(کوکت و کول، ۲۰۰۹).



نگار۱-۳- شکل های مورفولوژیکی مرغ اهلی و مسیر تکامل از اجداد وحشی نژادهای ۱)گالوس گالوس ۲)تیپ تخمگذار ۳)تیپ تزئینی ۴) تیپ بازی ۵)تیپ گوشتی(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

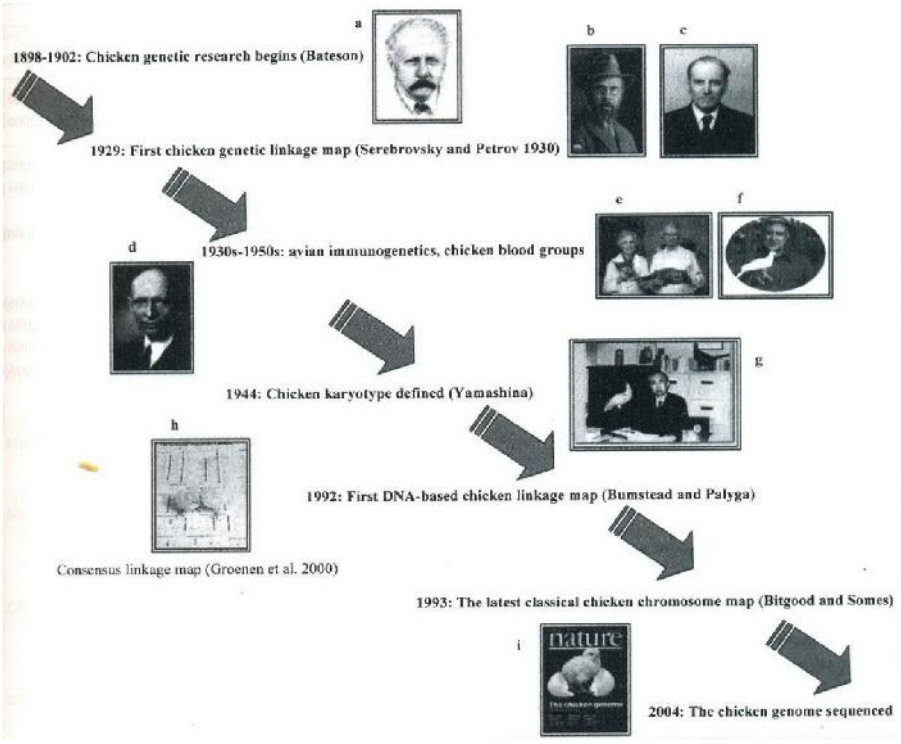
۲ـ۵ـ ژنتیک کلاسیک:

بررسی وراثت در مرغان بیش از یک قرن پیش شروع و منجر به توسعه و پیشـرفت ژنتیـک کلاسـیک شـده اسـت (نگاره ۲-۴). ژن های اولیه تخصیص داده شده به یک کروموزوم مجزا وابسته به جـنس بودنـد. در حـدود اواسـط قـرن بیسـتم ایمینوژنتیک طیور شروع شد و سیتوژنتیک به عنوان یک شاخه از ژنتیک طیور در اوایل دهه ۱۹۶۰ ایجـاد شـد و بـه یـک راه تحقیقی دیگر در زمینه توارث ماکیان تبدیل شد(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

پیشرفت های اخیر درزمینه های بیولوژی مولکـولی، سـیتوژنتیک و تکنولـوژی هـای مربـوط بـه DNA ، ابـزار هـای جدیدی را جهت نقشه یابی ژن مرغ و موضوعات مربوط به ژنومیکس آنها را سبب شده‌اند. در دهه ۱۹۹۰ ترکیب مولکولی مـرغ و نقشه‌های سیتوژنتیک پیشرفت معنی‌داری پیدا کردکاربرد کتابخانه کروموزوم مصنوعی باکتریایی، تهیه نقشه های فیزیکـی و توالی یابی کل ژنوم چشم انداز جدیدی را در ژنومیکس مرغ فراهم نمود. ژنوم هاپلوئید مرغ در حدود $۱/۲ \times ۱۰^{۹}$ جفـت بـاز از

DNA است که روی ۳۸ جفت از کروموزوم های اتوزومی و همچنین کروموزوم های جنسی Z و W مرتب شدند(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

اکثر کروموزوم های اتوزومی ، میکروکروموزوم های کوچکی هستند که برخلاف ماکروکروموزوم‌های بزرگ نمی تـوان آن‌ها را از طریق اندازه شناسایی کرد. این پیچیدگی ترکیب ژنوم در نقشه یابی ژن های مرغ و دسته بندی کروموزم های آن‌هـا ممانعت ایجاد کرده است(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

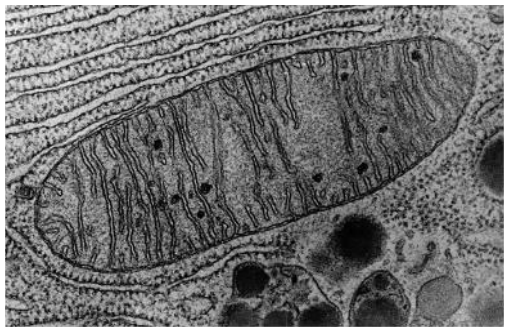


نگاره۲-۴- طرح کلی از تاریخ ژنتیک طیور.a) در زمان کشف قوانین وراثت مندل (۱۹۰۰)،William Bateson (a)، پدر ژنتیک مدرن ، با یک سری آزمایشاتی که روی مرغ انجام داد این پرنده اهلی را به عنوان یک مدل ژنتیک کلاسیک معرفی کرد. از سال ۱۹۳۰، اولین نقشه ژنتیکی مرغ توسط Serebrovsky (b و Petrov (c) تهیه شد. از اواسط قرن گذشته ایمینوژنتیک ماکیان متولد شد و گروه های خونی توسط L.Cole (d)، Irwin، McGibbon (e)، E.Briles، C.Briles (f)، Miller، ودیگران کشف گردید در سال ۱۹۹۴، Yamashina (g)، کاریوتایپ مرغ را به طوری که ما اکنون آن را می شناسیم مشخص کرد. با ظهور و ورود ژنتیک مولکولی، اولین نقشه ژنتیکی ژنومیک(DNA –based)، در

بریتانیا در سال۱۹۹۲ تهیه شد. در ادامه‌ی پیشرفت های نقشه های مولکولی در آمریکا و هلند،به تولید نقشه ژنتیکی دقیق در ۲۰۰۰ منجرشد ,h (UASDimagegallery,http://www.ars.uasd.gov/is/graphics/photos/) در سال ۱۹۹۳ نقشه کروموزومی مرغ به روز رسانی شد در سال ۲۰۰۴، انتشار پیش نویس اولیه توالی طیور به عنوان یک کار برجسته در تاریخ طیور صورت گرفت (i, Macmillan Publisher Ltd:Nature,2004)(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

۲ـ۶ـ تاریخچه مطالعه میتوکندری

اولین شناخت از میتوکندری به عنوان یک اندامک درون سولی بیش از ۱۰۰ سال پیش توسط دانشمندی آلمانی به نام ریچارد آلتمن در سال ۱۸۹۰ گزارش شد و بیوبلاست[۲۸] نام گرفت (نگاره۲- ۵). او تصور می کرد که این ارگان‌های شبیه باکتری موجودات ریز اولیه ای هستند که درون سلول ها زندگی می‌کنند. سپس بندا در سال ۱۸۹۷ اجزای اصلی آن را توصیف کرد. او در هنگام بررسی فرآیند اسپرماتوژنز، اجسام رشته مانند درون سلولی را میتوکندری که ترکیبی است از دو واژه یونانی Mito به معنای رشته و Chondrion به معنای دانه نام نهاد (یوسفی، ۱۳۸۵). چون این اندامک اغلب به فرم رشته‌ای یا به صورت دانه‌های کوچک در سیتوپلاسم همه سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد. از سال ۱۸۹۷ به بعد میتوکندری به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفت و به تدریج روش‌هایی برای جداسازی میتوکندری‌های سالم و دست نخورده ابداع شد. در سال ۱۹۴۹ کندی و لنینگر نشان دادند که در میتوکندری آنزیم‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو چرخه اسید سیتریک و اکسیداسیون اسیدهای چرب را انجام می دهند(مهدوی و همکاران، ۱۳۸۵). پیشرفت غیر منتظره زمانی اتفاق افتاد که ناس در سال ۱۹۶۳ وجود DNA در میتوکندری را توسط میکروسکوپ الکترونی نشان دادند.



نگاره۲- ۵- میکروگراف الکترونی از میتوکندری(شرف، ۲۰۰۸).

۲ـ۷ـ خواستگاه میتوکندری در سلول‌های یوکاریوتی

مطالعات بیوشیمیایی سال‌های اخیر و مشخص شدن شباهت‌های بین میتوکندری‌ها و باکتری‌ها، فرضیه‌ای را که سال‌ها قبل به وسیله سلول شناسان مطرح شده و به موجب آن میتوکندری دارای منشا باکتریایی فرض شده بود را تقویت

[28] Bioblast

کرده است. بر مبنای این نظر برخی محققان معتقدند که در گذشته بسیار دور، جو زمین فاقد اکسیژن بوده و جاندارانی که می‌زیسته‌اند بی هوازی بوده‌اند. با گذشت زمان و ضمن واکنش‌های شیمیایی، جو زمین دارای اکسیژن شده و به تدریج برخی جانداران و به ویژه پروکاریوت‌ها که ساختمانی ساده‌تر داشته اند با استفاده از اکسیژن و حالت هوازی سازگار شده اند. برخی از سلول‌های یوکاریوتی برای امکان بقای خود، برخی از سلوهای پروکاریوتی هوازی شده را به خدمت گرفته و از این همزیستی سلول‌های یوکاریوتی هوازی به وجود آمده‌اند. بنابراین نتیجه گیری شد که میتوکندری‌ها اجداد باکتریایی داشته اند.وجود شباهت‌های اساسی ساختمانی و رفتاری بین میتوکندری‌ها و باکتری ها از دلایل تایید کننده این نظر است. در عین حال تاکنون در بررسی های دیرین شناسی سنگواره های مشخصی از باکتری ها که آن ها را به عنوان اجداد میتوکندری‌ها مطرح می‌کنند، شناخته نشده است. از سوی دیگر میتوکندری ها قادر به بیوسنتز همه نوع پروتیین های مورد نیاز خود از جمله سیتوکروم اکسیداز نیستند، پس چگونه می توانسته اند درگذشته زندگی مستقلی داشته باشند. در پاسخ به این سوال نظر این است که وقتی در جو زمین اکسیژنی وجود نداشته است، نیازی هم به برخی ترکیبات کنونی از جمله سیتوکروم اکسیداز نبوده است. هم چنین شاید باکتری هایی که منشاء میتوکندری ها فرض می شوند،پس از همزیستی با سلول های یوکاریوتی و به اتکاء آن‌ها برخی از توانایی‌های خود را از دست داده‌اند(مجد ، ۱۳۸۵).

۲ ـ۸ـ شکل و اندازه میتوکندری و تغییرات آن‌ها

مطالعات روی سلول‌های زنده نشان داد که میتوکندری‌ها ساختمان‌های پویایی هستند که بطور مداوم شکل خود را تغییر داده و در داخل سیتوپلاسم سلول حرکت می‌کنند. شکل میتوکندری‌ها متغیر اما اغلب رشته‌ای یا دانه‌ای می‌باشند. میتوکندری‌ها در برخی مراحل عمل خود می توانند به شکل‌های دیگری نیز درآیند. به عنوان مثال یک میتوکندری طویل ممکن است در یک انتهای خود متورم شده و به صورتی شبیه گرز درآید (مثلاً در سلول های 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 برمی گردد(کوکت و کول، ۲۰۰۹).

اندازه میتوکندری‌ها نیز متغیر است و در بیشتر سلول‌ها ضخامت و طول آن ها به ترتیب ۵۰ میکرون و ۷ میکرون می‌باشد. اما متناسب با شرایط محیطی و نیز مرحله عمل سلول فرق خواهد کرد. در سلول‌هایی که هم نوع هستند یا دارای عمل مشترک می باشند دارای اندازه ثابت می باشند (یوسفی، ۱۳۸۵).

۲ـ۹ ـ ساختمان میتوکندری

۲ـ۹ـ۱ـ غشای خارجی

غشاء خارجی صاف و بدون چین خوردگی است این غشاء حاوی پروتئینی است که کانال های بین غشایی ایجاد نموده و نسبت به ذرات ریز از جمله آب و یون‌ها نفوذپذیر است. هم چنین دارای تعداد زیادی پروتئین است که به انتقال آسان مولکول های بزرگ کمک می کنند. علاوه بر این در این غشاء پروتئین هایی وجود دارد که چربی ها را به مواد قابل استفاده در ماتریکس تبدیل می کنند.

۲ـ۹ـ۲ـ فضای بین غشایی

فاصله بین دو غشاء ۱۰ تا ۲۰ نانومتر است. این فضا شامل آنزیم هایی است که با مصرف ATP سایر نوکلئوتید ها را فسفره می کند.

۲ـ۹ـ۳ـ فضای داخلی

این غشاء حاوی ذرات بسیار ریزی موسوم به زیر واحد های غشای داخلی و ATP آز است. غشای داخلی چین خوردگی‌های پلیسه مانندی به نام کریستا دارد که باعث افزایش سطح آن می شود. این کار کمک می کند تا کار بیشتری در فضای کوچکتر انجام شود. این قسمت دارای پیچ و خم‌های زیادی است در این قسمت سه پروتئین اصلی وجود دارد:

۱- پروتئینی که واکنش های زنجیره تنفسی را انجام می دهد.

۲- یک کمپلکس آنزیمی بنام ATP سنتاز که ATP می سازد.

۳- پروتئین های انتقال دهنده که ورود و خروج مواد به ماتریکس را کنترل می کنند.

غشای داخلی حاوی پروتئین بیشتری بوده و خاصیت نفوذپذیری نداشته لذا انتقال از میان این غشاء نیاز به مکانیسم‌های انتقال فعال دارد.

۲ـ۹ـ٤ـ ماتریکس

ماتریکس میتوکندری گرانول‌های متراکمی به قطر ۳۰ تا ۵۰ نانومتر دارد. تمایل این گرانول ها به اسمیوم بیانگر این نکته است که جزء اصلی ساختمان آن‌ها از لیپید بوده و آنالیز بیوشیمیایی نشان می دهد که حاوی فسفولیپو پروتئین هستند. سیکل کربس در اینجا اتفاق می افتد بعلاوه چندین کپی از ژنوم (mtDNA) ، ریبوزوم خاص میتوکندری , mRNA , tRNA rRNA و آنزیم هایی که برای انجام فعالیت های میتوکندری ضروری اند در این بخش قرار دارند (مهدوی و همکاران، ۱۳۸۵)

۲ـ۱۰ـ محل استقرار میتوکندری در سلول

میتوکندری‌ها اغلب در اطراف هسته دیده می‌شوند اما در شرایط غیر طبیعی (بیماری) در حواشی سیتوپلاسم نیز ظاهر می‌شوند. این پراکنش می تواند تحت تاثیر مقدارگلیکوژن و اسیدچرب قرار بگیرد. در طول میتوز، میتوکندری‌ها در مجاورت دوک جمع می شوند و وقتی تقسیم پایان می یابد در دو سلول دختر، پراکنش تقریباً یکسانی پیدا می کنند. پراکنش میتوکندری‌ها را می توان بر حسب عمل آن‌ها از نظر تامین انرژی، مطرح کرد که میتوکندری‌ها در داخل سلول‌ها جابجا شده و خود را به جایی که نیاز به ATP بیشتر است، می رسانند. (یوسفی، ۱۳۸۵)

۲ـ۱۱ـ تعداد میتوکندری در سلول

هر سلول شامل صد ها تا هزاران میتوکندری است که در سیتوپلاسم سلول وجود دارد که مواد غذایی را از طریق فرآیند فسفریلاسیون اکسیداتیو [۲۹] به انرژی تبدیل می کند.

تشخیص تعداد میتوکندریایی یک سلول دشوار است. اما اغلب بر حسب نوع سلول و مرحله عمل سلول متفاوت می باشد. در یک سلول معمولی کبد بیشترین تعداد و در حدود ۱۰۰۰ تا ۱۶۰۰ میتوکندری وجود دارد که در اثر تحلیل رفتن سلول و نیز سرطانی شدن آن کاهش می یابد. در مقابل، تعداد میتوکندری در بافت لنفی خیلی کمتر است. هر هپاتوسیت حاوی بیش از هزار میتوکندری است. در سلول‌های گیاهی، کمتر از سلول‌های جانوری می باشد چون در سلول‌های گیاهی بسیاری از اعمال میتوکندری‌ها به وسیله کلروپلاست انجام می‌شود. به طورکلی‌کبد، تخمدان و ماهیچه، بافت های غنی از میتوکندری می باشند(چیزی و همکاران، ۲۰۰۰).

۲ـ۱۲ـ نقش زیستی و فعالیت فیزیولوژیکی میتوکندری

با توجه به مجموعه ویژگی‌های ریخت شناسی، ساختاری، فراساختاری، سازمان مولکولی و ترکیب شیمیایی میتوکندری‌ها، می‌توان مهم ترین فعالیت‌های زیستی آن‌ها را به شرح ذیل مورد توجه قرار داد:

۲ـ۱۲ـ۱ـ فسفریلاسیون اکسیداتیو (تنفس هوازی یا تنفس سلولی)

میتوکندری ها در سلول های یوکاریوتی امروزی نقش هوازی [۳۰] را برعهده دارند، که آخرین مرحله از تنفس سلولی است.در تنفس هوازی، میتوکندری با تجزیه قند پیروات [۳۱] و تبدیل آن به دی اکسید کربن، بخش اصلی ATP مورد نیاز سلول یوکاریوتی را تولید می کند. وجود اکسیژن برای حیات سلول‌های یوکاریوتی بسیار مهم است، چون میتوکندری از اکسیژن بعنوان آخرین مولکول پذیرنده الکترون در زنجیره انتقال الکترون استفاده می کند و این انتقال الکترون در نهایت منجر به

[29] Oxidative Phosphorylation
[30] oxidative respirartion
[31] pirovat

تولید ATP می شود. بر این اساس، میتوکندری در تمام سلول های یوکاریوتی وجود دارد، اما نه به تعداد یکسان، بعنوان مثال در سلول های بافت عضلانی و یا کبد، که نیاز به انرژی بیشتری دارند، میتوکندری بیشتری نسبت به سلول های بافت استخوانی که نیاز کمتری به انرژی دارند، وجود دارد(یوسفی، ۱۳۸۵).

۲-۱۲-۲- متابولیسم اسید های چرب

۲-۱۲-۲-۱- سنتز اسید های چرب

یکی از راه‌های تولید اسید چرب، سیستم میتوکندریایی می باشد که عکس اکسیداسیون یا تجزیه آن‌ها می باشد(یوسفی، ۱۳۸۵).

۲-۱۲-۲-۲- دخالت میتوکندری درگوارش چربی‌ها

در هنگام گرسنگی، میتوکندری ها به طرف ذرات چربی حرکت کرده و روی ذرات چربی خم شده و آنزیم های میتوکندریایی شروع به هضم چربی و آزادسازی انرژی می کنند(یوسفی، ۱۳۸۵).

۲-۱۲-۲-۳- ذخیره و تجمع مواد در میتوکندری‌ها

میتوکندری‌ها می توانند در اطاق داخلی خود مواد مختلف را انباشته کنند که این مواد عبارتند از ترکیبات آهن دار، چربی‌ها، پروتئین‌ها، کاتیون‌ها و آب. در اثر ذخیره این مواد، میتوکندری‌ها اغلب به حالت یک غشایی و شبیه باکتری‌های کوچک دیده می شوند و به تدریج، کریستال ها محو می شوند اما بعد از حذف این مواد، دوباره همه به حالت اول برمی گردند(یوسفی، ۱۳۸۵).

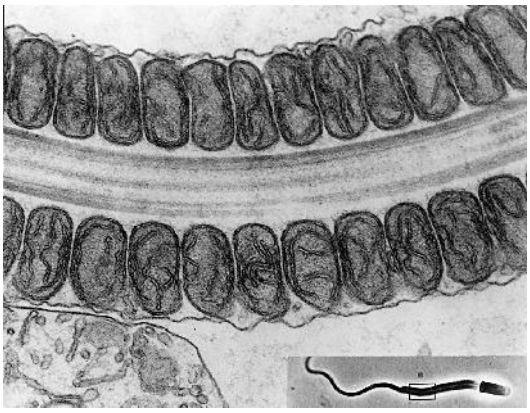
۲-۱۲-۲-٤- سنتز پروتئین

تخمین زده شده که صد ها پروتئین در یک میتوکندری وجود دارد. این پروتئین‌ها در تعداد زیادی از واکنش‌های شیمیایی غیر از فسفریلاسیون اکسیداتیو شرکت می‌کنند مثلاً در بیوسنتز پیریمیدین‌ها، اسیدهای آمینه، نوکلئوتیدها، کوآنزیم‌های فولات، آهن، اوره و غیره شرکت می‌کنند (یوسفی، ۱۳۸۵).

۲-۱۳- *وراثت میتوکندریایی*

در موجودات با تولید مثل جنسی میتوکندری منحصراً از مادر به ارث می رسد. میتوکندری موجود در اسپرم بعد از لقاح در فرایند تشکیل جنین از بین می رود. هم چنین بیشتر میتوکندری اسپرم در دم اسپرم قرار دارد که برای جلو راندن اسپرم استفاده می‌شود، بعضی مواقع دم در طول لقاح از بین می رود. مکانیسم دیگر برای توجیه توارث تک والدی DNA میتوکندریایی مکانیسم Dilution است. 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 نمی شود و این تنها هسته اسپرم است که وارد تخمک می شود در نتیجه DNA هسته زیگوت از هر دو والد است در حالی که DNA میتوکندریایی فقط از طرف مادر است (نگاره ۲- ۶). البته توراث پدری در دروزوفیلا، موش و توراث دو والدی هم در بعضی گونه ها مشاهده شده است(گراف، ۱۹۹۹).



نگاره ۲ - ۶ میتوکندری هایی که در طول دم اسپرم مرتب چیده شدند(شفلر۲۰۰۸).

در توراث DNA میتوکندریایی تغییراتی در این مولکول می تواند صورت گیرد که این تغییرات حاصل ایجاد جهش در ساختار مولکول DNA هستند، نه این که حاصل ادغام مولکول DNA میتوکندریایی مادری و پدری باشند(گراف، ۱۹۹۹).

۲-۱٤- ژنوم میتوکندری

میتوکندری تنها اندامک درون سلولی است که خود دارای DNA می باشد. اگر چه بیشتر DNA ها در کروموزوم‌های هسته وجود دارند، اما در میتو کندری نیز مولکول DNA وجود دارد که این ماده وراثتی به DNA میتوکندریایی معروف است. ژنوم میتوکندری اغلب موجودات، حلقوی دو رشته‌ای است که در حالت طبیعی در سلول به صورت ابر کلاف[۳۲] وجود دارد (نگاره ۷-۲). گرچه اشکال خطی نیز در بعضی گونه ها یافت می شود(امتیازی، ۱۳۸۶).

[32] Supercoli