



بررسی تنوع ژنتیکی در میان شترهای دو کوهانه استان اردبیل

بهزاد همتی^۱، محمد حسین بناءبازی^۲، سعید شاه کرمی^۳، المیرا مهندسان^۴ و پاملا برگر^۴

۱- دانشجویار، دانشگاه آزاد اسلام، واحد کرج، (نویسنده مسؤول: hemati@kiauo.ac.ir)

۲- استادیار، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۳- دانش آموخته کارشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۴- موسسه تحقیقات ژنتیک جمعیت، دانشگاه دامپزشکی، وین، اتریش

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۹

چکیده

شتر دو کوهانه استان اردبیل در شمال غربی ایران یک ذخیره ژنتیکی ارزشمند محسوب می شود ولی جمعیت آن به شدت رو به کاهش بوده است. از این رو هدف ما بررسی تنوع ژنتیکی میتوکندریایی در داخل این جمعیت می باشد. در ۳۷ نمونه، یک ناحیه ۵۱۸ جفت بازی از DNA میتوکندریایی (mtDNA) شامل بخشی از ژن سیتوکروم b، tRNAهای اسیدهای آمینه ترئونین و پرولین و آغاز ناحیه کنترل به طور موفقیت آمیز تکثیر و با توالی مرجع mtDNA شتر دو کوهانه هم ردیف گردید. در مجموع، ۵ ناحیه چندشکل و سه هاپلو تیپ مجزا بدست آمد. هتروژایگوسیتی برآورد شده از فراوانی های هاپلو تیپی ۰/۵۰۳ بدست آمد که حاکی از تنوع ژنتیکی بالا و دور از انتظار در داخل جمعیت شتر دو کوهانه ایرانی است. نتایج مطالعه حاضر، کاربردهای مهمی در حفظ تنوع ژنتیکی و مدیریت تولیدات دامی داشته و موجب ثبات یا افزایش بالقوه ارزش اقتصادی شتر می گردد. مطالعات بیشتر با استفاده از DNA هسته ای همچون نشانگرهای کروموزوم Y و ریزماهورها یا چندشکلی های تک نوکلئوتیدی می توانند نتایج این مطالعه را تقویت نمایند.

واژه های کلیدی: ژنوم میتوکندریایی، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، فراوانی هاپلو تیپی

مقدمه

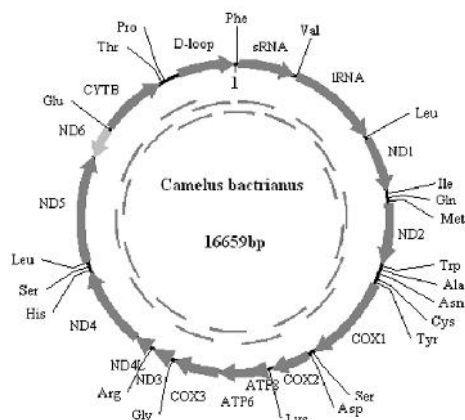
هر نژاد یا سویه حاصل فرآیندهای جهش، رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری مجزایی است که طی قرون متمادی حاصل گردیده است. فشار انتخاب در طی این زمان تحت تأثیر آب و هوا، انگل ها و بیماری های بومی، تغذیه و دخالت انسان تغییر کرده است. بنابراین می توان گفت هر نژاد مجموعه منحصر به فردی از ژن هاست که مخزن ژنی آن نژاد را می سازند. لذا تنوع درون نژادی حاکی از پتانسیل آن جمعیت برای بازسازی و نجات آن از خطر انقراض خواهد بود و مطالعه آن در اولویت مطالعات ژنتیکی حفاظت است. استفاده از نشانگرهای مولکولی و به ویژه ریزماهورها و چندشکلی های تک نوکلئوتیدی روی ژنوم کامل و ژنوم میتوکندریایی یکی از ابزارهای توانمند برای این منظور می باشد (۶). شتر دو کوهانه^۱ در سرتاسر آسیای مرکزی یافت می شود و پراکندگی شتر تک کوهانه^۲ از آسیای مرکزی و جنوب شرق آسیا تا شمال آفریقا می باشد (۱۲). جمعیت شتر دو کوهانه وحشی از دهه ۱۹۷۰ میلادی به شدت در خطر بوده و در وضعیت بحرانی^۳ قرار دارد (۱۳) و به عنوان یک گونه کمیاب و نزدیک به انقراض گزارش شده است (۱۴). جمعیت شتر دو کوهانه اهلی ایران نیز یکی از منابع ژنتیکی بسیار با ارزش و از سرمایه های ملی کشور است که به دلایلی از جمله عدم نیاز انسان به کاربری اصلی آن یعنی حمل بار و نیز احتمالاً آمیخته گری با سایر گونه های شتر و به ویژه با شترهای تک کوهانه، بیش از سایر دامها در معرض خطر انقراض قرار داشته و از سوی جامعه بین المللی حفاظت از طبیعت^۴ (ICUN) در فهرست قرمز^۵ گونه هایی است که به

شدت با کاهش جمعیت و خطر انقراض روبرو است. جمعیت شتر دو کوهانه کشور در استان های آذربایجان شرقی و اردبیل و گلستان وجود دارند (۲). در حال حاضر تعداد این شتران در کشور بسیار اندک بوده و در منطقه اصلی پراکنش آن یعنی استان های اردبیل و تعداد بسیار معدودی در استان های دیگر رسیده است (۱). شاه کرمی و همکاران (۳) تنوع ژنتیکی شتر دو کوهانه کشور (۱۱۰ نفر) را با استفاده از هفت جفت آغازگر ریزماهورهای مورد بررسی قرار دادند. در کل جمعیت تمامی مکان های ژنی مورد مطالعه انحراف معنی داری از تعادل هاردی- واینبرگ نشان دادند و تنوع ژنتیکی را با معیارهای میانگین الل های موثر و محتوای اطلاعات چند شکلی^۶ (PIC) بیان کردند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که جایگاه های مورد مطالعه از چندشکلی مناسبی در جمعیت مورد مطالعه برخوردار هستند و علیرغم اندازه بسیار کم جمعیت، این گونه همچنان از تنوع ژنتیکی قابل قبولی برخوردار است، که می تواند به حفظ آن کمک شایانی نماید. آنالیز میتوکندریایی^۷ نشان داده است که شتر دو کوهانه وحشی باقیمانده یک تبار مجزا می باشد (۱۶، ۱۷) ساختار و سازمان ناحیه D-loop برای چهار گونه شتر آمریکای جنوبی در آرژانتین توسط Mate و همکاران (۱۹، ۱۸) گزارش شد و ناهمگنی بالایی بین آنها یافت شد. توالی و ساختار کامل ژنوم میتوکندریایی برای آلاکا (۵، ۲۶)، شتر تک کوهانه و شتر دو کوهانه اهلی و وحشی در دسترس است (۹). توالی ژنومی با پوشش^۸ ۲X (۲۳)، ۱۵۱۶ جایگاه ریزماهورهای و نیز وجود ریز آرایه هایی با تراکم ۷۵۰۰۰۰ نشانگر SNP برای آلاکا امکان مطالعه بیشتر تنوع ژنتیکی شترها را تسهیل کرده است (۲۴).

1-Camelus bactrianus 2- Camelus dromedaries 3- Critically endangered 4- The International Union for Conservation of Nature (IUCN) 5- Red list 6- Polymorphic Information Content (PIC) 7- mtDNA 8- Coverage

هم‌ردیف^۳ بودند. ساختار ژنوم میتوکندریایی شتر دوکوهانه در شکل ۱ نشان داده شده است. سه توالی ژنوم میتوکندریایی به عنوان ژنوم میتوکندریایی مرجع^۴ برای *C. bactrianus* به طول ۱۶۶۵۹ تا ۱۶۶۶۷ جفت باز وجود دارند (۲۱) که از توالی ثبت شده برای نوع وحشی^۵ کوتاه‌تر است (۹).

برگر و پالامری (۸) با استفاده از توالی‌یابی شات‌گان^۱، ژنوم یک شتر نر دوکوهانه را بازسازی نمودند. با متوسط پوشش معادل ۶/۶x، ۱۱۶۰۰۰ SNP هتروزیگوت یافت شد و تنوع نوکلئوتیدی کل ژنومی مشابه با سایر چهارپایان اهلی بدست آمد. بیش از ۸۵ درصد توالی بیان شده نشان دار^۲ (EST) شتر تک‌کوهانه به طور موفقیت‌آمیزی با ژنوم حاضر



شکل ۱- ژنوم میتوکندریایی شتر دوکوهانه. ژن‌های کدکننده پروتئین به رنگ سیاه تیره و ژن‌های rRNA با پیکان نمایش داده شده اند. ژن nd6 به رنگ خاکستری روشن، در جهتی مخالف با بقیه خوشه رونویسی می‌شود. ژن‌های tRNA با اسیدهای آمینه مربوطه شان نشان داده شده اند. در وسط شکل قطعات PCR پوشش دهنده کل ژنوم میتوکندریایی نیز نشان داده شده است

Figure 1. The mitochondrial genome of *Camelus bactrianus*. Genes encoding proteins are displayed with Dark color and rRNA genes by the arrows. The nd6 gene which showed in bright gray is transcribed in an opposite direction to the rest of the cluster. The tRNA genes are shown with their corresponding amino acids. The PCR components which covering the entire mitochondrial genome are also shown in the middle of the shape.

tRNAهای اسیدهای آمینه ترئونین (از ۱۵۳۰۱ تا ۱۵۳۶۱) و پرولین (از ۱۵۳۶۹ تا ۱۵۴۳۴) و بخشی از ناحیه کنترل یا D-loop (از ۱۵۴۳۵ تا ۱۶۶۵۹) با استفاده جفت آغازگرهای جدول ۱ با سیستم ۱۰۰۰ MegaBACE مطابق با آنچه که Burger (۷) شرح داده است، در آزمایشگاه ژنتیک جمعیت دانشگاه دامپزشکی وین^۸ (اتریش) توالی‌یابی گردید. سپس کیفیت خوانش توالی‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار Chromas نسخه ۳.۴.۲ بررسی شد. توالی‌های مذکور با استفاده از نرم‌افزار CodonCodeAligner نسخه ۴.۴.۲ (Dedham, MA, USA) روی ژنوم میتوکندریایی مرجع شتر دوکوهانه هم‌ردیف شده و روی کانتینگ^{۱۰} حاصله چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی و فراوانی آنها بررسی شد. در این مطالعه از ژنوم مرجع با شماره دسترسی NC_009628 در بانک ژن NCBI با طول ۱۶۶۵۹ (۱۶) به عنوان توالی مرجع برای آنالیز هم‌ردیفی توالی‌های به دست آمده استفاده شد. انواع هاپلوטיפ حاصل از SNPهای یافت شده و فراوانی‌های مربوطه و سپس با استفاده از فراوانی‌های هاپلوטיפی محاسبه شده، شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون جمعیتی از جمله هتروزیگوسیتی (He) و تعداد موثر هاپلوטיפی (Ne) با استفاده از نرم‌افزار Haplotype Analysis نسخه ۱/۰۴ (۱۰) بدست آمد.

جی و همکاران (۱۶) روابط تکاملی بین شتر دوکوهانه اهلی و شترهای دوکوهانه وحشی باقیمانده را با استفاده از توالی ژن سیتوکروم b میتوکندریایی مطالعه نمودند. آنالیز ساعت مولکولی براساس توالی کامل ژنوم میتوکندریایی و با استفاده از یک نقطه کالیبراسیون فسیلی^۷ (۲۵) نشان داد که این تمایز در سطح زیرگونه‌ای و تقسیم آنها به دو تبار مجزا حدود هفت هزار سال قبل آغاز شده است. آنها نتیجه گرفتند که شترهای دوکوهانه وحشی باقیمانده تبار جداگانه‌ای هستند اما جد مستقیم شترهای دوکوهانه اهلی نمی‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی و فراوانی‌های هاپلوטיפی حاصل از آنها در یک ناحیه با چندشکلی بالا شامل بخشی از ژن سیتوکروم b و ناحیه کنترل روی ژنوم میتوکندریایی، در درون جمعیت شتر دو کوهانه استان اردبیل را بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۷ نفر شتر دوکوهانه در استان اردبیل خونگیری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل با استفاده از روش استخراج نمکی بهینه شده (۱۵) انجام شد. سپس قطعه‌ای از ژنوم میتوکندریایی به طول ۸۰۴ جفت باز از نوکلئوتید شماره ۱۵۱۲۰ تا ۱۵۹۲۸ شامل بخشی از ژن سیتوکروم b (از ۱۴۱۶۱ تا ۱۵۳۰۰)، ژن‌های کدکننده

1- Shotgun Sequencing 2- Expressed Sequence Tags 3- Align 4- Reference Sequence 5- C. bactrianus ferus
6- Molecular clock 7- Fossil calibration 8- Vetmeduni Vienna (<http://www.vetmeduni.ac.at>)
9- <http://www.technelysium.com.au/chromas.html> 10- Conting

جدول ۱- توالی، طول فرآورده و دمای اتصال شش جفت آغازگر مورد استفاده برای تکثیر قطعه ۸۰۴ جفت بازی مورد نظر روی ژنوم میتوکندریایی شتر دو کوهانه

Table 1. Sequence, product length, and annealing temperature for the six pairs of primers used to amplify the 804 Base pairs desired on the mitochondrial genome of *Camelus bactrianus*

نام آغازگر	دمای اتصال (°C)	طول فرآورده (جفت باز)	توالی آغازگر (5'-3')
CB15060_CF-f	۵۷/۸		CCTAGCACTTATCCCCATACTG
CR15627_CF-r	۵۹/۰	۵۶۸	TGTGCTATGCACGAACAAGA
CB15060_CF-f	۵۷/۸		CCTAGCACTTATCCCCATACTG
tPRO15371int_CF-r	۵۴/۷	۳۱۱	TGAGTCTTAGGGAGAGTGTG
CB15279int_CF-f	۵۸/۹		AAACCGCATCCTAAAATGAAGA
CR15627_CF-r	۵۹/۰	۳۴۸	TGTGCTATGCACGAACAAGA
tPRO15402_CF-f	۵۶/۹		CCAAAGCTGGAATTCTCATT
CR16034_CF-r	۵۸/۸	۶۳۴	GTTGTATGATGCGGGTAAATA
tPRO15402_CF-f	۵۶/۹		CCAAAGCTGGAATTCTCATT
CR15716int_CF+CD-r	۵۸/۵	۳۱۵	AGCGGGTTGATGATTTACAC
CR15641int_CF-f	۵۸/۳		TTTCCAGTCAGTACGCATATCA
CR16034_CF-r	۵۸/۸	۳۹۴	GTTGTATGATGCGGGTAAATA

وحشی بودند. علیرغم اندازه بسیار کوچک جمعیت شتر دو کوهانه کشور، هتروزایگوسیتی نسبتاً مطلوب (۰/۵۰۳) حاکی از تنوع ژنتیکی مناسب و مطلوب در جمعیت بسیار کاهش یافته این گونه است. این امر پتانسیل مناسبی برای بازسازی و کمک به حفاظت از این ذخیره ژنتیکی با ارزش را فراهم می نماید. شاه کرمی و همکاران (۳) نیز هتروزایگوسیتی مشابهی را با استفاده از هفت جایگاه ریزماهورای گزارش نموده اند (۰/۴۸۹). آن‌ها نیز این امر را یک مزیت در جهت کمک به حفاظت این گونه برشمرده اند.

در تحقیقاتی که توسط شش جفت آغازگر ریز ماهواره روی ۳۰ شتر غیرخویشاوند نژاد جایسالمری^۳ کشور هندوستان انجام گردید، مشاهده شد هر شش جفت آغازگر مورد بررسی دارای چند شکلی بودند. تعداد آل‌ها نیز بین دو تا پنج عدد در هر لوکوس متغیر بود. دامنه تغییرات هتروزایگوسیتی از ۰/۳۲ تا ۰/۶۵۱ و دامنه محتوای اطلاعات چند شکلی از ۰/۲۶۸ تا ۰/۵۸۵ بود (۱۱).

جانلین و همکاران (۲۸) جهت استفاده از جایگاه های شترهای دنیای جدید برای شترهای دنیای قدیم، از ۲۰ جفت جایگاه استفاده کردند. تمام جایگاه ها به جز VOLP05 به خوبی برای شترهای دنیای قدیم (تک و دوکوهانه) به کار برده شدند. ولی سه جایگاه (VOLP12, VOLP33, YWLL40) تک شکل بودند. از ۱۶ جایگاه باقیمانده، یازده جایگاه برای شترهای تک کوهان و ۱۶ جایگاه برای شترهای دوکوهانه بسط داده شده بودند. میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده بین دو گونه مشابه بود (۰/۵۲) برای تک کوهان و ۰/۵۵ (برای دوکوهانه). میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار برای شترهای دوکوهانه کمی بالاتر از تک کوهانه بود (۰/۶۳). در عوض (۰/۵۵). میانگین آل مشاهده شده در دوکوهانه‌ها ۶/۸ و در تک کوهانه‌ها ۵/۴ بود.

هتروزایگوسیتی بر اساس شاخص تنوع ژنتیکی نااریب Nei^۱ و از فرمول زیر محاسبه شد (۲۲):

$$H_e(j) = \frac{N(j)}{N(j)-1} \left(1 - \sum_{i=1}^{N_h} P_{(i,j)}^2 \right)$$

فرمول ۱: شاخص تنوع ژنتیکی نااریب Nei که P(i,j) در آن فراوانی نسبی i امین هاپلوتیپ در j امین جمعیت، N_h تعداد هاپلوتیپ‌های (جایگاه‌ها) مشاهده شده و N(j) اندازه نمونه در درون یک جمعیت است. تعداد موثر هاپلوتیپی^۲، یعنی عکس احتمال اینکه دو هاپلوتیپ انتخابی یکسان باشند، نیز از فرمول ۲ محاسبه شد:

$$N_e(j) = \frac{1}{\sum_{i=1}^{N_h} \frac{1}{P_{(i,j)}^2}}$$

فرمول ۲: تعداد موثر هاپلوتیپی که اجزای آن در فرمول ۱ شرح داده شد.

نتایج و بحث

از مجموع ۴۷ نفر شتر دوکوهانه، همدیفی در ۳۷ نمونه و برای ۵۱۸ جفت باز مشترک در همه آنها موفق بود. پس از کنترل کیفیت و ویرایش SNP‌های به دست آمده در کانتینگ حاصل از این همدیفی، تعداد ۵ چندشکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شد (جدول ۲).

با توجه به نزدیکی موقعیت این SNP‌ها روی توالی کوتاه تکثیر شده، مطالعه آنها در قالب هاپلوتیپ راهگشا خواهد بود. در نهایت، سه هاپلوتیپ به تعداد و با فراوانی‌های مندرج در جدول ۳ شناسایی شدند. جی و همکاران (۱۶)، ۱۴ هاپلوتیپ را در توالی‌های cyt b یافتند که از این میان ۱۱ هاپلوتیپ مربوط به شترهای اهلی و سه هاپلوتیپ مربوط به شترهای

1- Unbiased genetic diversity index (He)

2- Effective number of haplotypes (Ne)

3- Jaisalmeri

جدول ۲- تعداد ۵ چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) مشاهده شده در ۳۷ نفر شتر دو کوهانه اهلی این SNP ها حاصل از همردیفی قطعه ای به طول ۵۱۸ جفت باز بود که در تمام این افراد مشترک بوده است. فقط یکی از نمونه هایی که متفاوت بوده اند، آورده شده است. از روی این SNP ها، ۳ هاپلوتیپ مجزا به دست آمد. SNP اعداد بالای جدول موقعیت نوکلئوتید مربوطه را روی ژنوم مرجع میتوکندریایی شتر دو کوهانه و نیز روی توالی قطعه تکثیر شده نشان می دهند. "-" به معنای آن است که نوکلئوتید مربوطه در نمونه مورد نظر با توالی مرجع هم خوانی دارد (یکی است). "." به معنای آن است که نوکلئوتید مربوطه در نمونه مورد نظر به خوبی تعیین توالی نشده و نوع آن مشخص نیست. اعداد پایین جدول نیز تعداد نوکلئوتیدهای جایگزین در هر موقعیت SNP را در ۳۷ فرد نشان می دهند. رنگ سبز موقعیت SNP های واقع بر روی توالی ژن سیتوکروم b و رنگ زرد SNP های واقع بر روی توالی ناحیه D-loop را نشان می دهند

Table 2. Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) observed in 37 domestic ovum camels. The SNPs were the result of a 518-bp fragmentation that was common in all of these individuals. Only one example that has been different from the others has been brought in this table. Three separated haplotypes were obtained from these SNPs. The numbers above the table indicates the nucleotide position number and also the sequence number of the PCR product of the camel mitochondrial reference genome. "-" means that the corresponding nucleotide in the sample is consistent with the reference sequence. "." means that the nucleotide in the sample is not well sequenced and its type is not known. The bottom numbers in the table show the number of alternative nucleotides in each SNP position in 37 individuals. The green color indicates SNPs positioning on the sequence of the cytochrome b gene and the yellow color shows the SNPs located on the D-loop region sequence.

موقعیت روی ژنوم مرجع (bp)	۱۵۱۲۰	۱۵۱۶۰	۱۵۱۸۰	۱۵۲۶۳	۱۵۵۵۸
موقعیت روی توالی قطعه (bp)	۱۲۴	۱۶۴	۱۸۴	۲۶۷	۵۶۲
نوکلئوتید مورد اجماع	T	A	A	T	G
DC375	.	-	-	-	-
DC345	-	-	-	-	-
DC359	-	-	-	-	-
DC369	-	-	-	-	-
DC390	-	-	-	-	-
DC355	C	G	T	C	-
DC350	-	-	-	-	G
DC378	-	-	-	-	G
DC380	-	-	-	-	G
توالی مرجع	T	A	A	T	A
جمع هر نوکلئوتید	32T 1C	35A 1G	36A 1T	36T 1C	23G 14A

اطلاعات چند شکل در محدوده ۰/۲۷۷ تا ۰/۷۶۵ بدست آمد (۲۰). تلفیق نتایج مطالعه حاضر با مطالعات آتی روی تنوع اختصاصی کروموزوم Y به منظور پیگیری خط پدری و نشانگرهای خنثی همچون با استفاده از DNA ژنومی شامل تنوع ریزماهورای می تواند استنتاج فوق را تقویت نماید. از آنجایی که مطالعات متعددی نشان داده اند که آمیخته گری به ویژه بین گونه های مجزا از جمله بین گونه های اهلی و وحشی شتر دو کوهانه یک خطر بالقوه تهدیدکننده این ذخیره ژنی است، پیشنهاد می شود مطالعات مشابه روی سایر گونه های شتر در کشور و نیز آمیخته های میان آنها انجام شود تا معلوم گردد آیا آمیخته گری و تمایل احتمالی شتر داران کشور به این پدیده برای جمعیت در خطر شتر دو کوهانه اهلی کشور ما نیز یک خطر عمده محسوب می شود یا خیر؟
بر اساس این فراوانی معیارهای تنوع ژنتیکی به شرح جدول ۴ محاسبه گردید.

در تحقیقی که روی ۹۹ نفر شتر از سه نژاد مجاهیم^۱، سافر^۲ و شوچه^۳ در عربستان سعودی انجام شد. از ۱۶ جایگاه ریزماهوره که مورد مطالعه قرار گرفتند، در تعداد ۱۲ جایگاه، چند شکلی مشاهده شد و تعداد آلل در هر جایگاه دارای چند شکلی بین یک تا هفت مورد گزارش شد. ضمن اینکه آلل شماره ۲۱۱ از جایگاه VOLP77 تنها در نژاد مجاهیم با فراوانی ۱۵ درصد و آلل شماره ۱۴۸ از جایگاه LCA18 تنها در نژاد سافر با فراوانی ۱۲ درصد مشاهده گردید. هر یک از سه نژاد شترهای عربستان، هتروزیگوسیتی و چند شکلی در حد بسیار پایین و یکنواختی ژنتیکی بالایی را نشان دادند (۴). در تحقیقی دیگر که توسط ۱۶ جایگاه ریزماهوره روی ۳۰ نفر شتر غیر خویشاوند از نژاد کاجی^۴ در هندوستان انجام شد تعداد ۱۳ جایگاه چند شکل گزارش شد و تعداد آلل جایگاه های دارای چند شکلی بین دو تا شش عدد متغیر بود. پیش بینی هتروزیگوسیتی از ۰/۳۳۲ تا ۰/۷۹۶ و محتوای

جدول ۳- تعداد و فراوانی سه هاپلوتیپ حاصل از ترکیب ۵ چندشکلی تک نوکلئوتیدی یافت شده روی بخشی از DNA میتوکندریایی ۳۷ نمونه شتر دو کوهانه

Table 3. Number and frequency of three haplotypes derived from the combination of 5 SNPs found on a section of the mitochondrial DNA of 37 bivalve camels

شماره هاپلوتیپ	هاپلوتیپ	تعداد	فراوانی
H1		۱۳	۰/۳۵
H2	۱	۲۳	۰/۶۲
H3	۱۱۱۱۰	۱	۰/۳۰
جمع		۳۷	۱

1- Magaheem

2- Sufer

3- Shogeh

جدول ۴- میزان هتروزایگوسیتی در جمعیت

Table 4. Heterozygosity rate in the population

اندازه نمونه (N)	تعداد هاپلوتیپ اختصاصی (P)	اندازه موثر هاپلوتیپی (Ne)	هتروزایگوسیتی (تنوع ژنی) (He)
۳۷	۳	۱/۹۵۹	۰/۵۰۳

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر به عنوان طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه و با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج صورت گرفته است. لذا بدینوسیله از همکاری و مساعدت ریاست محترم

منابع

- Asadi, N., F. Afraz and M.H. Banabazi. 2010. An overview on Iranian genetic livestock resources. 11th congress on genetics. Shahid Beheshti University (In Persian).
- Tavakolian, J. 1999. An overview on Iranian indigenous livestock genetic resources. Animal Science Research Institute of IRAN (In Persian).
- Shah-Karami, S., F. Afraz, S.Z. Mir-Hoseini, M.H. Banabazi, N. Asadzadeh, N. Asadi, B. Hemati, A. Ghanbari and K. Razavi. 2012. Investigation of genetic population's diversity in Iranian two-humped camel (*Camelus bactrianus*). Iranian Journal of Genetic Novin, 7: 248-256 (In Persian).
- Al-Swailem, A.M., M.M. Shehata, K.A. Al-Busadah, M.H. Fallatah and E. Askari. 2009. Evaluation of the genetic variability of microsatellite markers in Saudi Arabian camels, Journal of Food, Agriculture & Environment, 7(2): 636-639.
- Arnason, U., A. Cullberg and A. Janke. 2004. Mitogenomic analysis provide new insights into cetacean origin and evolution. Gene 26: 27-34.
- Barker, J.S.F. 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, Guelph, ON, 21: 501-508.
- Burger, P.A. 2013. The use of the MegaBACE for sequencing and genotype analysis, Methods in molecular biology, 1006: 207-222.
- Burger, P.A. and N. Palmieri. 2013. Estimating the Population Mutation Rate from a de novo Assembled Bactrian Camel Genome and Cross-Species Comparison with Dromedary ESTs, Journal of Heredity, 105: 839-846.
- Cui, P. 2007. A complete mitochondrial genome sequence of the wild two-humped camel (*Camelus bactrianus ferus*): an evolutionary history of camelidae, BMC Genomics, 8: 241-252.
- Eliades, N.G. and D.G. Eliades. 2009. Haplotype Analysis: software for analysis of haplotypes data. Distributed by the authors. Forest genetics and forest tree breeding, Georg-August University Goettingen, Germany.
- Gautan, L., S.C. Mehta, R.S. Gahlot and K. Gautam. 2004. Genetic characterisation of Jaisalmeri camel using microsatellite markers. Indian J. of biotech, 4: 457-459.
- Groeneveld, L.F. 2010. Genetic diversity in farm animals – a review, Animal Genetics, 41: 6-31.
- Hare, J. 1997. The wild Bactrian camel *Camelus bactrianus ferus* in China: the need for urgent action. Oryx, 31: 45-48.
- International union for conservation of nature and natural resources. 2009. Available at: www.iucnredlist.org.
- Javanrouh, A., M.H. Banabazi, S. Esmailkhanian, C. Amirinia, H.R. Seyedabadi and H. Emrani. 2006. Optimization on salting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. The 57th Annual Meeting of the EAAP. Antalya, Turkey 21-25 August.
- Ji, R. 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., J. Ochieng, B. Lkhagva and O. Hanotte. 2004. Genetic diversity and relationship of domestic Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) in China and Mongolia. Journal of Camel Practice and Research, 12: 97-109.
- Mate, M., F. Dirocco, A. Zambelli and L. Vidal-Rioja. 2004. Mitochondrial DNA structure and organization of the control region of South American camelids. Molecular Ecology Notes 4: 765-767.
- Mate, M., F. Dirocco, A. Zambelli and L. Vidal-Rioja. 2007. Mitochondrial heteroplasmy in Control Region DNA of South American camelids. Small Ruminant Research, 71: 123-129.
- Mehta S.C. and M.S. Sahani. 2007. Microsatellite markers for genetic characterization of Bikaneri camel. Indian Journal of Animal Science, 77(6): 509-512.
- Moray, C., R. Lanfear and L. Bromham. 2014. Domestication and the mitochondrial genome: comparing patterns and rates of molecular evolution in domesticated mammals and birds and their Wild Relatives, Genome Biology and Evolution, 6: 161-169.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 70: 3321-3323.
- O'Brien, S., J. Pontius, W. Johnson and P. Perelman. 2008. The alpaca enters the genomic era. In: 1st International Workshop on Camelid Gene, pp: 6-9. The Alpaca Research Foundation and The Alpaca Registry Inc., Scottsdale, AZ, USA.
- Reed, K. and L. Chaves. 2008. Simple sequence repeats for genetic studies of alpaca. Animal Biotechnology 19: 243-309.
- Stanley, H., M. Kadwell and J. Wheeler. 1994. Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study, 256: 1-6.
- Wheeler, J., L. Chikhi and M. Bruford. 2006. Genetic analysis of the origins of domestic South American camelids. In: Archaeology and Animal Domestication: New Genetic and Archaeological Paradigms, University of California Press, Berkeley, 329-341.

Genetic Diversity within Bactrian Camel Population of Ardebil Province

Behzad Hemati¹, Mohammad Hossein Banabazi², Saeid Shahkarami³, Elmira Mohandesan⁴
and Pamela Burger⁴

1 and 3- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Science, Islamic Azad University, Karaj Branch, Alborz, IRAN (Corresponding author: hemati@kiau.ac.ir)

2- Assistant Professor, Department of Animal Genetics & Breeding, Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3- Associate Professor, Department of Animal Science, Islamic Azad University, Karaj Branch, Alborz, IRAN

4- Institute of Population Genetics, University of Veterinary Medicine (Vetmeduni) Vienna, Austria

Received: 31 October 2015

Accepted: 3 February 2016

Abstract

The Bactrian camel of Ardebil province, northwestern of Iran, is an adapted genetic resource and a great national wealth; however its population has dramatically decreased in numbers. Therefore, we aim to investigate the mitochondrial genetic diversity within this population. In 37 individuals, a 518-bp region of the mitochondrial DNA (mtDNA) that spanned a portion of the cytochrome b gene, the tRNAs praline and threonine, and the beginning of the control region were successfully amplified and aligned to the Bactrian mtDNA reference sequence. In total, we recovered 5 polymorphic sites and five distinct haplotypes. The heterozygosity estimated from the haplotype frequencies were 0.503 indicating an unexpected high genetic diversity within Iranian Bactrian camels. Our results have important implications for the conservation of genetic diversity and the management of livestock production to facilitate the retention of or potential increase in the camels' economic value. Further studies using nuclear DNA such as Y chromosome markers and microsatellites or single nucleotide polymorphisms are encouraged to substantiate the results of this study.

Keywords: Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), Haplotype frequenc