مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۹ شماره ۴/ سال۱۳۹۸/ صفحات ۶۹ تا ۸۸

بررسی فیلوژنتیکی و تکاملی توالی ژن میوستاتین شتر ترکمن در مقایسه با عملکرد این ژن در گونه‌های دیگر

کریم نوبری[1*]، عباس بهاری[2]، مرتضی بیطرف ثانی[3]، عبداله کاویان[4]

تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۸

[1]استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان

[2]استادیار پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان

[3]استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی یزد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یزد

[4]مربی بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان

[*]مسئول مکاتبه: Email: k.nobari@areeo.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: حدود ۲ هزار نفر از ۱۵۰ هزار نفر جمعیت شتر ایران در استان گلستان پرورش داده می‌شوند که هدف عمده نگهداری آنها گوشت و شیر می‌باشد. میوستاتین یا فاکتور تمایز ۸ (GDF8) از خانواده فاکتورهای تمایز رشد بتا (TGF-β)، عامل محدود شدن توده عضلات اسکلتی می‌باشد، بنابراین جهش در این ژن می‌تواند باعث نوسانات شدید در تولید گوشت لخم در گونه‌های دامی گردد. **هدف**: این تحقیق با هدف بررسی توالی ژن میوستاتین با رویکرد بررسی تعیین روابط تکاملی نوکلئوتیدهای آن و نحوه عمل انتخاب طبیعی بر روی توالی نوکلئوتیدها و در نتیجه توالی اسیدهای آمینه پروتئین میوستاتین شتر ترکمن ایرانی با سایر گونه‌ها صورت گرفته است. **روش کار**: در این تحقیق برای اولین بار ژنوم کامل یک نفر شتر ترکمن بر اساس توالی‌یابی Hiseq 2000 شرکت ایلومینا انجام گرفت. با استفاده از روش Denovo حدود ۲۳۵۹۷۸ موارد کانت شده بدست آمد که با استفاده از خوانش منطقه‌ای، مورد کانت شده مربوط به ژن میوستاتین مشخص گردید. با بررسی هم‌ترازی توالی کامل ژن، اگزون‌ها و توالی‌اسید آمینه‌ای آن درخت‌های فیلوژنتیک تهیه گردید. **نتایج**: مقایسه توالی میوستاتین شتر ترکمن ایرانی و سایر گونه‌های شتر نشان داد که از لحاظ تکاملی این ژن بین شترهای دوکوهانه و تک‌کوهانه عربی قرار می‌گیرد. تفاوتی بین توالی پروتئین در هیچکدام از شترهای مورد بررسی مشاهده نشد که دلیل آن وجود جهش‌ها در نواحی اینترون ژن و یا مترادف بودن جهش‌های اتفاق افتاده، می‌باشد. **نتیجه‌گیری نهایی**: در بررسی ژن میوستاتین، علیرغم اینکه بین توالی نوکلئوتید اینترون و اگزون‌های ژن در این خانواده بین ۱ تا ۱۰٤ نوکلئوتید تفاوت وجود دارد، در توالی اسیدهای آمینهٔ پروتئین این ژن تفاوتی مشاهده نگردید که نشان‌دهنده حفاظت کامل پروتئین این ژن طی دوره تکاملی می‌باشد. مقایسه شتر ترکمن ایرانی با سایر گونه‌ها نشان داد که گونه‌های شتر در یک گروه و در نزدیکی گونه اسب، انسان، گوسفند و بز قرار می‌گیرند.

واژگان کلیدی: فاکتور تمایز ۸، ژنوم شتر ترکمن، هم‌ترازی، توالی‌یابی، تکامل

مقدمه

قدمت تکامل شترهای تک کوهانه و دوکوهانه به حدود ٤٠ میلیون سال قبل بر می‌گردد. بطوری که حدود ٤٠ تا ٤٥ میلیون سال قبل، خانواده شترسانان (Camelida) در طول دوره ائوسن (Eocene) در آمریکای شمالی ایجاد گردیدند. بررسی‌های توالی کل DNA میتوکندریایی نشان می‌دهد که حدود ۱۱ تا ۲۵ میلیون سال پیش دو جنس Camelini (معروف به شتر جهان قدیم) و Lamini (معروف به شتر جهان جدید) از خانواده Camelida ایجاد شده‌اند. با مهاجرت شترهای جهان قدیم از طریق تنگه برینگ به آسیا و جهان جدید به آمریکای جنوبی و سپس انقراض انساب آنها در آمریکای شمالی، شترهای جهان قدیم و جدید عملا شکل گرفتند. در جنس Camelini به گونه شترهای دو کوهانه وحشی (Ferus)، اهلی (Bactrian) و تک کوهانه (Dromedary) تقسیم می‌شوند. همچنین، از جنس Lamini چهار گونه مختلف Guanaco، Lama، Alpaca و Vicugna ایجاد شده‌اند. امروز شترهای جهان قدیم به دو گروه وحشی و اهلی قابل تقسیم می‌باشند که صدها سال پیش نوع وحشی شترهای تک کوهانه از بین رفته‌اند (برگر ٢٠١٦). شتر تک کوهانه دارای شمار بیشتری در بین دیگر گونه‌های شتر است، که از شمال و شرق آفریقا تا شبه جزیره عربی تا جنوب غرب آسیا و به صورت گله‌های وحشی در استرالیا پراکنده شده اند. شمار شترهای تک کوهانه ایران حدود ۱۵۰۰۰۰ نفر می‌باشد (انصاری رنانی و همکاران ۲۰۱۰) که در این میان جمعیت شتر ترکمن ایران که در استان گلستان نگهداری می‌شود حدود ۲ هزار نفرمی‌باشد. شترهای تک کوهانه معمولا برای اهداف تولید گوشت، شیر، حمل و نقل، مو و ورزش نگهداری می‌شوند (عبدالعظیم و همکاران ۲۰۱۵؛ رمدان و اینوموراياما ۲۰۱۷). شتر تک کوهانه در بسیاری از کشورها یکی از دامهای مهم در جهت تولید گوشت مصرفی انسان می‌باشد (موزاچی و همکاران ۲۰۱۵). شتر به واسطه خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی منحصر به فرد خود قادر به تحمل شرایط سخت را در مناطق خشک بیابانی می‌باشد. میلیون‌ها نفر از ساکنین مناطق بیابانی وابسطه به تولید گوشت و شیر شتر می‌باشند (چلونبات و همکاران ٢٠١٤). پروفایل ژنتیکی افراد تعیین کننده توانایی‌های و پتانسیل‌های ذاتی آنها می باشد. میوستاتین به واسطه اثر منفی خود بر روی توسعه ماهیچه‌های اسکلتی یکی از اهداف اصلی در بررسی‌های ژنتیکی حیوانات دارای تولید گوشت می‌باشد.

بررسی روابط تکاملی بین گونه‌ها بر اساس جهش‌های موجود در سطح ژنوم آنها با استفاده از تجزیه فیلوژنتیکی امکان‌پذیر می‌باشد. امروزه استفاده از توالی DNA و اسیدهای آمینه در ترسیم درخت فیلوژنی به دلیل آسان بودن امتیازدهی آنها و همچنین محتوای اطلاعاتی زیاد آنها، بطوری‌که هر نوکلئوتید یا اسیدآمینه می تواند به‌عنوان یک خصوصیت باشد، به طور گسترده استفاده می‌گردد. ترسیم درخت فیلوژنی شامل تهیه توالی‌ها، همردیفی چندگانه آنها و ترسیم درخت می باشد (میچو ۲۰۰۷). امروزه اطلاعات توالی DNA برای شناخت هر چه بیشتر ارتباط آنها با بیماری‌ها و تولید مورد استفاده قرار می گیرد (قادری زفره‌ای و همکاران ۲۰۱۹). افزایش شناخت ما در رابطه با ژن میوستاتین می‌تواند درک ما را در رابطه با مکانیسم‌های رشد و تمایز ماهیچه در شتر افزایش دهد. دانش حاصل از بررسی توالی کامل ژن می‌تواند امکان بهره‌برداری از این نوع ژن‌ها در در انتخاب دام‌های پرتولید فراهم نماید. از جمله روشهایی که می توان از اطلاعات بدست آمده از بررسی ژنها در جهت بهبود ژنتیکی دام صورت گیرد می‌توان به انتخاب به کمک مارکرهای ژنتیکی شناسایی شده بر روی ژن‌های بزرگ اثر را نام برد (ویلّانووا و همکاران ۲۰۰۲). چندشکلی‌های ژنتیکی موجود بر روی ژن‌های بزرگ اثر می‌تواند در پیشرفت ژنتیکی در

برنامه های اصلاح نژاد مورد استفاده قرار گیرد. چندین مطالعه در گونه‌های مختلف نشان داده‌اند که چندشکلی‌های ژنتیکی موجود بر روی توالی ژن میوستاتین باعث افزایش نسبت عضلات (گوشت لخم) می‌شود (موشر و همکاران ۲۰۰۷). چندشکلی‌های شناسایی شده در این ژن در شتر شامل جهش‌های موجود در نواحی غیرکدکننده و جهش‌های مترادف بودند و نحوه تکامل توالی آن در گونه‌های مختلف مطالعه قرار گرفتند (شاه و همکاران ۲۰۰٦ وسجادی زرجانی و همکاران۲۰۱٦).

میوستاتین یا فاکتور تمایز ۸ (GDF8) از خانواده فاکتورهای تمایز رشد بتا (TGF-β) است که باعث محدود شدن توده عضلات می‌گردد(وانگ و مک فرّون ۲۰۱۲). جهش در ژن میوستاتین باعث افزایش توده عضلانی از طریق بزرگ شدن و تکثیر سلولهای آن می‌گردد (موشر و همکاران ۲۰۰۷). در مطالعه یافتن QTL با استفاده از طرح F2 در گوسفندان رومانف–تکسل جایگاه بزرگ اثر بر روی کروموزوم ۲ یافت شد که با مکانیابی دقیق مشخص گردید که عامل آن ژن میوستاتین می‌باشد. بررسی‌های مولکولی آزمایش تبدیل آلل G به A در ناحیه 3’ UTR تایید کرد. جهش مذکور باعث تبدیل آن نقطه به عنوان نواحی هدف mir1، mir206 و میکرو RNAهایی که در عضلات به وفور بیان می‌شوند، می‌گردد که در نهایت باعث تجزیه سریع mRNA میوستاتین شده و سطح پروتئین میوستاتین کاهش می‌یابد (کلوپ و همکاران ۲۰۰٦). تاثیر میوستاتین به حدی است که استفاده از آنتاگونیست‌های آن باعث افزایش توده عضلانی در جوندگان شده و امیدی برای درمان بیماری‌های ضعف عضلانی در انسان می‌باشد (کوتا و همکاران ۲۰۰۹؛ بیش و همکاران ۲۰۱۱ و بوسکوتس و همکاران ۲۰۱۲). خنثی شدن میوستاتین از طریق افزایش سنتز پروتئین و تداوم معمول سوخت آن باعث افزایش توده عضلانی می‌گردد (ولّه و همکاران ۲۰۱۱). هر چند صفتی به نام جفت عضله (Duble Muscling) ناشی از جهش ژن میوستاتین در گاو، گوسفند و بسیاری از گونه‌های پستانداران مشاهده شده بود، اما مطالعه موشر و همکاران (۲۰۰۷) برای اولین بار تاثیر جهش در ژن میوستاتین را بر روی عملکرد سرعت به اثبات رساند.

جهش‌های مختل کننده ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف باعث افزایش توده عضلات اسکلتی می‌گردد که نشان دهنده محافظت شدگی شدید آن ژن در مهره‌داران می باشد. همچنین در مطالعه موزاچی و همکاران (۲۰۱۵) شباهت بین توالی ژن میوستاتین گونه‌های شتر تک کوهانه و شتر دوکوهانه وحشی به اثبات رسیده است (موزاچی و همکاران ۲۰۱۵). در گاو برای این ژن ۲۰ جهش مختلف شناسایی شده است که ۱٤ جهش بر روی اگزون ها و ٦ جهش بر روی اینترون‌ها قرار دارد (استینکنس و همکاران ۲۰۱۱).

ژن میوستاتین با دارا بودن سه اگزون و ۲ اینترون، در شترهای دوکوهانه وحشی (*Camelus Ferus*) و اهلی (*Camelus Bactrianus*) و همچنین شترهای تک کوهانه (*Camelus Dromedarius*) عربی توالی‌یابی شده است. توالی این ژن به شدت محافظت شده است به طوری که توالی mRNA شترهای دوکوهانه وحشی و اهلی کاملا مشابه بودند و تنها ٤ تفاوت تک نوکلئوتیدی بین mRNA شترهای دوکوهانه و تک‌کوهانه مشاهده شد. ژن میوستاتین می تواند بر روی میزان و سرعت رشد دام و همچنین تولید گوست لخم تاثیر بسزایی داشته باشد. بنابراین، بررسی تفاوت آن در گونه‌های مختلف و شناخت دقیق‌تر نحوه تکامل آن می‌تواند شناخت ما را در رابطه با آن ژن افزایش دهد. اگزون‌ها با تاثیر بر روی توالی و در نهایت ساختار پروتئین و نقش اینترون‌ها در ویرایش و تنظیم جدا شدن اگزون‌ها بررسی کل توالی ژن در شتر ایرانی برای شناخت بیشتر ساختار، عملکرد، تکامل و چندشکلی‌های آن مفید

می‌باشد. علاوه بر آن، اینترون‌ها به دلیل عدم تاثیر مستقیم آنها در بر توالی پروتئین می تواند تنوع ژنتیکی بیشتری را در خود ذخیره نمایند. بنابراین، امکان تمایز گونه‌های نزدیک به هم در ناحیه اینترون‌ها فراهم می‌باشد. در این مطالعه توالی ژن میوستاتین (Gene ID: 105099167) شترهای (Camelus) دوکوهانه اهلی (Bactrianus)، وحشی (Ferus)، تک کوهانه عربی (Dromedarius) و برخی گونه‌های دیگر با شتر ترکمن ایرانی (Dromedarius) بررسی گردید. هدف از این مطالعه مقایسه و بررسی فیلوژنتیکی توالی ژن میوستاتین شتر ترکمن ایرانی با سایر گونه‌ها جهت تعیین روابط تکاملی بین آنها، با استفاده از توالی یابی کل ژنوم شتر ترکمن بود.

مواد و روش‌ها

جهت تهیه توالی ژن در شتر ترکمن ایرانی نمونه خون یک نفر شتر اصیل، خونگیری با استفاده از سرنگ از رگ شکمی انجام شد و در تیوب حاوی EDTA ذخیره گردید. استخراج DNA با استفاده از روش بهینه استخراج نمکی از خون انجام شد. بعد از استخراج DNA یک میکرولیتر از محصول استخراج به دستگاه Qubit Fluorometer انتقال داده شد که غلظت آن ۳۰٤ نانوگرم بر میکرولیتر بدست آمد. سپس نمونه برای توالی‌یابی ارسال گردید و توالی‌یابی کل ژنوم با استفاده از Illumina HiSeq 2000 انجام گردید. تعداد خوانش‌های شفاف ۵۸۹/۳۲٦/۱۵۸ متشکل از بیش از ۸۸ میلیارد باز واضح بود که طول هر یک از خوانش‌ها ۱۵۰ جفت باز می‌باشد. بعد از پیرایش نتایج توالی‌یابی، خوانش‌ها اسمبل شده و مورد کانت شدهٔ حاوی ژن میوستاتین با استفاده از بررسی هم‌ترازی ژن میوستاتین شتر تک کوهانه عربی، از کل ژنوم استخراج گردید.

جهت مقایسه گونه‌های مختلف شترهای جهان قدیم و جدید، توالی ژن میوستاتین شترهای تک کوهانه عربی (NW_011590997)، دوکوهانه وحشی (NW_006211358)، اهلی (NW_011514985) و شتر بدون کوهان آلپاکا (NW_005882806) از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) با کدهای دسترسی مربوطه، تهیه گردید. با استفاده از نرم افزار CLC Genomics Workbench 12 هم‌ترازی[1] جهت مقایسه و بدست آوردن فراسنجه‌های توالی ژن میوستاتین شترهای جهان قدیم و جدید انجام گرفت. سپس، میزان گسست ها[2]، تفاوت‌ها، فواصل، درصد تشابه[3] و تعداد تشابه نوکلئوتیدهای توالی ژن میوستاتین در شترها مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی میزان واگرایی گونه‌های شتر و زمان نسبی واگرایی گونه‌ها درخت فیلوژنی تهیه گردید. درخت فیلوژنی همانند شجره‌نامه بوده اما بر خلاف شجره‌نامه که نحوه ارتباط خویشاوندی گروه افراد فامیل را نشان می دهند، درخت فیلوژنی میزان ارتباط تکاملی ژن در گونه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

روش اتصال نزدیک[4] (NJ) یکی از روش‌های مبتنی بر فاصله است که از پرکابردترین روش‌های رسم درخت‌های فیلوژنتیکی است. در این روش انتخاب جفت توالی‌ها بر اساس جمع طول شاخه‌های درخت است. در این روش یک گره مرکزی وجود دارد و همه توالی‌ها از آن گره منشعب می شوند، هر چند از نظر کاملی چنین چیزی غیر ممکن است. این الگوریتم درختان افزایشی ایجاد می‌کند. این روش عمومی‌ترین روشی است که برای ساخت درختان استفاده می‌شود.احتمالا ترکیب روش اتصال نزدیک و آنالیز بوت‌استرپ بهترین روش برای ارزیابی درختان مورد مطالعه است. در استفاده از بوت‌استرپ درخت فیلوژنی به تعداد دفعات زیادی ترسیم شده و در نهایت محتمل‌ترین درخت انتخاب می گردد. درصد بالای بوت‌استرپ به مفهوم

[1]Alignment
[2]Gap
[3]Homology
[4] Neighbor joining

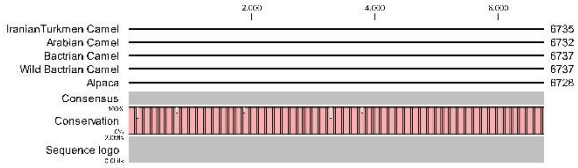
حمایت بیشتر و اطمینان بیشتر شاخه ها از نظر جایگاه فیلوژنتیکی هستند.

در این مطالعه، روش فاصله‌ای اتصال نزدیک (NJ) جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی و از مدل Kimura جهت تصحیح فاصله تکاملی استفاده گردید. فاصله تکاملی از مدل Kimura سرعت جهش‌های انتقال و تبدیل را در تصحیح فاصله تکاملی متفاوت در نظر می‌گیرد. در این مطالعه جهت ترسیم صحیح‌ترین درخت از ۱۰۰۰ مرتبه نمونه‌گیری مجدد به روش بوت‌استراپ انجام گردید.

همچنین با توجه به اینکه حاشیه‌نگاری (Annotation) توالی ژن میوستاتین گونه‌های شتر مشخص بودند، نواحی اگزون ژن استخراج گردید. سپس هم‌ترازی، تعداد گسست، تفاوت‌ها، فواصل، درصد تشابه و تعداد نوکلئوتیدهای مشابه در توالی اگزون‌ها مشخص شد و سپس با حذف نواحی گسست گونه‌های مختلف درخت فیلوژنتیکی آن ترسیم گردید. برای مقایسه وضعیت فیلوژنتیکی و تکاملی شتر ترکمن با گونه‌های دیگر توالی ژن میوستاتین گاو (NC_037329)، گاومیش (NC_037546)، یاک (NW_005395521)، گاو زبو (NC_032651) و آمیخته گاو تاوروس و زبو (NC_040077)، بز (NC_030809)، گوسفند (NC_019459)، اسب (NC_009161) و اسب przewalski (NW_007673325)، الاغ (NW_014637147) و انسان (NC_000002) نیز از بانک داده NCBI بخش Gene استخراج گردید.

نتایج

هم‌ترازی توالی میوستاتین گونه‌های مختلف شتر صورت گرفت و به دلیل گسست‌های موجود در توالی های مختلف علیرغم نقطه شروع و پایان یکسان، تعداد نوکلئوتیدها در هر یک از گونه‌ها متفاوت بودند. هم‌ترازی و تعداد نوکلئوتیدهای هر یک از گونه‌ها در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱- میزان هم ترازی و تعداد نوکلئوتیدهای ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف شتر

Figure 1- Alignment and length of MSTN gene in different camel species

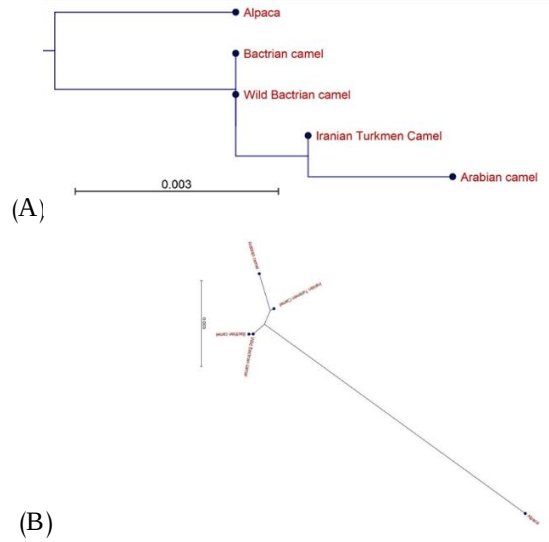
همچنین تعداد گسست، تفاوت‌ها، فواصل، درصد تشابه و تعداد تشابه نوکلئوتیدهای توالی ژن در گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است.

در این مطالعه، بیشترین تعداد گسست، تفاوت و فاصله و کمترین تشابه بین گونه آلپاکا و سایر گونه‌های شتر وجود داشت. همچنین بیشترین تشابه در بین شتر دوکوهانه اهلی و وحشی مشاهده شده است که تنها یک تفاوت در توالی میوستاتین آنها وجود دارد. از بین شترهای تک کوهانه مورد بررسی شتر ترکمن با حدود ۱۲ و ۱۱ تفاوت با شترهای دوکوهانه اهلی و وحشی همولوژی بیشتری را نشان داده است.

پس از حذف گسست‌ها و نواحی ناهمگون در توالی ژن گونه‌های مختلف شتر، درخت فیلوژنی به روش های مختلف ترسیم گردید. جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی از روش فاصله‌ای اتصال نزدیک (NJ) استفاده گردید و به منظور تصحیح فاصله تکاملی از مدل Kimura که سرعت جهش‌های انتقال و تبدیل را متفاوت در نظر می‌گیرد کمک گرفته شد. با ۱۰۰۰ مرتبه نمونه‌گیری مجدد مقادیر Bootstraping بدست آمد.

درخت فیلوژنتیکی بدست آمده مشخص نمود که آلپاکا نسبت به سایر گونه‌های شتر فاصله زیادی دارد. در بین شترهای دنیای قدیم، شترهای دو کوهانه تفاوت بیشتری با شتر تک‌کوهانه عربی دارد.

هم‌ترازی اگزون‌های ژن میوستاتین گونه‌های مختلف شتر انجام گرفت. در بررسی هم‌ترازی اگزون‌ها، طول اگزون‌ها در تمام گونه‌های شتر با یکدیگر برابر بود که نشان دهنده حفاظت شدگی طول اگزون و در نهایت طول پروتئین بود. همانند توالی کل ژن، تعداد گسست، تفاوت‌ها، فواصل، درصد تشابه و تعداد نوکلئوتیدهای مشابه در توالی اگزون‌ها در گونه‌های مختلف نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است.

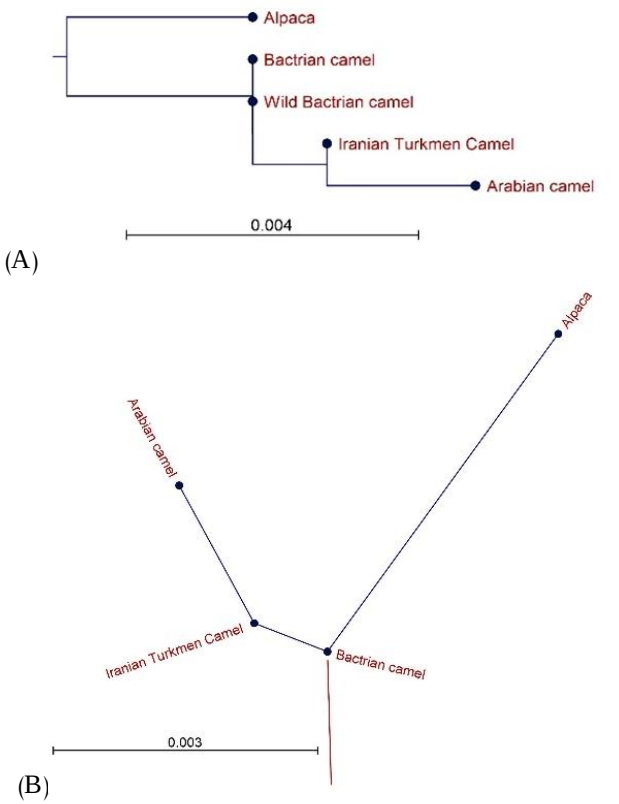


شکل ۲- درخت فیلوژنیک، ریشه‌دار (A) و بدون ریشه (B)، توالی ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف شتر

Figure 2- Phylogenetic tree, A) Rooted; B) Un-rooted, of MSTN gene sequence in different camel species

در بررسی میزان تشابه و تفاوت بین اگزون‌ها و کل توالی ژن در میان گونه‌های مختلف شتر مشخص گردید که آلپاکا از سایر گونه‌ها فاصله بیشتری دارد (برگر ۲۰۱۶). همچنین شترهای تک‌کوهانه با یکدیگر و شترهای دوکوهانه بایکدیگر تشابه بیشتری داشتند. نتایج بدست آمده با نتایج شاه و همکاران (۲۰۰۶) که با توالی‌یابی بخشی از اگزون شماره ۱ این ژن هیچ چندشکلی مشاهده نکرده اند، مطابقت داشت. در مطالعه یوی و همکاران (۲۰۱۷) نیز شترهای دوکوهانه اهلی، وحشی و تک‌کوهانه در شاخه‌های مختلف درخت فیلوژنتیکی قرار گرفتند. در این مطالعه شتر ترکمن ایرانی نیز در شاخه‌ای جداگانه بین شترهای دوکوهانه و تک‌کوهانه عربی قرار گرفت.

به دلیل عدم وجود گسست در توالی اگزون‌های ژن در بین گونه‌هایی مختلف درخت فیلوژنتیکی بدون حذف ناحیه‌ای از توالی ترسیم گردید. همانند قبل ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش فاصله ای اتصال نزدیک (NJ) انجام و برای تصحیح فاصله تکاملی از مدل Kimura استفاده شد (شکل ۳).



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی ریشه‌دار (A) و بدون ریشه (B) توالی‌های اگزون ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف شتر

Figure 4- Phylogenetic tree, A) Rooted; B) Un-rooted, of MSTN gene's exon sequences in different camel species

جدول ۱- تعداد گسست، تفاوت ها، فواصل، درصد تشابه و تعداد تشابه نوکلئوتیدهای توالی ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف شتر

Table 1- Number of gaps, differences, distance, percent identity, and identities of MSTN gene sequence in different camel species

	Gaps				Differences				Distance				Percent identity				Identities			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2	3				13				0.001				99.81				6722			
3	4	7			12	25			0.001	0.002			99.82	99.63			6726	6713		
4	4	7	0		11	24	1		0.001	0.002	0.000		99.84	99.64	99.99		6727	6714	6736	
5	21	18	21	21	101	104	101	100	0.010	0.010	0.010	0.010	98.50	98.46	98.50	98.52	6642	6635	6642	6643

Iranian Turkmen camel (1), Arabian camel (2), Bactrian camel (3), Wild Bactrian camel (4), Alpaca (5)

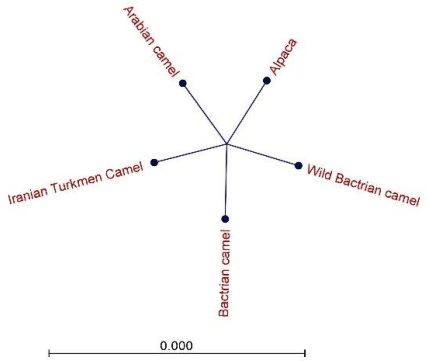
جدول ۲- تعداد گسست، تفاوت‌ها، فواصل، درصد تشابه و تعداد تشابه نوکلئوتیدهای توالی اگزون‌های ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف شتر

Table 2- Number of gaps, differences, distance, percent identity, and identities of exons of MSTN in different camel species

	gaps				differences				distance				percent identity				identity			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2	0				2				0.000				99.82				1126			
3	0	0			1	3			0.000	0.001			99.91	99.73			1127	1125		
4	0	0	0		1	3	0		0.000	0.001	0.000		99.91	99.73	100.00		1127	1125	1128	
5	0	0	0	0	6	8	5	5	0.010	0.010	0.000	0.000	99.47	99.29	99.56	99.56	1122	1120	1123	1123

Iranian Turkmen camel (1), Arabian camel (2), Bactrian camel (3), Wild Bactrian camel (4), Alpaca (5)

سپس اگزون‌های گونه‌های مختلف در قالب خوانش مناسب به پروتئین میوستاتین ترجمه شده و پارامترهای مربوطه بدست آمد. هم‌ترازی پروتیئن میوستاتین نیز منطبق با تشابه طول اگزون‌های گونه‌های مختلف شتر، طول پروتئین میوستاتین نیز در گونه‌های مختلف اندازه یکسان داشتند. با توجه به تشابه کامل توالی پروتئین میوستاتین در گونه‌های مختلف شتر، پروتئین این ژن در گونه‌های شتر از لحاظ تکاملی دارای فاصله مساوی از یکدیگر بودند. درخت فیلوژنتیکی مربوط به توالی پروتئین میوستاتین در شکل ٤ آورده شده است.

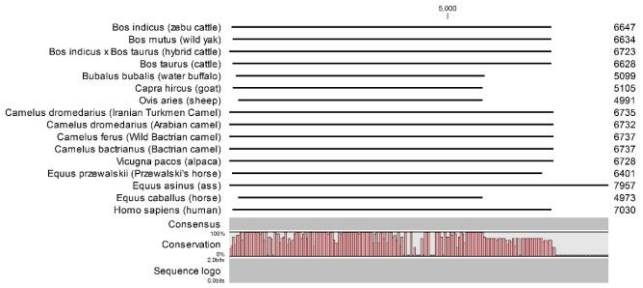


شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی پروتئین میوستاتین در گونه‌های مختلف شتر

Figure 6- Phylogenetic tree of MSTN protein in different camel species

اما برخلاف اگزون‌ها توالی اسیدهای آمینه پروتئین میوستاتین در گونه‌های مختلف کاملا مشابه بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جهش‌های صورت گرفته بر روی کدون‌ها از نوع مترادف بودند به طوری که تغییر توالی کدون باعث ایجاد تغییر اسید آمینه نگردیده است. این امر نشان دهنده تاثیرگذاری عمیق این ژن بر روی زیست حیوان بوده و عدم تکامل توالی این پروتئین در طول دوره‌های مختلف تکاملی این گونه‌ها را نشان می دهد.

هم‌ترازی توالی ژن میوستاتین بین گونه‌های مختلف شتر و گاو (گاو، گاومیش، یاک، گاو زبو و آمیخته گاو تاوروس و زبو)، بز، گوسفند، اسب (اسب و اسب przewalski)، الاغ و انسان انجام گرفت. طول توالی کامل ژن در گونه‌های مختلف متفاوت بودند. در شکل ٥ هم‌ترازی و تعداد نوکلئوتیدهای ژن در هر یک از گونه‌ها نمایش داده شده است.



شکل ۵- هم‌ترازی و تعداد نوکلئوتیدهای ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف

Figure 7- Alignment and length of MSTN gene in different species

هم‌ترازی صورت گرفته نشان می‌دهد که طول ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف متفاوت بوده و از میان گونه‌های مورد بررسی اسب و الاغ با دارا بودن ٤٩٧٣ و ٧٩٥٧ نوکلئوتید به ترتیب کوتاه‌ترین و بلندترین توالی را داشتند.

تعداد گسست و درصد شباهت های بین توالی ژن میوستاتین گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- درصد شباهت (بالای قطر) و تعداد گسست (پایین قطر)های بین توالی میوستاتین در گونه‌های مختلف

Table 3- percent identity and gaps of MSTN gene sequence in different species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		98.92	98.57	99.46	74.93	73.09	71.54	85.72	85.67	85.78	85.76	85.61	81.89	70.79	62.78	75.7
2	49		97.90	98.83	75.29	73.48	71.92	85.44	85.39	85.50	85.48	85.33	81.88	70.53	63.01	75.27
3	76	93		97.93	74.19	72.43	70.90	86.26	86.21	86.32	86.31	86.15	81.08	70.83	62.15	74.45
4	19	30	95		74.84	73.04	71.49	85.15	85.10	85.21	85.20	85.04	81.64	70.31	62.74	75.00
5	1590	1551	1632	1571		92.53	93.19	64.54	64.47	64.55	64.54	64.38	65.89	53.20	81.01	56.36
6	1594	1555	1636	1575	164		96.05	64.62	64.56	64.63	64.62	64.49	66.03	53.32	80.46	56.50
7	1707	1667	1748	1687	136	138		63.22	63.14	63.23	63.21	63.06	64.50	52.09	82.58	55.12
8	365	365	298	375	1890	1864	1976		99.81	99.84	99.82	98.50	82.88	73.38	63.75	76.40
9	353	362	295	372	1887	1861	1973	3		99.64	99.63	98.46	82.83	73.33	63.67	76.34
10	356	365	298	375	1892	1866	1978	4	7		99.99	98.52	82.91	73.43	63.76	76.46
11	356	365	298	375	1892	1866	1978	4	7	0		98.50	82.90	73.42	63.74	76.44
12	359	368	301	378	1889	1863	1975	21	18	21	21		82.77	73.27	63.52	76.18
13	365	495	552	503	1574	1558	1672	566	563	568	568	565		79.88	77.66	75.82
14	1626	1637	1610	1645	3138	3122	3236	1526	1523	1526	1526	1529	1564		62.08	66.07
15	1912	1873	1958	1893	344	374	224	1968	1965	1970	1970	1967	1428	2992		58.16
16	857	828	899	838	2343	2331	2445	879	880	879	879	892	955	2093	2341	

گاو زبو(۱)، یاک وحشی(۲)، گاو آمیخته(۳)، گاو(٤)، گاومیش(٥)، بز(٦)، گوسفند(۷)، شتر ایرانی(۸)، شتر عربی(۹)، دوکوهانه وحشی(۱۰)، دوکوهانه اهلی(۱۱)، شتر بدون کوهان(۱۲)، اسب przewalski (۱۳)، الاغ(١٤)، اسب(١٥)، انسان(١٦)

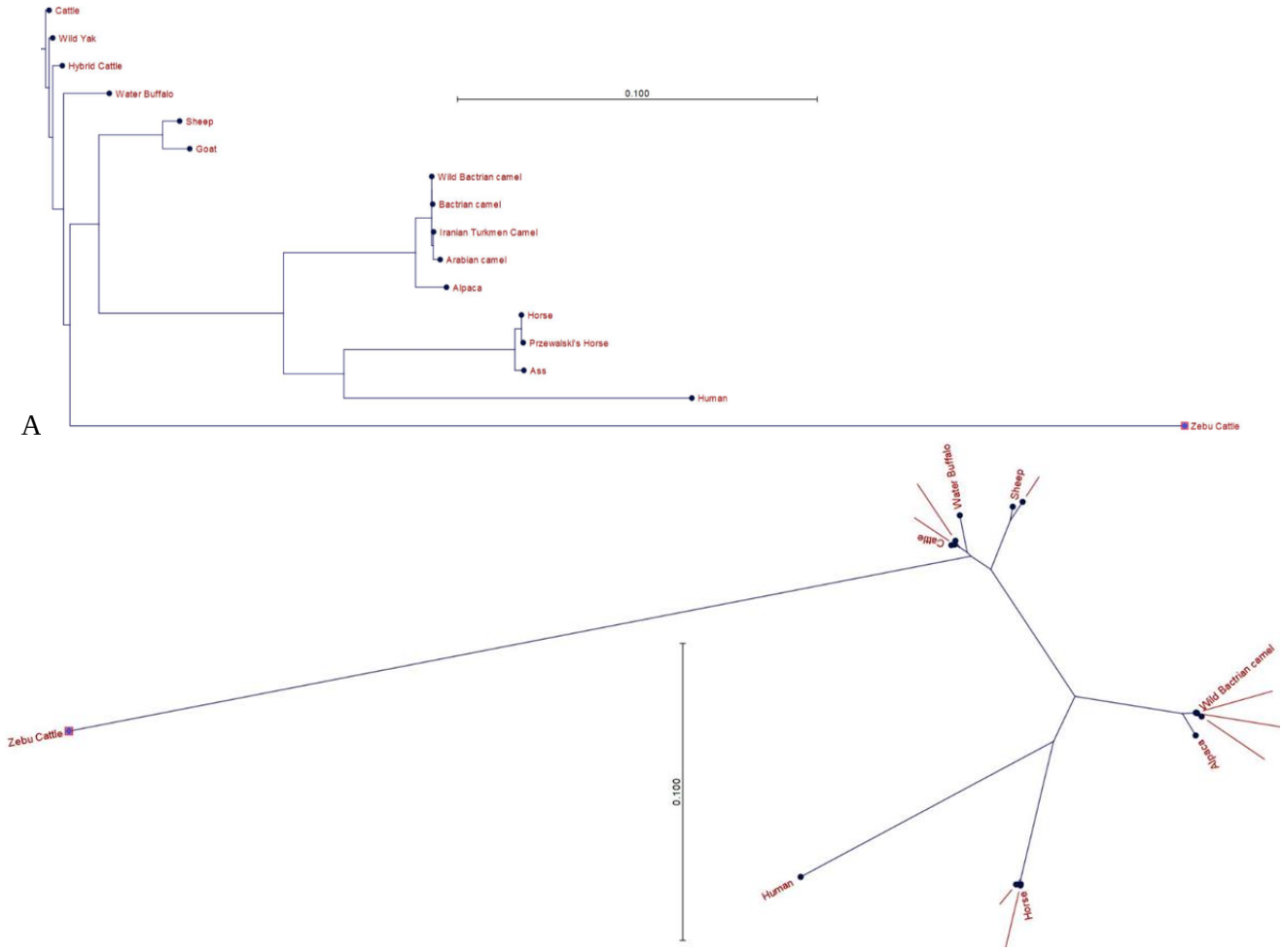
Zebu cattle (1), Wild yak (2), Hybrid cattle (3), Cattle (4), Water buffalo (5), Goat (6), Sheep (7), Iranian Turkmen camel (8), Arabian camel (9), Wild Bactrian camel (10), Bactrian camel (11), Alpaca (12), Przewalski’s horse (13), Ass (14), Horse (15), Human (16)

بیشترین گسست‌ها در توالی ژن، بین انسان و گوسفند وجود داشت و کمترین گسست‌ها بین شتر دوکوهانه اهلی و وحشی وجود داشتند. کمترین همولوژی نیز بین گوسفند و الاغ و بیشترین همولوژی هم بین گونه‌های شتر دوکوهانه اهلی و وحشی وجود داشت. برای بدست آوردن درخت فیلوژنی ژن میوستاتین گسست‌ها و نواحی مبهم حذف گردیدند.

ترسیم درخت فیلوژنتیکی با روش فاصله‌ای اتصال نزدیک با استفاده از مدل تصحیح فاصله تکاملی Kimura بدست آمده است. در شکل ٦ درخت فیلوژنی با ریشه و بدون ریشه ژن میوستاتین ١٦ گونه مورد بررسی آورده شده است.

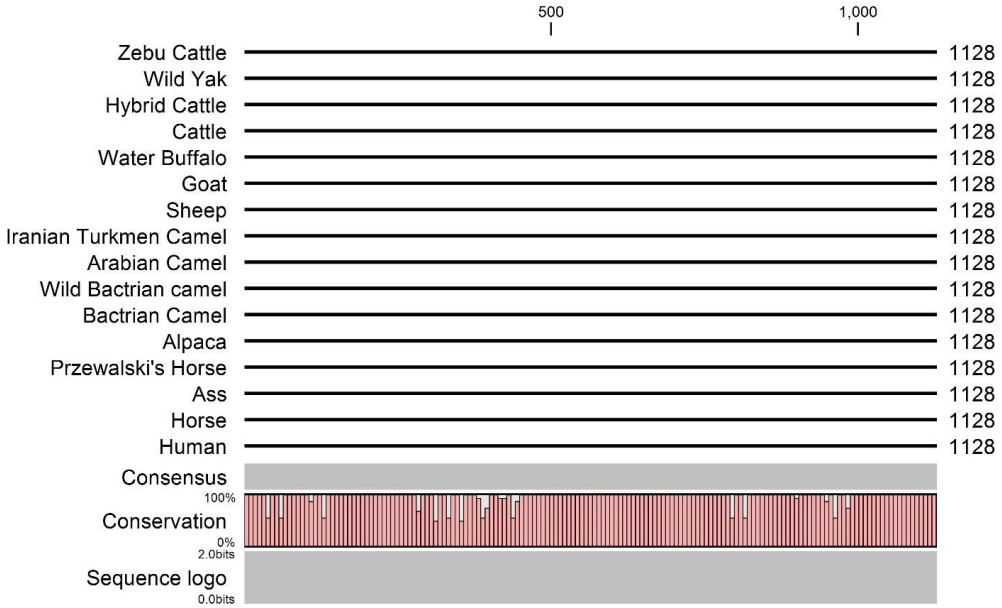
درخت فیلوژنتیکی که بعد از حذف گسست‌ها و توالی‌های ناهمگون و مبهم ترسیم شده بود، نشان داد که شترسانان، اسب‌سانان، گوسفند و بز و گونه‌های گاو در گروههای مختلف قرار می‌گیرند. در بررسی هدایت-ایوریق و همکاران (٢٠١٦) نیز مشخص گردید که شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه در بین دامهای مزرعه با گاوسانان فاصله بیشتر و با اسب فاصله کمتری دارند. در مطالعه سجادی زرجانی و همکاران (٢٠١٦) نیز خانواده گاو سانان و گوسفند و بز از لحاظ فیلوژنتیکی نزدیک یکدیگر بودند که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. طهمورث‌پور و همکاران (٢٠١٦) در ترسیم درخت فیلوژنتیکی بخشی از ژن کاپاکازئین شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه و برخی گونه‌های دیگر به نتایج مشابه نتایج حاضر دست پیدا کرده بودند. آنها در مطالعه خود دریافتند که فاصله ژنتیکی بین شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه کمتر از فاصله آنها نسبت به گونه‌های لاما می‌باشد.

پس از بررسی توالی ژن، هم‌ترازی اگزون‌های آن در گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ٧ هم‌ترازی اگزون‌ها و طول آنها در گونه‌های مختلف را نشان می دهد.



شکل ۶- درخت فیلوژنی با ریشه (A) و بدون ریشه (B) ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف

Figure 8- Phylogenetic tree, A) Rooted; B) Un-rooted, of MSTN gene sequence in different species

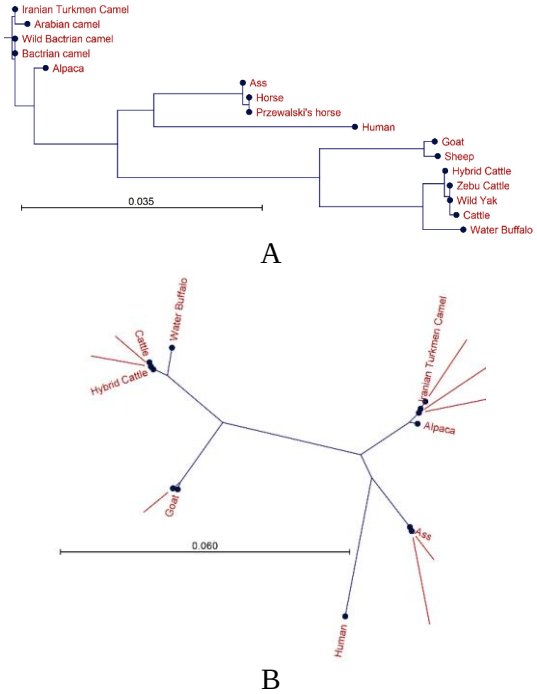


شکل ۷- هم‌ترازی اگزون‌ها و طول آنها در گونه‌های مختلف

Figure 9- Alignment and length of MSTN gene in different species

هیچ گسستی بجز نقاط مبهم در درون اگزون‌های ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف مورد بررسی وجود نداشت که نشان دهنده حفاظت شدگی طول اگزون این ژن در گونه‌های مختلف بود. درصد شباهت و تعداد تفاوت‌ها در توالی اگزون‌های گونه‌های مورد بررسی در جدول ٤ آورده شده است.

جدول ۳ نشان می‌دهد که شباهت زیادی بین اگزون‌های میوستاتین در گونه‌های مختلف وجود دارد به طوری که حداقل همولوژی و حداکثر گسست بین انسان و گاو-گاومیش به ترتیب مقدار ۹۱/۸٤ درصد و ۹۲ نوکلئوتید وجود داشت. شاه و همکاران (۲۰۰٦) حدود ۹٤ درصد همولوژی بین بخشی از اگزون شماره ۱ چند نژاد شتر با گاو یافتند که در این مطالعه نیز حدود همین مقدار همولوژی بین گونه‌های مختلف شتر و گونه‌های مختلف گاو یافت شده است.



شکل ۸- درخت فیلوژنی ریشه‌دار(A) و بدون ریشه(B) اگزون‌ها در ژن میوستاتین گونه‌های مختلف

Figure 10- Phylogenetic tree, A) Rooted; B) Un-rooted, of MSTN gene's exons sequence in different species

جدول ۴- در صد شباهت (بالای قطر) و تعداد تفاوت (پایین قطر)های توالی اگزون‌ها در گونه‌های مختلف

Table 4- identity percentage and differences of MSTN gene's exon sequence in different species

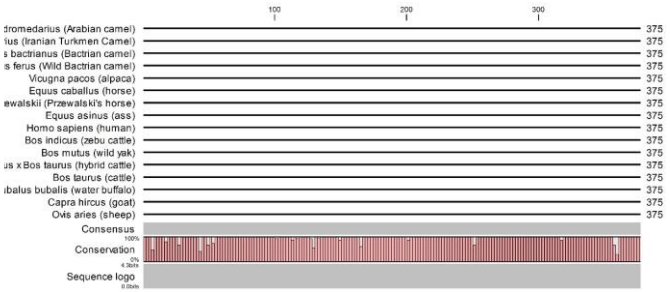
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		100.00	99.91	99.91	99.11	96.54	96.54	93.88	93.71	93.97	93.97	94.24	93.71	93/79	93.71	92.02
2	0		99.82	99.91	99.02	96.45	96.45	93.79	93.62	93.88	93.88	94.15	93.62	93.71	93.62	91.93
3	1	2		99.73	99.02	96.45	96.45	93.97	93.79	94.06	94.06	94.33	93.79	93.88	93.79	92.11
4	1	1	3		98.94	96.37	96.36	93.71	93.53	93.79	93.79	94.06	93.53	93.62	93.53	91.84
5	10	11	11	12		96.37	96.37	93.71	93.53	93.79	93.79	94.06	93.53	93.62	93.53	91.84
6	39	40	40	41	41		99.65	94.06	93.88	94.15	94.15	94.41	93.88	93.97	93.88	92.55
7	39	40	40	41	41	4		94.06	93.88	94.15	94.15	94.41	93.71	93.79	93.71	92.55
8	69	70	68	71	71	67	67		99.82	99.91	99.91	99.47	96.63	96.72	96.63	95.21
9	71	72	70	73	73	69	69	2		99.73	99.73	99.29	96.45	96.54	96.45	95.04
10	68	69	67	70	70	66	66	1	3		100.00	99.56	96.72	96.81	96.72	95.30
11	68	69	67	70	70	66	66	1	3	0		99.56	96.72	96.81	96.72	95.30
12	65	66	64	67	67	63	63	6	8	5	5		96.63	96.72	96.63	95.21
13	71	72	70	73	73	69	71	38	40	37	37	38		99.91	100.00	95.83
14	70	71	69	72	72	68	70	37	39	36	36	37	1		99.91	95.92
15	71	72	70	73	73	69	71	38	40	37	37	38	0	1		95.83
16	90	91	89	92	92	84	84	54	56	53	53	54	47	46	47	

گاو زبو(۱)، یاک وحشی(۲)، گاو آمیخته(۳)، گاو(٤)، گاومیش(٥)، بز(٦)، گوسفند(۷)، شتر ایرانی(۸)، شتر عربی(۹)، دوکوهانه وحشی(۱۰)، دوکوهانه اهلی(۱۱)، شتر بدون کوهان(۱۲)، اسب przewalski (۱۳)، الاغ(۱٤)، اسب(۱٥)، انسان(۱٦)

Zebu cattle (1), Wild yak (2), Hybrid cattle (3), Cattle (4), Water buffalo (5), Goat (6), Sheep (7), Iranian Turkmen camel (8), Arabian camel (9), Wild Bactrian camel (10), Bactrian camel (11), Alpaca (12), Przewalski's horse (13), Ass (14), Horse (15), Human (16)

به دلیل عدم وجود گسست، تنها نواحی مبهم در توالی اگزون‌های گونه‌های مختلف حذف گردیدند. درخت فیلوژنی بر اساس داده‌ها پس از ویرایش و با استفاده از روش فاصله‌ای اتصال نزدیک که به کمک مدل Kimura فاصله تکاملی را تصحیح می‌نمود، ترسیم شد. درخت فیلوژنی بدست آمده از اگزون‌های گونه‌های مختلف به صورت شکل ۸ بود.

با توجه به اینکه تعداد نوکلئوتیدهای توالی اگزون‌ها با یکدیگر برابر بودند، تعداد اسیدهای آمینه توالی پروتئین نیز در همه گونه‌ها برابر بود اما از لحاظ توالی اسیدهای آمینه با یکدیگر متفاوت بودند. بنابراین، توالی اگزون‌ها به پروتئین ترجمه گردید و هم‌ترازی به صورت شکل ۹ انجام گرفت.



شکل ۹- هم ترازی پروتئین در گونه‌های مختلف

Figure 11- Alignment and length of MSTN's protein in different camel species

بررسی هم‌ترازی پروتئین میوستاتین در گونه‌های مختلف نشان می‌دهد علیرغم تفاوت در توالی اسیدهای آمینه این ژن طول پروتئین در تمام گونه‌ها مشابه می‌باشند که می‌تواند نشان دهنده حافظت شدگی طول پروتئین در بین گونه‌های مورد بررسی باشد.

با توجه به تفاوت‌های توالی اسیدهای آمینه در پروتئین درصد شباهت و تعداد تفاوت‌های موجود در توالی پروتئین مورد بررسی قرار گرفته‌اند که نتایج آن در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵- در صد شباهت (بالای قطر) و تعداد تفاوت(پایین قطر)های توالی پروتئین میوستاتین در گونه‌های مختلف

Table 4- identity percentage and differences of MSTN's protein sequence in different species

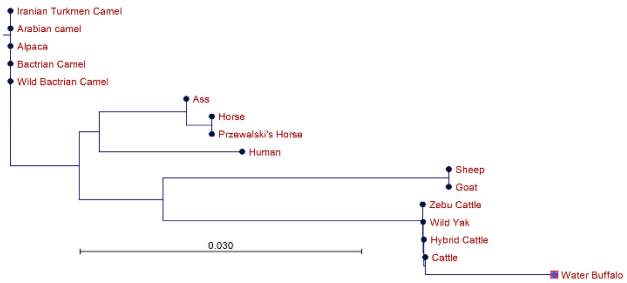
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		100.00	100.00	100.00	98.67	93.37	93.37	95.21	95.21	95.21	95.21	95.21	94.68	94.95	94.68	94.15
2	0		100.00	100.00	98.67	93.37	93.37	95.21	95.21	95.21	95.21	95.21	94.68	94.95	94.68	94.15
3	0	0		100.00	98.67	93.37	93.37	95.21	95.21	95.21	95.21	95.21	94.68	94.95	94.68	94.15
4	0	0	0		98.67	93.37	93.37	95.21	95.21	95.21	95.21	95.21	94.68	94.95	94.68	94.15
5	5	5	5	5		92.04	92.04	93.88	93.88	93.88	93.88	93.88	93.35	93.62	93.35	92.82
6	25	25	25	25	30		100.00	94.95	94.95	94.95	94.95	94.95	94.41	94.68	94.41	93.88
7	25	25	25	25	30	0		94.95	94.95	94.95	94.95	94.95	94.41	94.68	94.41	93.88
8	18	18	18	18	23	19	19		100.00	100.00	100.00	100.00	97.87	98.13	97.87	97.60
9	18	18	18	18	23	19	19	0		100.00	100.00	100.00	97.87	98.13	97.87	97.60
10	18	18	18	18	23	19	19	0	0		100.00	100.00	97.87	98.13	97.87	97.60
11	18	18	18	18	23	19	19	0	0	0		100.00	97.87	98.13	97.87	97.60
12	18	18	18	18	23	19	19	0	0	0	0		97.87	98.13	97.87	97.60
13	20	20	20	20	25	21	21	8	8	8	8	8		99.73	100.00	97.33
14	19	19	19	19	24	20	20	7	7	7	7	7	1		99.73	97.60
15	20	20	20	20	25	21	21	8	8	8	8	8	0	1		97.33
16	22	22	22	22	27	23	23	9	9	9	9	9	10	9	10	

گاو زبو(۱)، یاک وحشی(۲)، گاو آمیخته(۳)، گاو(٤)، گاومیش(٥)، بز(٦)، گوسفند(۷)، شتر ایرانی(۸)، شتر عربی(۹)، دوکوهانه وحشی(۱۰)، دوکوهانه اهلی(۱۱)، شتر بدون کوهان(۱۲)، اسب przewalski (۱۳)، الاغ(١٤)، اسب(١٥)، انسان(١٦)

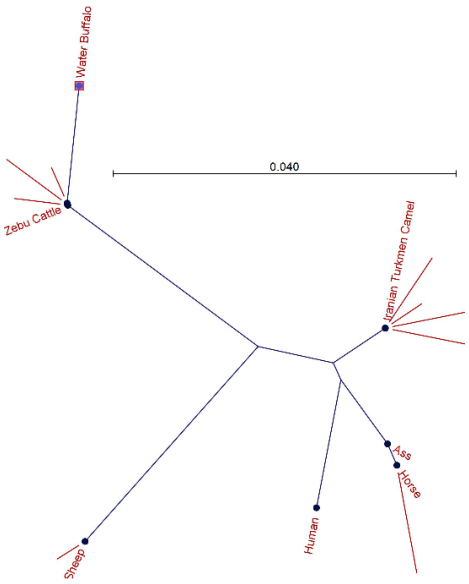
Zebu cattle (1), Wild yak (2), Hybrid cattle (3), Cattle (4), Water buffalo (5), Goat (6), Sheep (7), Iranian Turkmen camel (8), Arabian camel (9), Wild Bactrian camel (10), Bactrian camel (11), Alpaca (12), Przewalski's horse (13), Ass (14), Horse (15), Human (16)

علیرغم اینکه همولوژی توالی پروتئین بین گونه‌های مختلف شتر جهان قدیم و همچنین گاو زبو، یاک وحشی و گاوهای آمیخته صد در صد بود. همولوژی بین گوسفند و بز و همچنین اسب przewalski و اسب نیز کامل بودند. کمترین همولوژی بین انسان و گاومیش به مقدار ۹۲/۸۲ مشاهده شد. بیشترین گسست نیز با مقدار ۳۲۳٦ در بین گوسفند و الاغ مشاهده گردید.

با توجه به وجود نواحی مبهم در توالی اگزون برخی از گونه‌های مورد بررسی، که تولید اسیدهای آمینه را با ابهام مواجه می‌نمود، بر اساس داده‌ها پس از حذف اسیدهای آمینه مبهم، ترسیم درخت فیلوژنی (شکل ۱۰) انجام شد.



A



B

شکل ۱۰- درخت فیلوژنی ریشه‌دار (A) و بدون ریشه (B) پروتئین میوستاتین در گونه‌های مختلف

Figure 2- Phylogenetic tree, A) Rooted; B) Un-rooted, of MSTN' protein sequence in different camel species

توالی پروتئین به دلیل سرعت تکاملی پایین در بین گونه‌های مختلف دارای همولوژی بالایی می‌باشد. بنابراین، بررسی نمو توالی پروتئین می‌تواند برای تفکیک دقیق‌تر گونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

بحث

همانطور که نتایج برگر (۲۰۱٦) نشان داده است، ایجاد خانواده شترسانان (Camelida) حدود ٤۰ میلیون سال قبل بر می‌گردد. بنابراین، علیرغم اینکه بین توالی نوکلئوتید اینترون‌ها و اگزون‌های ژن در این خانواده تفاوت وجود

دارد، در توالی اسیدهای آمینه پروتئین این ژن تفاوتی مشاهده نگردید که نشان دهنده حفاظت کامل این ژن طی دوره تکاملی می باشد. می‌توان گفت که جهش‌های متعدد صورت گرفته در ژن طی انتخاب طبیعی حذف شده و فرصت تکاملی برای آن فراهم نگردیده است. از لحاظ تکاملی شتر تک‌کوهانه ترکمن بین شتر دوکوهانهٔ اهلی و شتر عربی قرار می گیرد. با توجه به بررسی میزان همولوژی و تفاوت و ترسیم درخت همولوژی مربوط به توالی ژن و پروتئین آن در ۱۶ گونه مورد بررسی، نشان داد که طول اگزون‌ها و در نهایت طول پروتئین در همه گونه‌ها برابر است، از طرفی، میزان همولوژی توالی پروتئین در گونه‌های مختلف متفاوت می باشد. با وجود تفاوت طول توالی ژن در گونه‌های مختلف، تشابه طول توالی اگزون‌ها و اسیدهای آمینه در آنها نشان‌دهندهٔ حفاظت کامل طول اگزون‌های این ژن در طی دورهٔ تکامل گونه‌ها است. بیشترین میزان نوسان طول توالی در گونه اسب‌سانان وجود داشت که در درخت فیلوژنی هر دو داخل یک خوشه قرار گرفتند. بنابراین در طی تکامل، تغییر پایدار در توالی پروتئین میوستاتین مستلزم حفظ طول پروتیئن بوده است. درخت فیلوژنی بدست آمده در این مطالعه مطابق با مطالعات مختلف ژن‌های گوناگون در گونه‌های متفاوت می‌باشد (برگر ۲۰۰۶؛ احمدپناه ۲۰۱۶). در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به کمک توالی پروتئین گونه‌های مختلف، گونه‌های شترسانان، اسب‌سانان و گاوها در شاخه‌های مجزا قرار گرفتند که نشان‌دهنده افزایش دقت تفکیک گونه‌ها با استفاده از داده های توالی پروتئین است.

نتیجه‌گیری کلی

طول توالی اگزون‌های ژن میوستاتین در تمام گونه‌ها مشابه است و ترسیم درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی پروتئین این ژن گونه‌ها را با دقت بیشتری تفکیک می نماید.

منابع مورد استفاده

Abdel-Aziem EA, El-Kader HAM, Alam SS and Othman OE, 2015. Detection of Msp Ipolymorphism and the single nucleotide polymorphism (SNP) of GHgene in camel breeds reared in Egypt. African Journal of Biotechnology 14: 752-757.

Ahmadpanah J, 2016. Phylogenetic Analysis and Molecular Evolution of the Leptin Gene. Research on Animal Production 7(13): 208-213.

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

Bish LT, Sleeper MM, Forbes SC, Morine KJ, Reynolds C, Singletary GE, Trafny D, Pham J, Bogan J, Kornegay JN, Vandenborne K, Walter GA and Sweeney HL, 2011. Long-term systemic myostatin inhibition via liver-targeted gene transfer in golden retriever muscular dystrophy. Human Gene Therapy 22: 1499-1509.

Burger PA, 2016. The history of Old World camelids in the lightof molecular genetics. Tropical Animal Health and Production 48: 905–913.

Busquets S, Toledo M, Orpí M, Massa D, Porta M, Capdevila E, Padilla N, Frailis V, López-Soriano FJ, Han HQ, Argilés JM, 2012. Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing in Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle 3: 37-43.

Chuluunbat B, Charruau P, Silbermayr K, Khorloojav T and Burger PA, 2014. Genetic diversity and population structure of Mongolian domesticBactrian camels (Camelus bactrianus). Animal Genetics 45: 550–558.

Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M, 2006. A mutation creating a potential

illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nature Genetics 38: 813–818.

Ghaderi-Zefrehei M, Amiri M, Hashemi L, Samadian F, 2019. Exploring structure, CPG islands, DNA methylation and protein of candidate genes influencing mastitis in dairy cows. journal of Animal Science Researches 29(1): 107-123.

Hedayat-Evrigh N, Vahedi V, Seyed-Sharifi R and Boustan A, 2016. Sequencing and identification of single nucleotide polymorphisms of Partial myostatin gene in dromedary and Bactrian camels. Agricultural Biotechnology Journal 8(3): 120-135.

Kota J, Handy CR, Haidet AM, Montgomery CL, Eagle A, Rodino-Klapac LR, Tucker D, Chilling CJ, Therfall DR, Walker CM, Weisbrode SE, Lanssen PML, Reedclarck R, Sahenk Z, Mendell JR and Kaspar BK, 2009. Follistatin gene delivery enhances muscle growth andstrength in nonhuman primates. Science Translational Medicine 1(66): ra15.

Michu E, 2007. A short guide to phylogeny reconstruction. Pant, Soil and Environmrnt 53(10): 442–446.

Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG and Ostrander EA, 2007. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. PLoS Genetics 3: e79.

Muzzachi S, Oulmouden A, Cherifi Y, Yahyaoui H, Zayed MA, Burger P, Lacalandra GM, Fayeand B and Ciani E, 2015. Sequence and polymorphism analysis of the camel (Camelus dromedarius) myostatin gene. Emirates Journal of Food and Agriculture 27(4): 367-373.

Ramadan S, Inoue-Murayama M, 2017. Advances in camel genomics and their applications: A review. The Journal of Animal Genetics 45: 49–58.

Sajadi Zarjani S, Bahreini Behzadi MR, Fardaei M, 2016. Sequencing of third exon of IGF1 gene in sheep. Agricultural Biotechnology Journal 7(4): 83-96.

Shah MG, Qureshi AS, Reissmann M and Schwartz HJ, 2006. Sequencing and sequence analysis of Myostatin gene in the exon 1 of the camel (Camelus Dromedarius). Pakistan Veterinary Journal 26(4): 176-178.

Stinckens A, Georges M and Buys N, 2011. Mutations in the myostatin gene leading tohypermuscularity in mammals: indications fora similar mechanism in fish? Animal Genetics 42(3): 229-234.

Tahmoorespur M, Sekhavati MH, Kahbiri AA and Mohammadhashemi A, 2016. Sequencing and Bioinformatics Analysis of Kappa-Casein Exon 4 Gene in Iranian Bacterianus and Dromedaries Camels. Iranian Journal of Applied Animal Science 6(1): 219-224.

Villanueva B, Pong-Wong R and Wooliams J, 2002. Marker assisted selection with optimised contributions of the candidates to selection. Genetics Selection Evolution 34: 679–703.

Wang Q and Mcpherron A, 2012. Myostatin inhibition inducesmuscle fbre hypertrophy prior to satellite cell activation. The Journal of Physiology 590: 2151-2165.

Welle S, Mehta S and Burgess K, 2011. Effect of postdevelopmental myostatin depletion on myofibrillar protein metabolism. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism 300: 993-1001.

Yi L, Ai Y, Ming L, Hai L, He J, Guo FC, Qiao XY and Rimutu Ji, 2017. Molecular diversity and phylogenetic analysis of domestic and wild Bactrian camel populations based on the mitochondrial ATP8 and ATP6 genes. Livestock Science 199: 95-100.

Phylogenetic and evolutionary investigation of MSTN gene sequence of Turkmen camel in comparison with other species

K Nobari[1], A Bahari[2] , M Bitaraf-Sani[3] and Abdollah Kavian[4]

Received: June 11, 2019 Accepted: September 30, 2019

[1]Asisstant professor, Animal Science Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran
Assistant professor, Research Institute of modern biological techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran
[3]Asisstant professor, Animal Science Research Department, Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yazd, Iran
[4]Member of Scientific Board, Animal Science Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran
*Corresponding author: k.nobari@areeo.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Researches
Journal of Animal Science/vol.29 No.4/ 2020/pp 69-88
https://animalscience.tabrizu.ac.ir
OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
This is an open access article under the CC BY license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

Introduction: The evolution of single and two humped camels dating back to 40 to 45 million years ago, when the Camelida family was evolved during the Eocene in North America. Genus Camelini and Genus Lamini, which includes species of Guanaco, Lama, Alpaca, and Vicugna, were evolved from the Camelida family, about 11 to 25 million years ago. Old world camel can be divided into wild and domestic one and two humped camels, in which wild type of one humped camel has been distanced centuries ago (Burger 2016). Among 150,000 of Iranian one-humped camel, there are about 2,000 one-humped (Turkmen) camels, which are the country's major species (Ansari Renani et al 2010), whom mainly rearing in Golestan province. Single-humped camels are used mainly for the purpose of producing meat, milk, transport, hair, and sports (Abdel-Aziem et al. 2015; Ramadan and Inoue-Murayama 2017). Several studies in different species have shown that the genetic polymorphisms of the Myostatin gene can increase the lean meat (Mosher et al. 2007). The identified polymorphisms of the gene in the camel included mutations in non-coding regions and synonymous mutations in coding regions (Shah et al. 2006; Sajadi Zirjani et al. 2016). Myostatin or Growth differentiation factor 8 (GDF8) is a member of beta-transforming family (TGF-β) that limits muscle mass (Wang and Mcpherron 2012). The mutation in the Myostatin gene increases muscle mass through the growth and proliferation of its cells (Mosher et al. 2007). The Myostatin gene with its three exons and two introns, has been sequenced in wild and domestic two-humped and domestic Arabian camel. The aim of this study was to investigate the sequence of the Myostatin gene (Gene ID: 105099167) of Camellus Bactrianus, Ferus, Dromedarius (Arabian) and some other species with Iranian Turkmen Dromedarius camel. Therefore, the evolutionary relationships among different species in terms of the sequence of this gene can be determined using phylogenetic study. For this reason, the whole genome sequence of Turkmen camel was performed and Myostatin gene sequences of different species were obtained from data banks.

Material and methods: The blood sample was obtained using syringe from the abdominal vein of a pure Iranian Turkmen camel, then stored in an EDTA containing plastic tube. After extraction, one microliter of the product was used to measure concentration using Qubit^{TM} Fluorometer (Invitrogen, Cat. No.

Q32857). After evaluation, the sample was sent for whole genome sequencing using the Illumina HiSeq 2000 platform. After trimming the results, reads were assembled and the reads containing the Myostatin gene were extracted from the whole data set. To compare the different species of camels, the Myostatin gene sequence of Arabic camels, wild Bactrian camel, domesticated Bactrian camel, and Alpaca were obtained from NCBI. Using the CLC Genomics Workbench 12 software, alignment was performed to compare and obtain the sequences of the Myostatin gene in old and new world camels. Alignment for comparison of Myostatin gene sequence parameters of different camel species were conducted using CLC Genomics Workbench 12 software. Then, the number of gaps, differences, distances, identity percent, and identity of Myostatin gene sequence nucleotides was considered in different camel species. To study the degree and the relative time of divergence of the camel species, a phylogeny tree using neighbor-joining method was prepared. Also, annotation information of Myostatin was used to extract exons and introns of the gene. Then, the number of gaps, differences, distances, identity percent, and identity of Myostatin protein sequences was considered in different camel species. The phylogenetic and evolutionary situation of the Turkmen camel compared to many other species.

Results and discussion: Concentration of extraction product was 304 ng/µl. A total of 589,326,158 clean reads of about 88 billion nucleotides in paired end mode with the length of 150 base pairs were obtained. The Myostatin gene sequence was extracted from the assembled whole data set. Alignment results of Myostatin gene sequence in different camel species showed the greatest gap, differences and distance, and the least similarity between the alpaca species and other camel species were obtained. Also, the most similarity obtained between wild and domestic two-humped camels. The phylogenetic tree obtained from the gene sequence alignment revealed that Alpaca is far apart from other camel species. Among old world camels, the two-humped camels are more distinct from the Arabian one-humped camel. The length of the exons in different species was equal, but not the sequence, and exon alignment showed evolutionary conservation of exon length and ultimately the protein length. Considering identity and differences of exons and gene sequence revealed that Alpaca is more distant from other species. Also, one-humped and two-humped camels were similar to each other. The results are consistent with the results of Shah et al. (2006), which did not observe any polymorphism by sequencing of exon 1 of this gene. In the study of Yi et al. (2017), domestic and wild two-humped camel were located in different branches of the phylogenetic tree. In this study, the Iranian Turkmen camel was located in a separate branch between the two-headed and one-humped Arab camels. Myostatin gene alignment was conducted between different species and the phylogenetic tree showed that camels, horses, sheep, goats and cows belong to different groups. In the study of Hedayat-Evrigh et al. (2016), it was found that one-humped and two-humped camels were far away from cattle and horses. Homology between sheep and goat, as well as przewalski horse and the horse were complete. The lowest homology of 92.82 was found between humans and buffaloes. The greatest gaps of 3236 nucleotide were seen between sheep and donkeys.

Conclusion: Although there are differences between the nucleotide sequence of the introns and the exons of Camelida family, there was no difference in amino acid sequence of the gene, which indicates the strong protection of this gene during the evolutionary period. It can be said that numerous mutations in the gene have been eliminated during natural selection and no evolutionary opportunity has been provided for the mutations. The study of the homology and difference between the 16 species revealed that the homology of the protein sequence is very high in different species.

Keywords: GDF8, Genome of Turkmen camel, Alignment, Sequencing, Evolution