

بررسی مولکولی ژن‌های میتوکندریایی دخیل در زنجیره انتقال الکترون در دو گونه شتر ایرانی

مرجان ازغندی^۱، مجتبی طهمورث‌پور^{۲*} و علی جوادمنش^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۱۱)

چکیده

هدف از این مطالعه توالی‌یابی برخی از ژن‌های میتوکندریایی دخیل در زنجیره انتقال الکترون شامل: NADH دهیدروژناز با زیرواحدهای ۱، ۵ و ۶، زیرواحد ۱ سیتوکروم اکسیداز C و زیرواحد ۶ ATP سنتاز در شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی بود. برای انجام این پژوهش ده و پانزده نمونه خون به ترتیب از شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه و به‌طور جداگانه از کشتارگاه مشهد و مرکز اصلاح نژاد مشکین‌شهر گردآوری شد. پس از استخراج DNA، قطعه‌های مورد نظر به روش PCR افزایش و توالی‌یابی شدند. نتایج بررسی تغییرپذیری اسیدآمینهای بین دو گونه شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی نشان داد که بیشترین تغییرپذیری مشاهده‌شده مربوط به ژن ATP6 بود. کمترین تغییرپذیری مشاهده‌شده نیز مربوط به ژن سیتوکروم اکسیداز C بود. نتایج درخت تبارزایی (فیلوژنی) نشان داد، گونه شتر ایرانی، در میان گونه‌های شترسانان دارای توالی ثبت‌شده، بیشترین همانندی را با شترهای عربی دارد. با توجه به درخت‌های ترسیم‌شده برای هر یک از ژن‌ها به‌طور جداگانه و پیوسته (مجموعه این ژن‌ها) می‌توان نتیجه‌گیری کرد که برای انجام بررسی‌های تبارزایی، استفاده از هر یک از این ژن‌ها به‌صورت جداگانه و یا استفاده از مجموعه آن‌ها نتیجه همسانی دارد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که با استفاده از یکی از این ژن‌ها نیز می‌توان بررسی‌های تبارزایی شایان‌پذیرشی را انجام داد.

واژه‌های کلیدی: زنجیره انتقال الکترون، ژن‌نامه میتوکندری، شتر ایرانی، تبارزایی.

Molecular study of mitochondrial electron transport chain genes in Iranian single and double humped camels

Marjan Azghandi¹, Mojtaba Tahmoorespour^{2*} and Ali Javadmanesh³

1, 2, 3. M.Sc. Student, Professor and Assistant Professor of Animal Genetics and Breeding, department of Animal science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: Jul. 10, 2015 - Accepted: Nov. 1, 2016)

ABSTRACT

The present study aimed to determine the sequence of mitochondrial DNA genes encoding NADH dehydrogenase subunits 1, 5 and 6, cytochrome c oxidase subunit 1 and ATP synthase subunit 6 in the Iranian single and double humped camels. In this study, 10 Dromedary blood samples from Mashhad slaughter house, and 15 blood Bacterian camel's Meshkinshahr Breeding Center samples from were collected. After DNA extraction, the regions of mtDNA was amplified by PCR and sequenced by chain termination method. Results showed that, the energy-related mitochondrial genes showed amino acid substitutions according to their roles in energy metabolism in both camels. ATP6 acquired the greatest changes because it controls the majority of energy production, and the COX1 acquired the lowest changes. The phylogenetic test results showed that Iranian camels have the lowest genetic distance with Arabian camels. Furthermore, it can be concluded that using either individual genes or a set of genes to draw a phylogenetic tree will lead to the same result. Therefore, to perform phylogenetic studies, we can propose that using only one of these genes can generate a tree, which represents a group of genes.

Keywords: Electron transport chain, Iranian camels, mitochondrial genome, phylogeny.

مقدمه

جنس شتر^۱، به دو گونه شتر تک‌کوهان^۲ و دوکوهان^۳ تقسیم می‌شود که به ترتیب ساکن آفریقای شمالی و آسیای مرکزی است. این حیوان به‌عنوان یک گونه اقتصادی بسیار مهم به‌ویژه در نواحی بیابانی سراسر جهان مطرح است (Ahmed *et al.*, 2013). شتر انرژی مورد نیاز خود را در قالب بافت چربی در نواحی مختلف بدن از جمله کوهان و ناحیه شکمی ذخیره می‌کند و به همین خاطر می‌تواند بدون خوردن غذا مدت زمان زیادی زندگی کند (Kadim *et al.*, 2002). این حیوان ویژگی‌های منحصر به فردی دارد که باعث سازگاری آن با نواحی بیابانی می‌شود (Ahmed *et al.*, 2013). با وجود اهمیت اقتصادی، فرهنگی و زیستی (بیولوژیکی) این حیوان، بررسی‌های مولکولی مبتنی بر ژن‌نامه (ژنوم) شتر بسیار محدود بوده و اطلاعات بسیار اندکی به‌ویژه در مورد شتر ایرانی در دسترس است. امروزه روش‌های مولکولی، مانند توالی‌یابی ژن‌نامه میتوکندری (mtDNA) یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین رابطه تبارزایی (فیلوژنتیکی) بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم به‌شمار می‌آید (Bruford *et al.*, 2003; Meadows *et al.*, 2011).

ژن‌نامه میتوکندری برهمکنش شناخته‌شده‌ای با محیط ندارد، لذا به‌نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی به‌دست‌آمده بازتابی از وجود جدایی تولیدمثلی باشد (Ovenden *et al.*, 1994). ژن‌نامه میتوکندری در ساختار و عملکرد در مقایسه با ژن‌نامه هسته ساده بوده و همه افراد mtDNA همسان والد ماده خود را حمل می‌کنند و این بدان معنی است که یک نوع منفرد از مولکول با تولیدمثل به ارث می‌رسد (Aderson *et al.*, 1981). میتوکندری در سیتوپلاسم یاخته‌ای واقع شده و نقش اصلی را در زندگی و مرگ یاخته‌ای ایفا می‌کند (Nesheva, 2014). بیش از ۹۵ درصد انرژی یاخته‌های یوکاریوتی توسط این اندامک تأمین می‌شود (Fonseca *et al.*, 2008). میتوکندری به واسطه تأمین انرژی مورد نیاز یاخته و شرکت

مستقیم در طیف گسترده‌ای از رخدادهای یاخته‌ای مانند: نشانه (سیگنال)‌های یاخته‌ای، سوخت‌وساز (متابولیسم)، زنده‌مانی و مسیر مرگ‌ومیر یاخته‌ای، نقش اساسی در حفظ هموستاز یاخته‌ای ایفا می‌کند (Wang *et al.*, 2015).

تاکنون بیشتر بررسی‌های تبارزایی انجام‌شده بر مبنای توالی‌یابی ناحیه کنترل (D-Loop) و سیتوکرم b صورت گرفته است درحالی‌که این دو ناحیه کمتر از ۱۲ درصد از ژن‌نامه میتوکندری را شامل می‌شوند (Meadows *et al.*, 2011). چون میتوکندری مسئول تولید ۹۵ درصد انرژی مورد نیاز یاخته است، در نتیجه هرگونه تنوعی در ژن‌های کدکننده پروتئین درگیر در فسفرافزایی (فسفوریلاسیون) اکسایشی (اکسیداتیو) در میتوکندری می‌تواند به‌طور مستقیم سوخت‌وساز و عملکرد بدن را تحت تأثیر قرار دهد. نظر به اهمیت این مسیر بیوشیمیایی بررسی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دخیل در این مسیر می‌تواند بینشی کلیدی در مورد تکامل mtDNA و قدرت سازگاری موجودهای مختلف با شرایط محیطی را ارائه دهد (Fonseca *et al.*, 2008).

پروتئین‌های دخیل در فسفرافزایی اکسایشی که توسط میتوکندری کد می‌شوند عبارت‌اند از: هفت زیرواحد از NADH دهیدروژناز (ND، ۱، ۲، ۳، ۴، ۴L، ۵ و ۶)، سیتوکرم ب (CytB)، سه زیر واحد از سیتوکرم اکسیداز سی (COX، ۱، ۲ و ۳) و دو زیر واحد از ATP سنتاز (ATP6 و ATP8) (Saraste, 1999).

کمپلکس تنفسی I (NADH) یک نقطه ورودی در زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری بسیاری از یوکاریوتی‌ها بوده و یک نقطه آغاز برای انتقال انرژی است (Bridges *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2013). NADH دهیدروژناز نخستین و بزرگ‌ترین کمپلکس آنزیمی درگیر در زنجیره تنفسی است و الکترون ناشی از اکسایش (اکسیداسیون) NADH را دریافت می‌کند (Fonseca *et al.*, 2008).

سیتوکرم اکسیداز سی (COX) یک کمپلکس نهای در زنجیره انتقال الکترون است و در غشای درونی میتوکندری واقع شده است. زیرواحدهای سیتوکرم اکسیداز سی (زیرواحد I، II و III) توسط

1. Camelidae
2. Camelus dromedaries
3. Camelus bactrianus

به‌دست‌آمده برای این نژادها در بانک جهانی ژن نیز ثبت شود.

مواد و روش‌ها

نمونه خون شترهای یک‌کوهانه و دوکوهانه بومی ایران به ترتیب از کشتارگاه مشهد و ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اردبیل، تهیه و به ترتیب شمار ده و پانزده نمونه خون انتخاب شد (در مورد نمونه‌های تهیه‌شده از ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اردبیل همه نمونه‌ها با اطمینان از نداشتن رابطه خویشاوندی انتخاب شدند). نمونه‌ها تا هنگام استخراج در لوله‌های حاوی EDTA و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس زیر صفر نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت Bioneer آمریکا (Cat. NO: K-3032) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده به روش طیف‌سنجی با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتوفتومتر) Nano Drop-ND 2000 (شرکت Thermo آمریکا) و الکتروفورز ژل آگارز سنجیده شد. طراحی آغازگرها برای افزایش ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار 5 primer premier و ژن‌نامه کامل میتوکندری شتر (شماره دسترسی NC_009628 برای شتر دوکوهانه و NC_009849 برای شتر تک‌کوهانه) انجام شد. توالی آغازگرهای طراحی‌شده در جدول ۱ مشاهده می‌شود. لازم به یادآوری است که برای ژن‌های با طول بیش از ۱۰۰۰ نوکلئوتید ۲ جفت آغازگر (پرایمر) طراحی شد.

ژن‌نامه میتوکندری کدگذاری می‌شوند. فعالیت عمده COX جلوگیری از تجمع بیش‌ازحد گونه‌های اکسیژن فعال است (Ahmed *et al.*, 2013).

ATP سنتاز یکی از مهم‌ترین موتورهای مولکولی در یاخته زنده بوده و به‌عنوان کوچک‌ترین محرک الکتریکی ماکرومولکولی در طبیعت شناخته می‌شود (Romanovsk & Tikhonov, 2010)، و یک مکان خاص را در میان ماکرومولکول‌های مبدل انرژی اشغال کرده است و بیشتر مولکول‌های ATP مورد نیاز یاخته توسط این کمپلکس پروتئینی ساخت (سنتز) می‌شوند (Ahmed *et al.*, 2013).

توالی‌های مربوط به ژن‌های ND1، ND5، ND6، COX1 و ATP6 ثبت‌شده در بانک ژن، مربوط به گونه شترهای عربی بوده و تا کنون هیچ بررسی مبنی بر توالی‌یابی این ژن‌ها در دو گونه شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی انجام نشده است. با توجه به موارد یادشده شناسایی توالی این مناطق به‌عنوان مشخصه ژنتیکی ثابت به‌شمار می‌آید و می‌تواند به تهیه شناسنامه ژنتیکی و نگهداری خلوص نژادهای بومی کمک فراوانی کند. هدف از این تحقیق، تعیین توالی ژن‌های میتوکندریایی دخیل در زنجیره انتقال الکترون (ND1، ND5، ND6، COX1، ATP6) در دو گونه شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی و بررسی تفاوت‌های ژنتیکی این نژادها با دیگر گونه‌ها بود تا افزون بر به‌دست آوردن اطلاعاتی از وضعیت توالی این نواحی از ژن‌نامه میتوکندری شتر ایرانی، توالی

جدول ۱. ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده برای افزایش ژن‌های میتوکندریایی شتر

Table 1. PCR primers used for amplification of camel mitochondrial genes

Gene		Sequence (5'-3')	PCR product length (bp)	Annealing temperature (°C)
ND1	Forward	TCCAGGTCGGTTTCTATCTAT	1023	60
	Reverse	AGTAGCAGTGTTTTGGCTACG		
ND5	Forward	CGCAACCTTTACTACTTACA	960	61
	Reverse	AAGTGAGGCTGGTTGATGC		
ND6	Forward	CATTATTTACAGCCCTTTGCG	1073	59
	Reverse	TTAGTGAGGAGGCAATGGG		
ND6	Forward	CTAGACCTACTTTGACTGGAG	954	58
	Reverse	GTGTGCGACTGAAGAGAAG		
COX1	Forward	ACTGGCTTCAATCTACTTCTC	765	58
	Reverse	AGAGAACGGCAGTGATTAG		
ATP6	Forward	TTGAAGCAGGAGCAGGCAC	988	62
	Reverse	TAGGCATCGGGTAGTCAGAG		
ATP6	Forward	GAAACTCTTAGTTTCGACTCC	1215	58
	Reverse	TACATAGGCTTGGATCATAGC		

رسم شد. برای تعیین تک‌جور (هاپلوتیپ)ها در توالی‌های مورد بررسی از نرم‌افزار dnasp5 استفاده شد (Librado & Rozas, 2009).

نتایج و بحث

استخراج DNA از همه نمونه‌ها با موفقیت انجام گرفت. نتایج طیف‌سنجی نیز نشان داد که DNA استخراج‌شده کیفیت مناسبی دارد. الکتروفورز محصولات افزایش‌شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد نشان داد که آغازگرهای طراحی‌شده به‌خوبی فعالیت کرده و قطعه‌های اختصاصی را برای همه ژن‌ها به‌خوبی افزایش کردند. تعیین توالی قطعه‌های مورد بررسی برای همه نمونه‌ها انجام گرفت و نتایج به‌دست‌آمده از توالی‌های مربوط به نمونه‌ها از لحاظ کیفیت توالی‌یابی برای هر باز، توسط نرم‌افزارهای CLC Main workbench 5.5 ارزیابی شد. نتایج نشان داد که توالی‌یابی برای همه نمونه‌ها با کیفیت بسیار بالایی صورت گرفته است. تجزیه و تحلیل توالی‌ها به کمک نرم‌افزار dnasp5 وجود تک‌جورهایی را در جمعیت شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه مورد بررسی در این بررسی را ثابت کرد (جدول ۲). لازم به یادآوری است که در هیچ‌یک از تک‌جورهای مشاهده شده، تغییر نوکلئوتیدی منجر به تغییر اسیدآمینه نشده بود. با توجه به هاپلوتیپ‌های به‌دست‌آمده، توالی مورد توافق برای شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه به‌صورت جداگانه برای هرکدام از ژن‌ها به کمک نرم‌افزار CLC Main workbench 5.5 به‌دست آمد و ترکیب نوکلئوتیدی این توالی‌ها نیز محاسبه (جدول ۳) و برای انجام دیگر بررسی‌های اطلاعات زیستی (بیوانفورماتیکی) از توالی‌های مورد توافق به‌دست‌آمده استفاده شد.

جدول ۲. تک‌جورهای مشاهده‌شده در نمونه‌های مورد بررسی

Table 2. Haplotype observed in the studied samples

Gene	Haplotype identified in Camelus dromedaries	Haplotype identified in Camelus bactrianus
ND1	0	1
ND5	1	2
ND6	2	0
COX1	4	3
ATP6	1	1

آنگاه، با استفاده از رویه BLAST، میزان همپوشانی آن‌ها با توالی‌های موجود مقایسه شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای افزایش قطعه‌های مورد نظر توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal آلمان انجام شد. اجزای واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در جدول ۲ نشان داده شده است و برنامه گرمایی نیز عبارت بود از: واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای سی ثانیه، اتصال در دمای اتصال (جدول ۱) برای سی ثانیه، افزایش در دمای ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه در ۳۴ چرخه (سیکل)، یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای ده دقیقه و یک مرحله افزایش نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ده دقیقه. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش خودکاری (اتوماتیک) سانگر توالی‌یابی شدند (MacroGen کره جنوبی). در آغاز کیفیت نتایج تعیین توالی به کمک برنامه CLC Main workbench 5.5 بررسی شد (<http://www.clcbio.com>). سپس با استفاده از ابزار BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI میزان همساختی (همولوژی) توالی‌های به‌دست‌آمده سنجیده شد (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). به‌منظور بررسی رابطه تبارزایی نژادهای مورد بررسی، نمودار درختی با استفاده از رویه Neighbor-Joining و با ۱۰۰۰۰ تکرار برای تک‌تک ژن‌های مورد بررسی به کمک نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 8 (<http://www.clcbio.com>) ترسیم شد افزون بر این به منظور بررسی این موضوع که آیا برای انجام بررسی‌های تبارزایی استفاده از یکی از این ژن‌ها به‌صورت تکی و یا مجموعه این ژن‌ها تفاوتی خواهد داشت یا خیر؟ توالی تک‌تک ژن‌های مورد بررسی در دو گونه شتر ایرانی و توالی‌های مرجع (رفرنس) ثبت‌شده برای گونه‌های شترسانان، به کمک نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 8 پشت سر هم قرار داده شد و دوباره درخت تبارزایی برای مجموعه این ژن‌ها به روش Neighbor joining و با ۱۰۰۰۰ تکرار

جدول ۳. درصد فراوانی نسبی نوکلئوتیدها در نواحی مورد بررسی در شترهای تک‌کوهان و دوکوهان ایرانی

Table 3. The frequency of nucleotide distribution of studied genes in Bactrianus and Dromedaries camels

Gene	Adenine (%A)	Thymine (%T)	Cytosine (%C)	Guanine (%G)	A+T%	C+G%
ND1 Camelus dromedaries Camelus bactrianus	28.1	25.7	32.2	13.9	53.9	46.1
	27.8	26.9	31.2	14.1	54.6	45.4
ND5 Camelus dromedaries Camelus bactrianus	30.3	28.4	28.8	12.5	58.7	41.3
	30.3	27.9	29.0	12.7	58.2	41.8
ND6 Camelus dromedaries Camelus bactrianus	39.2	21.0	29.5	10.2	60.2	39.8
	40.0	20.5	30.3	9.3	60.4	39.6
COX1 Camelus dromedaries Camelus bactrianus	25.9	30.5	25.0	18.6	56.4	43.6
	25.6	30.5	24.9	19.0	56.1	43.9
ATP6 Camelus dromedaries Camelus bactrianus	30.2	30.1	26.9	12.8	60.4	39.6
	31.0	28.8	27.6	12.6	59.8	40.2

درصد، بیشترین همسانی را با توالی‌های به‌دست‌آمده داشتند که این نتایج دلالت بر این دارد که این نواحی حفاظت شده بوده و تغییرپذیری نوکلئوتیدی در آن‌ها به‌ندرت رخ می‌دهد. نتایج مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده برای شترهای تک‌کوهان و دوکوهان با توالی‌های مرجع ثبت‌شده در پایگاه NCBI (شماره‌های دسترسی NC_009849 و NC_009628) به ترتیب برای شترهای تک‌کوهان عربی و دوکوهان باختری) و شترهای تک‌کوهان و دوکوهان به دست آمده باهم به ترتیب در جدول‌های ۴ و ۵ آورده شده است.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود درصد باز گوانین بسیار پایین به‌دست آمده است که این نتایج با بررسی Ahmad *et al.* (2013) همخوانی دارد، افزون بر این بررسی‌های پیشین نیز گزارش کرده‌اند که شمار کم باز گوانین در رشته سبک ژن‌نامه میتوکندری یکی از ویژگی‌های مشترک در بین چندپاخته‌ای‌ها است (Asakawa *et al.*, 1991). در ادامه با استفاده از ابزار BLAST درصد همسانی توالی‌های نواحی مورد بررسی در شترهای ایرانی با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه NCBI تعیین شد، که بیشتر توالی‌های ثبت‌شده در سطح ۱۰۰

جدول ۴. مقایسه تفاوت نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای مورد توافق شترهای تک‌کوهان و دوکوهان مورد بررسی با توالی‌های مرجع

Table 4. Comparison of Nucleotide and Amino acid substitutions among consensus sequence and reference sequences

Gene	Nucleotide substitutions		Amino acid substitutions	
	Camelus dromedaries	Camelus bactrianus	Camelus dromedaries	Camelus bactrianus
ND1	1 (position 29)	0	1	0
ND5	10 (position 243, 984, 1053, 1095, 1107, 1173, 1260, 1565, 1677 and 1704)	3 (position 663, 1297 and 1631)	1	2
ND6	0	0	0	0
COX1	6 (position 48, 103, 294, 336, 601 and 801)	1 (position 489)	1	0
ATP6	2 (position 125 and 127)	2 (position 183 and 297)	1	0

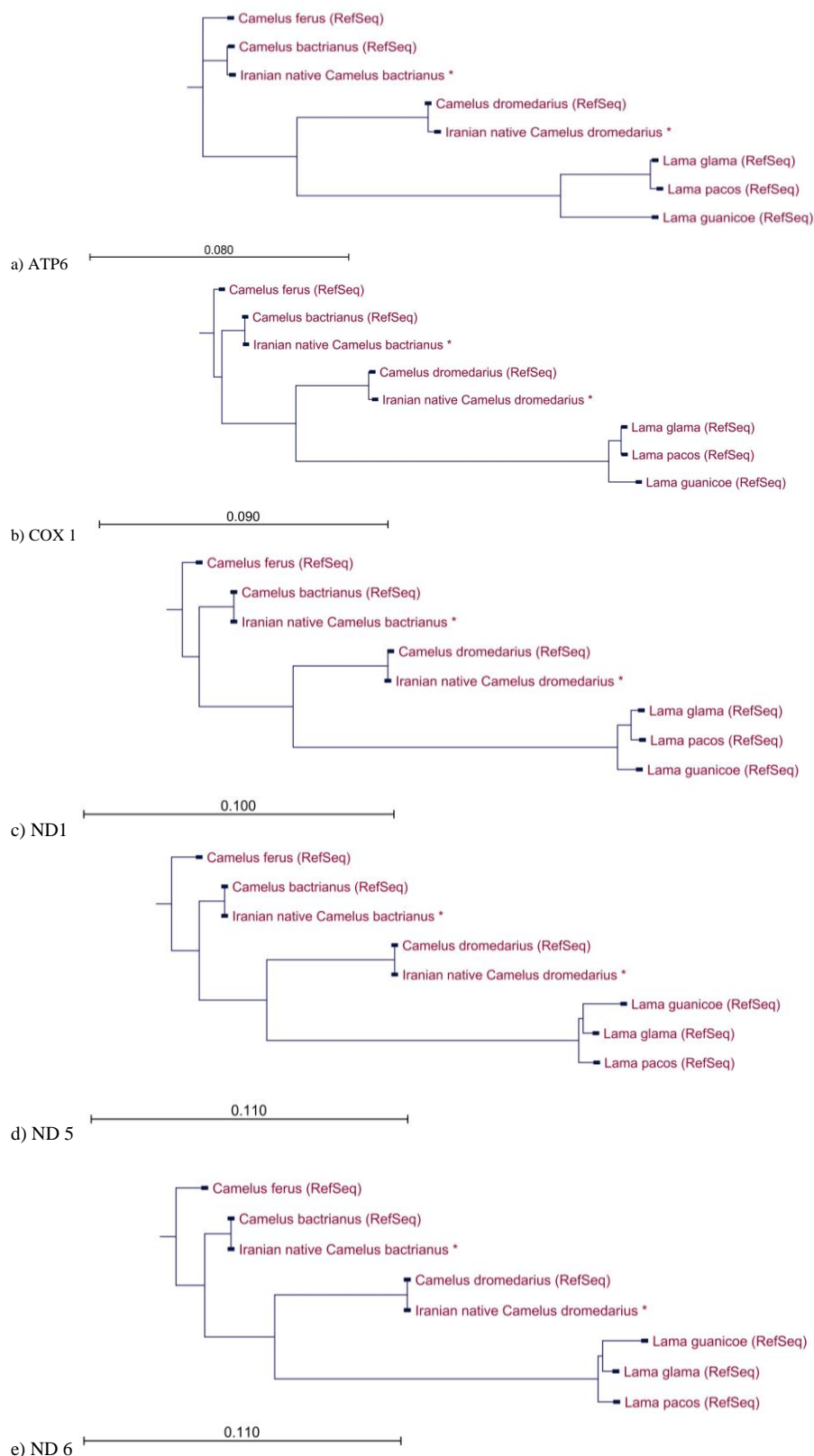
جدول ۵. مقایسه تغییرپذیری نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای بین شترهای تک‌کوهان و دوکوهان مورد بررسی در این تحقیق

Table 5. Comparison of Nucleotide and Amino acid substitutions among Camelus dromedaries and Camelus bactrianus

Gene	Size of sequenced fragment (bp)	Nucleotide substitutions	Amino acid substitutions
ND1	957	79	2
ND5	1820	160	20
ND6	528	48	5
COX1	1545	102	1
ATP6	681	57	8

نوکلئوتیدی بسیار کمی وجود دارد که این موضوع، می‌تواند به دلیل نزدیکی جغرافیایی و یا تفرق این دو جمعیت در فاصله زمانی کم باشد، که نتایج درخت تبارزایی (شکل ۱) نیز تأییدکننده این موضوع است.

همان‌طور که در جدول ۴ مشخص است بین توالی‌های به‌دست‌آمده از شتر تک‌کوهان و دوکوهان ایرانی با توالی‌های مرجع ثبت‌شده در بانک جهانی ژن که مربوط به شترهای عربی هستند، اختلاف



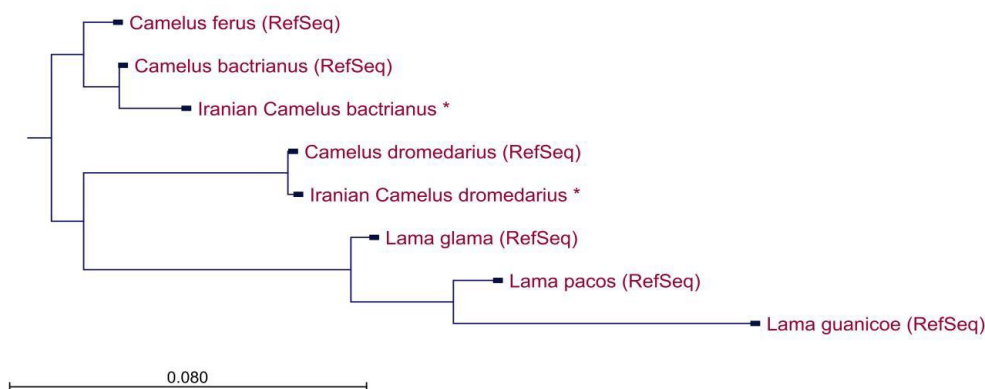
شکل ۱. درخت تبارزایی رسم شده به روش Neighbor joining و با ۱۰۰۰۰ تکرار، به کمک نرم افزار CLC Genomics Workbench 8 مربوط به ژن های مورد بررسی در این پژوهش در دو گونه شتر تک کوهانه و دو کوهانه ایران با توالی های مرجع ثبت شده برای آنها، قسمت های a، b، c، d و e به ترتیب مربوط به ژن های ATP6، COX1، ND1، ND5 و ND6 است.

Figure 1. Phylogenetic tree of study genes in Bactrianus and Dromedaries camels and reference sequences, using CLC Genomics Workbench 8 Software and Neighbor joining method with 10000 replications. The part a, b, c, d and e for ND1, ND5, ND6 and COX1 gene respectively.

تغییرپذیری اسیدآمینه‌ای نیز مربوط به ژن ATP6 است، چون این ژن به‌عنوان یکی از کمپلکس‌های ساخت‌کننده ATP، بیشتر مولکول‌های ATP مورد نیاز یاخته را ساخت می‌کند (Feldkamp *et al.*, 2005)، و با توجه به فنوتیپ متفاوت دو گونه شتر شاید بتوان درصد بالای تغییر اسیدآمینه‌ای در این ژن را به نیاز متفاوت انرژی در این دو گونه نسبت داد.

همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است در همه درخت‌های رسم‌شده، شتر تک‌کوهانه ایرانی و توالی مرجع ثبت‌شده برای این‌گونه (شماره دسترسی NC_009849، شتر عربی) در یک کلاد^۱ و شتر دوکوهانه ایرانی و توالی مرجع ثبت‌شده برای آن (شماره دسترسی NC_009628، شتر عربی) نیز در یک کلاد قرار گرفته‌اند. درخت فیلوژنتیک رسم‌شده برای همه قطعه‌های ژنی نیز رسم شد (شکل ۲).

با توجه به جدول ۵ می‌توان نتیجه گرفت، اختلاف اسیدآمینه‌ای در ژن ND1 بین دو گونه شتر ایرانی بسیار کم است. چون ND1 یک نقطه آغاز برای انتقال انرژی است (Bridges *et al.*, 2010) شاید بتوان این اختلاف کم را به نقش بیوشیمیایی همسان این پروتئین در دو گونه شتر نسبت داد. بیشترین تغییرپذیری نوکلئوتیدی مشاهده‌شده مربوط به ژن ND6 بوده و بیشتر تغییرپذیری نوکلئوتیدی مشاهده‌شده در COX1 در کدون شماره ۳ رخ داده است، در نتیجه تغییر اسیدآمینه‌ای کمی بین دو گونه شتر مشاهده می‌شود، سیتوکرم اکسیداز C در زنجیره انتقال الکترون، از تجمع بیش‌ازحد گونه‌های اکسیژن فعال جلوگیری می‌کند (Chen *et al.*, 2009)، که ممکن است این امر توضیح همانندی محتویات اسیدآمینه‌ای در هر دو گونه شتر باشد. بیشترین درصد



شکل ۲. درخت تبارزایی رسم‌شده به روش Neighbor joining و با ۱۰۰۰۰ تکرار، به کمک نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 8. درخت رسم‌شده مربوط به مجموعه همه ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش، در دو گونه شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی و توالی‌های مرجع ثبت‌شده برای گونه‌های شترسانان است.

Figure 2. Phylogenetic tree of all of study genes in Bactrianus and Dromedaries camels and reference sequences, using CLC Genomics Workbench 8 Software and Neighbor joining method with 10000 replications.

بررسی‌های تبارزایی استفاده از یکی از این ژن‌ها و یا استفاده از مجموعه این ژن‌ها باهم، نتیجه همسانی را در پی خواهد داشت، در نتیجه می‌توان پیشنهاد کرد که برای انجام بررسی‌های آینده، با استفاده از یکی از این ژن‌ها نیز می‌توان به بررسی رابطه‌های تبارزایی پرداخت و نتایج شایان‌پذیرشی را ارائه کرد.

با توجه به شکل ۲ به کلی مشخص است که شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی با توالی‌های مرجع ثبت‌شده برای آن‌ها (شتر عربی) هرکدام در یک کلاد قرار گرفته‌اند. از مقایسه این شکل با درخت‌های رسم‌شده برای هرکدام از ژن‌ها به‌صورت جداگانه (شکل ۱) می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که برای انجام

نتیجه‌گیری

توالی‌یابی ژن‌های ND1، ND5، ND6، COX1 و ATP6 در دو گونه شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی برای نخستین بار انجام شد. نتایج بررسی‌های تبارزایی روی ژن‌های مورد بررسی نشان داد که ارتباط نزدیکی بین شترهای بومی ایران و شترهای عربی وجود دارد. با توجه به نتایج درخت‌های تبارزایی رسم‌شده (شکل‌های ۱ و ۲)، می‌توان پیشنهاد کرد که برای بررسی رابطه تبارزایی بین گونه‌ها نیاز به بررسی مجموعه این ژن‌های میتوکندریایی نبوده و با بررسی روی یکی از این ژن‌ها نیز می‌توان به بررسی رابطه تبارزایی پرداخت.

تغییر اسیدآمینه‌ای موجود در ژن‌های میتوکندریایی، با توجه به نقش آن‌ها در سوخت‌وساز انرژی در دو گونه شتر ایرانی متفاوت است و به نظر می‌رسد که این تغییرها با فنوتیپ متفاوت و در نتیجه سوخت‌وساز متفاوت انرژی در دو گونه شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی مرتبط باشد. بیشترین درصد تغییر اسیدآمینه مشاهده شده در دو گونه شتر ایرانی مربوط

به ژن ATP6 بود و از آنجایی که نقش اصلی این ژن در کنترل تولید انرژی است، در نتیجه احتمال دارد این تغییرپذیری‌ها وابسته به نیاز متفاوت انرژی در این دو گونه باشد. کمترین تغییرپذیری‌ها نیز مربوط به ژن COX1 بود، که به احتمال این شباهت بالا در بین دو گونه شتر ایرانی مربوط به نقش مهم این ژن در جلوگیری از تجمع بیش‌ازحد گونه‌های اکسیژن فعال در زنجیره انتقال الکترون است.

در کل اطلاعات ژنتیکی به دست آمده از این پژوهش، می‌تواند گامی مؤثر در راهبردهای آینده باشد و به شناسایی ژنتیکی منابع ارزشمند شترهای بومی ایران نیز کمک کند.

سپاسگزاری

از همکاری مسئولان محترم کشتارگاه مشهد و مرکز اصلاح نژاد شهر مشکین‌شهر استان اردبیل به خاطر در اختیار گذاشتن نمونه‌های خون برای اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Aderson, S., Bankiev, A. T., Barrell, B. G. & DeBruijn, M. H. L. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-65.
- Ahmed, M., El-Shazly, S., Sayed, S. & Amer, S. (2013). Molecular study of energy related mitochondrial genes in Arabian and Bactrian camels. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 9(1), 61-70.
- Asakawa, S., Kumazawa, Y., Araki, T., Himeno, H. & Miura, K. (1991). Strand-specific nucleotide composition bias in echinoderm and vertebrate mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 511-520.
- Bridges, H. R., Fearnley, I. M. & Hirst, J. (2010). The Subunit Composition of Mitochondrial NADH: Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) From *Pichia pastoris*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9, 2318-2326.
- Bruford, M., Bradley, D. & Luikart, G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, 3, 900-910.
- Chen, Y.F., Kao, C.H., Chen, Y.T., Wang, C.H. & Wu, C.Y. (2009). Cisd2 deficiency drives premature aging and causes mitochondria-mediated defects in mice. *Genes & Development*, 23, 1183-1194.
- Feldkamp, T., Kribben, A. & Weinberg, J.M. (2005). F1FO-ATPase activity and ATP dependence of mitochondrial energization in proximal tubules after hypoxia/reoxygenation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16, 1742-1751.
- Fonseca, R. R. D., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Ramos, M. J. & Antunes, A. (2008). The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics*, 9, 119.
- Kadim, I. T., Mahgoub, O., Al-Maqbaly, R. S., Annamalai, K. & Al-Ajmi, D. S. (2002). Effects of age on fatty acid composition of the hump and abdomen depot fats of the Arabian camel (*Camelus dromedarius*). *Meat Science*, 62 (2002), 245-251
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Meadows, J. R. S., Hiendleder, S. & Kijas, J. W. (2011). Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. *Heredity (Edinb)*, 106(4), 700-706.

12. Nesheva, D. V. (2014). Aspects of ancient mitochondrial DNA analysis in different populations for understanding human evolution. *Balkan journal of medical genetics*, 17(1), 5-14.
13. Ovenden, J. R. & Brasher, D. J. (1994). *Stock identity of the red (Jasus edwardsii) and green (Jasus verreauxi) rock lobsters from mitochondrial DNA analysis*. In: B.F. Phillips, J.S. Cobb. & J. Kittaka (eds), *Spiny Lobster Management*. (pp. 230-249). Blackwell Scientific.
14. Romanovsk, Y. M. & Tikhonov, A. N. (2010). Molecular energy transducers of the living cell. Proton ATP synthase: A rotating molecular motor. *Physics-Uspeski*, 53, 893-914.
15. Saraste, M. (1999). Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science*, 283, 1488-1493.
16. Wang, W. X., Visavadiya, N. P., Pandya, J. D., Nelson, P. T., Sullivan, P. G. & Springer, J. E. (2015). Mitochondria-associated microRNAs in rat hippocampus following traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 265, 84-93.