نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۲۲، بهـار ۱۳۹٦
ص‌ص: ۲۱~۲٤

بررسی تنوع ناحیه D-loop در DNA میتوکندریایی شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی

- **نعمت هدایت ایوریق** (نویسنده مسئول)
استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی
- **رضا خلخالی ایوریق**
دانشجوی دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
- **کبری پوراسد**
دانشجوی دکترای تغذیه دام، دانشگاه تهران

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۱۹۷۳۶۸۱

Email: n.hedayat@uma.ac.ir

چکیده:

هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی تنوع ناحیه D-loop در DNA میتوکندریایی شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی بود. بررسی و کاوش درباره شترها در سطح ژنومی می‌تواند به شناخت هرچه بهتر و حفظ آگاهانه آن‌ها کمک کند. در تحقیق حاضر از تعداد ٤٥ نفر شتر تک‌کوهانه که از مناطق مختلفی (ایستگاه پرورش شتر یزد، ایستگاه طرود و گله‌های سمنان) انتخاب شده بودند به همراه ۲۹ شتر دوکوهانه که از استان اردبیل گزینش شده بودند به عنوان نمونه استفاده شد. ناحیه میتوکندریایی D-loop به طول ٦۰٥ جفت باز برای این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت و برای تمامی نمونه‌ها بسط داده شده و سپس توالی‌یابی گردید. نتایج نشان دادند که ناحیه D-loop در شترهای تک‌کوهانه به صورت چشمگیری تنوع بالاتری نسبت به این ناحیه در شترهای دوکوهانه دارد. به‌طوری‌که تعداد جهش‌ها در D-loop تک‌کوهانه‌ها ٥۱ برابر بیشتر از دوکوهانه‌ها بود. تفاوت نرخ جهش در نواحی مطالعه شده، می‌تواند بدلیل فشارهای انتخابی متفاوتی باشد که دو گونه شتر تجربه کرده‌اند.

واژه‌های کلیدی: ژنوم میتوکندریایی، شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه، D-loop

Applied Animal Science Research Journal No 22 pp: 21-24

Investigation of D-loop Region Diversity in Mitochondrial DNA of Iranian Dromedary and Bactrian Camels

By: N. Hedayat evrigh[1]*, R. Khalkhali evrigh[2], K. Pourasad[3]
1: Assistant Professor, Department of Animal Science, Mohaghegh Ardabili University
2: PhD student of Genetics and Animal Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3: PhD student of Animal Nutrition, Tehran University

The aim of present study was investigation of D-loop region diversity in mitochondrial DNA of Iranian Dromedary and Bactrian camels. Investigation about camels in genome level could help to better understanding and conscious preservation of them. As samples in current study, we used 45 dromedary camels that selected from different regions (camel breeding station of Yazd, Trod station and Semnan's herds), as well as 29 Bactrian camels collected from Ardabil province. Mitochondrial region of D-loop was used for this study. A fragment of 605bp from mitochondrial DNA corresponding to D-loop was amplified and then sequenced in all samples. Results indicate that diversity of D-loop in dromedaries was significantly more than Bactrian camels. As the number of mutations in D-loop of dromedary camels were 51 times higher than Bactrian camels. The differences in the mutation rate in studied region may be due to different selective pressure that two camel species have experienced.

Key words: Mitochondrial genome, Dromedary and Bactrian camels, D-loop

مقدمه

شترها از منابع اصلی و حیاتی تولید غذا در مناطقی هستند که دیگر پستانداران توانایی زندگی و تولید در آن شرایط را دارا نیستند. علاوه بر تولید غذا، اهمیت شترها در پزشکی از طریق تولید ایمونوگلوبولین‌های منحصربفرد (Muyldermans, *et al.*, 2009) و کاربرد شیر شتر در درمان دیابت (Agrawal, *et al.*, 2011) بر کسی پوشیده نیست. شترها در طی میلیون‌ها سال به ویژگی‌هایی دست پیدا کرده‌اند که آن‌ها را برای زندگی در شرایط سخت بیابانی (سرد و گرم) مهیا کرده است. تنوع بالای اقلیمی در ایران، شرایطی را به وجود آورده است تا جزء معدود کشورهایی باشد که هر دوگونه شتر یعنی تک‌کوهانه (تکامل‌یافته برای زندگی در بیابان‌های گرم و خشک) و دوکوهانه (تکامل‌یافته برای زندگی در اقلیم‌های سرد و خشک) را در خود جای داده است. به‌دلیل تغییرات آب و هوایی و گرم شدن کره زمین و هم‌چنین مشکلات عدیده تولید آب آشامیدنی، چالش جدید علم ژنتیک و اصلاح نژاد دام، معرفی گونه‌هایی است که در حین سازگاری با چنین شرایطی، توانایی تامین نیازهای غذایی روزافزون بشر را داشته باشند. از این رو توجه به شترها و انجام مطالعاتی برای شناخت هر چه بیشتر توانایی‌های ژنتیکی این حیوان جزء زمینه‌هایی به‌نظر می‌رسد که در بین محققین مهجور مانده است. آمارها نشان می‌دهند که از سال ۲۰۰۹، جمعیت شترهای ایران دچار افت شدیدی شده‌اند (FAOSTATE, 2016; Salehi; *et al.*, 2013) که هشداری جدی برای کاهش تنوع ژنتیکی در این گونه می‌باشد. مسئله کاهش جمعیت شترها در سال‌های اخیر اگر در کنار موضوع در خطر انقراض بودن شترهای دوکوهانه ایرانی قرار بگیرد، اهمیت توجه ویژه به شترها در ایران را دو چندان می‌کند. از آن‌جایی که تفکیک جغرافیایی و طرح‌های مختلف پرورشی و اصلاحی باعث بوجود آمدن زیر جمعیت‌های گوناگون در بین دام‌های اهلی شده است (Lenstra, *et al.*, 2012)، لذا

مطالعه تنوع ژنتیکی در بین نژادهای مختلف یک گونه، از زمینه‌های پرطرفدار علمی محسوب می‌شود (Groeneveld, *et al.*, 2010). در مطالعه پیش رو برآنیم تا با استفاده از ژنوم میتوکندریایی و بررسی ناحیه D-loop به شناسایی تنوعات موجود در این ناحیه و تفاوت‌های آن در بین شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی بپردازیم.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام مطالعه حاضر، نمونه‌های خونی به‌میزان ۴ میلی‌لیتر از ورید گردنی ۷۴ نفر شتر شامل ۴۵ شتر تک‌کوهانه (۲۱، ۱۵ و ۹ نمونه به‌ترتیب از ایستگاه یزد، ایستگاه طرود و گله‌های مردمی سمنان) و ۲۹ شتر دوکوهانه (گله‌های سطح استان اردبیل) اخذ شد. بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، استخراج DNA از نمونه‌های مذکور با استفاده از RBC mini kit[1] صورت گرفت.

بسط قطعه موردنظر در PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی Forward 5' to 3': GGTCTTGTAAGCCGAAAAA ، Backward 5' to 3': ATGGACTGAATAGCACCTT که با استفاده از نرم‌افزار primer 3 طراحی شده بود، صورت گرفت. دمای اتصال پرایمر مذکور ۵۸ درجه سلسیوس بود. برای انجام واکنش PCR از ۲۵ میکرولیتر محلول واکنش استفاده شد که شامل ۱/۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۱/۵ واحد Taq DNA polymerase، ۰/۱۵ میکرومولار پرایمر پیشرو و معکوس و در نهایت ۱۰۰ نانوگرم نمونه DNA بود. بعد از انجام واکنش PCR (براساس دستورالعمل جدول ۱)، قطعات بسط یافته که حاوی ناحیه D-loop با اندازه ۶۰۵ بودند با استفاده از Invitrogen kit تخلیص شده و توالی‌یابی شدند.

پس از توالی‌یابی و آماده‌سازی داده‌ها، برای هم تراز کردن قطعات توالی‌یابی شده و مشخص کردن تنوعات موجود در این توالی‌ها از نرم افزار bioEdit v.7.0.1 (Hall, 2004) استفاده شد.

[1] Real Biotech Corporation, RBC, South Korea

جدول ۱- شرح برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر b و سیتوکروم D-loopنواحی

تعداد چرخه	واسرشت سازی	اتصال	تکثیر
۱	۹۴ درجه/ ۵ دقیقه	–	–
۳۵	۹۴ درجه/ ۴۰ ثانیه	۶۴-۵۱ درجه/ ۴۰ ثانیه	۷۲ درجه/۴۰ثانیه
۱	–	–	۷۲ درجه/ ۵ دقیقه

نتایج و بحث

اهمیت تولید و ذخیره انرژی در شترها (به‌دلیل محیط‌های کم‌غذایی که شترها در آن‌ها زندگی می‌کنند) از یک‌سو و نقش عمده میتوکندری در چرخه انرژی از سویی دیگر باعث می‌شود که مطالعه نواحی مختلف ژنوم میتوکندریایی به درک بهتر روند تکامل شترها برای استفاده بهینه از انرژی منجر شود. در مطالعه حاضر، یک قطعه از ژنوم میتوکندری به‌طول ۶۰۵ باز که در برگیرنده نواحی D-loop بود، برای شناسایی چند شکلی‌های موجود مورد بررسی قرار گرفت. هم‌ترازی قطعات توالی‌یابی شده مشخص کرد که تعداد جهش‌های شناسایی شده در ناحیه D-loop در شترهای تک‌کوهانه ۵۱ برابر بیشتر از این عدد در دوکوهانه‌ها می‌باشد که تمام این جهش‌ها در هر دوگونه از نوع informative site بودند (جدول ۲). از ۴/۴ میلیون سال قبل که شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه به‌دلیل مهاجرت اجداد مشترکشان به منطقه اوراسیا مسیر افتراق از همدیگر را شروع کردند (Wu, *et al.*, 2014) تا به امروز که دوگونه متمایز از هم هستند، فشارهای انتخابی مختلفی را پشت سر گذاشته‌اند تا ویژگی‌های لازم برای زنده‌مانی در محیط‌های زندگی‌شان را کسب کنند. علیرغم فشار تکامل که سعی در کاهش اندازه ژنوم میتوکندریایی داشته، قطعه‌ای غیرکدکننده به‌نام ناحیه کنترل در میتوکندری در مقابل این فشار نقش خود را به‌عنوان مسئول کنترل رونویسی و همانندسازی DNA میتوکندری تثبیت کرده است (Pereira, *et al.*, 2008). بخشی از ناحیه کنترل را D-loop تشکیل می‌دهد که دارای ساختار سه‌رشته‌ای می‌باشد. در مطالعه‌ای در ژنوم میتوکندریایی انسان مشخص شد که ساختارهای ثانویه‌ای در ناحیه کنترل DNA میتوکندریایی وجود دارد که تعیین‌کننده میزان نرخ جهش متفاوت

در قسمت‌های مختلف این ناحیه می‌باشد (Pereira, *et al.*, 2008). ساختارهای ثانویه در این نواحی، قسمت‌هایی تک‌رشته‌ای هستند که بروی خودشان برگشته و قسمت‌های سنجاق سرمانند ایجاد کرده‌اند. در این سنجاق سرها به‌دلیل این‌که بعضی از بازها به‌صورت جفت نشده باقی می‌مانند، به‌همین دلیل نسبت به جهش آسیب‌پذیرتر از بازهایی هستند که با باز مکمل خود پیوند برقرار کرده‌اند و از این طریق این ساختارها می‌توانند نرخ جهش را کنترل کنند (Pereira, *et al.*, 2008). با احتمال بالایی می‌توان عنوان کرد که برخی از ساختارهای مذکور محصول هزاران سال فشارهای انتخابی هستند که در جهت سازگاری هر چه بیشتر انسان با محیط اطرافش شکل گرفته‌اند. از آن‌جایی که ناحیه کنترل در ژنوم میتوکندریایی در پستانداران تا حدود زیادی دارای ساختار مشابهی است (Sbisa, *et al.*, 1997) می‌توان انتظار داشت که رفتارهای ژنوم میتوکندری در شترها نیز تا حدودی از روند موجود در انسان تبعیت کند. هرچند بیشترین سهم تکامل یک‌گونه، از ژنوم هسته‌ای منشا می‌گیرد اما ژنوم میتوکندریایی که نقش مهمی در روند تولید انرژی موجودات دارد عامل تاثیرگذاری در این‌باره به‌شمار می‌رود. این موضوع به‌خصوص در مورد شترها که در شرایط غذایی نامناسب زندگی کرده و بیشتر از نظر بهینه‌سازی تولید و ذخیره انرژی پیشتاز هستند، صدق می‌کند. تفاوت در نرخ جهش‌پذیری ناحیه D-loop در شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه را می‌توان به‌شرایط مختلف محیطی نسبت داد که دوگونه مذکور برای تحمل آن محیط‌ها سازگاری یافته‌اند. چراکه این دوگونه در مسیر تکاملی خود با فشارهای انتخابی متفاوتی برای بقا دست و پنجه نرم کرده و به آرایش ژنومی متفاوتی دست پیدا کرده‌اند. البته مطالعات تکمیلی که بتواند به بررسی ساختارهای ثانویه این نواحی در دوگونه مورد نظر بپردازد، مورد نیاز است تا بتوان با اطمینان بالاتری در این مورد بحث کرد.

جدول ۲- تنوعات موجود در ناحیه D-loop مربوط به شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایرانی

نوع تنوع در ناحیه D-loop	دوکوهانه	تک‌کوهانه
Numbers of nucleotide	605	605
Polymorphism site	1	51
Parsimony informative site	1	51
Singleton site	0	0

منابع

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. European Journal of Clinical Nutrition, 65(9): 1048-1052.

FAO. (2016). FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Available at http://faostat.fao.org [verified 20 May 2016].

Groeneveld, L. F., Lenstra, J. A. Eding, H. Toro, M. A. Scherf, B. Pilling, D. Negrini, R. Finlay, E. K. Jianlin, H. Groeneveld, E and Weigend, S. (2010). Genetic diversity in farm animals–a review. Animal Genetics, 41(s1):6-31.

Hall, T. (2004). BioEdit v. 7.0. 1. Department of Microbiology, North Carolina State University.

Lenstra, J. A., Groeneveld, L. F. Eding, H. Kantanen, J. Williams, J. L. Taberlet, P. Nicolazzi, E. L. Sölkner, J. Simianer, H. Ciani, E and Garcia, J. F. (2012). Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. Animal Genetics, 43(5):483-502.

Muyldermans, S., Baral, T. N., Retamozzo, V. C. De Baetselier, P. De Genst, E. Kinne, J. Leonhardt, H. Magez, S. Nguyen, V. K. Revets, H and Rothbauer, U. (2009) Camelid immunoglobulins and nanobody technology. Veterinary Immunology and Immunopathology, 128(1):178-183.

Pereira, F., Soares, P. Carneiro, J. Pereira, L. Richards, M. B. Samuels, D. C and Amorim, A. (2008). Evidence for variable selective pressures at a large secondary structure of the human mitochondrial DNA control region. Molecular Biology and Evolution, 25(12):2759-2770.

Salehi, M., Mirhadi, A. Ghafouri-Kesbi, F. Asadi Fozi, M. and Babak, A. (2013). An evaluation of live weight, carcass and hide characteristics in Dromedary *vs*. Bactrian×Dromedary crossbred camels. Journal Agricultural Science Techniligy,15:1121-1131.

Sbisa, E., Tanzariello, F. Reyes, A. Pesole, G and Saccone, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. Gene. 205:125–140.

Wu, H., Guang, X. Al-Fageeh, M. B. Cao, J. Pan, S. Zhou, H. Zhang, L. Abutarboush, M. H. Xing, Y. Xie, Z and Alshanqeeti, A. S. (2014). Camelid genomes reveal evolution and adaptation to desert environments. Nature Communications. 5.