Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Genetic and phylogenetic analysis of 12S rRNA region in *camelus dromedaries* and *camelus bactrianus* of Iran

Azadeh Torabi

*Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran. Tel. +989130437800. Email: Azadehtorabi@gmail.com

Zahra Roudbari

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. Tel. +989132483343. Email: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

Mojtaba Tahmoores-Pour

Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran Tel. +989151159911. Email: Tahmoores@um.ac.ir

Abstract

Objective

Around the world, scientists are looking for new animal protein sources and trying to prioritize the animals with the best conversion rates. One of these animals is Camel. Identification of genetic differences in sequences of Mitochondrial Genome by Bioinformatics Tools is a rapid and confident method for identification and categorizing species. This method is one of the most effective ways of evaluating genetic biodiversity and Phylogenetic relationships in different livestock like Camel. This research was done for sequencing of Ribosomal non-coding RNA gene and comparison of its genetic construction between *camelus dromedaries* and *camelus bactrianus* of Iran.

Materials and Methods

We were collecting blood samples from twenty *camelus dromedaries* and *camelus bactrianus*. We extracted DNA at the beginning then 12S rRNA with 1326 pair bases was amplified and sequenced by two pair specific primers.

Results

The Presence of 3 Haplotypes in Bactria camels and one haplotype in Dromedary were proved in the study population. These Haplotypes have two single nucleotide polymorphism (SNP) site in *camelus bactrianus* and there was not any Nucleotides difference among *camelus dromedaries*. Phylogeny Tree design with using similar mitochondrial 12S rRNA gene sequencing in other species which are in World Gene Bank.

Conclusion

Phylogeny Analysis and defining, Genetic diversity was showing *camelus dromedaries* and *camelus bactrianus* are placing in two different groups and Iranian *camelus bactrianus* have more Genetic Diversity which indicates more historical evolution of this specie. More information about Genetic diversity among the different generation of Camels can facilitate developing generations revising Programs and is a necessity for protecting from Genetic Resources.

Keywords: Mitochondrial DNA, Genetic diversity, 12S rRNA gene.

Citation: Torabi A, Roudbari Z, Tahmoores-pour M (2020) Genetic and phylogenetic analysis of 12S rRNA region in *camelus dromedaries* and *camelus bactrianus* of Iran. Agricultural Biotechnology Journal 12(2), 209-223.

Agricultural Biotechnology Journal 12(2), 209-223.

DOI: 10.22103/jab.2020.16089.1246

Received: July 15, 2020; Accepted: August 27, 2020

©Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه 12S rRNA شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایران

آزاده ترابی

*نویسنده مسئول، استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۰۴۳۷۸۰۰، ایمیل: Azadehtorabi@gmail.com

زهرا رودباری

استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۲۴۸۳۳۴۳، ایمیل: roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

مجتبی طهمورث پور

استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۵۱۱۵۹۹۱، ایمیل: Tahmoores@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰٤/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰٦/۰٦

چکیده

هدف: دانشمندان علوم دامی در سرتاسر جهان در پی یافتن منابع جدیدی از پروتئین حیوانی بوده و تلاش می‌کنند تا حیواناتی که بهترین ضریب تبدیل را دارند در اولویت کاری خود قرار دهند. از جمله این دام‌ها می‌توان به شتر اشاره کرد. تحقیقات جهت حفظ این ذخیره ژنتیکی با ارزش از حساسیت و اهمیت بیشتری برخوردار است. شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی در توالی ژن‌های موجود در ژنوم میتوکندری با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک، روشی سریع و قابل اطمینان برای شناسایی و طبقه بندی گونه‌ها است و یکی از مؤثرترین ابزارها در برآورد تنوع زیستی ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک در نژادهای مختلف دام از جمله شتر محسوب می‌شود. هدف از انجام این پژوهش توالی‌یابی و مقایسه ساختار ژنتیکی ژن RNA غیر کدکننده زیر واحد کوچک ریبوزوم در شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایران بود.

مواد و روش‌ها: برای انجام این پژوهش از ۲۰ نفر شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی نمونه خون جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA ژن 12S rRNA با طول ۱۳۲۶ جفت باز در ژنوم میتوکندری توسط دو جفت آغازگر اختصاصی تکثیر و توالی‌یابی شدند.

نتایج: وجود ۳ هاپلوتایپ در شترهای دوکوهانه و ۱ هاپلوتایپ در شترهای تک‌کوهانه در جمعیت مورد پژوهش ثابت شد که این هاپلوتایپ‌ها به ترتیب دارای دو جایگاه چند شکل (SNP) در شتر دو کوهانه است و در بین شترهای تک‌کوهانه هیچ تفاوت

نوکلئوتیدی مشاهده نشد. درخت فیلوژنی پس از اخذ توالی‌های مشابه ژن 12S rRNA میتوکندری دیگر گونه‌های موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از آنها ترسیم شد.

نتیجه‌گیری: نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنی و تنوع ژنتیکی نشان داد گونه‌های شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه در دو گروه متفاوت قرار دارند و شترهای دوکوهانه ایرانی تنوع ژنتیکی بالاتری دارند که نشان از قدمت تکاملی طولانی‌تر این گونه دارد. اطلاعات در مورد تنوع ژنتیکی در میان نژادهای شتر می‌تواند توسعه برنامه‌های اصلاح نژاد را تسهیل کند و یک الزام برای حفظ منابع ژنتیکی است.

واژه‌های کلیدی: DNA میتوکندری، تنوع ژنتیکی، ژن 12S rRNA .

مقدمه

روند روز افزون مصرف مواد پروتئینی با منشا دامی در بین جوامع پیشرفته و در حال توسعه، باعث رشد سریع دامپروری در کشورهای مختلف جهان شده است. دامپروری نوین جهانی در پی یافتن منابع جدیدی از پروتئین حیوانی است و تلاش می‌کند تا پرورش حیواناتی که بهترین ضریب تبدیل را دارا هستند در اولویت کاری خود قرار دهد، از جمله این دام‌ها می‌توان به شتر اشاره کرد. شترها به خانواده شترسانان، زیرراسته Tylopoda، راسته Artiodactyla و رده پستانداران تعلق دارند (Ghasemi Meymandi et al. 2015). جنس شتر به دو گونه شترهای تک کوهانه (Camelus dromedaries) و دوکوهانه (Camelus bactrianus) تقسیم می‌شود. شتر تک کوهانه ساکن شمال آفریقا و خاورمیانه بوده، در حالی‌که شتر دوکوهانه در آسیای مرکزی ساکن است (Mohammadabadi et al. 2018). علاوه بر شتر تک کوهانه، شتر دوکوهانه نیز در مناطق افغانستان، پاکستان و آسیای جنوب غربی وجود دارد (Ghasemi Meymandi et al. 2016a). زیستگاه شترهای دوکوهانه عمدتاً در مناطق صحرایی سرد چین و مغولستان بوده و نقش مهمی در اقتصاد محلی این مناطق دارند (Ghasemi Meymandi et al. 2016b). شتر از جنبه تاریخی و اقتصادی در سراسر جهان گونه مهمی بوده به طوری که ۱۶ درصد جمعیت حیوانی شبه جزیره عربستان را تشکیل می‌دهد (Barazandeh et al. 2016). لازم به ذکر است که جمعیت شترهای تک کوهانه و دوکوهانه در ایران به ترتیب در حدود ۱۵۰۰۰۰ و ۱۰۰ نفر می‌باشد. شترهای دوکوهانه ایران جزء گونه‌های در معرض خطر محسوب شده و زیستگاه آن‌ها در شمال غربی ایران می‌باشد. علیرغم اهمیت اقتصادی، فرهنگی و بیولوژیکی، مطالعات مولکولی مرتبط با ژنوم شتر محدود بوده و اطلاعات زیادی در دسترس نیست (Barazandeh et al. 2019). شترها دارای خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی زیادی هستند که به آنها امکان تحمل شرایط سخت در مناطق خشک و بیابانی به ویژه در آسیا و آفریقا را می‌دهد. میلیون‌ها انسان در زندگی خود به شترها و محصولات آنها وابسته هستند چرا که علاوه بر استفاده از آنها در حمل و نقل، منبع اصلی گوشت و شیر در مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می‌شوند (Othman et al. 2017). شترسانان چون دارای بسیاری از خصوصیات فیزیولوژیکی خاص هستند از جمله؛ استفاده از مکانیزمی که می‌تواند دمای بدن را بین ۳۴ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد تغییر دهد، بنابراین تعریق را به حداقل رسانده و

از تلفات آب جلوگیری می‌کند از دیگر خصوصیات فیزیولوژیکی، توانایی نوشیدن مقادیر زیادی آب جهت جبران از دست دادن مایعات است، که می‌تواند به ۲۰۰ لیتر برسد (Ouajd and Kamel 2009) همچنین سلول‌های قرمز خون شتر با شکل بیضوی عجیب و غریب باعث تسهیل جریان خون در داخل رگ‌های خونی در این حیوانات می‌شود (Al-Swailem et al. 2007؛ 2014 .Warda et al). علاوه بر این، پلاکت‌های شتر می‌توانند دمای بالای ۴۳–۴۵ درجه سانتی‌گراد را تحمل کنند حتی استرس حرارتی بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد اثرات اندکی بر روی سلول‌های شتر دارد و عملکرد آنها را مختل نمی‌کند این در حالی است که باعث آسیب جدی به پلاکت‌های انسانی می‌شود، (Al Ghumlas et al. 2008؛ Hoter et al. 2019). علاوه بر این، شترها قادرند در صورت مواجه شدن با شرایط اکولوژیکی بیابانی، تولید اقلام مفیدی مانند شیر، گوشت و پشم را امکان پذیر کنند. گوشت شتر در مقایسه با دیگر گوشتها به علت چربی و کلسترول پایین‌تر، مطلوب‌تر است همچنین شیر شتر برای افرادی که به شیر گاو حساسیت دارند مناسب‌تر است (Othman et al. 2017). از آنجا که شتر یکی از دام‌های کلیدی در اقتصاد دامپروری می‌باشد، تحقیقات و بررسی جهت حفظ این ذخیره ژنتیکی با ارزش از اهمیت بیشتری برخوردار است (Eltanany et al. 2015). این در حالی است که نژادهای بومی در هر کشور به عنوان سرمایه ملی و محصولی راهبردی در اقتصاد و رونق آن کشور محسوب می‌شوند همچنین مطالعه مولکولی ساختار ژنتیکی شتر در جهت شناخت دقیق‌تر این حیوان می‌تواند موثر باشد (Samadian et al. 2020).

DNA میتوکندری[1] بر خلاف نشانگرهای هسته‌ای با وراثت مادری، توارث ساده، نوترکیبی نادر، وزن مولکولی پایین و افزایش جهش بالا و وجود نواحی حفاظت شده جهت مطالعه آنالیز ژنتیکی، تکامل مولکولی، شناسایی بیماری، پیری و آپوپتوزیس بسیار مهم است (Othman et al. 2017). همچنین نقش مهمی در شناسایی تنوع زیستی ژنتیکی بین نژادهای مختلف حیوانات اهلی از جمله گاو، خوک، گوسفند، اسب و بز دارد و به دلیل وجود نسخه‌های متعدد آن در سلول می‌تواند از تعداد کمی از نمونه‌های بافت حاوی DNA تخریب شده جدا شود. علاوه بر این، به دلیل میزان جهش بالا و تعمیر محدود نسبت به DNA هسته‌ای، باعث می‌شود مناطق حفاظت شده آن نسبت به DNA هسته‌ای برای شناسایی گونه‌ها ترجیح داده شود (Yang et al. 2014). شناسایی تفاوت های ژنتیکی در توالی ژن‌های موجود در ژنوم میتوکندری با استفاده از تکنیک‌های مولکولی یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین روابط تکاملی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک بهم می‌باشد (Rodbari and Nasiri 2019) چرا که این داده‌ها کمتر تحت تاثیر انتخاب قرار می‌گیرند و بهتر می‌توانند روابط فیلوژنی واقعی را نمایان سازند همچنین رسم درخت فیلوژنی ملاکی برای جداسازی جمعیت‌های خاص و تشخیص گونه‌های در معرض خطر انقراض است (Hall and Carlsbad 2011). روش‌های مبتنی بر ژنتیک مولکولی با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک، سریع و قابل اطمینان برای شناسایی و طبقه بندی گونه‌ها هستند و همچنین یکی از مؤثرترین ابزارها جهت برآورد تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک در نژادهای مختلف دام از جمله شتر محسوب می‌شود.

[1] Mitochondrial DNA (mtDNA)

از جمله مطالعات انجام شده روی شترهای ایران می‌توان به پژوهش Ghasemi Meymandi et al. (2015) اشاره نمود در این پژوهش تنوع ژنتیکی جمعیت شترهای یک کوهانه شمال استان کرمان با استفاده از پنج جفت نشانگر ریزماهواره‌ی مطالعه شد. نتایج نشان داد که جمعیت شترهای شمال استان کرمان تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی دارند که همین امر یکی از مهم‌ترین دلایل سازگاری آنها به تغییرات شدید محیطی کرمان است. تحقیق Shahabi and Thmorespour (2015) بر روی ژن‌های NADH3 وNADH4L ژنوم میتوکندری شتر دوکوهانه ایران نشان دادند توالیهای نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژن‌های NADH3 وNADH4L در شتر دوکوهانه ایرانی و دوکوهانه اهلی دارای فاصله ژنتیکی نزدیکی است و با Lama کمترین قرابت را دارند. در تحقیق Hedayat-Evrigh et al (2016, 2015) بر روی ژن میوستاتین و ناحیه D-loop میتوکندری شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی نشان دادند ناحیه D-loop میتوکندری در شترهای تک‌کوهانه به صورت چشمگیری تنوع بالاتری نسبت به این ناحیه در شترهای دوکوهانه دارد. Hemati et al (2017) به بررسی تنوع ژنتیکی بخشی از ژن سیتوکروم b و تعدادی از tRNA های اسیدهای آمینه شترهای دوکوهانه ایران پرداختند. از آنجاییکه مطالعه‌ای در ناحیه 12S rRNA این دام صورت نگرفته است و شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایران جزء دام‌های حائز اهمیت است ، لذا هدف این مطاله بررسی و تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی 12S rRNA ژنوم میتوکندری شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایران با سایر دام‌ها و گونه‌ها بود.

مواد و روش‌ها

نمونه خون به صورت تصادفی از ۱۰ نفر شتر تک‌کوهانه و ۱۰ نفر شتر دوکوهانه تهیه گردید و تا زمان استخراج در لوله‌های حاوی EDTA در دمای ۲۰- نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت Bioneer (کره جنوبی Cat NO. K3032) صورت گرفت. به منظور سنجش کیفیت DNA در محلول استخراج شده از الکتروفورز و برای تعیین کمیت DNA از دستگاه نانودارپ اسپکتوفوتومتر (THERMO ND-2000, USA) استفاده شد.

به منظور تکثیر ژن 12S rRNA میتوکندری شتر های تک‌کوهانه و دوکوهانه به طول ۶۱۳ و ۷۱۳، دو جفت آغازگر اختصاصی براساس توالی‌های مرجع ثبت شده برای شتر تک‌کوهانه با شماره دسترسی NCBI (NC_009849.1) و شتر دوکوهانه با شماره دسترسی (NC_009628.2) در بانک جهانی ژن (NCBI) و با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 طراحی شد (Lalitha 2000). آغازگرها به گونه‌ای طراحی شد که نواحی بالا دست و پایین دست ژن 12S rRNA را تکثیر کنند تا توالی کامل این ژن با صحت خوانش بالا، برای آنالیزهای بیوانفورماتیکی موجود باشد. توالی آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده در زیر آمده است.

Forward 1-5´- AGGCATCAAGCACACAGACCTGTAG - 3´

Reverse 1- 5´- AGCCCATTTCTTCCCAGACCA - 3´

Forward 2- 5´- GGTCAAGGTGTAACCGATGGG - 3´

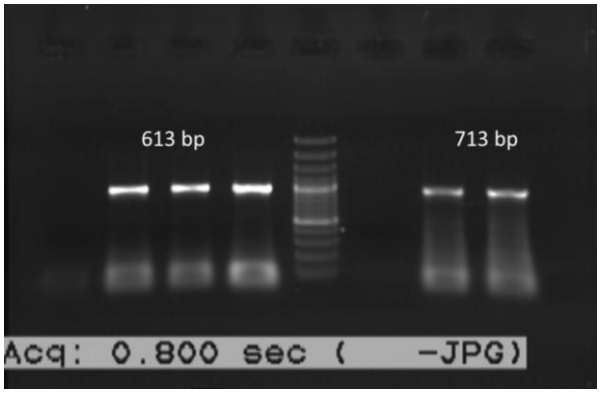
Reverse 2-5´- TGGACAACCAACTATCACCAGGC - 3´

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر کل ناحیه ژنی 12S rRNA از mtDNA با دو قطعه ۶۱۳ و ۷۱۳ جفت بازی توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal بر اساس روش استاندارد انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت مواد برابر بود با: 100mM Tris-HCL(PH 8.8)، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۰/۲mM از هر dNtp، ۱/۵mM 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 ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸/۵ به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵ سیکل تکثیر شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز یک درصد صورت گرفت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، خالص‌سازی شد و به منظور تعیین توالی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شد. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند.

به منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی گونه‌های شتر در پژوهش حاضر، ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده با استفاده از Chromas Lite 2.4 ویرایش و تبدیل به فرمت FASTA شدند (MacCarthy 2005) سپس توالی‌های حاصل از ۲۰ نمونه از لحاظ کیفیت توالی‌یابی برای هر باز توسط الگوریتم PHRED (Ewing and Green, 1998) مورد آنالیز قرار گرفت و کیفیت توالی‌یابی برای هر باز مشخص شد. توالی‌های با کیفیت پایین، بر اساس انتخاب بلندترین آستانه میانگین خطای کمتر از ۰/۱ درصد، از دو انتهای قطعات حذف شدند و پس از آن توالی دو قطعه سرهم شد و با استفاده از ابزار قدرتمند BLAST و رویه blastn و نرم‌افزار CLC Main workbench 5.5 میزان شباهت توالی‌های بدست آمده با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن با یکدیگر مقایسه شدند. این توالی‌ها به همراه ۲۰ توالی انتخاب شده از بانک جهانی ژن در یک فایل ادغام و همردیف سازی چندگانه با برنامه BioEdit 7 انجام شد (Hall and Carlsbad 2011). فایل‌های همردیف‌سازی شده حاصل از این برنامه به منظور ترسیم درخت فیلوژنتیکی از رویه NeighborJoining (NJ) با ۱۰۰۰ تکرار به کمک نرم افزار MEGA 6 (Tamura et al. 2013) و تعیین هاپلوتایپ‌ها با رویه Disparity Index Analysis نرم افزار MEGA6 انجام شد و فراسنجه های ژنتیک جمعیت مانند تنوع ژنتیکی مانند تعداد هاپلوتایپ (H)، تنوع هاپلوتایپ (Hd)، تعداد سایت‌های پلی‌مورف (S)، تنوع نوکلئوتیدی (π) و میانگین تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت (K) با استفاده از نرم افزار DnaSP 5 محاسبه گردید (Librado and Rozas 2009). جهت بررسی امکان وقوع نوترکیبی در ژن 12S rRNA میتوکندری بین گونه‌های شتر از رویه RecombinationParameter نرم افزار DnaSP 5 استفاده شد.

نتایج و بحث

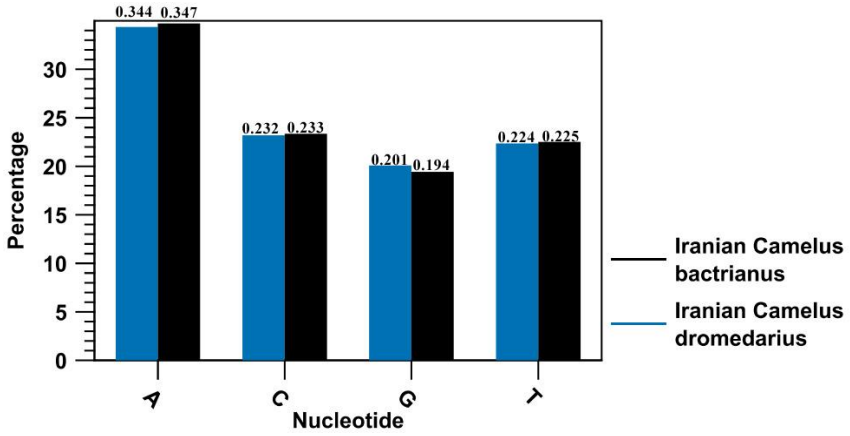
نتایج الکتروفورز و طیف سنجی نشان داد کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مناسب بود. همچنین الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاکی از آن بود که آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش به خوبی فعالیت نموده و توالی ژن 12S rRNA (۹۶۸ جفت باز) و نواحی بالا دست و پایین دست آن در مجموع با طول ۱۳۲۶ جفت باز در شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی به طور مناسب تکثیر شده بود (شکل ۱).



شکل ۱. تکثیر قطعات ژنی 12S rRNA شتر یک کوهانه و دوکوهانه ایرانی روی ژل آگارز

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of amplified gene fragments 12S rRNA gene in *camelus dromedaries* and *camelus bactrianus* of Iran

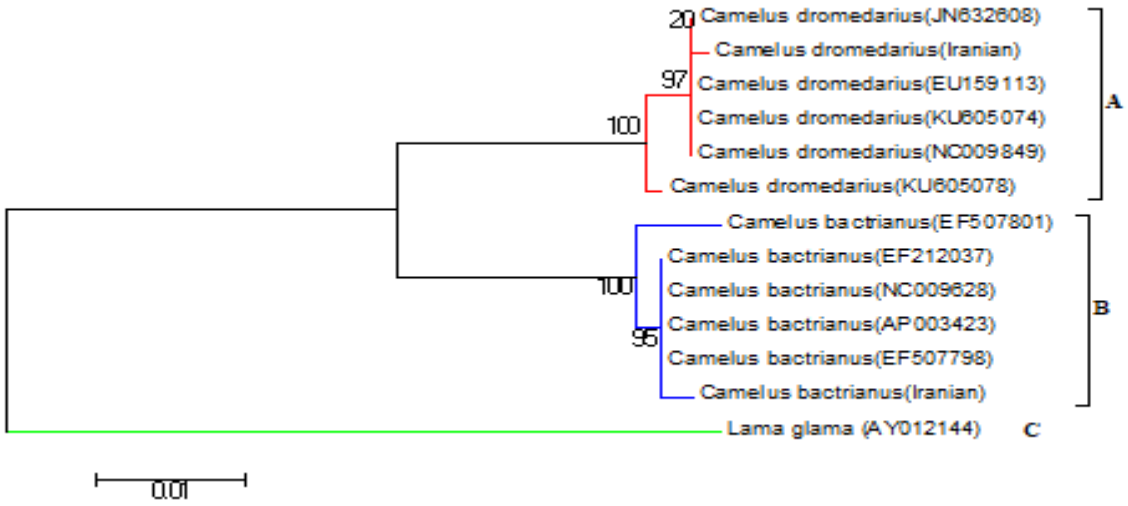
قطعه ۱۳۲۶ جفت بازی بدست آمده از توالی‌یابی، ویرایش و توالی کامل ژن 12S rRNA با ۹۶۸ جفت باز در آنالیزها مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه بین توالی‌ها وجود ۳ هاپلوتایپ در شترهای دوکوهانه و ۱ هاپلوتایپ در شترهای تک‌کوهانه در جمعیت مورد مطالعه را نشان داد که این هاپلوتایپ‌ها به ترتیب دارای دو و صفر جایگاه چند شکل (SNP) بودند. توالی ژن 12S rRNA ژنوم میتوکندری در تمام نمونه ها ۹۶۸ نوکلئوتید طول داشت. این نشان می‌دهد در توالی ژن 12S rRNA حذف یا اضافه شدن نوکلئوتید صورت نگرفته است. توالی نوکلئوتیدی بدست آمده از ژن 12S rRNA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و فراوانی بازها در شکل ۲ نمایش داده شده است. فراوانی A+T و G+C به ترتیب برای شترهای تک‌کوهانه ۰/۵۶۷ و ۰/۴۳۳ و برای شتر دوکوهانه ۰/۵۷۲ و ۰/۴۲۸ بود، که با توجه به این نتیجه می‌توان ادعا نمود هر دو گونه از ترکیب و فراوانی نوکلئوتیدی تقریباً مشابه و یکسانی برخوردار بودند.



شکل۲. ترکیب نوکلئوتیدی ژن 12S rRNA میتوکندری در شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایران

Figure 2. Nucleotide composition 12S rRNA gene in *camelus dromedaries* and *camelus bactrianus* of Iran

ترسیم درخت فیلوژنتیکی منجر به تفکیک گونه‌های شتر در ۳ گروه (A,B,C) و تبارزایی با بوت استرپ بالا شد که گروه A شترهای تک‌کوهانه و گروه B شترهای دوکوهانه و گروه C مربوط به گونه Lama است که به عنوان Outgroup در نظر گرفته شد (شکل ۳). نتایج درخت فیلوژنتیکی نشان داد واگرایی ژنتیکی بالا است و منشا گونه‌های شتر از یکدیگر جدا می‌باشد. روابط ژنتیکی نزدیک میان شترهای تک‌کوهانه با یکدیگر و شترهای دوکوهانه با یکدیگر ممکن است به دلیل جریان ژنی و یا منشأ مشترک آنها و حتی شرایط زیستگاهی مشابه باشد. همچنین تفکیک گونه‌ها در درخت فیلوژنتیکی بیانگر این است شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی از نظر قرابت ژنتیکی، در خانواده شترسانان کمترین فاصله ژنتیکی را با گونه‌های اهلی شتر دارد همچنین کمترین درصد تشابه و بیشترین فاصله ژنتیکی را با گونه Lama شتر دوکوهانه وحشی دارد. این نتایج با نتایج تحقیق سوی و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد (Cui et al. 2007). آنها با استفاده از نتایج تجزیه و تحلیل توالی ژنوم میتوکندری گزارش کردند که دو گونه شتر دوکوهانه وحشی و Lama حدود ۲۵ میلیون سال پیش از یک جد مشترک جدا شده‌اند. منشا اصلی شتر دو کوهانه اهلی و وحشی در شمال آمریکا رخ داده است و شترهای اهلی و وحشی دارای منشأ جدا از هم می‌باشند (Zhao et al. 2013). نتایج تخمین تنوع ژنتیکی با استفاده از پارامترهای ژنتیکی و نرم افزار DnaSP 5 در جدول ۱ نشان داده شده است.



شکل ۳. درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ژن 12S rRNA شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی و دیگر گونه‌های شتر موجود در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آنها

Figure 3. Phylogenetic tree between Bactrian camel and dromedary camels and other camel species in World Bank Gene with their access code based on 12S rRNA gene

جدول ۱. پارامترهای اساسی تنوع ژنتیکی مربوط به ژن 12S rRNA میتوکندری شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه

Table 1. Parameters of genetic diversity related to the 12S rRNA mitochondrial gene of Bactrian camel and dromedary camels

Genetic Diversity Parameters						پارامترهای تنوع ژنتیکی
K	**Π**	**H_d**	**H**	**S**	**N**	Population جمعیت
0.667	0.0006	0.6	3	2	10	شتر دو کوهانه ایران Bactrian camels of Iran
0	0	0	1	0	10	شتر تک کوهانه ایران dromedary camels of Iran
3.198	0.003	0.868	8	10	18	مجموع شترهای دوکوهانه Total Bactrian camels
0.9	0.0009	0.492	3	5	22	مجموع شتر تک کوهانه Total dromedary camels

تعداد سایت‌های نوکلئوتیدی پلی مورف (S)، تعداد هاپلوتایپ (H)، هتروزایگوسیتی (H_d)، تنوع نوکلئوتیدی (π)، میانگین تعداد نوکلئوتیدهای متفاوت (K).

تنوع نوکلئوتیدی در شترهای دوکوهانه و تک‌کوهانه ایرانی به ترتیب ۰ و ۰/۰۰۰۶ تخمین زده شد که این تنوع نوکلئوتیدی در محدوده موجودات یوکاریوت است (Nei and Kumar 2000). شترهای دوکوهانه ایرانی در مقایسه با شترهای تک‌کوهانه ایرانی بیشترین تنوع را نشان دادند در حالی‌که در بین توالی‌های نوکلئوتیدی نمونه های شتر تک‌کوهانه مورد مطالعه در این تحقیق تفاوت نوکلئوتیدی گزارش نشد. بالا بودن تنوع ژنتیکی در شترهای دوکوهانه ایرانی نسبت به شترهای تک‌کوهانه ایرانی نشان می‌دهد که این گونه احتمالا قدمت تکاملی طولانی‌تری داشته است چرا که تنوع ژنتیکی بالا جهت انتخاب طبیعی بیشتر مطلوب می‌باشد. جدایی جغرافیایی مهم ترین عامل شکل گیری ساختار ژنتیکی است که مسبب بوجود آوردن جمعیت های جدا در یک گونه می شود. مراحل اولیه گونه زایی نیز ایجاد جمعیت های جدا از هم بوده که بواسطه جدایی تولید مثلی ایجاد می شود (Quinta et al. 2004). همچنین در مقایسه نمونه‌های توالی‌یابی شده در این پژوهش و توالی‌های بانک جهانی ژن شترهای دوکوهانه میزان هتروزایگوسیتی بالاتری (۰/۶) نشان دادند که این نتایج در راستای نتایج بررسی پارامترهای ژنتیکی برای گونه‌های ایرانی می‌باشد. Hemati et al (2017) به منظور بررسی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی و فراوانی‌های هاپلوتایپی حاصل از آنها در یک ناحیه با چندشکلی بالا شامل بخشی از سیتوکروم b و ناحیه کنترل روی ژنوم میتوکندریایی در درون جمعیت شتر دوکوهانه استان اردبیل گزارش کردند که از مجموع ۳۷ نمونه توالی شتر دوکوهانه هم ردیفی شده پس از کنترل کیفیت و ویرایش توالی‌ها، تعداد ۵ چندشکلی تک نوکلئوتیدی وجود دارد که با توجه به نزدیکی موقعیت این چندشکلی ها روی توالی ۳ هاپلوتایپ شناسایی شده است و میزان هتروزیگوسیتی را در جامعه مورد مطالعه ۰/۵ گزارش کردند که علیرغم اندازه بسیار کوچک جمعیت شتر دوکوهانه کشور، نسبتاً مطلوب است و حاکی از تنوع ژنتیکی مناسب و مطلوب در جمعیت بسیار کاهش یافته این گونه است. قاسمی میمندی و همکاران (۲۰۱۵) نیز هتروزایگوسیتی مشابهی را با استفاده از پنج جایگاه ریزماهواره ای بین ۰/۷ تا ۰/۹ گزارش نموده‌اند. آنها این امر را یک مزیت مناسب برای بازسازی و کمک به حفاظت این ذخیره ژنتیکی در کشور بر شمرده‌اند. نتایج مطالعه اخیر بر این دلالت دارد که ژن 12S rRNA غیر کدکننده در ژنوم میتوکندری می‌باشد و نسبت به ژن ناحیه کنترل میزان جهش و تنوع کمتری دارد (Eyre-walker and Awadalla 2001). نتایج آنالیز نوترکیبی نشان داد هیچ جایگاه نوترکیبی در توالی ژن مورد مطالعه وجود نداشت که این به منزله عدم نوترکیبی است چرا که ژنوم میتوکندری پستانداران بدون هیچ گونه تغییری از مادر به فرزند منتقل می‌شود. همچنین، عدم نوترکیبی در ژنوم میتوکندری و توارث تک والدی و هاپلوئید بودن ژنوم که منجر به کاهش قابل توجه اندازه ژنوم میتوکندری در مقایسه با ژنوم هسته‌ای می‌شود (Bellagamba et al. 2001) نمونه‌برداری در مقیاس جغرافیای کوچک و تعداد اندک نمونه نیز می‌تواند از دلایل احتمالی وجود تنوع کم یا عدم تنوع در جمعیت‌های مورد مطالعه باشد (Beaumont and Hoare 2003). توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده از ژن 12S rRNA با طول ۹۶۸ جفت باز برای شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی برای اولین بار در بانک جهانی ژن با کدهای دسترسی KX554925-KX554934 ثبت شدند. با توجه به یافته‌های این تحقیق انجام مطالعات بیشتر با استفاده از تعداد نمونه بیشتر، ژن های مناسب و موثر در مهاجرت و روش‌های دیگر مانند AFLP و ریزماهواره

ضروری به نظر می‌رسد. این اطلاعات می‌تواند در بهره برداری و بازسازی احتمالی ذخایر این گونه در سال‌های آینده، مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که مشابهت زیادی بین توالی به‌دست آمده از ناحیه ژنی مورد مطالعه برای شترهای ایرانی با توالی‌های مرجع ثبت شده از آنها در پایگاه NCBI وجود دارد. که این نزدیکی ممکن است به علت تشابه ژنتیکی شترهای ایران از طریق مشابهت اجدادی به این نژادها باشد. توصیف ژنتیکی و تنوع زیستی بین نژادهای مختلف این امکان را به وجود می‌آورد که طی برنامه های صحیح مدیریتی و اصلاح نژادی از انقراض ذخایر ژنتیکی با ارزش کشور هرچه سریع‌تر جلوگیری به عمل آید.

منابع

رودباری زهرا، نصیری خدیجه (۱۳۹۸) بررسی تنوع ژنتیکی و اثر انتخاب ژن های RNA ریبوزومی و ناقل در ژنوم میتوکندری شترهای تک کوهانه و دو کوهانه. فصلنامه محیط زیست جانوری ۱۱ (۱)، ۱۱۰-۱۰۵.

شهابی امین، طهمورث پور مجتبی (۱۳۹۴) تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی ژن های NADH3 وNADH4L ژنوم میتوکندری شتر دو کوهانه ایران. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۷ (۳) ۱۷۴-۱۶۳.

صمدیان فرهاد، دارفرین هوشنگ، قادری زفره‌ای مصطفی، ترابی آزاده، شریعت مریم (۱۳۹۸) آنالیز فیلوژنتیکی ناحیه سیتوکروم B ژنوم میتوکندری چند نژاد بز بومی ایران. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱ (۴)، ۳۴-۱۹.

قاسمی میمندی مهرداد، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، منتظری مهدیه (۱۳۹۵) بررسی انتساب افراد به جمعیت‌هایی از شترهای شمال استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. فصلنامه علمی ژنتیک نوین ۱۱ (۳)، ۳۲۹-۳۳۵.

قاسمی مهرداد، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده علی (۱۳۹۴) تنوع ژنتیکی شترهای شمال استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. مجله تحقیقات تولیدات دامی ۴ (۱)، ۴۵-۳۵.

قاسمی میمندی مهرداد، محمدآبادی محمدرضا، منتظری مهدیه (۱۳۹۵) ارزیابی ساختار ژنتیکی شتر با استفاده از روش های PCA و خوشه بندی سلسله مراتبی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۸ (۳)، ۸۳-۹۶.

محمدآبادی محمدرضا، قاسمی میمندی مهرداد، منتظری مهدیه (۱۳۹۷) بررسی تنوع ژنتیکی شترهای بومی شمال استان کرمان با استفاده از آمارهF. نشریه اصلاح و بهنژادی دام ۱(۲)، ۱۳-۱.

هدایت ایوریق نعمت، واحدی وحید، سیدشریفی رضا، آزاده بوستان (۱۳۹۵) توالی یابی و شناسایی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی بخشی از ژن میوستاتین در شترهای تک کوهانه و دوکوهانه. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۸ (۳) ۱۳۵-۱۲۰.

همتی بهزاد، بناءبازی محمدحسین، شاه کرمی سعید، مهندسان المیرا، برگر پاملا (۱۳۹۶) بررسی تنوع ژنتیکی در میان شترهای دو کوهانه استان اردبیل. پژوهشهای تولیدات دامی، ۸ (۱۶)۱۹۷-۱۹۲.

References

Al-Swailem AM, Al-Busadah KA, Shehata M et al. (2007) Classification of Saudi Arabian camel (*Camelus dromedarius*) subtypes based on RAPD technique. J Food Agric Environ 5, 143–148.

Al Ghumlas AK, Abdel Gader AG, Hussein MF, Al Haidary A, White JG (2008) Effects of heat on camel platelet structure and function-a comparative study with humans. Platelets 19, 163-71.

Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi M, Nezamabadipour H (2016) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. Czech J Anim Sci 61, 487.

Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Rafeied F, Imumorin IG (2019) Whole genome comparative analysis of CpG islands in camelid and other mammalian genomes. Mamm Biol 98, 73-79.

Bellagamba F, Moretti V, Comincini S, Valfare F (2001) Identification of species in animal Feedstuffs by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of Mitochondrial DNA. J Agric Food Chem 49, 3775-3781.

Cui P, Ji R, Ding R et al. (2007) A complete mitochondrial genome sequence of the wild two-humped camel (Camelus bactrianus ferus): an evolutionary history of camelidae. BMC Genomics 8, 241.

Eltanany M, Elfaroug O, Sidahmed S, Distl O (2015) Assessment of genetic diversity and differentiation of two major camel ecotypes (Camelus dromedarius) in Sudan using microsatellite markers. Arch Anim Breed 58, 269–275.

Ewing B, Green P (1998) Based-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred.II. Error Probabilities. Genome Res 8, 186-194.

Eyre-walker A, Awadalla P (2001) Does human mtDNA recombine. J Mol Evol 53, 430-435.

Ghasemi Meymandi, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh A (2015) Genetic variation of camels in the North of Kerman province using microsatellite markers. Anim Prod Sci 4, 35-45 (In Persian).

Ghasemi Meymandi M, Mohammadabadi MR, Montazeri M (2016) Analysing Genetic Structure of Camelus dromedarius Using PCA and Hierarchical clustering methods. Agric Biotechnol J 3, 83-96 (In Persian).

Ghasemi Meymandi M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh Kashkoieh A, Montazeri M (2016) Investigation of individuals' attribution to populations of camels in the north of Kerman province using microsatellite markers. 3, 329-335 (In Persian).

Hall TA, Carlsbad C (2011) BioEdit: An important software for molecular biology. Chem Pharm Bull Chemical 2, 60-61.

Hemati B, Banabazi MH, Shahkarami S ,Mohandesan E, Burger P (2017) Genetic Diversity within Bactrian Camel Population of Ardebil Province. Anim Prod Sci 8, 192-197 (In Persian).

Hedayat-Evrigh N, Vahedi V, Sharifi SR, Boustan A (2016) Sequencing and identification of single nucleotide polymorphisms of Partial myostatin gene in dromedary and Bactrian camels. Agric Biotechnol J 8, 120-135 (In Persian).

Hoter A, Rizk S, Naim HY (2019) Cellular and Molecular Adaptation of Arabian Camel to Heat Stress.Front Genet 10, 588-599.

Lalitha S (2000) Primer premier 5. Biotech Software & Internet Report: The Computer Software. J. Softw 1, 270-272.

Librado P. Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. J. Bioinform 25, 1451-1452.

McCarthy C (2005). Chromas, pp. Technelysium Pty Ltd

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

Samadian F, Darfarin H, Ghaderi zefrehi M, Torabi A, Shariat M (2020) Phylogenetic Analysis of Cytochrome B of Mitochondrial Genome in some Iranian Goat Breeds. Agric Biotechnol J 11, 19-34 (In Persian).

Shahabi A, Tahmorespour M (2015) Bioinformatics and Phylogenetic Analysis of NADH3 and NADH4L mitochondrial genes in Iranian Camelus bactrianus. Agric Biotechnol J 7, 163-174 (In Persian).

Tamura K, Stecher D, Peterson A et al. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol Biol Evol 12, 2725-2729.

Quinta R, Gomes L, Santos ATD (2004). A mitochondrial DNA PCR – RFLP marker for population studies of the black Scabbard fish (Aphanopus carbo). J Mar Sci 61, 864 – 867.

Othman E, Heba AM, El-KaderSally A et al. (2017) Cytochrome b conservation between six camel breeds reared in Egypt. J Gen Eng Biotech 15, 1-6.

Ouajd S, Kamel B (2009) Physiological particularities of dromedary (Camelus dromedarius) and experimental implications. Scand J Lab Anim Sci 36, 19–29.

Rodbari Z, Nasiri, K (2019) Study of Genetic diversity and selection effect on ribosomal RNA and transfer RNA genes in the mitochondrial genome of one humped camel and two-humped camel. J Anim Environ Sci 11, 105-110.

Warda M, Prince A, Kim HK et al. (2014) Proteomics of old world camelid (Camelus dromedarius): Better understanding the interplay between homeostasis and desert environment. J Adv Res 5, 219-42.

Yang L, Tan Z, Wang D et al (2014) Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. J Sci. Rep 4, 4089

Zhao E, Yu Q, Zhang N, Kong D, Zhao Y (2013) Mitochondrial DNA diversity and the origin of Chinese indigenous sheep. J Tropic Anim Prod 45, 1715-1722.