مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

ارزیابی ساختار ژنتیکی شتر با استفاده از روش‌های PCA و خوشه‌بندی سلسله مراتبی

مهرداد قاسمی میمندی*[۱]، محمدرضا محمدآبادی[۲]، مهدیه منتظری[۳و٤]

[۱] دانش اموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان
[۲] استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.
[۳] دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
[٤]انجمن پژوهشگران جوان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۲٦، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۹

چکیده

الگوهای حاصل از داده‌های مولکولی می‌توانند جهت شناسایی ارتباط میان جمعیت‌های یک گونه به کار گرفته شوند. در ایران، شتر به عنوان یکی از منابع مهم جهت تامین شیر، گوشت و الیاف کاربرد گسترده‌ای دارد. با استفاده از ۸ جفت نشانگر ریزماهواره (YWLL08، VOLP03، VOLP08، YWLL38، CVR01، YWLL44، VOLP32 و VOLP67) ساختار و فاصله ژنتیکی جمعیت ۸۱ نفره شتر، ارزیابی گردید. با استفاده از روش نمکی بهینه یافته، DNA ژنومی شترها استخراج و تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با موفقیت انجام شد و فرآورده‌های حاصل روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸٪ واسرشته‌ساز الکتروفورز شدند. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت شهربابک و صحرای جهاد (۰/۵٦) و کمترین آن بین دو جمعیت رفسنجان (۰/۱۱) مشاهده گردید. نتایج PCA به بهترین شکل تعداد گروه‌های ژنتیکی موجود در مجموعه داده‌ها را توجیه کرد و نشان داد که کل نمونه‌ها به ۳ مولفه اصلی تفکیک شدند. هم‌چنین نتایج خوشه‌بندی سلسله مراتبی نشان داد که در اولین سطح خوشه‌بندی، جمعیت‌های شهربابک، رفسنجان ۱ و رفسنجان ۲ در خوشه مشترکی قرار دارند و جمعیت شمشیرآباد خوشه متمایز دیگری را به خود اختصاص داده است، در حالی‌که جمعیت صحرای جهاد در یک خوشه کاملا مستقل قرار گرفته است. در کل نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده مطابقت خوشه‌بندی ژنتیکی جمعیت‌ها با فواصل جغرافیایی آنهاست.

واژه‌های کلیدی: *شتر، تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی، خوشه‌بندی سلسله مراتبی، فاصله ژنتیکی.*

*نویسنده مسئول: مهرداد قاسمی میمندی تلفن: ۰۳٤۳٤۱۱٦٤٦۷ Email: m.ghasemimeymandy@mail.com

مقدمه

شترها یکی از شگفت انگیزترین انواع پستانداران در جهان محسوب می‌شوند که قابلیت فوق العاده آن‌ها در تطبیق یافتن با شرایط دشوار آب و هوائی، مقاومت بسیار زیاد آن‌ها در برابر بی آبی، توانائی حمل بار و طی کردن مسیرهای طولانی، سبب شده است که انسان از دیرباز از این جانوران در راستای اهداف خود استفاده کند. با توجه به شرایط جغرافیایی حاکم بر بخش زیادی از ایران، شتر ذخیره ژنتیکی منحصر به فردی برای کشور ایران محسوب می‌گردد (Ansari-Renani *et al*., 2010; Barazandeh, 2016; Barazandeh *et al*., 2016a; Barazandeh *et al*., 2016b). همچنین محصولات شتر جزء محصولات ارگانیک بوده و به عنوان غذاهای فراسودمند با رویکرد دارویی محسوب می شوند. از طرفی شتر دارای ویژگی های منحصر به فردی از جمله ذخیره انرژی در کوهان به صورت چربی، متغیر بودن دمای بدن در طول روز، دوبرابر بودن گلوکز خون نسبت به نشخوارکنندگان، ۸ برابر بودن نمک رژیم غذایی نسبت به گوسفند وگاو و دارا بودن آنتی بادی زنجیره سنگین (HCAbs) منحصر به فرد است که منجر به تحمل و بقا شتر در شرایط سخت صحرا و دماهای گوناگون و به‌ویژه گرمای شدید تابستان و کمبود آب و علوفه می‌گردد. بنابراین، می‌توان گفت که شتر کشتی بیابان‌هاست و قوی‌ترین، کم خرج‌ترین، پرفایده‌ترین، آرام‌ترین و بردبارترین حیوان است (Barazandeh, 2016; Barazandeh *et al*., 2016a; Barazandeh *et al*., 2016b). با توجه به موارد ذکر شده در مورد شتر و ویژگی‌های آن تحقیق و پژوهش بر روی این حیوان ممکن است منجر به بهبود و استفاده بهینه از تولیدات آن گردیده و همچنین باعث شناسایی سازوکارهایی گردد که می‌تواند در درمان بیماری‌ها و بهبود سلامت در انسان گردند (Barazandeh, 2016). کاهش تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شتر و یکسان شدن خزانه ژنی آنان می‌تواند در آینده سبب بروز برخی مشکلات غیر قابل پیش‌بینی گردد، چرا که امکان پیش‌بینی نیازهای آتی بشر به نوع فراورده‌های دامی دشوار بوده و از طرفی کاهش تنوع ژنتیکی، مقاومت این حیوانات به بیماری‌ها را نیز کاسته و بیش از پیش آنها را در معرض انقراض قرار می‌دهد (Jianlin, 2000). با توجه به موارد مذکور، حفظ حداکثر تنوع ژنتیکی دام‌ها ضرورت داشته و لازمه آن انجام مطالعات مستمر ژنتیکی خصوصاً در سطح مولکولی می‌باشد. ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیتی علاوه بر اینکه سهم عمده‌ای در بدست آوردن عناصر مورد نیاز برای حمایت از برنامه-های حفاظت نژادی دارد، برای بهبود برنامه‌های اصلاح نژادی نیز نقش مشابه ایفا می‌نماید (Shahkarami *et al*., 2012).

همزمان با وقوع تغییرات گسترده در شرایط آب و هوایی زمین، لزوم تغییر نگرش در برنامه‌های اصلاح نژادی دام‌های اهلی بیشتر احساس می‌شود (Herrero-Medrano *et al*., 2013). شناسایی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها گامی مهم در

جهت توسعه برنامه‌های حفاظتی و مدیریت پایدار منابع ژنتیکی محسوب می‌شود (Groeneveld *et al*., 2010). استفاده از ژنتیک ملکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (Mousavizadeh *et al*., 2009)، همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به طور مهیجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (Javanmard *et al*., 2008). شرح کامل تفاوت ژنتیکی داخل هر نژاد امکان پذیر نیست، اما معیارهای فاصله ژنتیکی بهترین شرح در دسترس برای بیان تفاوت ژنتیکی آنها می‌باشند (Tavakoliyan, 1999). در طول دهه‌های اخیر به‌کارگیری روش‌های مبتنی بر ژنتیک جمعیت و آمار منجر به توسعه حیواناتی با بازده بالا شده است و ترکیب این روش‌ها با علوم جدیدی همچون نشانگرهای ریزماهواره، پیشرفت‌های شگرفی را در اصلاح نژاد دام‌های اهلی پدید آورده است (Barker, 1994; Jianlin, 2000; Abdussamad *et al*., 2015; Schulz *et al*., 2010; Montazeri *et al*., 2016).

انجمن بین المللی ژنتیک حیوانی[1] ریزماهواره ها را به عنوان بهترین نشانگر جهت تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های حیوانی معرفی کرده است (Mohammadifar and Mohammadabadi, 2011). بر اساس بررسی-های ثبت شده توسط FAO، ٦٦ درصد کل مطالعات تعیین فاصله ژنتیکی با استفاده از ریزماهواره‌ها انجام گرفته است و ۷۰ درصد پژوهشگران ریزماهواره‌ها را انتخاب کرده‌اند (Mohammadifar and Mohammadabadi, 2011).

تحلیل خوشه‌ای را نه تنها می‌توان برای شناسایی ساختاری که در داده‌ها وجود دارد به کار گرفت، بلکه می‌توان از آن برای تفکیک مناسب یک مجموعه داده که اطلاعات کمی در مورد آنها وجود دارد، نیز استفاده نمود. رویکردهای بسیار زیادی برای خوشه‌بندی در منابع علمی معتبر گزارش شده است که به ویژه روش‌های خوشه‌بندی جزء به جزء را می‌توان به دو دسته‌ی متفاوت رویکردهای پارامتری و ناپارامتری تقسیم نمود. روش‌های پارامتری خود به دو دسته روش‌های مبتنی بر مدل (مانند STRUCTURE) و روش‌های مبتنی بر فاصله (مانند PCA[2] و سلسله مراتبی) تقسیم می‌شوند. روش‌هایی از قبیل فواصل ژنتیکی، درخت فیلوژنتیک و روش تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA)، به وضوح تمایز جمعیت‌های مورد بررسی را مطابق با منشاء تاریخی آنها نشان می-دهند (Edea *et al*., 2013). به منظور گروه‌بندی ۱۵۲ شتر عربستان سعودی بر اساس خصوصیات بدنی‌اشان، از روش خوشه‌بندی سلسله مراتبی استفاده شد (Abdallah *et al*., 2012). در مطالعه‌ای دیگر برای بررسی رابطه‌ی بین نژادها از روش‌های PCA و STRUCTURE و برای

[1] International society for animal genetics

[2] Principal component analysis

تشخیص خرده ساختارهای احتمالی جمعیتی آماره F_{ST} استفاده شد. محققین توانستند با این روش‌ها حیوانات مهاجر و یا دارای اختلاط ژنتیکی را تعیین نمایند (Kijas et al., 2009).

مطالعه وضعیت اکولوژیکی و تکاملی جمعیت‌های شتر بومی به دلیل توزیع جغرافیایی غیرتصادفی آنها نیازمند شناخت صحیح ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها است. به طور کلی، مطالعاتی که در جهت درک بهتر ساختار ژنتیکی جمعیت موجود شترهای بومی انجام گیرند، می‌توانند در تدوین راهکار مناسب‌تر برای حفظ و نجات آنها کمک نمایند. بررسی فواصل ژنتیکی بین گروه‌ها و زیرگروه‌ها می‌تواند امکان مطالعات بعدی بر روی این جمعیت‌ها را آسان و گسترده‌تر نماید تا تصویری از فاصله و ارتباط تکاملی این گونه با ارزش ایرانی بدست آید و به عنوان راهنمایی برای تصمیم‌گیری‌های حفاظتی آینده مورد استفاده قرار گیرد. در همین راستا، هدف این پژوهش بررسی فاصله و تعیین ساختار ژنتیکی پنج جمعیت از شترهای یک کوهانه شمال استان کرمان بر اساس استفاده از روش‌های PCA و خوشه‌بندی سلسله مراتبی بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر، از سیاهرگ وداج ۸۱ نفر از شترهای یک کوهانه شمال استان کرمان خون گیری بعمل آمد. نمونه‌های خون به صورت کاملا تصادفی از ۵ ناحیه و سه شهرستان جمع‌آوری گردید (جدول ۱). در تقسیم‌بندی جمعیت‌ها به معیارهایی از قبیل پراکندگی جغرافیایی و تنوع فنوتیپی افراد (رنگ بدن، پوشش بدن و جثه) دقت شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی (Miller *et al.*, 1988) انجام گرفت و سپس کیفیت DNA نمونه‌ها بررسی شد. در این مطالعه ۸ جایگاه ریزماهواره (VOLP03, YWLL0 VOLP08, YWLL38, CVRL01, VOLP32, YWLL44, VOLP67) بر اساس مطالعات مشابه قبلی انتخاب گردید (Lang *et al.*, 1996; Obreque *et al.*, 1998; Sasse *et al.*, 2000). در انتخاب جایگاه‌ها به ویژگی‌هایی از قبیل هتروزایگوسیتی و چند شکلی بالا بر اساس تعداد آلل‌ها و پراکندگی متعدد ژنومی دقت شد.

جدول ۱- تعداد نمونه‌های استفاده شده در جمعیت‌های مورد بررسی.

Table 1- Number of samples used in the studied populations.

شهرستان (City)	راور Ravar	راور Ravar	شهربابک Shahr-e Babak	رفسنجان Rafsanjan	رفسنجان Rafsanjan
ناحیه (Area)	صحرای جهاد Sahra-e Jahad	شمشیرآباد Shamshir Abad	رباط Robat	نوق Nogh	شمس آباد Shams Abad
تعداد نمونه (Number of samples)	7	14	21	11	28

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر طی ۳۵ سیکل انجام شد که برای هر جایگاه شامل DNA، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR (1x)، ۰/۳۷ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۳ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر و ۰/۱۶ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز بود. صحت انجام PCR با بررسی وجود محصولات تکثیر در ژل آگارز یک درصد صورت گرفت. سپس الکتروفورز عمودی ژل آکریلامید ۸ درصد واسرشته ساز با ولتاژ ۲۰۰ تا ۲۵۰ به مدت ۱۲ ساعت انجام شد و رنگ آمیزی ژل‌ها به روش نیترات نقره صورت گرفت.

برای بدست آوردن اندازه آلل‌ها از نرم‌افزار فتوشاپ و جهت تعیین انواع آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها از نشانگر اندازه و نرم افزار Excel استفاده گردید. تکنیک آماری PCA، روشی از آنالیزهای چند متغیره آماری است که تعداد کمتری از عوامل را بنام مولفه‌های اصلی از میان عوامل اولیه گزینش می‌کند، به طوری که تعدادی از اطلاعات کم اهمیت حذف می‌شوند (Truxillo & Hamer, 2007). یکی از کاربردهای عمده این روش در مبحث ژنومی یافتن ساختار ارتباطی بین متغیرها است که در حقیقت همان کلاستربندی متغیرها می‌باشد. در این تحقیق، آنالیز PCA با استفاده از دستور prcomp در محیط R صورت گرفت (R Core Team, 2015). در این مطالعه با استفاده از نرم افزار PopGen32 (Yeh et al., 1999)، ماتریس فواصل ژنتیکی برای معیار فاصله ژنتیکی مورد استفاده، یعنی فاصله ژنتیکی استاندارد Nei (DS و DA) با ۱۰۰۰ بار خود راه‌اندازی تشکیل گردید (Nei, 1972).

در بین روش‌های خوشه‌بندی، روش خوشه-بندی سلسله مراتبی[1] به دلیل نحوه نمایش و قرار دادن تک تک عناصر در خوشه‌ها به عنوان یکی از رایج‌ترین روش‌ها معرفی می‌گردد (Gershon, 2002). در واقع این روش با یک ساختار شبیه تنه درخت آغاز می‌شود و مجاورین صحیح را با

[1] Hierarchical

حداقل کردن مجموع طول همه شاخه‌ها می‌یابد. به منظور کمک به تفسیر نتایج ساختار ژنتیکی، نمودار خوشه‌بندی سلسله مراتبی نیز برای بررسی تشابه ژنتیکی افراد مختلف رسم شد. به این صورت که ماتریس متشکل از فاصله جفتی اقلیدسی بین وضعیت ژنوتیپی افراد مختلف با استفاده از معیار Ward محاسبه شد (Ward, 1963). سپس این ماتریس فاصله به عنوان ورودی به برنامه R داده شد و با استفاده از تابع hclust عمل خوشه‌بندی انجام گرفت (R Core Team, 2014). در هر تکرار از الگوریتم خوشه‌بندی، دو کلاستر که بیشترین تشابه را با هم داشتند در یک گروه قرار گرفتند. فواصل بین این خوشه‌های دوتایی جدید و خوشه‌های قدیمی به وسیله معیار Ward محاسبه شد (فرمول ۱).

فرمول ۱

$$Euc.Dist = \sqrt{\sum_{i=1}(a_i - b_i)^2}$$

که در آن، a و b عناصر متناظر ماتریس خویشاوندی ژنتیکی بین افراد می‌باشند.

نتایج و بحث

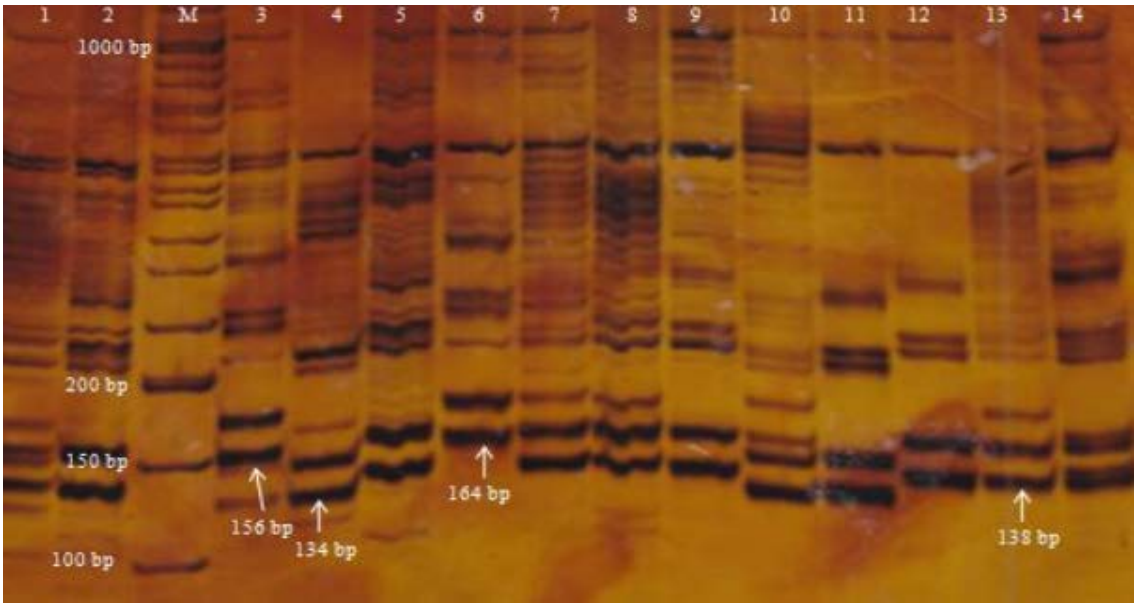
پس از بهینه سازی شرایط و انجام واکنش‌های PCR، تمامی جایگاه‌ها به خوبی تکثیر شدند و چند شکلی خوبی نشان دادند (شکل ۱). با توجه به نتایج موجود در جدول ۲، در جمعیت صحرای جهاد جایگاه‌های CVR01، VOLP08، VOLP32، YWLL08، YWLL44 و VOLP67، جمعیت شمشیر آباد جایگاه‌های YWLL08 و VOLP32، جمعیت شهربابک جایگاه‌های YWLL44 و VOLP32 و در جمعیت رفسنجان ۱ جایگاه‌های VOLP32، VOLP08، YWLL08 و YWLL44 انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی–واینبرگ نشان دادند ($P<0.05$).

در مطالعه‌ای که بر روی چهار نژاد شتر هند (بی‌کانر، جی سامری، کاتچی و می واری) با ۲۳ جایگاه ریزماهواره (CMS121, CMS13, CMS58, CMS50, CMS16, LCA18, LCA63, LCA90, LCA66, VOLP08, VOLP10, VOLP67, CVRL04, CVRL05, CVRL01, CVRL06, CVRL02, CVRL07, CVRL08, YWLL44, YWLL09, YWLL08, YWLL38) انجام شد، مشخص گردید که ۱۱ جایگاه در نژاد بی‌کانری، ۵ جایگاه در نژاد جی سامری، ٦ جایگاه در نژاد کاتچی و ٦ جایگاه در نژاد می واری در جمعیت‌های مورد بررسی انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی–وینبرگ نشان دادند (Vijh *et al.*, 2007). انحراف از تعادل هاردی–وینبرگ را می‌توان به علت عدم کنترل ورود و خروج مواد ژنتیکی در بین جمعیت‌ها، کم شدن حیوانات بومی این منطقه، ناکافی بودن تعداد نمونه‌ها و خطای نمونه‌برداری دانست (Chauhan *et al.*, 2007).

جدول ۲- مقادیر P-value برای جایگاه‌های انتخاب شده مربوط به کل جمعیت‌های مورد بررسی.

Table 2- P values of Kerman's camel populations across all loci.

رفسنجان ۲	رفسنجان ۱	شهربابک	شمشیر آباد	صحرای جهاد	جمعیت
Rafsanja2	Rafsanjan1	Shahr-e Babak	Shamshir Abad	Sahra-e Jahad	Population
0.019	0.061	0.000	0.001	0.465	VOLP08
0.000	0.006	0.000	0.001	0.497	CVR01
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	YWLL38
0.000	0.026	0.005	0.000	0.004	VOLP03
0.000	0.536	0.000	0.090	0.504	YWLL08
0.000	0.273	0.097	0.036	0.697	YWLL44
0.000	0.031	0.000	0.007	0.223	VOLP67
0.014	0.124	0.064	0.114	0.423	VOLP32



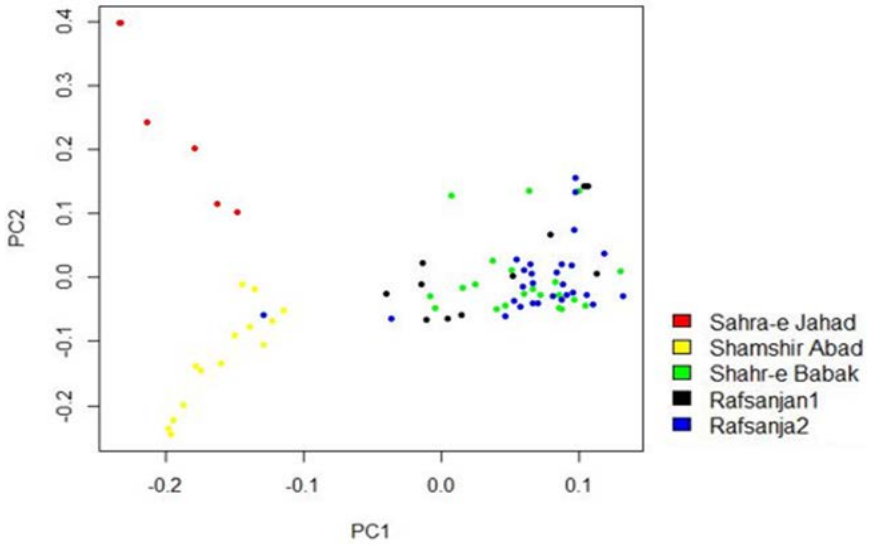
شکل ۱- نمونه‌ای از نتایج تکثیر جایگاه YWLL08 در جمعیت رفسنجان ۲.

Figure 1- Some samples of amplification results from YWLL08 marker in Rafsanjan2 population.

جهت بررسی ساختار جمعیت‌های مورد مطالعه، آنالیز PCA بر اساس همه اطلاعات ژنوتیپ‌های در دسترس مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر مولفه‌ها به ترتیب از بالا به پایین سیر نزولی داشتند، در نتیجه سهم آنها در توضیح واریانس نیز کاهش یافت. سه مولفه اول به ترتیب ٦١/٣٨، ٢٩/٩ و ٥/٧٤ درصد از کل واریانس را توجیه نمودند.

نتایج آنالیز PCA نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس اطلاعات PC1 و PC2 بر اساس منطقه جغرافیایی جدا شدند و کل نمونه‌ها به ۳ مولفه اصلی تفکیک شدند (شکل ۲). همانطور که در شکل مشخص می‌گردد، تمایز واضحی بین جمعیت‌ها بسته به مناطق جغرافیایی آنها وجود دارد. خوشه‌بندی، جمعیت شهربابک و دو جمعیت رفسنجان که محل پرورش آنها شمال غرب استان کرمان می‌باشد را در یک گروه قرار داد که می‌تواند ناشی از یکسان بودن خط پدری آنها باشد. نتایج PCA دو نژاد شتر واقع در مناطق شرق و غرب سودان، نشان داد که هر دو نژاد در یک دسته قرار دارند. این گروه‌بندی می‌تواند با آمیزش اجدادی و وقوع جریان ژنی در مناطق جغرافیایی متفاوت مرتبط باشد (Eltanany *et al.*, 2015).

اگر دو جمعیت در برخی جایگاه‌ها توزیع فراوانی آللی یکسانی داشته باشند، فاصله ژنتیکی بین آنها در آن جایگاه صفر خواهد بود. از طرفی وقتی دو جمعیت برای آلل‌های متفاوتی تثبیت شده باشند، فاصله ژنتیکی بین آنها حداکثر خواهد بود (Barker, 1994). ماتریس فواصل ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی نئی (D_S) در جدول ۳ موجود می‌باشد. بیشترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت رفسنجان ۱ و رفسنجان ۲ (۰/۸۹) و کمترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت شهربابک و صحرای جهاد (۰/٥٦) برآورد شد. احتمالا اختلاط مواد ژنتیکی در طول زمان، کاهش انتخاب و تعادل هاردی–وینبرگ از دلایل شباهت ژنتیکی زیاد بین دو جمعیت رفسنجان می‌باشد. بعلاوه پیش بینی می‌شود به دلیل شباهت ژنتیکی اندک بین جمعیت صحرای جهاد و جمعیت شهربابک و میزان تنوع نسبتا مناسب این دو جمعیت، هتروزیس بیشتری در نتاج حاصل از این دو مشاهده گردد. در مطالعه‌ای با استفاده از اطلاعات ۷۰ شتر مصری، بالاترین سطح تفاوت ژنتیکی بین نژادهای مغربی و موالاد (۰/۹۱) و کمترین فاصله بین دو نژاد بلادی و سومالی (۰/١٤) مشاهده شد. در مجموع این شترها شباهت ژنتیکی زیادی با جد مشترک خود نشان دادند (Mahrous *et al.*, 2011). در بررسی شترهای دو کوهانه چین و مغولستان، مشخص شد که شترهای وحشی باقیمانده گروه مستقلی از شترهای اهلی بوه‌اند و شترهای دو کوهانه، تک اجدادی هستند و از یک جمعیت وحشی بوجود آمده‌اند (Ji *et al.*, 2009).



شکل ۲- خوشه‌بندی حیوانات بر اساس تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی با استفاده از ژنوتیپ افراد.

Figure 2- The individuals clustering base on principal components analysis.

جدول ۳- ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد بررسی.

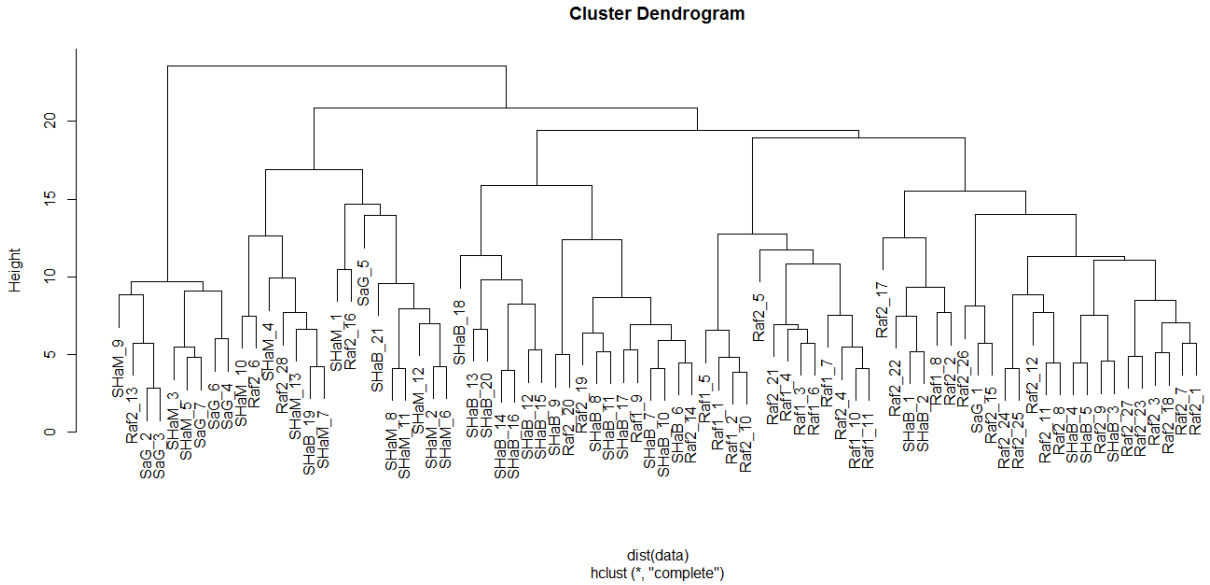
Table 3- Nei's genetic distance and identity between each pair of 5 populations.

رفسنجان ۲	رفسنجان ۱	شهربابک	شمشیر آباد	صحرای جهاد	جمعیت
Rafsanja2	Rafsanjan1	Shahr-e Babak	Shamshir Abad	Sahra-e Jahad	Population
0.69	0.57	0.56	0.64	*	صحرای جهاد (Sahra-e Jahad)
0.80	0.77	0.76	*	0.44	شمشیرآباد (Shamshir Abad)
0.82	0.79	*	0.27	0.56	شهربابک (Shahr-e Babak)
0.89	*	0.22	0.25	0.54	رفسنجان ۱ (Rafsanjan1)
*	0.11	0.19	0.21	0.36	رفسنجان ۲ (Rafsanja2)

شباهت ژنتیکی (اعداد بالای قطر) و فواصل ژنتیکی (اعداد زیر قطر) با استفاده از معیار استاندارد نئی

Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

نتایج خوشه‌بندی پنج جمعیت شتر استان کرمان به کمک دندروگرام تشکیل شده بر اساس فاصله اقلیدسی در شکل ۳ نمایش داده شده است. به طور کلی این پنج جمعیت در ۳ خوشه قرار گرفته‌اند اما الگوی پراکنش منظمی خصوصا در خوشه اول و دوم (از سمت چپ) وجود ندارد. اگر چه به ظاهر افراد هر جمعیت در چندین خوشه قرار گرفته است، اما به لحاظ محتوا مجموعا هر کدام از جمعیت‌ها در یک خوشه اصلی قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال خوشه اول، تنها ۹ حیوان را در بر گرفته و مخلوطی از سه جمعیت رفسنجان ۲ (۱ فرد)، شمشیرآباد (۳ فرد) و صحرای جهاد (۵ فرد) است. هم‌چنین مشاهده می‌شود که از تعداد ۱۱ حیوان در جمعیت رفسنجان ۱، ۹ حیوان به خوشه ٤ و یک حیوان به هر کدام از خوشه‌های ۳ و ۵ تعلق گرفته است. لذا می‌توان اینطور بیان نمود که جمعیت‌های شهربابک، رفسنجان ۱ و رفسنجان ۲ در یک زیر خوشه، جمعیت شمیرآباد در یک زیر خوشه دیگر و جمعیت صحرای جهاد نسبت به جمعیت‌های دیگر در یک دسته مجزا قرار گرفته است که نشان دهنده‌ی روابط ژنتیکی دور این جمعیت با سایر جمعیت‌ها می‌باشد. در تحقیق صورت گرفته بر روی ۸۷ شتر از نیجریه (پنج جمعیت)، تعداد شش خوشه به بهترین شکل تعداد گروه‌های ژنتیکی موجود در مجموعه داده-ها را توجیه کرد. محققن بیان نمودند که احتمالا در طول سفرهای صحراگردی در اطراف نیجریه بین جمعیت‌ها جریان ژنی صورت گرفته است (Abdussamad et al., 2015). ساختار جمعیتی شترهای هند به کمک نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت (Banerjee et al., 2012). هفده فرد مورد آنالیز داخل دو خوشه مجزا گروه‌بندی شدند. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که افراد از هتروزیگوسیتی مناسبی برخوردارند و می‌تواند برای توسعه استراتژی‌های حفاظتی و اصلاح نژادی شترهای هند مورد استفاده قرار گیرند. تقسیم شدن جمعیت‌ها به زیر جمعیت‌های کوچکتر در طی نسل‌های متمادی احتمالاً باعث تغییر در ساختار ژنتیکی آنها شده است. همانطور که در شکل ۳ مشخص می‌شود از هر گروه اصلی چندین زیر گروه تشکیل شده که این زیرگروه‌ها به صورت درون و بین گروهی با همدیگر مرتبط هستند. این موضوع نشانگر جریان ژنی بین مناطق پراکنش مختلف آنها از طریق مهاجرت بین گروهی و آمیزش‌های انجام شده بین افراد می‌باشد. به عبارتی روابط بین این زیرگروه‌ها، نشانگر روابط نزدیک بین افراد این جمعیت‌ها می‌باشد. در این میان احتمالا جمعیت صحرای جهاد در طول زمان در اثر عواملی نظیر جهش و جفتگیری غیرتصادفی، تنوع ژنتیکی آن کاهش یافته و متمایز از سایر جمعیت‌ها گردیده است. شاید اندازه نمونه کم در این مطالعه برای چنین استنباطی کافی نبوده و تنها باید به استنباط تمایز جغرافیایی این جمعیت‌ها که با واقعیات عینی نیز سازگار است، بسنده کرد.



شکل ۳- خوشه‌بندی بر اساس فاصله اقلیدسی. شهربابک (SHaB)، رفسنجان ۱ (Raf1)، رفسنجان ۲ (Raf2)، شمشیرآباد (SHaM) و صحرای جهاد (SaG).

Figure 3- Clustering base on Pairwise Euclidean Distance. Shahr-e Babak (SHaB), Rafsanjan1 (Raf1), Rafsanjan2 (Raf2), Shamshir Abad (SHaM) and Sahra-e Jahad (SaG).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج PCA و خوشه‌بندی بر اساس فاصله اقلیدسی، تقریبا تمام افراد جمعیت-های دو شهرستان شهربابک و رفسنجان، در یک دسته قرار دارند و با یکدیگر همپوشانی بالایی نشان می‌دهند که می‌تواند ناشی از یکسان بودن خط پدری در جمعیت‌های مورد مطالعه باشد. بر اساس نتایج کلیه آنالیزها، بیشترین شباهت بین دو جمعیت رفسنجان مشاهده گردید که با توجه به فاصله این دو جمعیت منطقی به نظر می‌رسد. به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان دهنده مطابقت خوشه‌بندی ژنتیکی جمعیت‌ها با فواصل جغرافیایی و محیط‌های پرورش آنها می‌باشد.

منابع

Abdallah HR, Faye B (2012). Phenotypic classification of Saudi Arabian camel (*Camelus dromedarius)* by their body measurements. Emirates Journal of Food and Agriculture 24: 272-280.

Abdussamad AM, Charruau P, Kalla DJU, Burger PA (2015). Validating local knowledge on camels: Color phenotypes and genetic variation of dromedaries in the Nigeria-Niger corridor. Livestock Science 181: 131-136.

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

Barazandeh A (2016). Whole genome CpG islands investigation in Camelid species. PhD Thesis, Shahid Bahonar University of Kerman, pp. 128 (In Farsi).

Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi M, Nezamabadipour H (2016a). Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. Czech Journal of Animal Science 61: 487-495.

Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi M, Nezamabadipour H (2016b). Predicting CpG islands and their relationship with genomic feature in cattle by hidden Markov model algorithm. Iranian Journal of Applied Animal Science 6: 571-579.

Banerjee P, Joshi J, Upasan S, Ganai N, Vijh RK (2012). Genetic characterisation of two humped camel of India (Camelus bactrianus). Indian Journal of Animal Sciences 82: 1205–1212.

Barker JSF (1994). A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proceedings of the 5th world congress on genetics applied to livestock production. University of Guelph, Canada. 501-508.

Chauhan T, Lal KK, Mohindra V, Singh R, Punia O, Gopalakrishnan A, Sharma PC, Lakra WS (2007). Evaluating genetic differentiation in wild populations of the Indian major carp. Aquaculture 269: 135-149.

Edea Z, Dadi H, Kim SW, Dessie T, Lee T, Kim H, Kim JJ, Kim KS (2013). Genetic diversity, population structure and relationships in indigenous cattle populations of Ethiopia and Korean Hanwoo breeds using SNP markers. Frontiers in Genetics, 4.

Eltanany M, Elfaroug SO, Distl O (2015). Assessment of genetic diversity and differentiation of two major camel ecotypes (*Camelus dromedarius*) in Sudan using microsatellite markers. Archives Animal Breeding 58: 269–275.

Gershon D (2002). Microarray technology: an array of opportunities. Nature 416: 885-891.

Groeneveld LF, Lenstra JA, Eding H, Toro MA, Scherf B (2010). Genetic diversity in farm animals-a review. Animal Genetics 41: 6-31.

Herrero-Medrano JM, Megens H, Groenen MAM, Ramis G, Bosse M, Pérez-Enciso M, Crooijmans RPMA (2013). Conservation genomic analysis of domestic and wild pig populations from the Iberian Peninsula. BMC Genetics 14: 106-120.

Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmansh A, Asadzadeh N (2008). Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian Bos taurus) Russian Journal of Genetics 44: 495-497.

Ji R, Cui P, Ding F, Geng J, Gao H, Zhang H, Yu J, Hu S, 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.

Jianlin H (2000). Origin, evolution and genetic diversity of old world camels. Ph.D. Thesis. Lanzhou University, Lanzhou, China.

Kijas JW, Townley D, Dalrymple BP, Heaton MP, Maddox JF, McGrath A, Wilson P, Ingersoll RG, McCulloch R, McWilliam S (2009). A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. PlOS one 4: 46-68.

Lang KDM, Wang Y, Plante Y (1996). Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in lamas and alpacas. Animal Genetics 27: 285-294.

Mahrous KF, Ramadan HAI, Abdel-aziem SH, Mordy MA, Hamdan D (2011). Genetic variations between camel breeds using microsatellite markers and RAPD techniques. Journal of Applied Biosciences 39: 2626-2634.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple sating out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16: 12-15.

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011). Application of microsatellite markers for a study of Kermani sheep genome. Iranian journal of Animal Science 42: 337-344 (In Farsi).

Montazeri M, Masoudi AA, Vaez Torshizi R (2016). Microsatellite loci analysis for the genetic variability and paternal lineages in Iranian native dogs. Journal of Livestock Science and Technologies 4: 61-70.

Mousavizadeh A, Mohammad Abadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H, Esmailizadeh 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 (1972). Genetic distances between populations. American Naturalist 106: 283-292.

Obreque VL, Coogle PJ, Henney E, Bailey R, Mancilla J, Garcia-Huidobro P, Cothran EG (1998). Characterization of 10 polymorphic alpaca dinucleotide microsatellites. Animal Genetics 29: 460-467.

R Development Core Team (2014). R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. Open access available at: http://cran r-project org.

R Development Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org.

Sasse J, Mariasegaram M, Jahabar MK, Pullenayegum R, Kinne BR, Werney U (2000). Development of a microsatellite parentage and identity verification test for dromedary racing camels. 27th International Conference on Animal Genetics, Minneapolis, USA.

Schulz U, Tupac-Yupanqui I, Martínez A, Méndez S, Delgado JV, Gómez M, Dunner S, Cañón J (2010). The canarian camel: a traditional dromedary population. Diversity 2: 561-571.

Shahkarami S, Afraz F, Mirhosseini Z, Banabazi MH, Asadzadeh N, Hemati B, Ghanbary A, Razavi K (2012). The study of genetic diversity in Iraian *Camelus bactrianus*. Novin Genetic 2: 248-256.

Tavakoliyan J (1999). Review of Genetic Resources of Native Livestock and Poultry of Iran. Research Institute of Animal Science, Karaj. pp. 68-79.

Truxillo C, Hamer R (2007). Multivariate statistical methods: Practical research applications, course notes, SAS institute.

Vijh RK, Tantia MS, Mishra B, Bharani Kumar ST (2007). Genetic diversity and differntiation of dromedarian camel of India. Animal Biotechnology 18: 81-90.

Ward JH (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. Journal of American Statistical Association 58: 236-244.

Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999). PopGene. Version 1.31. Microsoft window-based free software for population genetic analysis. University of Alberta, Canada, 1-28.

Analysing Genetic Structure of *Camelus dromedarius* Using PCA and Hierarchical clustering methods

Ghasemi Meymandi M.[*1], Mohammadabadi M.R.[2], Montazeri M.[3, 4]

[1]Graduate M. Sc. degree, Department of animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[2]Professor, Department of animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[3]Ph.D student, Department of animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[4] Young Researchers Society, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

Patterns in heritable molecular data can be used to summarize the relationships between populations of a species. In Iran, camels are providers of milk, meat and fibers. Using of 81 reproductive individuals belonging to five sampling locations of *Camelus dromedarius* in Kerman province, eight microsatellite markers (YWLL08, VOLP03, VOLP08, YWLL38, CVR01, YWLL44, VOLP32 and VOLP67) were analyzed to genetic structure and genetic distance in these populations. DNA extraction was conducted with optimized and modified salting-out method. The polymerase chain reactions for 81 individuals were successfully done with all primers and then amplification products were resolved on 8% polyacrylamid gel and stained with silver nitrate. The highest genetic distance obtained between Shahr-e Babak and Sahra-e Jahad (0.56) populations and the lowest genetic distance was observed between the two populations of Rafsanjan (0.11). Principal component analysis indicated that all samples could be mainly regrouped into three main clusters and most suitable number of genetic groups in dataset was explained. Results of this study indicated that in the first level of clustering, Shahr-e Babak, Rafsanjan1 and Rafsanjan 2 populations shared the same cluster and Shamshir Abad had another separate cluster while Sahra-e Jahad population appeared as an independent cluster. A similarity of geographical distribution was in good accordance with founded genetic relationships in this study.

Keywords: *Camel, Principal component analysis, Hierarchical clustering, Genetic distance.*

[*] Corresponding Author: Ghasemi Meymandi M. Tel: 03434116467 Email: m.ghasemimeymandy@mail.com