فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال دوازدهم، شماره ۳، تابستان ۱۳۹۹ ص.۱۱-۲۰

مقاله پژوهشی

شناسایی و ثبت بارکد DNA شتر دوکوهانه ایران (*Camelus bactrianus*)

لاله پارسا یگانه[۱*]، مریم صادقی[۱]، رضا آذربایجانی[۱]، عبدالرضا دانشور آملی[۲]، شیوا محمدی مغانجوقی[۲]، پروانه فرزانه[۲]، سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی[۳]، حمیدرضا خالدی[۴*]

[۱] بانک مولکولی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
[۲] بانک سلول های انسانی و جانوری، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.
[۳] دانشکده علوم پایه و فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
[۴] دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام (ره)، شهرری، ایران

[*] Email: la_yeganeh@yahoo.com, k_khaledi2000@yahoo.com

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۹

چکیده

تنوع زیستگاهی در ایران، منجر به تنوع زیستی بی‌نظیر گیاهی و جانوری در این کشور شده است. حفاظت از تنوع زیستی ایران از ۵۰ سال پیش در کشور آغاز شده است اما با این وجود سرعت انقراض گونه‌های جانوری در ایران بالاست و هر ساله لیستی از گونه‌های جانوری و گیاهی در معرض انقراض و یا تهدید ایران در لیست سرخ IUCN منتشر می‌شود. بارکدینگ DNA ابزاری مولکولی است که با استفاده از آغازگرهای استاندارد و تکثیر توالی ۶۰۰ تا ۸۰۰ نوکلئوتیدی از ژن سیتوکروم C اکسیداز I میتوکندریایی به طور گسترده جهت طبقه‌بندی تاکسونومیک گونه‌ها استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر این روش برای مطالعه و دسته‌بندی گونه‌ها جهت الویت‌بندی فعالیت‌های حفاظت تنوع زیستی محبوبیت و عمومیت فزاینده‌ای یافته است. شتر دوکوهانه ایرانی یکی از گونه‌های مهم بومی در معرض خطر انقراض ایران با توزیع پراکندگی در شمالغرب ایران است. با توجه به کاهش شدید جمعیت آن، توجه بیشتر به این نژاد از دیدگاه حفاظت تنوع زیستی بسیار حائز اهمیت است. در این تحقیق از ۶ نفر شتر دوکوهانه ایران نمونه برداری شده و بعد از استخراج DNA ناحیه مذکور ژنوم میتوکندریایی به طول ۶۵۰ نوکلئوتید تکثیر و توالی یابی شد. بعد از انجام آنالیزهای استاندارد بیوانفورماتیک توالی بارکد DNA شتر دوکوهانه ایرانی شناسایی و به همراه مشخصات کامل زیستگاهی و مورفولوژیکی نمونه‌ها در پایگاه داده بارکد DNA تنوع زیستی جهانی (BoldSystem) به نام ایران ثبت شد.

کلیدواژه‌ها: بارکدینگ DNA ، تنوع جنسی، شتر دوکوهانه، کنسرسیوم بارکدینگ DNA.

مقدمه

تنوع زیستگاهی در ایران، شرایط را برای زیستن انواع گستره‌ای از حیوانات در کشورمان فراهم کرده است. اقلیم‌های پیچیده و مختلف، شرایط توپوگرافیک، تشکیلات زمین‌شناسی و مدیریت انسانی منابع طبیعی منجر به پیدایش تنوع بیولوژیک بی‌نظیر و متنوعی در کشور شده است. به

دلیل گستردگی کشور، تنوع زیست بوم‌ها و اجزاء تنوع زیستی آن، ایران یکی از مهم‌ترین کشورها برای حفاظت از تنوع زیستی در خاورمیانه و غرب آسیاست [۱۲]. حفاظت تنوع زیستی ایران از حدود ۵۰ سال پیش آغاز شده است و در حال حاضر ۱۰ % از کشور تحت حفاظت است. با این وجود تنوع زیستی ایران بسیار در معرض تهدید است و در حال حاضر طبق لیست قرمز گونه‌های در معرض خطر سازمان جهانی حفاظت از منابع طبیعی بیش از ۱۰۰ گونه جانوری از مهره‌داران ایران در معرض تهدید و یا انقراض قرار دارند. افزایش جمعیت و فعالیت‌های انسانی، تغییر شرایط جوی، خشکسالی، بیابان‌زایی، کشاورزی، شکارچیان و تحریم‌های اقتصادی به ایجاد این بحران کمک کرده است [۲۲]. یکی از گونه‌های مهم بومی و در معرض انقراض ایران شتر دوکوهانه است. در مورد مکان اهلی شدن شترهای دو کوهانه بیشتر پژوهشگران معتقدند که شتر دوکوهانه در منطقه خراسان بزرگ، مغولستان، چین، افغانستان و آسیای میانه اهلی شده است و گروهی معتقدند که واژه Bactrian که در زبان انگلیسی به شتر دوکوهانه اطلاق می‌شود از ریشه Bactar یا باختر است. شترهای دوکوهانه، مناطق پراکنش محدودی دارند و در استان آذربایجان شرقی، اردبیل و گلستان و البرز پرورش داده می‌شوند. جمعیت شتر دوکوهانه در ایران محدود بوده و حدود۱۵۰ نفر از آن در مناطق مختلف کشور پرورش می‌یابند. با توجه به اینکه شتر دوکوهانه جزو نژادهای بومی کشور بوده و خاستگاه اولیه آن نیز ایران است، حفظ و ثبت جهانی این نژاد به نام ایران یک از اهداف محققین کشور است تا آیندگان فرصت استفاده از این منبع عظیم خدادادی را برای اهداف مختلف از جمله دستیابی به غذای کافی، تولید محصولات متنوع جدید، پایداری در کشاورزی و محیط زیست با داشتن تنوع زیستی لازم و کافی را داشته باشند [۳]. خط شناسه‌گذاري DNA یا DNAbarcoding روش شناسایی مولکولی و دقیق براساس DNA حفاظت شده موجودات در پژوهش‌های تاکسونومي است. این روش در سال‌های ۲۰۰۳-۲۰۰۲ مطرح شده و به سرعت به عنوان روشی استاندارد و جهانی برای شناسایی گونه‌های مختلف موجود در تنوع زیستی تبدیل شد [۸ و ۱۰]. بارکد DNA برای گونه‌های جانوری قطعه‌ای به طول ۶۰۰ -۸۰۰ جفت باز از ژن سیتوکروم c اکسیداز ۱ میتوکندریایی است که به دلیل حفاظت شدگی در گونه‌های جانوری و نیز تنوع کافی برای تفکیک گونه‌های جانوری از یکدیگر، به عنوان بارکد DNA جانوری معرفی شده است. امروزه این روش در تلفیق با روش‌های دیگر نقش بسیار مهمی در مطالعات تاکسونومیک و حفاظت از تنوع زیستی دارد [۹ و ۱۳]. کنسرسیوم DNA barcoding (Consortium for the Barcode of Life-CBOL) به عنوان تشکلی بین‌المللی برای استانداردسازی پروتکل‌ها و ثبت و استفاده از این توالی‌ها تشکیل شده و پروژه‌های بین‌المللی بارکدینگ گونه‌های جانوری با همکاری کشورهای مختلف از سال ۲۰۱۰ تا کنون تحت نظارت این کنسرسیوم تحت عنوان بارکدینگ تنوع زیستی انجام شده است. کنسرسیوم بارکدینگ تلاش مي‌کند چارچوبي براي همکاري‌هاي بين‌المللي پديد آورد تا همه کشورها بهتر بتوانند به ارزيابي و حفظ تنوع زيستي خود بپردازند و این در حالیست که بیش از ۱۰۰ موسسه از بیش از ۴۰ کشور عضو رسمی کنسرسیوم جهانی بارکدینگ بوده و در قالب سه هسته و گروه به فعالیت در زمینه شناسایی تنوع زیستی مشغول هستند [۱۶ و۱۹]. یکی از پروژه‌های بین‌المللی CBOL شناسایی و ثبت بارکد DNA از گونه‌های مهم در معرض تهدید و یا خطر انقراض می‌باشد [۲۱]. این درحالیست که کشور ایران علی رغم دارا بودن تنوع وسیع زیستی و گونه‌های مهم در معرض انقراض تا کنون اقدام به اجرا و انجام پروژه‌های منسجم بارکدینگ DNA در قالب همکاری بین‌المللی نکرده است اما پروژه‌هایی به طور پراکنده بر روی آبزیان و حشرات و گیاهان در ایران انجام شده و بارکد آن‌ها ثبت شده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۰ توسط افرند و همکاران انجام شد با استفاده از تکنیک بارکدینگ DNA، ۸ گونه از آنچوی ماهیان دریای عمان و خلیج فارس شناسایی و طبقه‌بندی گردید. در این تحقیق مجموعا ۵۳ نمونه و به طور میانگین از هر گونه ۶ نمونه مورد بررسی قرار گرفت و DNA بارکد گونه *Thryssa whiteheadi* به عنوان گونه بومی خلیج فارس برای اولین بار شناسایی و ثبت شد

[۲]. در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۲۰ توسط ابوالحسنی و همکاران جهت بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت ماهی پرچمی در مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری صورت گرفت ۳۰ نمونه از رودخانه‌ها و تالاب‌های استان جمع‌آوری گردید و محموعا در ۶ هاپلوتایپ طبقه‌بندی شد. و در نهایت تنوع ژنتیکی معنی‌داری در گونه *Aphanius vladykovi* مشاهده نشد (۱). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۹ بر روی دو گیاه دارویی مهم کاکوتی و آویشن موجود در بازار ایران توسط مسعود شیدایی و همکاران صورت گرفت بارکد DNA برای اولین برای این گیاهان شناسایی و معرفی شد. هدف از این مطالعه عدم اختلاط این دو گیاه در بازار مصرف گیاهان دارویی ایران بود [۱۸]. تنوع ژنتیکی گونه‌های پشه کولکس، پروانه سانان، و گیاهان دارویی مختلف ایران توسط تکنیک بارکدینگ DNA مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۱۷-۱۵-۷]. در سال ۲۰۱۳ چنگیزی و همکاران با استفاده از شناسایی گونه‌ها از طریق بارکدینگ DNA نشان دادند که برخی از محصولات و فراورده‌های غذایی دریایی موجود در بازار ایران به اشتباه برچسب‌گذاری شده بودند[۵]. تکنیک بارکینگ DNA چارچوبی عملیاتی و موثر برای شناسایی تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی گونه‌های پستانداران فراهم کرده است. تلاش برای ایجاد یک کتابخانه مرجع از داده‌های ژنتیکی پستانداران منجر به جمع‌آوری بیش از ۳۵۰۰۰ توالی نوکلئوتیدی از زیر واحد I ژن سیتوکروم اکسیداز در قالب پروژه‌های بارکدینگDNA پستانداران شده است [۱۱]. در این مطالعه با استفاده از تکنیک DNA بارکدینگ بارکد DNA گونه در معرض خطر انقراض شتر دوکوهانه شناسایی و به همراه مشخصات کامل مورفولوژیکی و زیستگاهی در پایگاه جهانی بارکد DNA ثبت شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: مقداري از پوست گوش خارجي شتر دوکوهانه با استفاده از پانچر نمونه برداري برداشته می‌شود. برای نمونه برداری ۵ نفر شتر دوکوهانه از مرکز حفاظت و توسعه شتر دوکوهانه کشور واقع در جعفر آباد و پارس آباد (مغان) (۵ تکرار) انتخاب شدند. پس از انتخاب شتر دوکوهانه و قبل از انجام نمونه‌گیری، اسم و یا شماره گوش، سن، جنس، رنگ، مشخصات پدر و مادر، تاریخ و محل نمونه‌گیری از شتردوکوهانه مورد نظر و مشخصات بیومتریک آن در فرم‌های ثبت مشخصات درج گردید. ضمنا یک تصویر از هر شتر دوکوهانه برای قرارگیری در شناسنامه حیوانی و سایت اینترنتی مرکز ذخایر ژنتیکی در نظر گرفته شد.

- استخراج DNA

DNA ژنومی با استفاده از کیت " استخراج DNA ژنومی از خون و سلول‌های کشت شده IBRC" با اعمال تغییرات جزئی مطابق با بافت مورد نظر استخراج شد. بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. تکثیر ژن COI جهت تکثیرژن میتوکندریایی سیتوکروم‌C اکسیداز زیر واحد۱ (COI) باطول تقریباً۷۱۰ جفت باز، از "مستر میکسPCR تاپ" (شرکت توپاز ژن، شماره کاتالوک TGP3003) استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده آغازگرهای استاندارد فولمری [۲۰] LCO1490:GGTCAACAAATCATAAAGAT ATTGG-3' و HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' 5'- و PCR با برنامه یک سیکل واسرشت اولیه ۹۴ $^{\circ}$C به مدت ۳ دقیقه، ۵ سیکل با برنامه واسرشت ۹۴ $^{\circ}$C به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال ۴۵ $^{\circ}$C به مدت ۹۰ ثانیه و طویل سازی ۷۲ $^{\circ}$C به مدت ۶۰ ثانیه، ۲۵ سیکل واسرشت ۹۴ $^{\circ}$C به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۱ $^{\circ}$C به مدت ۹۰ ثانیه و طویل سازی ۷۲ $^{\circ}$C به مدت ۶۰ ثانیه و یک سیکل طویل‌سازی ۷۲ $^{\circ}$C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. قطعه تکثیر شده از ژن سیتوکروم اکسیداز توسط" کیت تخلیص محصول IBRC PCR " طبق پروتکل کیت تخلیص شد.

- توالی یابی ژن COI و آنالیز بیوانفورماتیکی

توالی‌یابی دو طرفه به روش سنگر در شرکت میکروسینس (Microsynth) سوییس انجام شد. نتایج توالی یابی در دو فرمت. ab1 (به عنوان فایل کروماتوگراف) و .seq (به عنوان فایل خام توالی‌یابی) دریافت شد. جهت آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌ها در ابتدا جهت همگذاری (Assembling) از نرم‌افزارهای bl2seq و MEGA7 استفاده گردید. در نهایت بعد از حذف قسمت همپوشان دوتوالی کامل مستقیم و معکوس برای هر نمونه حاصل گردید. سپس طبق استاندارد کنسرسیوم بارکدینگ، توالی‌ها به طریق دستی کنترل کیفی گردید. به این ترتیب که با آنالیز کروماتوگراف یا پیک‌های توالی‌یابی مربوط به هر نمونه با نرم‌افزار Chromas در الگویی همزمان با چک کردن با پایگاه داده‌ها، نوکلئوتیدهای با رزولشن نامشخص و یا وزن پیک کمتر مورد بررسی مجدد قرار گرفتند. توالی‌های به دست آمده با استفاده از Blastn و Blastx با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن مقایسه گردید. بعد از اصلاح توالی‌ها، با دریافت توالی بارکد ثبت شده از۱۶۷ نمونه شتر در BOLD System، فاصله ژنتیکی درون و بین گونه‌ای با استفاده از روش Kimura-2-parameter (K2P) و حذف کامل‌Gap، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسفورژن، سرعت جانشینی یکنواخت و الگوی هموژن بین افراد در نرم‌افزار MEGA7 به دست آمد. درخت فیلوژنی از مجموعا ۴۸ توالی ثبت شده از سه گونه شتر و ۵ توالی به دست آمده از نمونه‌های شتر دوکوهانه مورد مطالعه و یک نمونه outgroup بر اساس روش Neighbor-Joining با استفاده از فاصله ژنتیکی K2p با پشتوانه تکرار ۱۰۰۰ بار، حذف کامل Gap، در نظر گرفتن جهش‌های ترانزیشن و ترانسفورژن، سرعت جانشینی یکنواخت و الگوی هموژن بین افراد در نرم‌افزار MEGA7.0.26 ترسیم گردید(۱۴).

نتایج

نمونه‌برداری و ثبت اطلاعات: اطلاعات فردی نمونه، تاکسونومیکی و نمونه برداری در جداول مربوطه ثبت شد. جدول شماره ۱ اطلاعات مربوط به نمونه، جدول شماره ۲ اطلاعات تاکسونومیکی و جدول شماره ۳ اطلاعات مربوط به نمونه برداری اعم از نام ایستگاه، مختصات جغرافیایی، فرد جمع اوری کننده نمونه را نشان می‌دهد. شکل ۱ تصویر شتر دوکوهانه را نشان می‌دهد.

- استخراج DNA، تکثیر ژن COI و توالی یابی

DNA از تمام نمونه‌ها در مقدار مناسب و کیفیت مناسب A260/A280 ≥1.7 جهت انجام PCR استخراج شد. قطعه‌ای به طول تقریبی ۷۵۰ جفت باز در تمام نمونه‌ها تکثیر شد. قطعه تکثیر شده روی ژل الکتروفورز آگارز ۱% مشاهده و با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR تخلیص شد.

جدول ۱ : اطلاعات فردی نمونه

Specimen Details			
1	Sample ID	C10277	C10280
2	Sex	Male	Female
3	Repro- duction	Sexual	Sexual
4	Life Stage	2 years old	2 years old
5	Notes	Sandy Beige	Sandy Beige
6	Voucher Status	Registered collection	Registered collection
7	Tissue Descriptor	Skin	Skin
8	Associated Taxa	-	-
9	Associated Specimens	-	-
10	External URLs	IBRC name: CaBa 06	IBRC name: CaBa 09

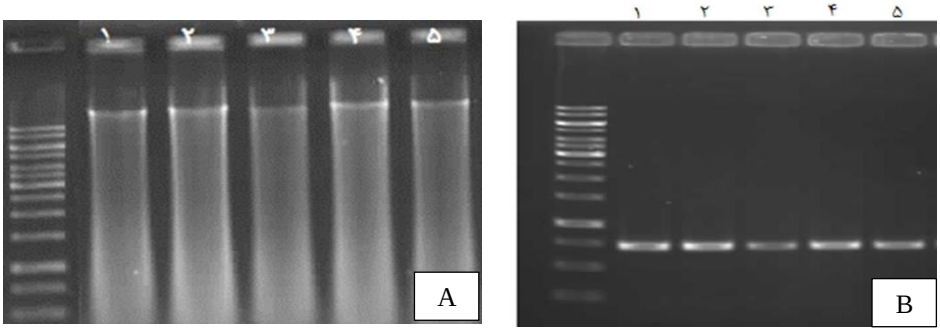
جدول ۲ : اطلاعات تاکسونومیکی نمونه

Taxonomy			
	Sample ID	C10277	C10280
1	Phylum	Chordata	Chordata
2	Class	Mammalia	Mammalia
3	Order	Artiodactyla	Artiodactyla
4	Family	Camelidae	Camelidae
5	Genus	Camelus	Camelus
6	Species	*Camelus bactrianus*	*Camelus bactrianus*
7	Identifier		
8	Identifier Email		
9	Identifier Institution	Ministry of Jehad Agriculture, Research center of Agriculture & Natural Resources of Ardebil Province, Jafar Abaad breeding station, Iran.	Ministry of Jehad Agriculture, Research center of Agriculture & Natural Resources of Ardebil Province, Jafar Abaad breeding station, Iran.
10	Identification Method		

جدول ۳ : اطلاعات مربوط به جمع آوری نمونه

Collection Info			
1	Sample ID	C10277	C10280
2	Collectors	Dr. Daneshvar	Dr. Daneshvar
3	Collection Date	03.Feb.2013	03.Feb.2013
4	Continent/	Asia	Asia
5	Country/Ocean	Iran	Iran
6	State/ Province	Ardebil	Ardebil
7	Region	Jafar Abaad	Jafar Abaad
8	Sector		
9	Exact Site	Ministry of Jehad Agriculture, Research center of Agriculture & Natural Resources of Ardebil Province, Jafar Abaad breeding station, Iran.	Ministry of Jehad Agriculture, Research center of Agriculture & Natural Resources of Ardebil Province, Jafar Abaad breeding station, Iran.
10	Latitude	38.25	38.25
11	Longitude	48.30	48.30
12	Elevation	1350m	1350m
13	Depth	-	-
14	Elevation Precision	-	-
15	Depth Precision	-	-
16	GPS Source	Wikimini Atlas	Wikimini Atlas
17	Coordinate Accuracy	1 min	1 min
18	Event Time	Noon	Noon
19	Collection Date Accuracy	1 day	1 day
20	Habitat	Villiage	Villiage
21	Sampling Protocol	Punch	Punch
22	Collection Notes	-	-
23	Site Code	Ardebil	Ardebil
24	Collection Event ID	IBRC	IBRC

شکل ۱: تصویر دو نمونه از شترهای دوکوهانه که اطلاعاتشان در پایگاه داده رسمی بارکد DNA موجودات "Bold System" ثبت شد.



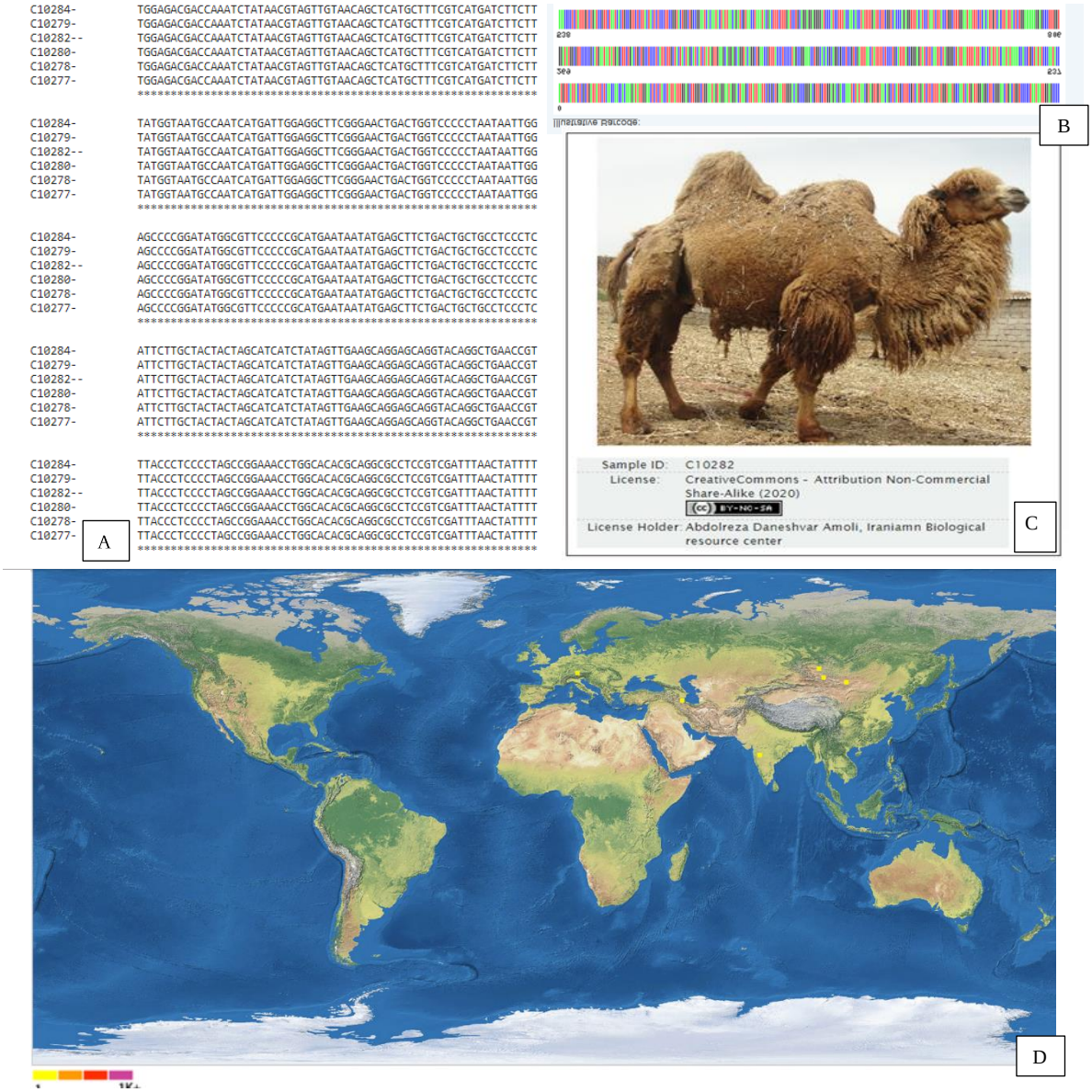
شکل ۲: A) الکتروفورز DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱%، B) الکتروفورز ۵ میکرولیتر محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز آگارز ۱%

- توالی خط شناسه DNA

نتایج بلاست توالی DNA تصحیح شده به طول تقریبی۵۸۰ جفت باز، صحت قطعه تکثیری ژن COI میتوکندریایی را نشان داد. توالی‌های به دست آمده به عنوان بارکد DNA برای ۵ نمونه شتر دوکوهانه تحت مطالعه به همراه ۴۸ توالی ژن COI از سه گونه شتر *bacterianus*، *ferus* و *deromedarius* برگرفته از BOLD System در نرم‌افزار MEGA7.0.26 با روش ClustalW همردیف شده و درخت فیلوژتیکی با استفاده از روش Neighbor-joining ترسیم شد (شکل ۳). درخت فیلوژنتیکی قرابت نزدیک شترهای دوکوهانه ثبت شده ایران با نمونه‌های ثبت شده از کشورهای دیگر را نشان داد. فاصله ژنتیکی درون و بین گونه‌ای در میان ۱۷۲ توالی بارکد ثبت شده از جنس *Camelus* و سه گونه مذکور محاسبه شد. میانگین فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای با استفاده از روش K2P معادل ۰/۳۹ %، حداکثر فاصله ژنتیکی معادل ۱/۷۲ % و فاصله ژنتیکی با نزدیک‌ترین گونه معادل ۳/۰۷ % بود. در میان اعضای هاپلوتایپ *bacterianus* مورد مطالعه تفاوت ژنتیکی مشاهده نشد. بارکد DNA ی به دست آمده از۵ نمونه شتر دوکوهانه ایران در پایگاه داده رسمی بارکد DNA موجودات "Bold System" ثبت شد. علاوه بر ثبت توالی بارکد DNA، کلیه اطلاعات مربوط به جداول ۲،۱ و ۳ نیز در این پایگاه داده ثبت گردید. داده‌ها بعد از تایید در دسترس عموم قرار گرفت. شکل ۴ توالی DNA، بارکد DNA، عکس نمونه و نقشه پراکندگی شتر دوکوهانه را نشان می‌دهد.

مطابقه نقشه توزیع پراکندگی حیوان در جهان در boldsystem، تاکنون شتر دوکوهانه از ایران، مغولستان، قزاقستان، روسیه و چین گزارش و بارکد DNA آن ثبت شده است.

شکل۳: درخت فیلوژنتیکی ۴۸ بارکد ثبت شده در دیتابیس مرتبط با سه گونه *Camelus ferus*، *Camelus bacterianus* و *Camelus dromedarious* و ۵ توالی شتر دوکوهانه مورد مطالعه و یک نمونه outgroup با استفاده از نرم‌افزار MEGA7.0.26 و با استفاده از روش Neighbor – joining و bootstrap 1000 ترسیم شد.



شکل ۴ : A) توالی DNA، B) بارکد DNA، C) عکس نمونه و D) نقشه توزیع پراکندگی شتر دوکوهانه را نشان می‌دهد.

بحث

تکنیک DNA Barcoding یکی از روش‌های مولکولی استاندارد برپایه تکثیر و تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه‌ای به طول ۶۵۰ جفت باز از ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ (COI) میتوکندریایی است که برای شناسایی دقیق و سریع گونه‌ها استفاده می‌شود. در حال حاضر تکنیک خط شناسه‌گذاری DNA به عنوان یک روش پذیرفته شده استاندارد جهانی برای تمایز همه یا حداقل اکثریت گونه‌های جانوری مورد استفاده قرار میگیرد. ناحیه بارکد ژن COI علیرغم کوتاهی و تعیین توالی سریع و ارزان آن، دارای توالی حفاظت شده از طرفی و همچنین تفاوت کافی جهت تمایز گونه‌ها از یکدیگرمی‌باشد و از این جهت مورد تایید متخصصین به عنوان شناساگر بارکدگذاری قرار گرفته است. همچنین تنوع درون گونه‌ای برای این ژن در مقایسه با تنوع بین گونه‌ای کم می‌باشد و در نتیجه گونه‌ها بوسیله کلادهای مشخص از توالی‌های بسیار مشابه تشخیص داده می‌شوند. در سال ۲۰۱۰ یانسن و همکاران ۱۸ گونه گاو را با استفاده از ژن COI مورد بررسی فیلوژنتیکی قرار داده و قدرت فکیک این ژن و ناحیه بارکدی مورد توافق آن را جهت استفاده برای شناسایی بین گونه‌ای مورد تایید و مناسب ارزیابی کردند

[۴]. در سال ۲۰۱۲ چاوز و همکاران نشان دادند که در گوشتخواران ژن COI می‌تواند به عنوان مارکر موثر و استاندارد برای شناسایی دقیق در سطح گونه مورد استفاده قرار گیرد(۶). امروزه این تکنیک به عنوان کلید شناسایی گونه‌ها و همچنین تعیین روابط گونه‌ها با یکدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر آن، نتایج این روش می‌تواند جهت تعیین اعتبار و درستی مطالعات ریخت‌شناسی استفاده شود. این روش به دلیل قدرت تفکیک بالا برای شناسایی گونه‌ها می‌تواند مشکلات موجود در مطالعات تاکسونومی را حل نماید. شترهای دوکوهانه ایران با نام علمی (*Camelus bactrianus*) به‌عنوان ذخیره ژنتیکی دامی بسیار ارزشمندی به‌حساب می‌آیند که موطن و جایگاه اصلی آن‌ها در ایران، استان اردبیل (دشت مغان و مشگین شهر) بوده و همچنین گزارش‌های پراکنده‌ای از وجود تعداد انگشت شماری شتر دوکوهانه در استان‌های گلستان و آذربایجان شرقی حکایت می‌کند. در حال حاضر تعداد شترهای دوکوهانه ایران ۱۵۰ نفر گزارش شده است و با توجه به سیر نزولی جمعیتی داشته در حال حاضر در رده‌بندی‌های جهانی «به شدت در معرض خطر انقراض» دسته‌بندی شده و رده حفاظتی مشابه با یوزپلنگ ایرانی دارد [۲۲]. یکی از پروژه‌های مهم و بین‌المللی کنسرسیوم بارکدینگ جهانی، شناسایی و ثبت توالی بارکد DNA گونه‌های جانوری و گیاهی در معرض خطر انقراض درآسیای میانه است. از اینرو شناسایی بارکد DNA و ثبت این گونه مهم جانوری بومی ایران در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران انجام شد و در دیتابیس جهانی بارکدینگ DNA (BoldSystem) به نام ایران به عنوان خاستگاه مهم این گونه در معرض انقراض ثبت شد. توالی ژن COI از ۱۲۷ نمونه شتر دوکوهانه از کشورهای مغولستان، قزاقستان، چین و روسیه نیز در این پایگاه ثبت شده است. در محاسبه فاصله ژنتیکی درون و بین گونه‌ای در میان ۱۷۲ توالی بارکد ثبت شده از جنس *Camelus* و سه گونه *bacterianus*، *ferus* و *deromedarius* میانگین فاصله ژنتیکی محاسبه شده درون گونه‌ای با استفاده از روش K2P معادل ۰/۳۹ %، حداکثر فاصله ژنتیکی معادل ۱/۷۲ % و فاصله ژنتیکی با نزدیک‌ترین گونه معادل ۳/۰۷ % محاسبه شد. در میان اعضای هاپلوتایپ *bacterianus* مورد مطالعه تفاوت ژنتیکی مشاهده نشد. وجود شباهت بالای توالی بارکد DNA به دست آمده از شتر دوکوهانه ایرانی با توالی‌های ثبت شده از شترهای آسیای میانه قرابت ژنتیکی و اجدادی این شترها را نشان داد.

منابع

[1] Abolhasani, F., Hashemzadeh, I., Heidarnejad, M.S. and Tabatabaei, S.N., 2020. DNA barcoding of Aphanius vladykovi from different habitats in Chaharmahal va Bakhtiari Province, Iran. International Journal of Aquatic Biology, 8(1), pp.66-72.

[2] Afrand, M., Sourinejad, I., Fazeli, S.A.S., Akbarzadeh, A.R.A.S.H., Yeganeh, L.P., Sadeghi, M.A.R.Y.A.M. and Azarbaijani, R., 2020. Morphological identification and molecular validation of anchovies (*Engraulidae*) in the Persian Gulf and Oman Sea. Zootaxa, 4742(2), pp.375-391.

[3] Amoli, A.D., Aminafshar, M., Fazeli, S.A., Kashan, N. and Khaledi, K.J., 2017. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers from Endangered Species (*Camelus bactrianus*). Iranian Journal of Applied Animal Science, 7(4).

[4] Cai, Y., Zhang, L., Shen, F., Zhang, W., Hou, R., Yue, B., Li, J. and Zhang, Z., 2011. DNA barcoding of 18 species of Bovidae. Chinese Science Bulletin, 56(2), pp.164-168.

[5] Changizi, R., Farahmand, H., Soltani, M., Asareh, R. and Ghiasvand, Z., 2013. Species identification reveals mislabeling of important fish products in Iran by DNA barcoding. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12(4), pp.783-791.

[6] Chaves, P.B., Graeff, V.G., Lion, M.B., Oliveira, L.R. and Eizirik, E., 2012. DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples.

Molecular Ecology Resources, 12(1), pp.18-35.

[7] Ghorbani, A., Saeedi, Y. and De Boer, H.J., 2017. Unidentifiable by morphology: DNA barcoding of plant material in local markets in Iran. PloS one, 12(4), p.e0175722.

[8] Hajibabaei, M., Singer, G.A., Clare, E.L. and Hebert, P.D., 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. BMC biology,5(1), 7p.

[9] Hanner, R., 2012. Data standards for BARCODE records in INSDC (BRIs).

[10] Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. and Dewaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(1512), pp.313-321.

[11] Ivanova, N.V., Clare, E.L. and Borisenko, A.V., 2012. DNA barcoding in mammals. In DNA barcodes (pp. 153-182). Humana Press, Totowa, NJ.

[12] Jowkar, H., Ostrowskirsity in Iran: threats, challenges and hopes. Iranian Studies, 49(6), pp.1065-1077.

[13] Krishnamurthy, P.K. and Francis, R.A., 2012. A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. Biodiversity and conservation, 21(8), pp.1901-1919.

[14] Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and evolution, 33(7), pp.1870-1874.

[15] Rubinoff, D., 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. Conservation Biology, 20(4), pp.1026-1033.

[16] Schindel, D.E. and Miller, S.E., 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. Nature, 435(7038), pp.17-18.

[17] Shahhosseini, N., Kayedi, M.H., Sedaghat, M.M., Racine, T., P. Kobinger, G. and Moosa-Kazemi, S.H., 2018. DNA barcodes corroborating identification of mosquito species and multiplex real-time PCR differentiating *Culex pipiens* complex and *Culex torrentium* in Iran. PloS one, 13(11), pp.0207308.

[18] Sheidai, M., Tabaripour, R., Talebi, S.M., Noormohammadi, Z. and Koohdar, F., 2019. Adulteration in medicinally important plant species of *Ziziphora* in Iran market: DNA barcoding approach. Industrial Crops and Products, 130, pp.627-633.

[19] Stockle, M.Y. and Hebert, P.D., 2008. Barcode of life. Scientific American, 299(4), pp.82-88.

[20] Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol, 3(5), pp.294-9.

[21] Waugh, J., 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. BioEssays, 29(2), pp.188-197.

[22] Yusefi, G.H., Faizolahi, K., Darvish, J., Safi, K. and Brito, J.C., 2019. The species diversity, distribution, and conservation status of the terrestrial mammals of Iran. Journal of Mammalogy, 100(1), pp.55-71.

Journal of Developmental Biology
Vol. 12, No. 3, Summer 2020

Identification and Record of DNA Barcode of Iranian Bactrian Camel (*Camelus bactrianus*)

Parsa Yeganeh L. [1*], Sadeghi M.[1], Azarbaijani R.[1], Daneshvar Amoli A. [2], Mohamadi Moghanjoghi S.[2], Farzaneh P. [2], Shahzadeh Fazeli S. A. [3], Khaledi H. R. [4 *]

[1] Molecular bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran
[2] Human and animal cell bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran.
[3] Faculty of Biological Science and Technology, University of science and culture, ACECR, Tehran, Iran.
[4] Yadegar -e- Imam Khomeini (RAH) Shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University

[*] Email: k_khaledi2000@yahoo.com, k_khaledi2000@yahoo.com

Received: January 2020 Accepted: December 2020

Abstract

Because of vast Habitat diversity, Iran harbors a unique plant and animal biodiversity. National conservation programs has begun 50 years ago in Iran, but nonetheless, the rate of extinction of animal species in this country is high and every year a list of Iranian endangered or threatened animal and plant species is published on the IUCN Red List. DNA barcoding is a molecular tool that uses standardized genetic primers, and amplification of a segment of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase I, to classify species. In recent years, this technique has become gradually widespread for the study and classification of species to prioritize biodiversity conservation activities.Iranian Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) is an endangered livestock breed with distribution in northwest of Iran. Given its severe population decline, it is important to pay more attention to this breed from a biodiversity conservation perspective. In this study, 6 Iranian Bactrian camel specimens were sampled and after DNA extraction the Barcode segment of mitochondrial COI gene was amplified and sequenced. Following bioinformatics analysis, the DNA barcode of the Iranian Bactrian camel was identified and recorded in the DNA Barcode of life Database (BoldSystem) with all habitat and morphological characteristics of the samples.

Keywords: DNA barcoding, Biodiversity, *Camelus bactrianus*, *CBOL*.