مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی ژن های NADH3 وNADH4L ژنوم میتوکندری شتر دو کوهانه ایران

امین شهابی[1]، مجتبی طهمورث پور*[2]

[1]دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد.
[2]استاد گروه علوم دامی ، دانشگاه فردوسی مشهد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۲۳

چکیده

حفظ تنوع ژنتیکی در نژادهای بومی ایران به عنوان سرمایه ملی بسیار حائز اهمیت است. بررسی توالی ژنوم میتوکندری در بین نژادها یا در درون آنها می تواند شاخص مناسبی از میزان تنوع موجود در جمعیت های مورد مطالعه باشد. هدف از پژوهش اخیر، بررسی بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ژنهای NADH3 وNADH4L از ژنوم میتوکندری در شترهای دوکوهانه ایرانی بود. بدین منظور۱۰ نمونه خون از شترهای دوکوهانه ایران جمع آوری گردید. پس از استخراج DNA، تکثیر قطعه ۹۷۱ جفت بازی از ژنوم میتوکندری شتر دوکوهانه توسط آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. قطعات تکثیر شده پس از خالص سازی به صورت رفت و برگشت توالی یابی شدند. نتایج به دست آمده تعداد ۲ هاپلوتیپ مختلف بر اساس یک جایگاه چند شکل موجود در توالی ها نشان دادند و همچنین توالی نهایی بدست آمده از هاپلوتیپ ها با طول تقریبی۷۱۵ جفت باز که شامل ۲۷/۷۳ درصد آدنین، ۱۳/۷۰ درصد گوانین، ۲۵/۶۳ درصد سیتوزین،۳۲/۷۷ درصد تیمین بود. مقایسه توالی های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه ای ژن های NADH3 وNAD4L در شتر دو کوهانه ایرانی نشان داد که این گونه با شتر دو کوهانه اهلی دارای فاصله ژنتیکی نزدیکی است. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining نشان داد، که این گونه در میان خانواده شترسانان، با Lama کمترین قرابت را دارند.

کلمات کلیدی: *ژن NADH3، ژن NADH4L، شتر دوکوهانه ایران، ژنوم میتوکندری.*

* نویسنده مسئول: مجتبی طهمورث پور تلفن: ۰۵۱۳۸۷۹۵۶۱۸ Email: m_tahmoorespur@yahoo.com

مقدمه

شتر از جنبه تاریخی و اقتصادی در سراسر جهان گونه مهمی می باشد و جنس شتر به دو گونه شترهای تک کوهانه (*Camelus dromedaries*) و دوکوهانه (*Camelus bactrianus*) تقسیم می‌شود (Al-Swailem *et al*., 2010). زیستگاه شترهای دوکوهانه عمدتاً در مناطق صحرایی سرد چین و مغولستان بوده و نقش مهمی در اقتصاد بومی این مناطق دارند (Ji *et al*.,2009). شترهای دوکوهانه ایران جزء گونه‌های در معرض خطر انقراض می باشند و زیستگاه آن‌ها در شمال غربی ایران می‌باشد (Ansari-Renani *et al*., 2010). برخلاف اهمیت اقتصادی، فرهنگی و بیولوژیکی، مطالعات مولکولی مرتبط با ژنوم شتر محدود بوده و اطلاعات زیادی دردسترس نمی باشد (Ahmed *et al*., 2013). بر اساس آمار منتشره توسط سازمان خوار و بار جهانی در سال ۲۰۱۰ در جهان ۲٤،٦٦٤،۲۲۸ نفر شتر وجود دارد که بیش-ترین جمعیت آن در قاره آفریقا (۲۰،۹۵۹،۰۱۵ نفر، ۸۵ درصد) است (Ghasemi Meymandi *et al*., 2015). در ایران ۱۵۰،۰۰۰ نفر شتر یک کوهانه وجود دارد که این تعداد شتر ۰/۵٦ درصد از جمعیت شتر جهان را شامل می‌شود (Ghasemi Meymandi *et al*., 2015) و در نواحی سیستان و بلوچستان، خراسان، کرمان، یزد، هرمزگان، کهکیلویه و بویراحمد، اصفهان، سمنان، خوزستان، بوشهر، قم، گلستان، تهران، فارس، آذربایجان شرقی و غربی، ایلام، قزوین و اردبیل پراکنده می باشند (Ghasemi Meymandi *et al*., 2015). شتر های موجود در ایران را به ۵ اکوتیپ شامل کلکوهی، ترکمنی، بلوچی ، جماز و دوکوهانه تقسیم می‌کنند (Ghasemi Meymandi *et al*., 2015). در حوزه ژنتیک و اصلاح، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه ریزی برای طرح های اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد (Alinaghizadeh *et al*., 2010). اخیرا پیشرفت-های قابل توجهی در ژنتیک مولکولی جهت کشف ژن‌های کاندیدا در ارتباط با صفات تولید مثلی صورت گرفته است (Mousavizadeh *et al*., 2009). استفاده از ژنتیک مولکولی کاربردهای زیادی دارد. یکی از آن‌ها تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه‌های ژنتیکی خاص است و یکی از کاربردی ترین راههای شناسایی موجودات در خطر انقراض استفاده از تکنیک مولکولی به خصوص استفاده از ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) است که اساس این گونه تحقیقات بر پایه استخراج DNA، خالص سازی محصولات PCR و توالی یابی می باشد. میتوکندری اندامکی سیتوپلاسمی است، که در بیشتر سلول های بدن وجود دارند. این اندامک قادر به تولید انرژی برای سلول است. دارای DNA حلقوی اختصاصی و مستقل از DNA هسته ای است (Pirani *et al*., 2010). ژنوم میتوکندری شتر دارای ۱٦ ژن کد کننده پروتئین

است که کدون آغازین ۱۰ عدد از این ژن ها ATG ، سه عددآنها ATA ، کدون پایان ۷ ژن TAA و ۲ ژن آنها TAG و یکی از آنها AGA می باشد و سه ژن COX3T، ND3 وND4 کدون پایان نرمال ندارند اما به ترتیب دارای رمزهای TA، T وT می باشند (Cui *et al*.,2007). جهت بررسی ارتباط تکاملی شتر دوکوهانه اهلی و شتر دو کوهانه وحشی و بررسی منشاء پیدایش شتر دو کوهانه اهلی، در تحقیقی ژن Cytb ژنوم میتوکندریایی ۲۱ شتر دو کوهانه (۱۸ نفر شتر دو کوهانه اهلی و ۳ نفر شتر دوکوهانه وحشی در کشور عربستان) توالی یابی و نتایج فیلوژنتیکی نشان داد که شتر دو کوهانه اهلی درریشه مادری با شتر دو کوهانه وحشی جد مشترک دارد و نتایج تجزیه و تحلیل ساعت مولکولی نشان داد که زیر گونه زایی از حدود ۷۰۰ میلیون سال پیش از دو دودمان شروع شده است. بنابراین، نتیجه گرفته شد که شتر دو کوهانه وحشی دارای اصل و نسب جداگانه است و جد مشترک مستقیم با شتر دو کوهانه اهلی ندارد (Ji *et al*.,2009). با توجه به این که مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی دام‌های بومی ضروری است (Mohammadi *et al*., 2009) و این که تاکنون مطالعه‌ای در مورد ژنوم میتوکندری شتر دو کوهانه ایران گزارش نشده است، هدف این پژوهش تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی ژن های NADH3 وNADH4L ژنوم میتوکندری شتر دو کوهانه ایران بود.

مواد و روش ها

نمونه های خون شتر دوکوهانه ایران از ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اردبیل (روستای جهاد آباد) تهیه و تعداد ۱۰ نمونه خون با اطمینان از عدم رابطه خویشاوندی بین نمونه ها انتخاب گردید. نمونه های خون تا زمان استخراج در لوله های حاوی EDTA در فریزر در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از کیت GenNet صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر Nano Drop-ND 2000 شرکت Thermo آمریکا سنجیده شد. به منظور تکثیر ژن-های NADH3 وNADH4L میتوکندری شتر دوکوهانه با طول ۹۷۱ جفت باز یک جفت آغازگر اختصاصی با استفاده از نرم افزار Primer premier 5 (Premier Biosoft, USA) و ژنوم کامل میتوکندری شتر دوکوهانه (شماره دسترسی EF212038) طراحی شد. توالی آغازگرهای طراحی شده در تحقیق اخیر به صورت زیر بود:

Forward 5´-CGTCTGGCTGTTCCTCTATGTCTC-3´

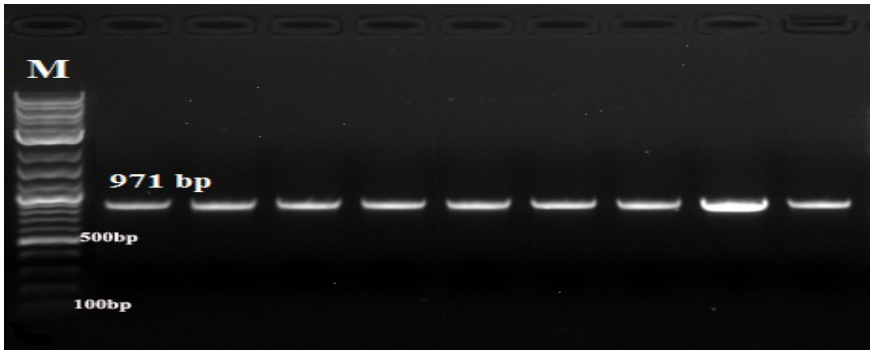
Reverse 5´-TTGGTGCTGATGTCGCTATACTGA-3´

آغازگرها به گونه ای طراحی شدند که نواحی بالادست ژن NADH3 و پایین دست ژنNADH4L را تکثیر کنند به منظور این که توالی کامل ژن ها با صحت خوانش بالا، برای آنالیزهای بیوانفورماتیکی موجود باشد. سپس، با

استفاده از رویه BLAST موجود در پایگاه بانک جهانی ژن (NCBI)، میزان همپوشانی آنها با توالی های موجود، مقایسه گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر قطعه ۹۷۱ جفت بازی از mtDNA شتر دوکوهانه توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal براساس روش استاندارد انجام گرفت. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل 100 mM Tris-HCL(PH 8.8)، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۰/۲mM از هر dNTP، ۱/۵ mM از $MgCl_2$، ۵ pmol از آغازگر اختصاصی ژن و ۱۰۰ نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی واسرشت سازی در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦۰ درجه برای ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه برای ٤۵ ثانیه، یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در ۳۵ سیکل تکثیر شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز، خالص سازی شد و به همراه ۵۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده با غلظت ۱۰ پیکامول به منظور تعیین توالی به شرکتMacroGen کره جنوبی ارسال گردید. این نمونه ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی یابی شدند. سپس با استفاده از ابزار قدرتمند BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی های بدست آمده سنجیده شد. به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نژادهای مورد مطالعه، نمودار درختی با استفاده از رویه Neighbor-Joining توالی های همردیف شده، به کمک نرم افزار5 MEGA (Tamura *et al*., 2011) ترسیم گردید. تعیین هاپلوتیپ ها از رویهDisparity Index Analysis نرم افزار MEGA5 استفاده گردید.

نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه ها با موفقیت انجام گرفت. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار است. الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی آگارز ۱ درصد نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعه اختصاصی برای ژنهای NADH3 وNADH4L به طول ۷۱۵ جفت باز و نواحی بالادست و پایین دست آنها در مجموع قطعه ۹۷۱ جفت بازی را تکثیر نمودند (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR به طول ۹۷۱ جفت باز روی ژل آگارز ۱ درصد.

Figure 1-Electrophoresis of 971 bp PCR Products on 1 % Agarose gel.

تعیین توالی قطعه ۹۷۱ جفت بازی برای همه نمونه ها انجام گرفت. قطعه ۹۷۱ بدست آمده از توالی یابی در همه نمونه ها جهت آنالیزهای بیوانفورماتیکی مورد استفاده قرار گرفت. تعداد ۲ هاپلوتیپ از بین توالی های مورد بررسی تعیین شدند، که دارای یک جایگاه چند شکل (SNP) از نوع جایگزینی در نوکلئوتید ۱۰۸ از ژن NADH4L هستند که در این جایگاه جهش جایگزینی حاصل تغییرات بازهای پورینی است.، این جهش در نوع اسیدآمینه تغییری ایجاد نکرده و تنها باعث تغییر در کدون همان اسیدآمینه شده است(شکل۲).(Cui *et al.*, 2007) ژنوم کامل میتوکندری شتر دوکوهانه وحشی توالی یابی کردند و جایگزینی های نوکلئوتیدی در ژن های ATP, ND4L, ND3 ND4, , و ATP8 را مشاهده کردند و گزارش کردند که ژن های خانواده ND و ATP سنتتاز ممکن در تکامل سریعتر از دیگر ژنهای کد کننده پروتئین در ژنوم میتوکندری باشند. با توجه به هاپلوتیپ های به دست آمده می توان توالی مورد توافق را محاسبه نمود. از آنجائی که تعداد جایگاه های چند شکلی وابسته به تعداد نمونه هستند، لذا از پارامتر دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی(π) یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید استفاده گردید، که تحت تاثیر طول DNA و اندازه نمونه نیست و عبارت از متوسط تفاوت نوکلئوتیدی بین دو توالی در هر جایگاه می باشد (Nei & Kumar., 2000). مقدار تنوع هاپلوتیپی در جمعیت حاضر۰/۵۷ برآورد گردید، که بیانگر سطح تنوع پایین در جمعیت شترهای دوکوهانه ایران می باشد. نتایج مطالعه اخیر بر این دلالت دارد، که در ژن های مورد مطالعه که کد کننده پروتئین می باشند میزان جهش و تنوع در آن پایین است (Eyre-walker & Awadall., 2001). همچنین، عدم نوترکیبی در ژنوم میتوکندریایی و توارث تک والدی و هاپلوئید بودن ژنوم که منجر به کاهش قابل توجه اندازه ژنوم میتوکندری در مقایسه با ژنوم هسته ای می شود، تاثیرپذیری آن را از مشکلات رایج نظیر رانش ژنتیکی و بروز تنگنا درجمعیت در مقایسه با ژنوم هسته ای افزایش می دهد.

```
                Start                    20                      40                      60
NADH4L-H1  ATGTCCATAG TGTATATAAA TATTATCCTA GCATTCACTA TGTCCCTTGC CGGTCTTCTG ATATATCGAT 70
            Met Ser Met  Val Tyr Met Asn  Ile Ile Leu  Ala Phe Thr  Met Ser Leu Ala  Gly Leu Leu  Met Tyr Arg

NADH4L-H2  ATGTCCATAG TGTATATAAA TATTATCCTA GCATTCACTA TGTCCCTTGC CGGTCTTCTG ATATATCGAT 70
            Met Ser Met  Val Tyr Met Asn  Ile Ile Leu  Ala Phe Thr  Met Ser Leu Ala  Gly Leu Leu  Met Tyr Arg

                     80                      100        SNP 108        120                     140
NADH4L-H1  CCCACCTAAT GTCTTCCCTA CTCTGCCTGG AAGGCATGAT ACTTTCTCTT TTCGTAATGG CATCCCTAAT 140
           Ser His Leu Met  Ser Ser Leu  Leu Cys Leu  Glu Gly Met Met  Leu Ser Leu  Phe Val Met  Ala Ser Leu Met

NADH4L-H2  CCCACCTAAT GTCTTCCCTA CTCTGCCTGG AAGGCATAAT ACTTTCTCTT TTCGTAATGG CATCCCTAAT 140
           Ser His Leu Met  Ser Ser Leu  Leu Cys Leu  Glu Gly Met Met  Leu Ser Leu  Phe Val Met  Ala Ser Leu Met

                                160                     180                     200
NADH4L-H1  AATCCTAAAT AATCACTTTA CTTTAGCCAG CGTTATGCCT ATCATTCTTC TAGTGTTCGC AGCATGTGAA 210
             Ile Leu Asn  Asn His Phe  Thr Leu Ala Ser  Val Met Pro  Ile Ile Leu  Leu Val Phe Ala  Ala Cys Glu

NADH4L-H2  AATCCTAAAT AATCACTTTA CTTTAGCCAG CGTTATGCCT ATCATTCTTC TAGTGTTCGC AGCATGTGAA 210
             Ile Leu Asn  Asn His Phe  Thr Leu Ala Ser  Val Met Pro  Ile Ile Leu  Leu Val Phe Ala  Ala Cys Glu

                     220                     240                     260                     280
NADH4L-H1  GCCGCATTAG GCCTAGCCCT ACTAGTAATG GTCTCCAATA CATATGGCAC AGATTATGTA CAAAACCTCA 280
            Ala Ala Leu  Gly Leu Ala Leu  Leu Val Met  Val Ser Asn  Thr Tyr Gly Thr  Asp Tyr Val  Gln Asn Leu

NADH4L-H2  GCCGCATTAG GCCTAGCCCT ACTAGTAATG GTCTCCAATA CATATGGCAC AGATTATGTA CAAAACCTCA 280
            Ala Ala Leu  Gly Leu Ala Leu  Leu Val Met  Val Ser Asn  Thr Tyr Gly Thr  Asp Tyr Val  Gln Asn Leu

                                Stop
NADH4L-H1  ATCTCCTACA ATGTTAA 297
           Asn Leu Leu Gln  Cys Stp

NADH4L-H2  ATCTCCTACA ATGTTAA 297
           Asn Leu Leu Gln  Cys Stp
```

شکل۲- مقایسه توالی نوکلئوتیدی واسید آمینه ای ژن NADH4L در ها پلوتایپ های شتر دو کوهانه ایران.

Figue. 2- Comparison of amino acid sequence of NADH4L gene in two haplotypes of Iranian Camelus bactrianus.

نمونه برداری در مقیاس جغرافیای کوچک و تعداد اندک نمونه نیز می تواند از دلایل احتمالی وجود تنوع اندک در هاپلوتیپ های مشاهد شده باشد(Beaumont & Hoare., 2003). فراوانی نسبی نوکلئوتیدها همراه با درصد نوکلئوتیدها در توالی مورد توافق شتر دو کوهانه ایران به طول ۷۱۵ نوکلئوتید در این ناحیه از mtDNA شتر دو کوهانه ایران با شتر دو کوهانه اهلی ثبت شده در NCBI با شماره دسترسی (NC_009628) و شتر دو کوهانه وحشی با شماره دسترسی (NC_009629) توسط (Ji *et al.*, 2005) مقایسه شدند (جدول ۱). این مقایسه نشان داد که توالی بدست آمده از شتر دو کوهانه با توالی شتر دو کوهانه اهلی ثبت شده کاملاً مشابه هستند بطوری که می‌توان نتیجه گرفت شتر دو کوهانه مورد مطالعه و گونه اهلی ثبت شده دارای قرابت ژنتیکی بسیار نزدیکی هستند. همچنین نتایج تجزیه و تحلیل محتوی نوکلئوتیدی توالی مورد تحقیق با نتایج (Cui *et al.*,2007) که توالی کامل ژنوم میتوکندری شتر

دوکوهانه وحشی بررسی کردند، مطابقت دارد. (Cui *et al*.,2007)گزارش کرده اند کدون CTA لوسین با ۲۷۷ بار تکرار بیشترین فراونی و کدون CGA آرژنین با ۷ بار تکرار کمترین فراوانی در کل ژنوم میتوکندری شتر دارند و کدون های پایانی که با نوکلئوتید های A و T ختم شوند فراوانی شان بیشتر از نوکلئوتیدهای C و G است و محتوی A+T آن ۵۷/۹ می باشد و مشابه آنچه که در میان سایر پستانداران یافت می شود.

در ادامه با استفاده از ابزار BLAST درصد تشابه توالی ژن های NADH3 و NADH4L با توالی های ثبت شده در پایگاه NCBI بررسی شد اکثریت توالی های گرفته شده از بانک جهانی ژن در سطح ۹۹ درصد بیشترین تشابه را با توالی های شتر دو کوهانه ایران داشتند . این نتایج دلالت بر این دارد که این ژن ها جز ژن های کد کننده پروتئین در ژنوم میتوکندری می باشند و توالی آنها حفاظت شده است و تغییرات نوکلئوتیدی در آنها به ندرت رخ می دهد(Eyre-walker and Awadalla., 2001).

جدول-۱- درصد فراوانی نسبی نوکلئوتیدها درناحیه NADH3 وNADH4L در شتردوکوهانه ایرانی، اهلی و وحشی.

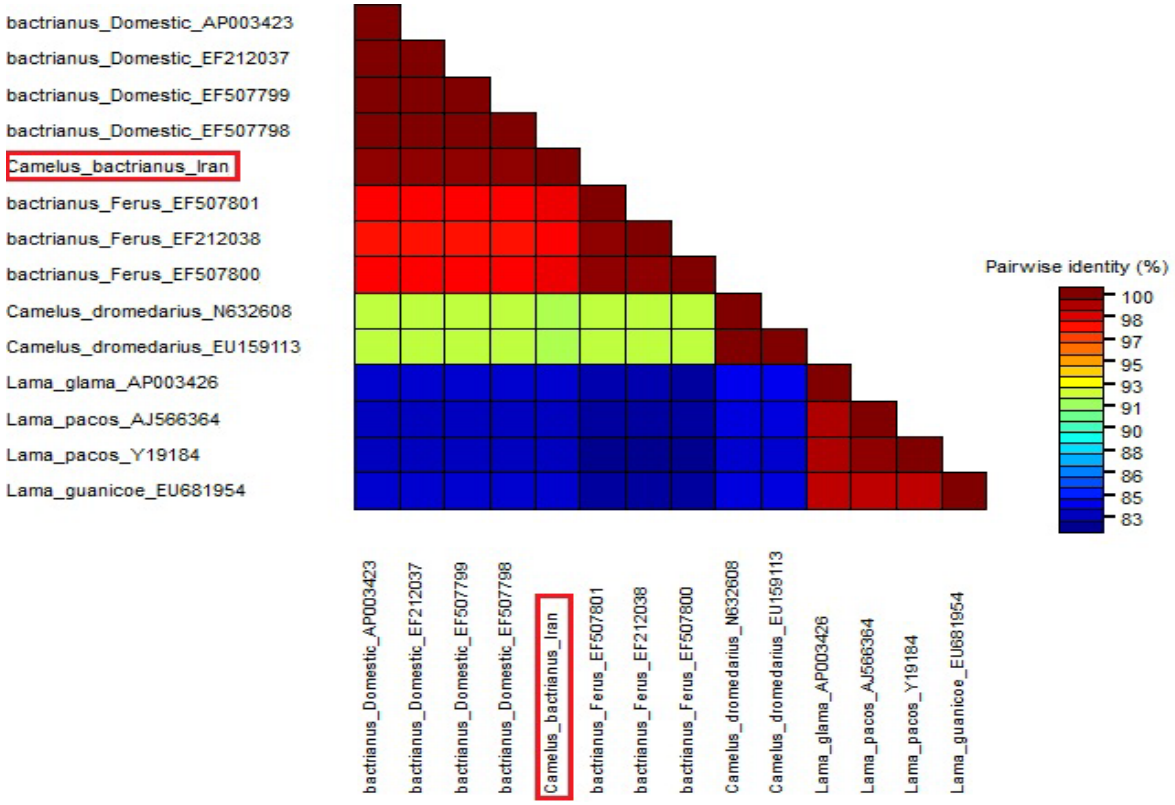
Table 1 Relative frequency percentage- of Nucleotides in NADH3 and NADH4L region in Iranian Camelus bactrianus, domestic and wild.

جمعیت Population	A+T	G+C	A	T	G	C
	درصد فراوانی نوکلئوتیدی Nucleotides frequency percentage					
شتر دو کوهانه ایران Iranian camelus bactrianus	60.5	39.5	27.73(198)	32.77(234)	13.87(99)	25.63(183)
شتر دوکوهانه اهلی camelus bactrianus	60.4	39.6	27.60(197)	32.80(234)	14(100)	25.60(183)
شتر دوکوهانه وحشی Camelus ferus	59.52	40.48	27.45(196)	32.07(229)	13.87(99)	26.61(190)

با توجه به این که درصد تشابه با فاصله ژنتیکی بین دو حیوان رابطه عکس دارند و فاصله ژنتیکی بین دو حیوان با همبستگی فیلوژنتیکی بین حیوانات مرتبط خواهد بود، در نتیجه از این شاخص هم می توان برای تعیین دوری و نزدیکی ژنتیکی حیوانات مختلف استفاده کرد. درصد تشابه (جدول ۳) توالی ناحیه ژنی NADH3 و NADH4L شتر دوکوهانه ایرانی با سایر توالی-های شترسانان موجود در پایگاه NCBI با استفاده از نرم افزار آنلاین SDTv1.5

(http://web.cbio.uct.ac.za/SDT) مورد محاسبه قرار گرفت. از آن‌جایی که درصد تشابه بین حیوانات مختلف به صورت دو به دو است، تیرگی رنگ هر مربع بیانگر میزان تشابه است که هر چه تیره تر باشد درصد تشابه بین دو حیوان بیشتر است. با توجه به شکل شماره ۳ می‌توان نتیجه گرفت که شتردو کوهانه ایرانی از نظر قرابت ژنتیکی، در خانواده شترسانان دارای بیشترین درصد تشابه(۹۹/۸) و کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۲) با شترهای دوکوهانه اهلی و کمترین درصد تشابه (۸۲/۲) و بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۲) با گونه Lama است.

جهت تایید نتایج حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی، درخت فیلوژنتیک توالی کلی ژن های NADH3 وNADH4L شتردوکوهانه ایرانی با سایر توالی‌های موجود در پایگاه NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 ترسیم شد (شکل ٤).

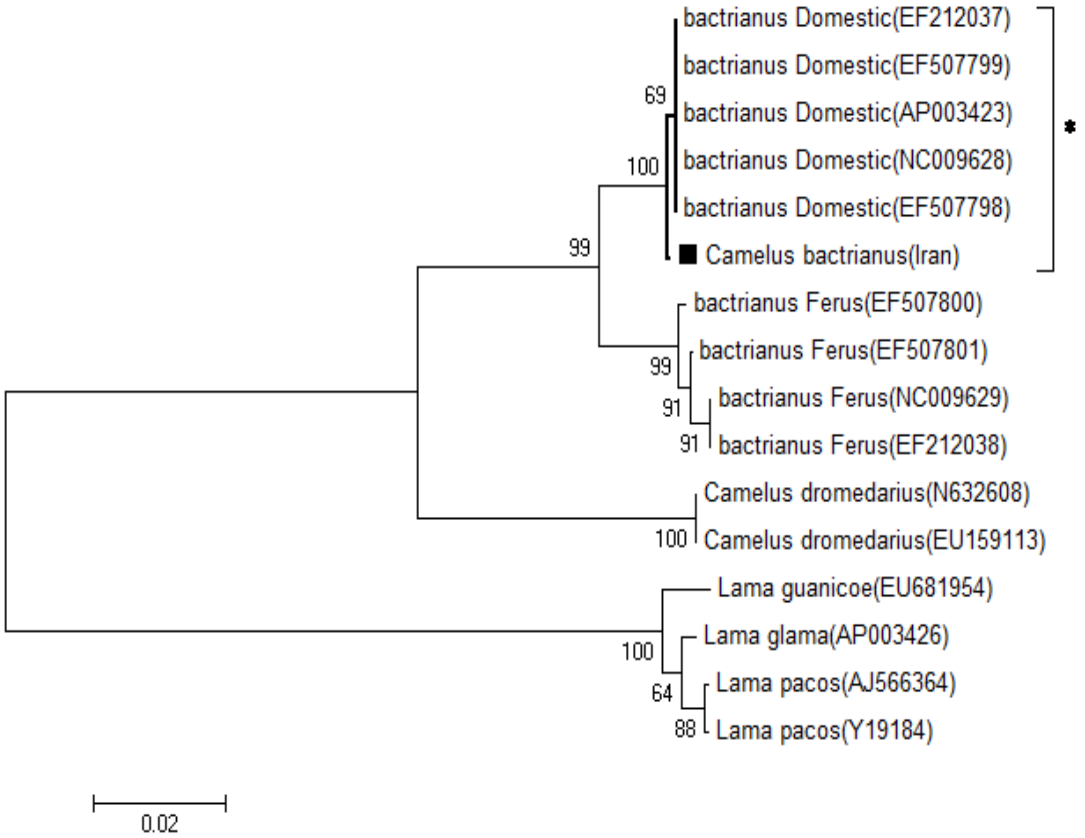


شکل ۳- فواصل ژنتیکی بین توالی های شتر دوکوهانه ایران و دیگر گونه های مختلف شترسانان برای ژن‌های NADH3 وNADH4l.

Figure 3- Matrix of Genetic distance between sequences of NADH3 and NADH4Lgene in Iranian Camelus bactrianus and other species of Camelid.

درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده نتایج بدست آمده از ماتریس فواصل ژنتیکی را تایید کرد بطوری که بر اساس آن شتر دوکوهانه ایرانی با شترهای دوکوهانه اهلی در یک زیر گروه قرار

دارند که این موضوع بیانگر قرابت ژنتیکی تقریباً نزدیک آنها می‌باشد. همچنین شتر دو کوهانه ایرانی کمترین شباهت را با گونه Lama دارد. این نتایج با نتایج (Cui *et al*.,2007) مطابقت دارد. گزارش کردند که ژنوم میتوکندریایی در شتر دو کوهانه وحشی دارای ۱۳ ژن کد کننده پروتئین،۲۲ژن tRNA و ناحیه کنترل است. تجزیه و تحلیل ساعت مولکولی ژنوم میتوکندریایی نشان داد که دو گونه شتر دو کوهانه وحشی و Lama حدود ۲۵ میلیون سال پیش از یک جد مشترک جدا شده اند و همچنین منشا اصلی شتر دو کوهانه اهلی و وحشی در شمال آمریکا رخ داده قبل از این که به جنوب آمریکا مهاجرت کنند.



شکل ٤- نمودار فیلوژنی براساس توالی کلی ژن های NADH3 و NADH4L شتر دوکوهانه و دیگر نژادهای شتر موجود در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آنها.

Figure 4- Phylogenetic tree based on consensus sequences of genes NADH3 and NADH4L *Camelus bactrianus* and other *Camelus* breeds are taken from GenBank along with their accession numbers.

منابع

Ahmed MM, El-Shazly SA, Sayed SM and Amer SA. (2013). Molecular study of energy related mitochondrial genes in Arabian and bactrian camels.American Journal of Biochemistry and Biotechnology 9:61-70.

Al-Swailem AM, Shehata MM, Abu-Duhier FM, Al-Yamani EJ and Al-Busadah KA *et al*. (2010). Sequencing, Analysis and Annotation of ExpressedSequence Tags for Camelus dromedaries. PLoS One 5:e10720.

Alinaghizadeh H, Mohammad Abadi MR, Zakizadeh S (2010). Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. Agricultural Biotechnology 2: 69-80.

Ansari-Renani H, Salehi M, Ebadi Z and Moradi S. (2010). Identification of hair follicle characteristics and activity of one and two humped camels. Small Ruminant Research 90(1):64-70.

Beaumont AR and Hoare K. (2003). Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Blackwell Science Ltd.

Cui P, Ji R, Ding F, Qi D, Gao H, Meng H, Yu J, Hu S and Zhang H. (2007). A complete mitochondrial genome sequence of the wild two-humped camel (Camelus bactrianus ferus): an evolutionary history of camelidae. BMC Genomics 8:241.

Eyre-walker A, Awadalla P. (2001). Does human mtDNA recombine Journal of Molecular Evolution 53: 430-435.

Ghasemi Meymandi M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK (2015). Genetic variation of camels in the North of Kerman province using microsatellite markers. Animal Production Research 4: 35-45.

Ji R, Cui P, Ding F, Geng J, Gao H, Zhang H, Hu S and Meng H.(2009). Monophyletic origin of domestic bactrian camel (Camelus bactrianus) and its evolutionary relationship with the extant wild camel (Camelus bactrianus ferus). Animal Genetics 40: 377–382.

Mohammadi A, Nassiry MR, Mosafer J, Mohammadabadi MR, Sulimova GE (2009). Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (Bos indicus). Russian Journal of Genetics 45: 198-202.

Mousavizadeh A, Mohammad Abadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H, AliEsmailizadeh AK (2009). Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Iranian Journal of Biotechnology 7: 51-53.

Nei M and Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Pirani N, Mohammadhashemi A, Alijani S, Rezazadeh Goli R, Ghanbari S .(2010). Molecular Analysis of Mazandrani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA. Journal of Agriculture Biotechnology 1(2): 53- 60.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Bioinformatics and Phylogenetic Analysis of NADH3 and NADH4L mitochondrial genes in Iranian Camelus bactrianus

Shahabi A.[1], Tahmoorespur M.[*2]

[1]PhD Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
[2] Professor, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Abstract

Keeping genetic diversity among native Iranian breeds is very important as a national resource. Studying mitochondrial genome between or within breeds can be a useful indicator of genetic diversity of the population to be studied. The aim of current study was bioinformatic and phylogenetic investigation of NADH3 and NADH4L genes of mitochondrial genome in Camelus bactrianus in Iran. For this purpose, blood samples were collected from 10 Camelus bactrianus in Iran. After extracting DNA, fragment 971 bp of genome mitochondrial of Camelus bactrianus amplified by primers. The amplified fragments were sequenced after purification. Results indicated two different haplotypes based on one single nucleotide polymorphism sequence. The final sequences of each haplotype had a length of approximately 715 bp which included 27/70 % adenine, 13/80 % guanine, 25/60 % cytosine and 32/80 % thymine. Comparison of nucleotide and amino acid sequences of NADH3 and NADH4L genes among Iranian Camelus bactrianus demonstrated that this specie had close genetic distance with domestic Camelus bactrianus. Phylogenetic analysis using Neighbor-Joining method showed that this specie has the lowest similarity with Lama among the *Camelidae family.*

Keywords: *NADH3 gene, NADH4L gene, Camelus bactrianus, genome mitochondrial.*

[*] Corresponding Author: Tahmoorespur M. Tel: 05118795618 Email: m_tahmoorespur@yahoo.com