(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122277

بررسی فیلوژنی شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایران براساس توالی ژن ۱۶S rRNA

- **آزاده ترابی***: گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
- **زهرا رودباری**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران

تاریخ دریافت: تیر ١٣٩٩ تاریخ پذیرش: مهر ١٣٩٩

چکیده

شتر گونه‌ای بسیار مقاوم در برابر خشکی است که در سخت‌ترین شرایط آب و هوایی، محصولاتی مانند شیر و گوشت تولید می‌کند. با توجه به این‌که تعداد شترهای ایران در حال کاهش است، برای حفظ و بهبود تولیدات این گونه، مطالعات کاربردی ژنتیکی ضروری است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن ١٦S rRNA میتوکندری شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی بود. در پژوهش حاضر از ١٠ نمونه شتر دوکوهانه و ١٠ نمونه شتر تک‌کوهانه مناطق مختلف، نمونه خون جمع آوری شد. پس از استخراج DNA، ژن ١٦S rRNA میتوکندریایی به طول ١٥١٢ جفت باز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد. هم‌ردیفی کامل نوکلئوتیدی شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی با روش اتوماتیک سانگر صورت گرفت و سپس توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های حاصل از مطالعات دیگر مقایسه شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد شباهت نوکلئوتیدی ژن ١٦S rRNA میتوکندریایی با هم‌ردیفی کامل سایر شترسانان موجود در بانک جهانی ژن ٩٣/٩٨ تا ١٠٠ درصد محاسبه گردید. مقایسه هم‌ردیفی نوکلئوتیدی، رسم ماتریس فواصل ژنتیکی و رسم درخت فیلوژنتیکی هم‌ردیفی کامل حاصله از آنالیز فاصله ژنتیکی نشان داد که شترهای تک‌کوهانه ایران بیش‌ترین شباهت با شتر تک‌کوهانه عربی و شترهای دوکوهانه ایران بیش‌ترین شباهت با شتر دوکوهانه باختری دارد. هم‌چنین ترسیم این درخت نشان داد که جمعیت شترهای ایرانی یک گروه مونوفیلتیک هستند.

کلمات کلیدی: DNA میتوکندری، تنوع ژنتیکی، ژن ١٦s rRNA، شتر

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: azadehtorabi@gmail.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122277

مقدمه

نژادهای بومی ایران بخشی از سرمایه ملی تلقی می‌شوند که حفظ آن‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. توجه بیش‌تر به این نژادها از دیدگاه ژنتیک با توجه به کاهش شدید جمعیت آن‌ها در برخی مناطق، بسیار حائز اهمیت است. بیش از ۳۵ میلیون شتر در سطح جهان وجود دارد (FAO، ۲۰۱۹). که در بسیاری از کشورهای آفریقای شمالی و آسیا به‌عنوان منبع غذایی برای عشایر و جمعیت روستایی کم درآمد و مسابقه مورد استفاده قرار می‌گیرند (Khalkhali و همکاران، ۲۰۱۸). حدود ۹۵ درصد از شترهای موجود تک‌کوهانه (Dromedary camels) هستند که بیش‌تر به‌دلیل توانایی بی‌نظیر آن‌ها برای زنده ماندن در محیط‌های بیابانی شناخته شده‌اند (Hashim و همکاران، ۲۰۱۵). این حیوانات به شدت با شرایط سخت بیابانی از جمله درجه حرارت بالا، کمبود مواد غذایی و آب سازگار هستند و در دمای بیش از ۴۰ درجه سانتی‌گراد را به‌خوبی تحمل می‌کنند و می‌توانند ۲۰ تا ۳۵ روز بدون آب زنده بمانند در حالی‌که تنها ۲۵ درصد از وزن بدن خود را از دست می‌دهند (Agrawal و همکاران، ۲۰۱۱؛ Musa و همکاران، ۲۰۰۶). توانایی بی‌نظیر شترها در مقاومت در برابر شرایط سخت محیطی همراه با مزایای پزشکی آن‌ها، این حیوانات را به یک مورد ایده‌آل جهت مطالعات بیش‌تر تبدیل کرده است (Romli و همکاران، ۲۰۱۶). از آن‌جا که شترها به‌طورکلی در کشورهای در حال توسعه پرورش می‌یابند، مطالعات در مورد آن‌ها محدود می‌شود. این در حالی است که افزایش اطلاعات گسترده ژنوم در شترها می‌تواند پرورش شتر را بهبود ببخشد (Khalkhali و همکاران، ۲۰۱۸). بیش از ۸۴ درصد ایران خشک یا نیمه‌خشک است و برخی مناطق تحت تأثیر افزایش فشار جمعیت بر منابع زمین و آب قرار گرفته‌اند و درمعرض بیابان‌زایی قراردارند(Heshmati و Squires، ۲۰۱۳؛ Lehane و همکاران، ۲۰۱۴). شرایط آب و هوایی به همراه ارزش‌های دینی و فرهنگی سنتی ایرانیان نشان‌دهنده پتانسیل بالایی برای پرورش شتر است. متأسفانه، پرورش شتر در ایران، مانند اکثر نقاط جهان، به‌صورت علمی انجام نمی‌شود. با این وجود، به‌نظر می‌رسد که تحقیقات ژنوم بومی شتر ایرانی می‌تواند درک تکامل شتر را افزایش دهد و فرصتی ارزشمند را برای برنامه‌های پرورش و تولیدمثل فراهم کند (Khalkhali و همکاران، ۲۰۱۸). DNA میتوکندریایی در شتر مشابه سایر پستانداران از ۱۳ ژن کدکننده پروتئین‌های مرتبط با زنجیره تنفسی،ژن‌های ۱۶s rRNA و ۱۲s rRNA و ۲۲ ژن tRNA تشکیل شده است (Ji و همکاران، ۲۰۰۹). آنالیز ژن‌های کدکننده زیرواحدهای ریبوزومی ۱۶s و ۱۲s ازجمله روش‌هایی است که امروزه به‌طور گسترده برای طبقه‌بندی و شناسایی استفاده می‌شود. الزامات کلیدی ژن مطالعه شده در طبقه‌بندی فیلوژنی آن است که همگانی، پایدار، قابل تکثیر، مبتنی بر علم و حاوی اطلاعات ژنی بالایی باشد. ژن‌های ریبوزومی پایه علم فیلوژنی به‌شمار می‌روند و علاوه بر این، ژن‌های ریبوزومی نسبت به ژن‌های کدکننده پروتئین به آرامی در حال تکامل هستند و این امر در تجزیه و تحلیل فیلوژنی گونه‌های دور از هم و یا مرتبط با هم بسیار حائز اهمیت است (Ahmed و همکاران، ۲۰۱۳). به ویژه مدل ساختار ثانویه ژن‌های ریبوزومی صرفاً براساس مقایسه و تجزیه و تحلیل توالی‌های به‌دست آمده صورت می‌گیرد. به‌نظر می‌رسد میزان حفاظت شدگی و پایداری آن نتیجه نقش مهم و اساسی این ساختار به‌عنوان جزئی از عملکرد اساسی و حیاتی سلولی باشد،زیرا ژن‌های ریبوزومی به‌دلیل کد نکردن پروتئین، هیچ‌گونه فعالیت آنزیمی ندارند و سلول اغلب جهش در این ژن را تحمل می‌کند، به این معنا که این ساختارها در اثر جهش‌های نقطه‌ای، حذف و یا اضافه شدن نوکلئوتیدی دچار تغییر ماهیتی و عملکردی نمی‌شوند. این در حالی است که در بررسی‌های فیلوژنی ژن‌های اندکی وجود دارد که میزان ثبات و حفظ شدگی توالی آن‌ها مشابه توالی ژن‌های ریبوزومی باشد(Patwardhan و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ansari-Renani و همکاران، ۲۰۱۰). از آن‌جا که اغلب مطالعات انجام شده روی شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه مربوط به ژن‌های کدکننده پروتئین و ژن‌های مرتبط با صفات اقتصادی بوده است (رودباری و نصیری، ۱۳۹۸) و با توجه به این‌که مطالعه تنوع‌ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی دام‌های بومی ضروری است و این‌که تاکنون مطالعه‌ای در مورد ژن ۱۶s rRNA میتوکندری شتر دو کوهانه و تک‌کوهانه ایران گزارش نشده است، هدف این پژوهش تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی ژن ۱۶s rRNA ژنوم میتوکندری شتر دوکوهانه و تک‌کوهانه ایران بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: تعداد ۱۰ نمونه خون از شترهای تک کوهانه و ۱۰ نمونه خون از شترهای دوکوهانه از بانک خون موجود در آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد، به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های خون شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه به‌ترتیب از کشتاگاره مشهد(جاده‌فریمان روستای تپه سلام) و ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اردبیل (روستای جهادآباد) تهیه شده‌بودند.نمونه‌های خون تا زمان استخراج‌در لوله‌های حاوی EDTAدرفریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

استخراج DNA: استخراج DNA از خون کامل، با استفاده از کیت Bioneer (کره جنوبی Cat NO. K3032) با اندکی تغییرات در دستورالعمل کیت انجام گرفت. تغییر اعمال شده به این

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122277

صورت بود که برطبق دستورالعمل کیت، میزان خون مورد نیاز برای هر بار استخراج ۲۰۰ میکرولیتر بود که به‌دلیل غلظت بالای نمونه خون‌های شتر، عبور دادن نمونه‌های خون از ستون مشکل بود، بنابراین به‌منظور رقیق کردن آن‌ها، این میزان به ۱۰۰ مایکرولیتر خون کاهش یافت و با استفاده از PBS به حجم مورد نظر رسانده شد و سایر مراحل مطابق دستورالعمل کیت صورت گرفت. جهت بررسی کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده به‌ترتیب از روش الکتروفورز (ژل آگارز ۱ درصد، رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید) و طیف سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (THERMO ND-2000، آمریکا) استفاده شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): جهت تکثیر ژن ۱۶s rRNA میتوکندری شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه باطول ۱۵۱۲، دو جفت آغازگر اختصاصی براساس توالی‌های مرجع ثبت شده برای شتر تک‌کوهانه با شماره دسترسی NCBI NC_009849 و شتر دو کوهانه با شماره دسترسی NC_009628 در بانک جهانی ژن (NCBI) و با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 5 (Premier Biosoft, USA) طراحی شد، آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که نواحی بالادست و پایین‌دست ژن ۱۶s rRNA را تکثیر کنند تا توالی کامل این ژن با صحت خوانش بالا، برای تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی موجود باشد. توالی آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده به‌صورت زیر بود:

Forward 1-٥´- GGTATCCTGACCGTACAAAGGTAGC - ٣´
Reverse 1- 5´- GGAGGATGGGGACGATAAGTGTG - 3´
Forward 2- ٥´- CTCGTCTATGTGGCAAAATAGTGAG -٣´
Reverse 2-5´- ATTTCACTGATTGGAAGCAAGAGAC - 3´

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر ژن ۱۶s rRNA از mtDNA توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر بود که با استفاده از برنامه حرارتی واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه برای ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه، یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در ۳۰ سیکل تکثیر شد. به‌منظور حصول اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک‌درصد، الکتروفورز گردیدند. مقدار ۳۰ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، خالص‌سازی شدو به‌همراه ۱۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت مورداستفاده با غلظت ۱۰ پیکومول به‌منظور تعیین توالی به شرکت MacroGen کره جنوبی ارسال شد. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI3130 به‌روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی گردید.

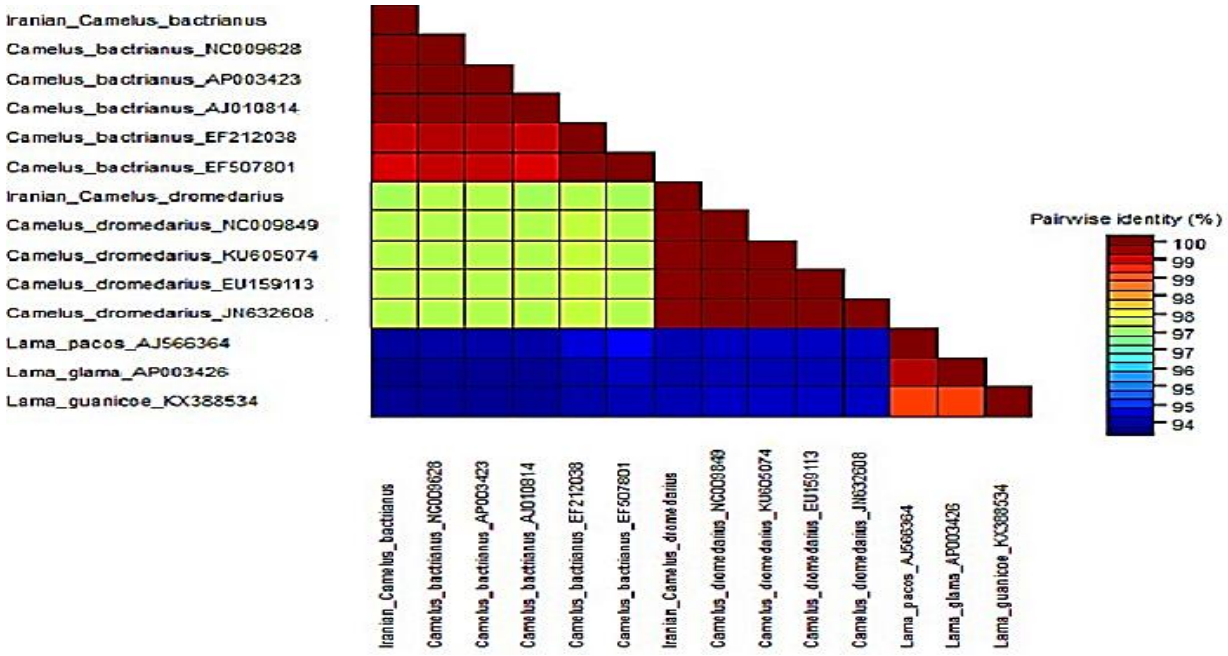
تجزیه و تحلیل داده‌ها: به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی و تکاملی گونه‌های شتر در این مطالعه، در ابتدا کیفیت نتایج تعیین توالی به‌کمک برنامه BioEdit 7 (Hall و Carlsbad، ۲۰۱۱) مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار CLC Main workbench 5.5 همسانی توالی‌ها به‌کمک ابزار قدرتمند BLAST و رویه blastn موجود در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های ثبت شده در این پایگاه سنجیده شد. به‌منظور سرهم کردن نتایج دو قطعه تکثیرشده و داشتن طول کامل ژن ۱۶s rRNA میتوکندری شتر از رویه اسمبلی کردن توالی‌ها نرم‌افزار CLC Main workbench 5.5 استفاده شد. این توالی‌ها به‌همراه توالی‌های انتخاب‌شده از بانک جهانی ژن در یک فایل ادغام و هم‌ردیف‌سازی چندگانه (Multiple Alignmennt) با برنامه BioEdit 7 انجام شد. فایل‌های هم‌ردیف‌سازی شده حاصل از این برنامه جهت تعیین هاپلوتایپ‌ها با رویه Disparity Index Analysis نرم‌افزار MEGA6 استفاده شدند و برای تعیین میزان درصد تشابه نوکلئوتیدی بین گونه‌های شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه این تحقیق با یکدیگر و با سایر جدایه‌های در دسترس از سایر کشورها از نرم‌افزار SDT v.1.2 (Muhire و همکاران، ۲۰۱۴) استفاده شد. جهت تعیین فاصله ژنتیکی به رویه مقایسه دو به دو و ایجاد فاصله (Create Pairwise Comparison) و به‌منظور ترسیم درخت فیلوژنتیکی با رویه Neighbor Joining (NJ) با ۱۰۰۰ تکرار به‌ترتیب نرم‌افزارهای Main CLCWorkbench ۵,۵ و MEGA 6 (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) استفاده شدند و برای بررسی هر گونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی، تست‌های Neutrality شامل Tajima´s D و Fu´s Fs با استفاده از نرم‌افزار DnaSP v.5.10.0 (Ramos-Onsins و Rozas، ۲۰۰۲) محاسبه و از معنی‌داری آن‌ها اطمینان حاصل شد. سطوح معنی‌داری برای تست‌های Tajima´s D و Fu´s Fs به‌ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۰۱ درنظر گرفته شد.

نتایج

نتایج سنجش تعیین کمیت و کیفیت استخراج DNA نشان داد که استخراج DNA از تمام نمونه‌ها با موفقیت انجام گرفته و DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برخوردار است. الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی آگارز ۱ درصد نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به‌صورت اختصاصی توالی ژن ۱۶s rRNA و نواحی بالادست و پایین‌دست آن‌را درمجموع با طول ۱۵۱۲ جفت باز را در شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی تکثیر نمودند. تعیین توالی قطعات ۷۸۱ و ۷۳۱ جفت بازی ژن ۱۶s rRNA برای هر ۲۰ نمونه انجام گرفت، کیفیت این توالی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان دادند که خوانش‌ها با کیفیت بسیار بالایی صورت گرفته و برای انجام تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی مناسب هستند.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122277

پس از ویرایش قطعات به‌دست آمده از توالی‌یابی و سرهم کردن آن‌ها توالی کامل ژن16s rRNA حاصل شد که براساس هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها در نرم‌افزار BioEdit 7 تغییرات نوکلئوتیدی در یک جایگاه شتر تک کوهانه و ۱۰ جایگاه در شتر دوکوهانه ایرانی مشاهده شد که ترکیب این تغییرات باعث ایجاد هاپلوتایپ گردیده که مقایسه توالی نوکلئوتیدهای ۱۰ نمونه شتر تک‌کوهانه و ۱۰ نمونه شتر دوکوهانه ایرانی با استفاده از ابزار Disparity Index Analysis نرم‌افزار MEGA وجود ۳ هاپلوتایپ در شترهای دوکوهانه و ۱ هاپلوتایپ در شترهای تک کوهانه را ثابت نمود (شکل ۱). ماتریس فواصل ژنتیکی درشکل ۲ نتایج مربوط به‌رابطه تبارزایی شترهای مورد مطالعه به‌صورت فواصل ژنتیکی و تفاوت نوکلئوتیدی بین توالی‌های شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایران و دیگر گونه‌های مختلف شترسانان براساس ژن 16s rRNA میتوکندریایی را نشان می‌دهد.



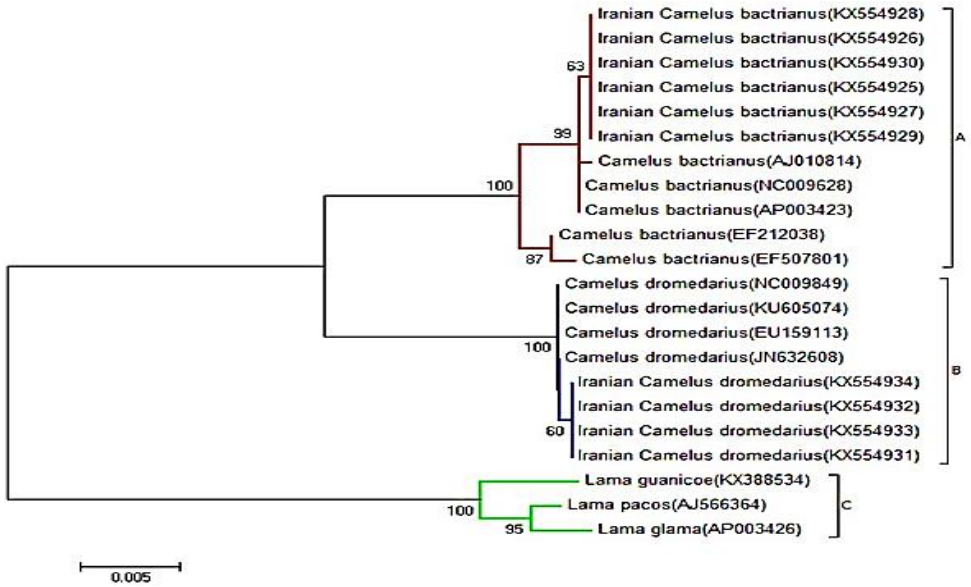
شکل ۱: ماتریس درصد تشابه ژنتیکی بین توالی‌های شترهای ایرانی و دیگر گونه‌های مختلف شترسانان براساس ژن 16s rRNA میتوکندریایی

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Iranian Camelus bactrianus	1		99.94	99.94	99.68	99.42	99.29	97.24	97.31	97.31	97.31	97.31	94.17	93.98	94.05
Camelus bactrianus(NC009628)	2	0.00		100.00	99.74	99.49	99.36	97.31	97.37	97.37	97.37	97.37	94.24	94.05	94.11
Camelus bactrianus(AP003423)	3	0.00	0.00		99.74	99.49	99.36	97.31	97.37	97.37	97.37	97.37	94.24	94.05	94.11
Camelus bactrianus(AJ010814)	4	0.00	0.00	0.00		99.23	99.10	97.18	97.24	97.24	97.24	97.24	94.17	93.98	94.04
Camelus bactrianus(EF212038)	5	0.01	0.01	0.01	0.01		99.87	97.43	97.50	97.50	97.50	97.50	94.37	94.17	94.11
Camelus bactrianus(EF507801)	6	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00		97.31	97.37	97.37	97.37	97.37	94.49	94.30	94.24
Iranian Camelus dromedarius	7	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03		99.94	99.94	99.94	99.94	94.24	94.17	94.24
Camelus dromedarius(NC009849)	8	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.00		100.00	100.00	100.00	94.30	94.24	94.30
Camelus dromedarius(KU605074)	9	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.00	0.00		100.00	100.00	94.30	94.24	94.30
Camelus dromedarius(EU159113)	10	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00		100.00	94.30	94.24	94.30
Camelus dromedarius(JN632608)	11	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00		94.30	94.24	94.30
Lama pacos(AJ566364)	12	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06		99.55	99.04
Lama glama(AP003426)	13	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.00		99.04
Lama guanicoe(KX388534)	14	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.01	0.01	

شکل۲: ماتریس فواصل ژنتیکی بین توالی‌های شترهای ایرانی و دیگر گونه‌های مختلف شترسانان براساس ژن 16s rRNA میتوکندریایی

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122277

جهت تایید نتایج حاصل از ماتریس درصد تشابه نوکلئوتیدی و فواصل ژنتیکی، درخت فیلوژنتیک توالی ژن ۱۶s rRNA میتوکندریایی میتوکندریایی شترتک کوهانه و دوکوهانه ایرانی با سایر توالی‌های موجود در پایگاه NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 ترسیم شد (شکل ۳).



شکل ۳: ترسیم درخت فیلوژنی براساس توالی ژن ۱۶s rRNA میتوکندریایی شترهای ایرانی و سایر توالی‌های این ژن در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آن‌ها. اعداد روی گره مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰۰ مرتبه نمونه‌گیری می‌باشد.

Phylogenetic tree of 16s rRNA gene among populations with used NJ methods

تست‌های Neutrality شامل Tajima´s D و Fu´s Fs به‌منظور بررسی هر گونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر ژن ۱۶s rRNA در شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه محاسبه شد (جدول ۱). در بین گونه‌هایی که انتخاب جهت‌دار عمل کرده باشد یا افزایش معنی‌دار در اندازه جمعیت موثر شده باشد، مقادیر تست‌های Neutrality منفی و معنی‌دار می‌باشد، درحالی‌که مقادیر مثبت و معنی‌دار این تست‌ها نشان‌دهنده اثرات مربوط به رانش ژنتیکی، تنگناهای ژنتیکی و یا اثر انتخاب متعادل کننده در طول تاریخ تکاملی گونه‌ها است. نتایج این مطالعه نشان داد که مقادیر تست‌های Neutrality برای ژن ۱۶s rRNA مثبت است و در این پژوهش هیچ‌کدام از گونه‌ها مقادیر عددی D و Fs منفی نشان ندادند.

جدول ۱: نتایج تست‌های Neutrality برای ژن ۱۶s rRNA میتوکندریایی در شترهای تک کوهانه و دو کوهانه ایرانی

گونه	تست Tajima´s D	تست Fu and Li's D	تست Fu and Li's F
شتر تک‌کوهانه	۱/۴۴	۰/۸۸	۱/۱
شتر دوکوهانه	۱/۴۹	۱/۷۳	۱/۸۶

بحث

مطالعه حاضر که جهت تکثیر و تعیین توالی ژن ۱۶s rRNA ژنوم میتوکندری شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی انجام شده است. مقایسه توالی نوکلئوتیدهای ۱۰ نمونه شتر تک‌کوهانه و ۱۰ نمونه شتر دوکوهانه ایرانی وجود ۳ هاپلوتایپ در شترهای دوکوهانه و ۱ هاپلوتایپ در شترهای تک‌کوهانه را ثابت نمود. علت پایین بودن تعداد هاپلوتایپ در نمونه‌های مورد مطالعه، ممکن است اولاً به‌دلیل کوچکی اندازه نمونه باشد، به‌نحوی‌که ممکن است نمونه مطالعه شده بیانگر سطح تنوع واقعی در جمعیت اصلی شترهای ایرانی نباشد و دوماً به‌نظر می‌رسد از آن‌جایی‌که اندازه موثر جمعیت این شترها در کشور کم است، ایستگاه‌های تحقیقاتی به‌منظور حفظ این گونه‌ها از

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122277

انقراض، مجبور به تلاقی شترهای خویشاوند با هم هستند که این خود می‌تواند باعث کاهش چشمگیر تنوع ژنتیکی شود (ازغندی، ۱۳۹۴). به‌علاوه لازم به ذکر است که نمونه‌های به‌دست آمده جهت انجام این مطالعه همگی از یک مرکز تحقیقاتی جمع‌آوری شده بودند که خود می‌تواند دلیلی برای کم بودن تعداد هاپلوتایپ در نمونه‌های مورد مطالعه باشد. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار SDT v.1.2 درصد تشابه نوکلئوتیدی توالی ژن ۱۶s rRNA میتوکندریایی شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی با توالی‌های ثبت شده در پایگاه NCBI تعیین شد. اکثریت توالی‌ها در سطح ۱۰۰ درصد بیش‌ترین تشابه را با توالی ژن ۱۶s rRNA شترهای ایرانی داشتند که نتایج بر این دلالت دارد که ژن ۱۶s rRNA در بین ژن‌های ژنوم میتوکندریایی دارای کم‌ترین درصد تغییرات نوکلئوتیدی می‌باشد. از آن‌جایی‌که این ژن جزء ژن‌های ساختاری و غیر کدکننده میتوکندریایی می‌باشد به‌عنوان نشانگر مناسب برای رمزنگار مولکولی در گروه‌های جانوری به‌کار می‌رود (Aliabadian و Nijman، ۲۰۱۲). با توجه به شکل ۱ که بر پایه مقایسه چند ردیفی در سطح نوکلئوتیدی شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی با سایر شترسانان است و درصد تشابه بین حیوانات مختلف به‌صورت دو به دو است، تیرگی رنگ هر مربع بیانگر میزان تشابه است که هر چه تیره‌تر باشد درصد تشابه بین دو حیوان بیش‌تر است. می‌توان نتیجه گرفت که شتر تک‌کوهانه ایرانی از نظر قرابت ژنتیکی، در خانواده شترسانان دارای بیش‌ترین شباهت با شتر تک‌کوهانه عربی (NC009849) و کم‌ترین شباهت با گونه لاما است. هم‌چنین شتر دوکوهانه ایرانی بیش‌ترین و کم‌ترین شباهت را به‌ترتیب با شتر دوکوهانه باختری (NC9628) و لاما دارد. به‌علاوه می‌توان نتیجه گرفت که بین شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایران قرابت ژنتیکی تقریباً مناسبی (۹۷ درصد) وجود دارد و گونه‌های لاما با سایر گونه‌های شترسانان از نظر ژنتیکی فاصله دارند که تاییدی بر مطالعات قبلی بود که براساس ژن‌های NADH3 و NADH4L انجام شده بود (شهابی و طهمورث‌پور، ۱۳۹۴).

با توجه به این‌که درصد تشابه نوکلئوتیدی با فاصله ژنتیکی بین دو حیوان رابطه عکس دارند در نتیجه از این شاخص هم می‌توان برای تعیین دوری و نزدیکی ژنتیکی گونه‌های مختلف استفاده کرد. هم‌چنین با توجه به این‌که تکامل در طول دوره‌های زمانی طولانی که به‌طور مستقیم قابل مشاهده نیست اتفاق می‌افتد، زیست‌شناسان مجبورند فیلوژنی‌ها را با استنباط روابط تکاملی میان جانداران امروزی بازسازی کنند. داده‌های مولکولی و برای تشخیص روابط تبارزایی و ساخت درخت‌های فیلوژنتیک استفاده می‌شوند. از آن‌جایی‌که اعداد حاصل از فواصل ژنتیکی بین گونه‌های مختلف به‌صورت دو به دو است، در نتیجه این اعداد نمایانگر میزان جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی‌های گونه‌های مورد بررسی می‌باشند و فاصله ژنتیکی بین دو گونه، با همبستگی فیلوژنتیکی بین گونه‌ها مرتبط خواهد بود (Van de Peer، ۲۰۰۹). جهت تایید نتایج حاصل از ماتریس درصد تشابه نوکلئوتیدی وفواصل ژنتیکی، درخت فیلوژنتیک توالی ژن ۱۶s rRNA میتوکندریایی شترتک کوهانه و دوکوهانه ایرانی با سایر توالی‌های موجود در پایگاه NCBI ترسیم شد، به‌طوری‌که براساس آن شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی با شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه اهلی در یک گروه و با فاصله تکاملی زیاد از گونه لاما قرار گرفتند که این امر می‌تواند تاییدکننده وجود جد مشترک شترهای ایرانی با شترهای اهلی در زمان‌های بسیار دور باشد. به‌عبارت دیگر قرار دادشتن آن‌ها در یک خانواده مشترک (مونوفیلتیک) باشد (شکل ۳). این نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج Cui و Ding (۲۰۰۷) که کل ژنوم میتوکندری را بررسی کردند و با تجزیه و تحلیل ساعت مولکولی ژنوم میتوکندریایی نشان دادند که دو گونه شتر دو کوهانه وحشی و لاما از یک جد مشترک جدا شده‌اند اما شترهای دو کوهانه اهلی دارای جد جدایی از گونه لاما می‌باشند مطابقت دارد. هم‌چنین با نتایج سایر محققین که ژن‌های دیگری از ژنوم میتوکندری شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی را بررسی کردند و گزارش کردند که شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی به‌ترتیب با شتر عربی و شتر دوکوهانه باختری در یک زیر گروه قرار دارند در یک راستا می‌باشد (عباسی و همکاران، ۱۳۹۵: شهابی و طهمورث‌پور، ۱۳۹۴). از سوی دیگر نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از روش توالی‌یابی ژن ۱۶s rRNA روش مناسبی در تمایز گونه‌ها است، به‌طوری‌که حتی قادر است دو گونه نزدیک به هم یعنی شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه را از هم متمایز نماید و این ادعا در شکل ۳ به‌صورت واضح در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده نمایش داده شده است. در نهایت توالی‌های به‌دست آمده از این منطقه از ژنوم میتوکندری شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی با طول ۱۵۱۲ جفت باز برای اولین بار در بانک ژن با کدهای دسترسی KX554925-KX554934 ثبت شدند.

نتایج تست‌های Neutrality به‌منظور بررسی هر گونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر ژن ۱۶s rRNA در شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه نشان داد که مقادیر تست‌های Neutrality برای ژن ۱۶s rRNA مثبت است و در این پژوهش هیچ‌کدام از گونه‌ها مقادیر عددی D و Fs منفی نشان ندادند (جدول ۱)، که این نتایج می‌تواند به‌دلیل این‌که ژنوم میتوکندری تک والدی و هاپلوئید است نسبت به تنگناهاژنتیکی و رانش‌ژنتیکی حساس است رخ دهد (زارعی و علی‌پناه، ۱۳۹۲). از طرف دیگر مطالعات نشان داده‌اند که تست Fu´s Fs برای جمعیت‌های با اندازه کوچک و تست

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122277

Tajima´s D و برای جمعیت‌های با اندازه بزرگ کاراتر است (Ramos Onsins و Rozas، ۲۰۰۲). عدم معنی‌داری نتایج تست‌ها برای ژن ۱۶s rRNA در جمعیت‌های مورد مطالعه ممکن است به‌دلیل تعداد اندک نمونه‌های به‌کار گرفته شده در این آنالیز باشد.

منابع

۱. **ازغندی، م.، ۱۳۹۴.** توالی‌یابی و بررسی بیوانفورماتیکی ژنوم میتوکندری شترهای تک کوهانه و دوکوهانه ایرانی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲. **رودباری، ز. و نصیری، خ.، ۱۳۹۸.** بررسی تنوع ژنتیکی و اثر انتخاب ژن‌های RNA ریبوزومی و ناقل در ژنوم میتوکندری شترهای تک کوهانه و دو کوهانه. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۱، شماره ۴، صفحات ۳۳ تا ۳۸.

۳. **زارعی، ف. و علی‌پناه، ه.، ۱۳۹۲.** مقایسه بیوانفورماتیکی چهار ژن mtDNA مربوط به جمعیت‌های سوزن ماهی *Syngnathus* (*abaster* در تالاب‌های ناحیه غرب مدیترانه به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیک، تاریخ دموگرافیک و شناسایی ساختار ژنتیک جمعیت. نشریه علمی فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. جلد ۱، شماره ۲، صفحات ۱ تا ۳۵.

۴. **شهابی،ا.و طهمورث‌پور، م.، ۱۳۹۴.** تجزیه‌وتحلیل بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی ژن‌های NADH3 و NADH4L ژنوم میتوکندری شتر دوکوهانه ایران. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. جلد ۷، شماره ۳، صفحات ۱۶۳ تا ۱۷۴.

۵. **عباسی‌دلویی، ط.؛ سخاوتی، م.ه. و طهمورث‌پور، م.، ۱۳۹۵.** تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی ژن COX3 میتوکندری شترهای تک کوهانه و دوکوهانه ایران. پژوهش‌های علوم دامی ایران. جلد ۸. شماره ۲، صفحات ۳۶۱تا ۳۶۹.

۶. **Aliabadian, M. and Nijman, V., 2012.** Mitochondrial sequence divergence suggests old world a new world barn owls are genetically distinct. Iranian Journal of Anim Biosystematics. Vol. 8, No. 1, pp: 47-55.

۷. **Agrawal, R.P.; Jain, S.; Shah, S.; Chopra, A. and Agarwal, V., 2011.** Effect of camel milk on glycemic control and insulin requirement in patients with type 1 diabetes: 2-years randomized controlled trial. Eur J Clin Nutr. Vol. 65, pp: 1048-1052.

۸. **Ahmed, M.M.; El-Shazly, S.A.; Sayed, S.M. and Amer, S.A., 2013**. Molecular study of energy related mitochondrial genes in Arabian and Bactrian camels. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. Vol. 9, pp: 61-70.

۹. **Ansari-Renani, H.; Salehi, M.; Ebadi, Z. and Moradi, M.S., 2010.** Identification of hair follicle characteristics and activity of one and two humped camels. Small Ruminant Research. Vol. 90, No. 1, pp: 64-70**.**

۱۰. **Bahbahani, H.; Musa, H.; Wragg, H.; Shuiep, D.; Almathen, E. and Hanotte, O., 2019**. Genome Diversity and Signatures of Selection for Production and Performance Traits in Dromedary Camels. Frontiers in genetics. Vol. 10, pp: 893.

۱۱. **Cui, P.; Ji, R. and Ding, F., 2007**. A complete mitochondrial genome sequence of the wild two-humped camel (*Camelus bactrianus ferus*). J evolutionary history of camelidae. BMC Genomics. Vol. 8, pp: 241

۱۲. **Duchemin, S.I.; Colombani, C.; Legarra, A.; Baloche, G.; Larroque, H. and Astruc, J.M., 2011.** Genomic selection in the French Lacaune dairy sheep breed. J Dairy Sci. Vol. 95, pp: 2723-2733.

۱۳. **Hall, T.A. and Carlsbad, C., 2011**. BioEdit: important software for molecular biology. GERF Bulletin of Biosciences. Vol. 2, No. 1, pp: 60-61.

۱۴. **Hayes, B.J.; Bowman, P.J.; Chamberlain, A.J. and Goddard, M.E., 2009**. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. J Dairy Sci. Vol. 92, pp: 433-443.

۱۵. **FAO. 2019.** Faostat database collections Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize.

۱۶. **Heshmati, G.A. and Squires, V.R., 2013**. Combating desertification in Asia, Africa and the Middle East. Springer.

۱۷. **Hashim, M.W.; Galal, Y.M.; Ali, M.; Khalafalla, A. and Hamid, A.S., 2015**. Dromedary camels in Sudan, types and sub types, distribution and movement. Int. J. Pharm. Res. Anal. Vol. 5, pp: 8-12.

۱۸. **Ji, R.; Cui, P.; FDing, P.; Geng, H.; Gao, H.; Zhang, J.; Yu, S.; Hu, A. 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. Vol. 40, pp: 377-382.

۱۹. **Khalkhali-Evrigh, R.; Hafezian, S.H.; Hedayat-Evrigh, N.; Farhadi, A. and Bakhtiarizadeh, M.R., 2018.** Genetic variants analysis of three dromedary camels using whole genome sequencing data. PloS one. Vol. 13, No. 9, pp: 102-109.

۲۰. **Lehane, S., 2014.** The Iranian water crisis. Future Directions international.http://www.futuredirections.org.au/publication/the-iranian-water-crisis.

۲۱. **Muhire, BM.; Varsani, A. and Martin, D.P., 2014.** SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. PLoS ONE. Vol. 9, No. 9, pp: 119-123.

۲۲. **Musa, H.; Shuiep, H. and El-Zubeir, E.S., 2006.** Camel husbandry among pastoralists in Darfur, Western Sudan. Nomadic Peoples. Vol. 10, pp: 101-105.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122277

۲۳. **Patwardhan, A.; Ray, S. and Roy, A., 2014.** Molecular markers in phylogenetic studies-A Review. J Phylogenetics Evol Biol. Vol. 131, No. 2, pp: 1-9.

۲۴. **Romli, F.; Abu, N.; Khorshid, F.A.; Syed Najmuddin, S.U.; Keong, Y.S. and Mohamad, N.E.l., 2016.** The Growth Inhibitory Potential and Antimetastatic Effect of Camel Urine on Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo. Integr Cancer Ther.

۲۵. **Ramos-Onsins, S.E. and Rozas, J., 2002.** Statistical properties of new neutrality tests against population growth. Molecular Biology and Evolution. Vol. 19, No. 12, pp: 2092-2100.

۲۶. **Brejnev, M.M.; Varsani, A. and Patrick Martin, D., 2014.** SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation.

۲۷. **Tribout, T.; Larzul, C. and Phocas, F., 2012**. Efficiency of genomic selection in a purebred pig male line. J Anim Sci. Vol. 90, pp: 4164-4176.

۲۸. **Tsogtgerel, M.B.; Munkhtogtokh, S. and Nansalmaa, L.S., 2017.** 16S rRNA Gene Sequence Analysis of Snow Leopard, Gray Wolf, Horse and Bactrian camel in Mongolia. Journal of Agricultural Science and Technology. VoL. 7, pp: 56-66.

۲۹. **Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S., 2011**. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution. Vol. 28, pp: 2731-273.

۳۰. **Van de Peer, Y., 2009.** Phylogenetic inference based on distance methods: Theory.

۳۱. **Lemey, P.; Salemi, M. and Van Damme, A.M., 2009.**The phylogenetic handbook: a pratical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. Cambridge University Press. pp: 142-160.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122277

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 4, Winter 2020

Genetic and phylogenetic analysis of 16s rRNA region in *Camelus dromedaries* and *Camelus bactrianus* of Iran

- **Azadeh Torabi*:** Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran
- **Zahra Roudbari:** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran

Received: July 2020 Accepted: October 2020

Keywords: Mitochondrial DNA, Genetic Diversity, 16s rRNA gene, Camel

Abstract

Camel is a resistant species to drought and cold weather and produces milk and meat in harshest environmental condition. Camel population has been decreasing during last decades in Iran, and genetic studies are quite necessary for considering the conservation and productivity of this species. The aim of this study was to bioinformatics and phylogenetic analysis of mitochondrial sequence of 16sr RNA gene in Iranian *camelus dromedaries* and *Camelus bactrianus.* In the present study, the blood samples were collected from 10 Bactrian and 10 dromedary camels, and DNA was extracted; the mitochondrial 16S rRNA gene with 1512 bp was amplified using specific primers. Sequencing was performed by automated Sanger method. Then complete nucleotide sequencing of Iranian two-humped and one-humped camels was performed by Sangar automatic method and then the obtained sequences were compared with the sequences obtained from other studies. The results showed that the nucleotide similarity of 16S mitochondrial rRNA gene with the complete sequence of other camels in the World Bank of the gene was calculated to be 93.98 to 100%. Comparison of nucleotide sequence, construct of the genetic distance matrix and drawing of phylogenetic tree, the complete sequence obtained genetic distance analysis showed that Iranian one-humped camels are most similar to Arabian one-humped camels and Iranian double-humped camels are most similar to western two-humped camels. The drawing of this tree also showed that the population of Iranian camels is a monophyletic group.

* Corresponding Author's email: azadehtorabi@gmail.com