

## تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی ژن COX3 میتوکندری شترهای تک کوهانه و دوکوهانه ایران

طوبی عباسی دلویی<sup>1</sup> - محمد هادی سخاوتی<sup>2</sup> - مجتبی طهمورث پور<sup>3</sup>\*

تاریخ دریافت: 1393/04/04

تاریخ پذیرش: 1394/02/01

### چکیده

نژادهای بومی ایران بخشی از سرمایه ملی تلقی، بنابراین حفظ آن‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. توجه بیشتر به این نژادها از دیدگاه ژنتیک حفاظتی با توجه به کاهش شدید جمعیت آن‌ها در برخی مناطق، از اهمیت زیادی برخوردار است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی زیرواحد 3 کمپلکس سیتوکروم اکسیداز (COX3) میتوکندری در شترهای تک کوهانه و دوکوهانه ایرانی بود. برای این منظور 10 نمونه خون از هر یک از این دو گونه جمع آوری شد (20 نمونه). پس از استخراج DNA، قطعه 979 جفت بازی از ژنوم میتوکندریایی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر گردید. توالی‌یابی با روش اتوماتیک سانگر صورت گرفت و سپس توالی‌های بدست آمده با توالی‌های حاصل از مطالعات دیگر، مقایسه شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که هیچ تفاوت نوکلئوتیدی بین توالی COX3 نمونه‌های مختلف تک کوهانه و نمونه‌های مختلف دوکوهانه ایرانی وجود نداشته و همچنین توالی‌های نوکلئوتیدی در این دو گونه به ترتیب با شتر تک کوهانه (شتر عربی) با شماره دسترسی NC\_009849 و شتر دوکوهانه (شتر باختری) با شماره دسترسی NC\_009628، همولوژی 100 درصد دارند. مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای و همچنین ساختار سه بعدی COX3 در گونه‌های شتر ایرانی نشان داد که این دو گونه دارای فاصله ژنتیکی نزدیکی هستند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مشخص کرد که این دو گونه در میان خانواده شترسانان، با *Lama guanicoe* کمترین قرابت را دارند.

**واژه‌های کلیدی:** شتر دوکوهانه، شتر تک کوهانه، COX3، DNA میتوکندریایی.

### مقدمه

شترها به خانواده شترسانان، زیرراسته Tylopoda، راسته Artiodactyla و رده پستانداران تعلق دارند (10). جنس شتر به دو گونه شترهای تک کوهانه (*Camelus dromedaries*) و دوکوهانه (*Camelus bactrianus*) تقسیم می‌شود. شتر تک کوهانه ساکن شمال آفریقا و خاورمیانه بوده، در حالی که شتر دوکوهانه در آسیای مرکزی ساکن است (2). علاوه بر شتر تک کوهانه، شتر دوکوهانه نیز در مناطق افغانستان، پاکستان و آسیای جنوب غربی وجود دارد (1). زیستگاه شترهای دوکوهانه عمدتاً در مناطق صحرایی سرد چین و مغولستان بوده و نقش مهمی در اقتصاد محلی این مناطق دارند (6). شتر از جنبه تاریخی و اقتصادی در سراسر جهان گونه مهمی بوده به طوری که 16% جمعیت حیوانی شبه جزیره عربستان را تشکیل می‌دهد (2). لازم به ذکر است که جمعیت شترهای تک کوهانه و

دوکوهانه در ایران به ترتیب در حدود 150000 و 100 نفر می‌باشد. شترهای دوکوهانه ایران جزء گونه‌های در معرض خطر محسوب شده و زیستگاه آن‌ها در شمال غربی ایران می‌باشد (3). علیرغم اهمیت اقتصادی، فرهنگی و بیولوژیکی، مطالعات مولکولی مرتبط با ژنوم شتر محدود بوده و اطلاعات زیادی در دسترس نیست (1). همچنین مطالعات ژنتیکی محدودی روی ژنوم شتر در ایران صورت گرفته است. خبیری و همکاران (2014)، توالی نوکلئوتیدی ناحیه غیر کد کننده بالادست ژن کاپا کازین با طول تقریبی 1200 نوکلئوتید را در دو گونه شتر تک کوهانه و دو کوهانه ایران مورد بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی قرار دادند (7).

توالی‌های کد کننده پروتئین در DNA میتوکندریایی (mtDNA) در هر گونه محافظت شده بوده، بنابراین برای مطالعه روابط تکاملی گونه‌های مختلف مناسب است (5). همچنین mtDNA نسبت به DNA ژنومی دارای مزایای متعددی شامل تکامل سریع، نوترکیبی محدود، عدم وجود اینترون و تعداد نسخه بالا، می‌باشد (3). mtDNA در شتر مشابه سایر پستانداران از 13 ژن کد کننده پروتئین‌های مرتبط با زنجیره تنفسی، ژن‌های 16s rRNA و 12s rRNA، و 22 ژن

1، 2 و 3- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و استاد گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد.

\* - نویسنده مسئول: (Email: m\_tahmoorespur@yahoo.com)



بالا دست و پایین دست ژن COX3 را تکثیر کنند تا توالی کامل این ژن با صحت خوانش بالا، برای آنالیزهای بیوانفورماتیکی موجود باشد (جدول 1).

دوکوهانه با طول 784 نوکلئوتید، یک جفت آغازگر اختصاصی بر اساس توالی ثبت شده در NCBI با شماره دسترسی JN632608 و با استفاده از نرم افزار Premier 5 (Primer Premier (آمریکا، Biosoft) طراحی شد. آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که نواحی

جدول 1- توالی آغازگرها جهت تکثیر ژن COX3 ژنوم میتوکندری شترهای تک کوهانه و دوکوهانه ایران

Table 1- The primer sequences in order to amplify COX3 gene from mitochondrial genome of Iranian *Camelus dromedaries* and *Camelus bactrianus*

طول محصول PCR PCR product length	توالی Sequence	آغازگر رفت Forward primer
979 جفت باز 979 base pair	5' TTGCCGTGGCTATGATCC 3' ' GTACGAGAAGGGATGCTAAGG 3'	آغازگر برگشت Reverse primer

نظر تعیین شد. رسم درخت فیلوژنتیکی بین گونه‌های مختلف با استفاده از رویه Neighbor-Joining (یا 1000 تکرار) نرم‌افزار Create MEGA 5 انجام شد. جهت تعیین فاصله ژنتیکی از رویه Pairwise Comparison نرم‌افزار 5.5 CLC Main workebench استفاده شد. پیش‌بینی ساختار دوم و سوم پروتئین ژن COX3 به ترتیب توسط رویه Predict Secondary Structure نرم‌افزار CLC Main workebench 5.5 و نرم افزار 3DLigandSite (11) صورت گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج طیف‌سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کمیته و کیفیت مناسبی برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برخوردار است. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد نشان داد که آغازگرها، ژن COX3 (784 bp) و نواحی بالا دست و پایین دست آن (در مجموع با طول 979 bp) را در شترهای تک کوهانه و دوکوهانه ایرانی به طور مناسبی تکثیر کرده‌اند (شکل 2).

تمامی نمونه‌ها پس از انجام خالص‌سازی محصولات PCR به صورت رفت و برگشت، برای اطمینان کامل از صحت خوانش، توسط شرکت MACRO GEN تعیین توالی شدند. کیفیت این توالی‌ها با استفاده از نرم افزارهای Chromas Lite و BioEdit مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج نشان دادند که خوانش‌ها با کیفیت بسیار بالایی صورت گرفته (شکل 3) و برای انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی مناسب هستند.

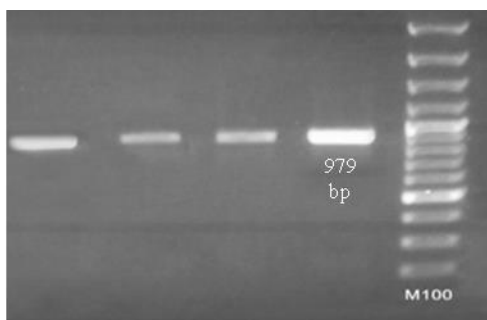
مقایسه بین توالی ژن COX3 در شترهای تک کوهانه با یکدیگر و همچنین شترهای دوکوهانه با یکدیگر با استفاده از رویه Create Alignment نرم‌افزار 5.5 CLC Main workebench، نشان دهنده عدم اختلاف بین نمونه‌های توالی‌یابی شده بود. در نتیجه می‌توان گفت جمعیت‌های مورد مطالعه فاقد هاپلوتایپ بودند.

واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra (آلمان، T-personal) و در 30 چرخه حرارتی انجام پذیرفت. برنامه حرارتی واکنش PCR با حجم نهایی 25 میکرولیتر عبارت بود از واسرشت سازی در دمای 94 °C به مدت 30 ثانیه، اتصال در دمای 60 °C به مدت 30 ثانیه و تکثیر در دمای 72 °C به مدت 60 ثانیه؛ و یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای 94 °C به مدت 6 دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای 94 °C انجام شد. محصولات PCR با اندازه مورد انتظار توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1/5 درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، زیر اشعه UV مشاهده گردیدند. جهت تایید تکثیر و تعیین توالی قطعه مورد نظر، مقدار 20 میکرولیتر از محصولات PCR به همراه 15 میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت 5 پیکومول به شرکت MACRO GEN کره جنوبی ارسال گردید.

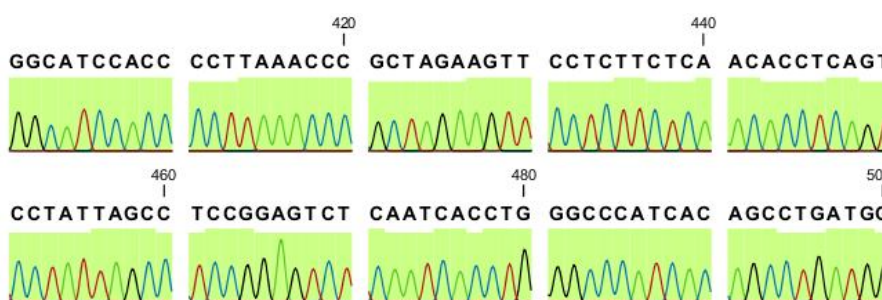
### آنالیز بیوانفورماتیکی

آنالیز نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی MEGA 5.5، chromas Lite 2.01، CLC Main workebench 5.5 و Bio Edit انجام گرفت. ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار chromas Lite 2.01 ویرایش شدند، پس از تبدیل توالی‌ها به فرمت FASTA، از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI و نرم‌افزار CLC Main workebench 5.5 جهت تعیین شباهت توالی بدست آمده با توالی‌های ثبت شده از همین ژن در بانک ژن NCBI و همچنین خود توالی‌ها با هم استفاده شد. از آن جایی که ژن مورد مطالعه دارای توالی مرجع در NCBI می‌باشد،<sup>1</sup> ORF آن با نرم‌افزار CLC Main workebench 5.5 و بر اساس شباهت بین توالی مرجع و ژن مورد

1 Open Reading Frame



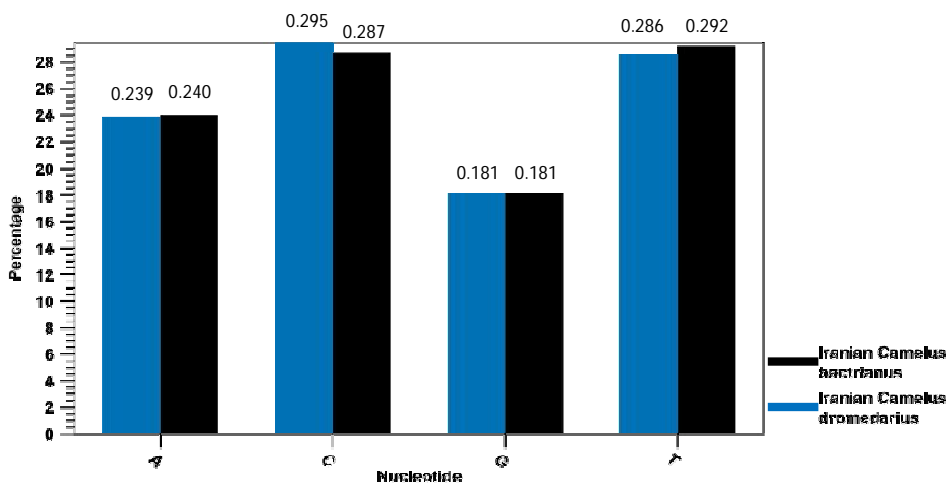
شکل 2- الکتروفورز محصولات PCR ژن COX3 (به همراه بخشی از نواحی بالا دست و پایین دست) با طول 979 bp بر روی ژل آگارز 1/5 درصد  
**Figure 2-** Electrophoresis of COX3 gene PCR products (with part of upstream and downstream sequences) with 979 bp length on 1/5% Agarose gel



شکل 3- بخشی از نتایج توالی‌یابی محصولات PCR ژن COX3  
**Figure 3-** Part of sequencing results of COX3 gene PCR products

ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌های بدست آمده مورد محاسبه قرار گرفت (شکل 4). فراوانی A+T به ترتیب برای شترهای تک کوهانه برابر 0/524 و 0/476 و برای شترهای دوکوهانه برابر با 0/468 و 0/532 بود، که با توجه به آن می‌توان نتیجه گرفت که هر دو گونه از ترکیب و فراوانی نوکلئوتیدی تقریباً مشابه و یکسانی برخوردار بودند.

ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌های بدست آمده مورد محاسبه قرار گرفت (شکل 4). فراوانی A+T به ترتیب برای شترهای تک کوهانه برابر 0/524 و 0/476 و برای شترهای دوکوهانه برابر با 0/468 و 0/532 بود، که با توجه به آن می‌توان نتیجه گرفت که هر دو گونه از ترکیب و فراوانی نوکلئوتیدی تقریباً مشابه و یکسانی برخوردار بودند.



شکل 4- ترکیب نوکلئوتیدی ژن COX3 در شترهای تک کوهانه و دوکوهانه ایران  
**Figure 4-** Nucleotide composition of COX3 gene in Iranian *Camelus dromedaries* and *Camelus bactrianus*

توالی بدست آمده برای شترهای تک کوهانه و دوکوهانه با توالی ثبت شده از آن‌ها در NCBI (شماره‌های دسترسی NC\_009849 و

توالی بدست آمده برای شترهای تک کوهانه و دوکوهانه با توالی ثبت شده از آن‌ها در NCBI (شماره‌های دسترسی NC\_009849 و

قربت ژنتیکی بسیار نزدیکی هستند. همچنین توالی بدست آمده از شتر دوکوهانه با توالی ثبت شده از شتر دوکوهانه وحشی (Camelus ferus) در پایگاه NCBI (با شماره دسترسی NC\_009629) مورد مقایسه قرار گرفت (جدول 2).

NC\_009628 به ترتیب برای شترهای تک کوهانه عربی و دوکوهانه باختری) مقایسه شدند. این مقایسه نشان داد که توالی‌های بدست آمده با توالی‌های ثبت شده کاملاً مشابه هستند بطوریکه می‌توان نتیجه گرفت گونه‌های مورد مطالعه و گونه‌های ثبت شده دارای

جدول 2- اختلافات مشاهده شده در ژن COX3، موقعیت نوکلئوتیدی هر یک از آن‌ها و تغییر اسیدآمینه‌ای

Table 2- Differences in gene COX3, the position of each of its nucleotide and amino acid changes

	موقعیت جهش‌های نوکلئوتیدی																	
	Nucleotide mutation																	
	723	720	648	645	615	540	468	453	378	327	291	282	133	121	114	84	78	63
<sup>1</sup> شتر دو کوهانه ایرانی Iranian Camelus bactrianus <sup>1</sup>	T	A	A	A	A	A	T	G	G	T	T	T	C	G	T	G	A	C
<sup>2</sup> شتر دو کوهانه باختری Bakhtari Camelus bactrianus <sup>2</sup>	T	A	A	A	A	A	T	G	G	T	T	T	C	G	T	G	A	C
<sup>3</sup> شتر دو کوهانه وحشی Wild Camelus bactrianus <sup>3</sup>	C	G	C	G	G	G	C	A	A	C	C	C	T	A	C	A	G	T
تغییرات امینو اسیدی Amino acid changes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V : I	-	-	-	-

<sup>1</sup> شتر دوکوهانه مورد بررسی در این مطالعه

<sup>2</sup> توالی مرجع برای شتر دوکوهانه باختری (Camelus bactrianus) با شماره دسترسی NC\_009628

<sup>3</sup> توالی مرجع برای شتر دوکوهانه وحشی (Camelus ferus) با شماره دسترسی NC\_009629

<sup>1</sup> Studied Camelus bactrianus in this research

<sup>2</sup> Reference sequence for Bakhtari Camelus bactrianus with NC\_009628

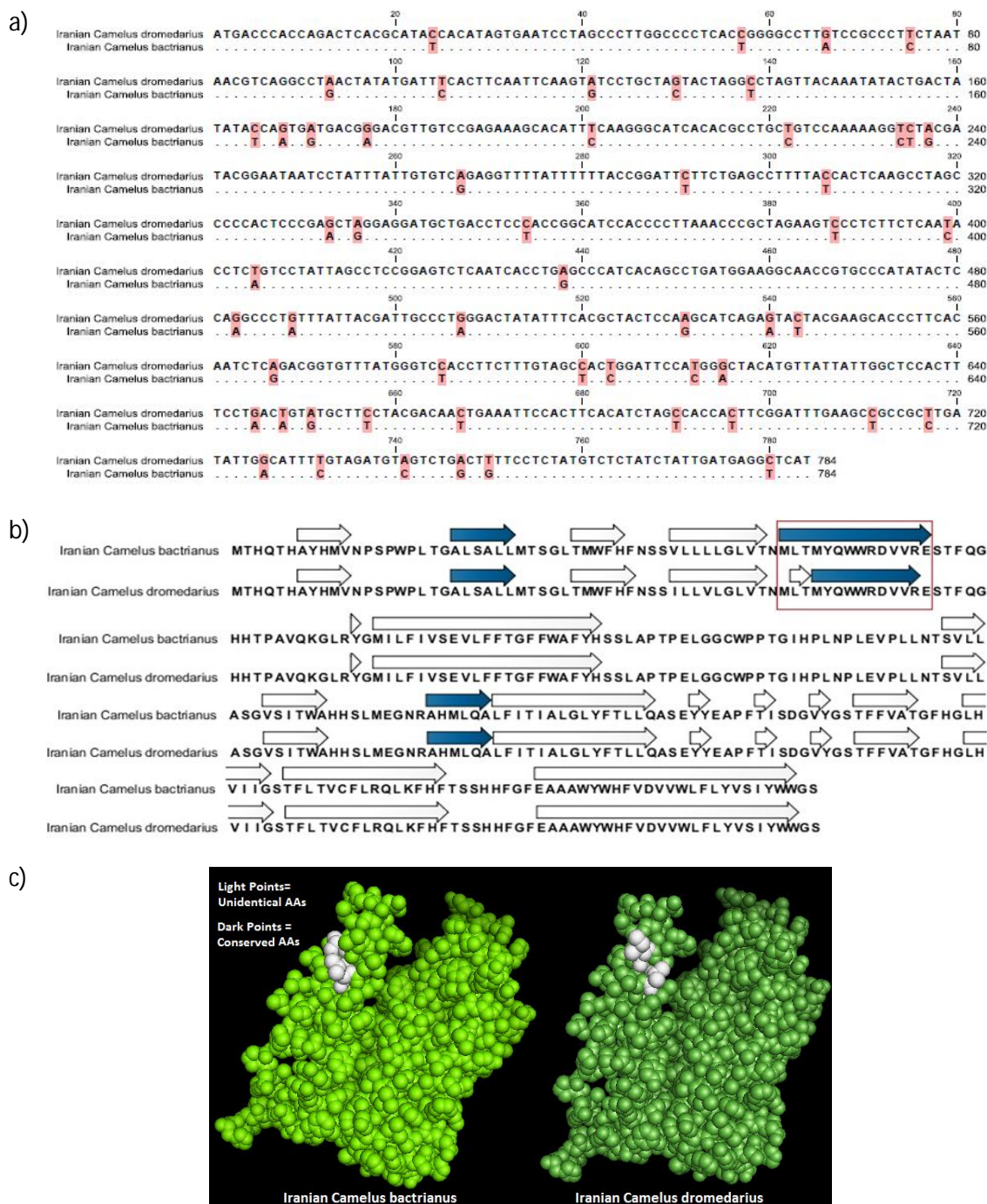
<sup>3</sup> Reference sequence for Wildi Camelus bactrianus with NC\_009629

گرفته و اینکه این اسیدآمینه‌ها همگی جزء اسیدآمینه‌های غیرقطبی می‌باشند احتمالاً در ساختار فضایی پروتئین COX3 در دو گونه تک کوهانه و دوکوهانه ایران تفاوتی وجود ندارد (شکل 5.c). همان‌طور که در شکل 5.b مشاهده می‌شود در ساختمان ثانویه پروتئین COX3، میزان ماریچ آلفا کمتر از صفحات چین‌دار بتا است، بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد این پروتئین دارای شکل فضایی متغیر و انعطاف‌پذیری است.

فواصل ژنتیکی (جدول 3) توالی‌های COX3 شترهای تک کوهانه و دوکوهانه ایرانی با سایر توالی‌های شترسانان موجود در پایگاه NCBI با استفاده از نرم افزار CLC Main workebench 5.5 مورد محاسبه قرار گرفت. از آنجایی که فواصل ژنتیکی بین حیوانات مختلف به صورت دو به دو است، اعداد حاصله در جدول 3 نشان دهنده جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی‌های مورد بررسی می‌باشند. فاصله ژنتیکی بین دو حیوان، با همبستگی فیلوژنتیکی بین حیوانات مرتبط خواهد بود؛ در نتیجه از این شاخص هم می‌توان برای تعیین دوری و نزدیکی ژنتیکی حیوانات مختلف استفاده کرد.

با توجه به جدول 2 بین شتر دوکوهانه ایران و شتر دوکوهانه وحشی تعداد 18 تفاوت نوکلئوتیدی مشاهده گردید که تنها در نوکلئوتید 121 (اسیدآمینه 41)، اسیدآمینه والین در شتر دوکوهانه ایرانی به ایزولوسین در شتر دوکوهانه وحشی تغییر کرده است و سایر تفاوت‌ها در نوع اسیدآمینه تغییری ایجاد نکرده و تنها باعث تغییر در کدون همان اسیدآمینه شده است. با توجه به تغییر اسیدآمینه‌ای صورت گرفته و اینکه هر دو اسیدآمینه غیر قطبی می‌باشند می‌توان نتیجه گرفت پروتئین COX3 در این دو گونه نقش کاربردی یکسانی داشته و همچنین ساختار فضایی در هر دو گونه مشابه می‌باشد.

همچنین توالی نوکلئوتیدی، اسیدآمینه‌ای و ساختار پروتئین COX3 در شترهای تک کوهانه و دوکوهانه ایران مورد مقایسه قرار گرفتند (شکل 5). از مجموع 55 تفاوت نوکلئوتیدی، تنها تفاوت نوکلئوتیدهای 121 و 130 باعث تغییر اسیدآمینه‌ها به ترتیب در موقعیت‌های 41 (ایزولوسین و والین به ترتیب در شترهای تک کوهانه و دوکوهانه) و 44 (والین و لوسین به ترتیب در شترهای تک کوهانه و دوکوهانه) شدند. با توجه به تغییرات اسیدآمینه‌ای صورت



شکل 5- a) توالی نوکلئوتیدی ژن COX3 در شترهای تک کوهانه و دو کوهانه ایران و هم‌ردیف‌سازی آن‌ها با یکدیگر. b) توالی اسیدآمینه‌ای و جایگاه‌های فعال جهت تشکیل ساختار ثانویه COX3 در این دو گونه: فلش‌های روشن نشان دهنده جایگاه‌های فعال برای تشکیل چین‌دار بتا و فلش‌های تیره نشان دهنده جایگاه‌های فعال برای تشکیل مارپیچ آلفا می‌باشد؛ مربع قرمز تفاوت موجود در ساختار ثانویه را نشان می‌دهد. c) ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده برای پروتئین COX3: نقاط تیره و روشن به ترتیب اسیدآمینه‌های یکسان و غیر یکسان را نشان می‌دهند.

**Figure 5-** a) The nucleotide sequence of COX 3 gene in Iranian Dromedary and Bactrian camels and its alignment with each other. b) Amino acid sequence and secondary structure COX3 to form the active sites of the two species: the bright flash represents the active sites for the formation of wavy dark flash represents the beta and alpha helix is the site active to form, square red shows the difference in secondary structure. c) The predicted three-dimensional structure of protein COX3: the amino acid sequence identical and non-identical shown with dark and light points, respectively.

دو کوهانه باختری (NC\_009628) و Lama guanicoe (NC\_011822) دارد. علاوه می‌توان نتیجه گرفت که بین شتر تک کوهانه و دو کوهانه ایران نیز قرابت ژنتیکی تقریباً مناسبی (92/98) وجود دارد و گونه‌های Lama با سایر گونه‌های شترسانان از نظر ژنتیکی بیشترین فاصله را دارند.

با توجه به جدول شماره 3 می‌توان نتیجه گرفت که شتر تک کوهانه ایرانی از نظر قرابت ژنتیکی، در خانواده شترسانان دارای بیشترین شباهت با شتر تک کوهانه عربی (NC\_009849) و کمترین شباهت با Lama guanicoe (NC\_011822) است. همچنین شتر دو کوهانه ایرانی بیشترین و کمترین شباهت را به ترتیب با شتر

**جدول 3-** ماتریس فواصل ژنتیکی و درصد تشابه که با مقایسه توالی COX3 گونه‌های مختلف شترسانان بدست آمده است. مثلث بالایی، فواصل ژنتیکی و مثلث پایینی، درصد تشابه ژنتیکی را نشان می‌دهند. گونه‌های مربوط به این مطالعه با علامت (\*) مشخص شده‌اند.

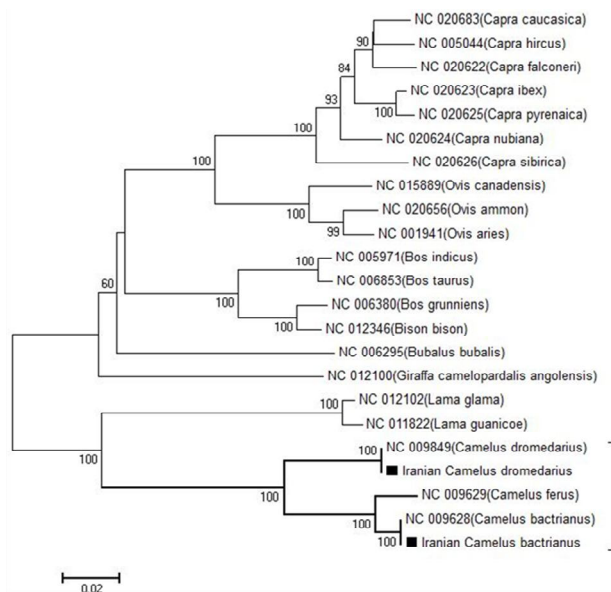
**Table 3-** The genetic distance matrix and the percentage of sequence similarity of COX3 gene by comparing different species of Camelus species. The upper triangle, show genetic distances and the bottom triangle, show that the percentage of genetic similarity. Iranian species in this study remark with an (\*)

	1	2	3	4	5	6	7
NC_009628 (شتر دو کوهانه)							
NC_009628 (Camelus bactrianus)	1	0.00	0.02	0.07	0.07	0.20	0.20
* شتر دو کوهانه ایرانی							
* Iranian Camelus bactrianus	2	100.00	0.02	0.07	0.07	0.20	0.20
NC_009629 (Camelus ferus)	3	97.70	97.70	0.08	0.08	0.20	0.20
NC_009629 (Camelus ferus)							
NC_009849 (Camelus dromedarius)	4	92.98	92.98	92.09	0.00	0.18	0.18
* شتر تک کوهانه ایرانی							
* Iranian Camelus dromedaries	5	92.98	92.98	92.09	100.00	0.18	0.18
NC_011822 (لاما گوانیکوس)	6	82.40	82.40	82.40	83.67	83.67	0.01
NC_011822 (Lama guanicoe)							
NC_012102 (لاما گلاما)	7	82.65	82.65	82.65	84.06	84.06	98.85
NC_012102 (Lama glama)							

این دو گونه می‌باشد. علاوه بر این همانطور که مشاهده می‌گردد شتر تک کوهانه و دو کوهانه ایرانی از نظر ژنتیکی بیشترین شباهت را به ترتیب با شتر تک کوهانه عربی (NC-009849) و شتر دو کوهانه باختری (NC-009628) داشته و کمترین شباهت را با گونه‌های بز (Capra) و گوسفند (Ovis) دارند. مشابه نتایج به دست آمده در مطالعه سوئی و همکاران (2007) شتر دو کوهانه باختری در مقایسه با گاو (Bos Tarus)، قرابت ژنتیکی بیشتری با لاما دارد (5).

جهت تایید نتایج حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی، درخت فیلوژنتیک توالی‌های COX3 شترهای تک کوهانه و دو کوهانه ایرانی با سایر توالی‌های موجود در پایگاه NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 ترسیم شد (شکل 6). درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده نتایج بدست آمده از ماتریس فواصل ژنتیکی را تایید کرد. به طوری که بر اساس آن دو گونه شتر تک کوهانه و دو کوهانه ایرانی در یک زیر گروه قرار دارند که این موضوع بیانگر قرابت ژنتیکی تقریباً نزدیک





شکل 6- نمودار فیلوژنتیکی توالی ژن COX3 شتر ایرانی و گونه‌های بررسی شده. توالی شترهای ایرانی با علامت (■) مشخص شده‌اند.  
**Figure 6-** Phylogenetic diagram of COX3 gene sequence in Iranian camel species and other species. Iranian camels sequence specified with (■).

#### منابع

- 1- Ahmed, M. M., S. A. El-Shazly., S. M. Sayed., and S. A. M. Amer. 2013. Molecular study of energy related mitochondrial genes in Arabian and Bactrian camels. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 9:61-70.
- 2- Al-Swailem, A. M., M. M. Shehata., F. M. Abu-Duhier., E. J. Al-Yamani., and K. A. Al-Busadah. 2010. Sequencing, Analysis, and Annotation of Expressed Sequence Tags for *Camelus dromedarius*. *PLoS ONE* 5(5): e10720.
- 3- Ansari-Renani, H., M. Salehi., Z. Ebadi., and S. Moradi. 2010. Identification of hair follicle characteristics and activity of one and two humped camels. *Small Ruminant Research*, 90(1):64-70.
- 4- Bannikova, A. A. 2004. Molecular markers and modern phylogenetics of mammals. *Journal of General Biology*, 65:278-305.
- 5- Cui, P., R. Ji, F. Ding., D. Qi., H. Gao., H. Meng., J. Yu., S. Hu., and H. Zhang. 2007. A complete mitochondrial genome sequence of the wild two-humped camel (*Camelus bactrianus ferus*): an evolutionary history of camelidae. *BMC Genomics*, 8:241.
- 6- Ji, R., P. Cui., F. Ding., J. Geng., H. Gao, H. Zhang., J. Yu., S. Hu., and H. Meng. 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.
- 7- Khabiri, A. A., M. Tahmoorespur., M. R. Nassiri., and M. H. Sekhavati. 2014. Mapping of transcription factor binding Region of kappa casein (CSN3) gene in Iranian Bactrianus and Dromedaries camels. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(5): 1726-1733
- 8- Mather, M. W., P. Springer., S. Hensel., G. Buse., and J. A. Fee. 1993. Cytochrome oxidase genes from *Thermus thermophilus*. Nucleotide sequence of the fused gene and analysis of the deduced primary structures for subunits I and III of cytochrome caa3. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(8): 5395-5408.
- 9- Michel, H. 1999. Cytochrome c oxidase: catalytic cycle and mechanisms of proton pumping-a discussion. *Biochemistry*, 38(46): 15129-15140.
- 10- Schwartz, H. 1992. Productive performance and productivity of dromedaries (*Camelus dromedarius*). *Animal Research and Development*, 35:86-98.
- 11- Wass, M. N., L. A. Kelley., and M. J. E. Sternberg. 2010. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Research*. 38: 469-473.
- 12- Zhang, C. L., Y. H. Wang., M. Xie., M. Chen., X. H. Wang., and S. S. Hou. 2010. Mitochondrial Coding Gene Polymorphisms Associated with Carcass Traits in Beijing Duck. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9:2522-252



## Bioinformatics and Phylogenetic Analysis of Mitochondrial COX3 Gene in Iranian *Camelus Dromedaries* and *Camelus Bactrianus*

T. Abbassi-Dalooi<sup>1</sup> - M. H. Sekhavati<sup>2</sup> - M. Tahmoorespur<sup>3\*</sup>

Received: 25-06-2014

Accepted: 21-04-2015

**Introduction** Camels belong to the family of Camelidae, suborder of Tylopoda, order of artiodactyla and class of mammalians. The family Camelidae has two old world species, double-humped camel (CAMELUS BACTRIANUS) and single-humped camel (CAMELUS DROMEDARIES) and four new world (tribe Lamini) species, guanaco (LAMA GUANICOE), llama (LAMA GLAMA), alpaca (LAMA PACOS) and vicuna (LAMA VICUGNA or VICUGNA VICUGNA) at present time. The single-humped camel inhabits Afro-Arabia, Ethiopia and west Central Asia while the double-humped inhabits eastern Central Asia and China). Camel has been historically and economically an important species worldwide especially in the Africa and Asia. Camel has unique characteristics enable it to adapt its desert environment. The total worldwide camel population at present estimated to be about 23 million in the world. Somalia and Sudan together hold approximately 50% of the whole camel population. In the last 40 years, the number of camels has increased by almost 45%. Iranian native species are considered as part of the national capital so their preservation is so important. Due to severe decrease in their population in some areas, more attention to conservation genetics perspective of these species is very important. The aim of this study was to bioinformatics and phylogenetic analysis of mitochondrial sequence of cytochrome c oxidase subunit 3 (COX3) in Iranian *Camelus dromedaries* and *Camelus bactrianus*.

**Materials and Methods** For this purpose 10 blood samples were collected from each species (totally 20 samples). After DNA extraction, the fragment with 979 bp length from mitochondrial DNA was amplified using polymerase chain reaction. Sequencing was performed by automated Sanger methods then the obtained sequences were compared with sequences from other studies. The nucleotide sequences obtained were edited using the PHRED software (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>). After editing, basic local alignment search tool (BLAST) were used in order to find the homology of sequences. Further analysis of the sequences were carried out, by using the other software's such as Chromas Lite (<http://www.technelysium.com.au>), Bio Edit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) and the obtained sequences, were aligned with other COX3 gene of camel and other species, using CLC Main workbench 5.5 software (<http://www.clcbio.com>). The sequences were conducted using the maximum composite likelihood method by MEGA software ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net), version v.5.2). Phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method by the same software.

**Results and discussion** The results shown that there are no differences between COX3 sequences in both samples from Iranian *Camelus dromedaries* and *Camelus bactrianus* and also their sequences have 100 percent homology with *Camelus dromedarius* (Arabian camel) and Iranian *Camelus dromedaries* *Camelus bactrianus* (Bactrian camel), respectively. Comparison of nucleotide and amino acid sequences and also three-dimensional structure of COX3 in Iranian camel species demonstrated that these two species have close genetic distance. Phylogenetic analysis revealed that these two species have the most genetic distance with Lama guanicoe among the CAMELIDAE FAMILY. The content of nucleotide sequences showed that the estimated frequencies of A + T and C + G were in the range of 52.4 and 47.6 percents for Iranian *Camelus dromedaries* and 53.2 and 46.8 percents for Iranian *Camelus bactrianus*, respectively.

**Conclusion** COX3 sequence analysis shown that Iranian Dromedarius and Bactrianus camels had high level homology in sequence and nucleotide content.

**Keywords:** *Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, COX3, Mitochondrial DNA.

1,2,3- PhD candidate, Assistance professor and professor of Animal Science, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(\*-Corresponding Author Email: [m\\_tahmoorespur@yahoo.com](mailto:m_tahmoorespur@yahoo.com))