

Research paper

Identification of Important Variants of ATPase and Cytochrome b Coding Genes of the Mitochondrial Genome in Holstein and Cholistani Cows

Ahmad Tamroosi¹, Gholam Reza Dashab², Mohammad Hossein Banabazi³ and Ali Maghsoudi⁴

1- M.Sc. in Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

2- Associate Professor of Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran, (Corresponding author: dashab@uoz.ac.ir)

3- Associate Professor of Animal Breeding and Genetics, Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

4- Associate Professor of Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 19 April, 2024

Revised: 06 July, 2024

Accepted: 19 August, 2024

Extended Abstract

Background: Selection over the past years has caused commercially modified livestock to have less genetic resistance and adaptability compared to native livestock, which is the reason for the reduction of genetic diversity. It is necessary to implement breeding programs to quickly adapt to environmental changes. In the past studies that were conducted to investigate the differential analysis of genes in the Holstein and Cholistani breeds of the Punjab province in Pakistan, a very significant difference in expression was observed in some genes, including mitochondrial genes, which became the basis of the present study. Therefore, this research aims to investigate the reasons for the difference in gene expression between Holstein and Cholistani cattle breeds in mitochondrial genes, including ATP6, ATP8, and CYTB genes, which are involved in important processes such as energy metabolism in dealing with biotic and abiotic stresses, and also play a role in disease resistance, using transcript data (RNA-Seq). For this purpose, transcriptome coverage, nucleotide and protein regions and mutations, and deletion and addition genetic differences were investigated in the mitochondrial genome of these two breeds.

Methods: Transcriptome data (RNA-Seq) with free access to 40 samples of dairy cows from the University of Wisconsin, USA, and 45 female cows of Cholistani from the Gujatipir dairy cow unit of Bahawalpur City, located in the Punjab state of Pakistan, were used in the present study. Since the results of the differential gene expression of the two breeds showed different expression levels in several mitochondrial genes, and part of the differences were related to their different genetic structures in the two breeds, the present study aimed to investigate this topic. Using NCBI genome databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Ensemble (<https://asia.ensembl.org/index.html>), the sequences of three mitochondrial genes, including ATP6, ATP8, and CYTB, for Holstein cattle (*Bos taurus*) and Cholistani cattle (*Bos indicus*) were extracted and stored in FASTA format. IGB version 6 software was used to examine the level of transcriptomic coverage. MEGA6 software was used to calculate the polymorphic regions and to calculate the percentage of nucleotide substitution and alignment of the sequences. The types of polymorphisms occurring in the mitochondrial genomes of Holstein and Cholistani using nucleotide and amino acid sequences, as well as haplotype blocks, were specified by determining insert and deletion regions and protected regions in the genome using Dnasp5 software.

Results: Deletion sites in the Holstein breed in the three ATP6, ATP8, and CYTB gene loci were 96, 28, and 91, respectively, which were more than the number of deletion points in the Cholistani breed (vs. 84, 9, and 57). In the Cholistani breed, there was an insertion of 64 bp in the ATP6 gene locus at position 8733 bp, and two insertion regions in the CYTB gene locus at positions 15846 and 14779 bp, 17 and 24 bp in length, respectively. No insertion was observed in the ATP8 locus in the Cholistani breed. In the Holstein breed, there was an insertion region at position 8185 with a length of 16 bp in the ATP8 locus, an insertion region at position 8733 bp with a length of 20 bp in the ATP6 gene locus, and in the CYTB gene, three insertion regions were observed at positions 14779, 15355, and 15356, respectively, 27, 42, and 16 base pairs in length. Among the three gene loci, ATP6 and ATP8 showed the highest and the lowest levels of coverage, respectively, and CYTB was in the middle of the other two loci. The comparison of the nucleotide



sequences of the ATP6 gene locus with a length of 678 base pairs in two Holstein and Cholistani breeds showed eight polymorphic regions and three polymorphic regions based on the amino acid sequence. They included two threonine-to-alanine conversions and one isoleucine-to-valine conversion position. A comparison of the nucleotide sequences of the ATP8 gene locus with a length of 198 base pairs in Holstein and Cholistani breeds, containing six polymorphic regions, and based on the amino acid sequence, showed that they contained two polymorphic regions. Amino acid changes included valine to isoleucine and threonine to alanine. A comparison of the nucleotide sequences of the CYTB gene locus with a length of 1137 bp in the Holstein and Cholistani breeds, containing 19 polymorphic regions, and based on the amino acid sequence, revealed that only two polymorphic regions were found where the amino acid valine was converted to valine-isoleucine and isoleucine-valine. Finally, the results of analyzing the conserved regions in the aligned fragment of ATP6, ATP8, and CYTB genes showed that from the sequence of the mentioned genes, the ATP6 gene had a 217 bp conserved fragment, and the conserved region was not found in the ATP8 gene. Non-protected genes are susceptible to nucleotide changes and mutations, which have caused the coming into being of new proteins and their new functions, and most regions of the CYTB gene were protected. The CYTB gene had the most conserved regions in DNA, with a length of 605 bp. Moreover, the results showed that transitional substitution in all genes was more than transversional substitution.

Conclusion: The results of the comparison analysis of transcripts in Holstein and Cholistani breeds, in addition to different expression levels in different genes, including the mitochondrial genome and complementary analysis of nucleotide and amino acid sequences of ATP6, ATP8, and CYTB genes, showed that evolutionary factors, including mutations, selection, and migration, were three of the most important factors that caused changes in the genetic structures of breeds, including Holstein, in such a way that the mentioned changes caused different expression levels of mitochondrial genes in the two breeds. Therefore, to improve the compatibility of commercial breeds, it is possible to combine effective variants and increase the economic lifespan of commercial livestock in combination with native livestock by designing suitable breeding programs and genomic selection.

Keywords: Cholistani, Genetic variant, Holstein, Nucleotide substitution, Transcriptome

How to Cite This Article: Tamroosi, A., Dashab, Gh. R., Banabazi, M. H., & Maghsoudi, A. (2025). Identification of Important Variants of ATPase and Cytochrome b Coding Genes of the Mitochondrial Genome in Holstein and Cholistani Cows. *Res Anim Prod*, 16(2), 159-171. DOI: 10.61882/rap.2024.1489



مقاله پژوهشی

شناسایی واریانت‌های مهم ژن‌های کدکننده آنزیم ATPase و سیتوکروم b ژنوم میتوکندری در گاوهای هلشتاین و کلیستانی

احمد تمبروسی^۱، غلامرضا داشاب^{۱b}، محمد حسین بناءبازی^۳ و علی مقصودی^۴

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
 ۲- دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، (نویسنده مسوول: dashab@uoz.ac.ir)
 ۳- دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
 ۴- دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۹

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۶
صفحه ۱۵۹ تا ۱۷۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۳۱

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: انتخاب طی سالیان گذشته باعث شده است که دام‌های اصلاح‌شده تجاری در مقایسه با دام‌های بومی از مقاومت ژنتیکی و قدرت سازگاری کمتری برخوردار باشند که دلیل آن کاهش تنوع ژنتیکی است. لازمه اجرای هر گونه برنامه اصلاح نژادی جهت سازگاری سریع نسبت به تغییرات محیطی است. در مطالعات گذشته که به منظور بررسی تجزیه تفریقی ژن‌ها در نژادهای هلشتاین و کلیستانی استان پنجاب پاکستان انجام گرفتند، در برخی از ژن‌ها از جمله ژن‌های میتوکندری تفاوت بیان بسیار فاحش مشاهده گردید که به عنوان پایه مطالعه حاضر قرار گرفت. لذا هدف از تحقیق حاضر، بررسی دلایل تفاوت بیان ژن متفاوت بین دو نژاد گاو هلشتاین و کلیستانی در ژن‌های میتوکندری شامل ژن‌های ATP6، ATP8، و CYTB که در فرایندهای مهمی از جمله متابولیسم انرژی در مقابله با تنش‌های زیستی و غیر زیستی و نیز مقاومت به بیماری نقش دارند، با استفاده از داده‌های ترانسکریپت (RNA-Seq) بود. به این منظور، پوشش ترانسکریپتومی، نواحی و جهش‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی و اختلافات ژنتیکی حذف و اضافه در ژنوم میتوکندری این دو نژاد مورد بررسی قرار گرفتند. **مواد و روش‌ها:** در مطالعه حاضر، از داده‌های ترانسکریپتوم (RNA-Seq) با دسترسی آزاد ۴۰ نمونه از گاوهای شیری دانشگاه ویسکانسین آمریکا و ۴۵ گاو ماده کلیستانی از واحد گاو شیری گوجانپیر شهر باهوالپور واقع در ایالت پنجاب پاکستان استفاده گردید. با توجه به این که نتایج بیان افتراقی دو نژاد در تعدادی از ژن‌های میتوکندری بیان متفاوتی را نشان دادند و بخشی از اختلافات مربوط به ساختار ژنتیکی متفاوت آن‌ها در دو نژاد است، هدف مطالعه حاضر قرار گرفت. با استفاده از پایگاه‌های داده ژنومی NCBI به آدرس (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) و Ensembl به آدرس (<https://asia.ensembl.org/index.html>) توالی‌های سه ژن میتوکندریایی شامل ATP6، ATP8، و CYTB برای نژاد گاو هلشتاین (*Bos taurus*) و نژاد گاو کلیستانی (*Bos indicus*) استخراج و به فرمت FASTA ذخیره گردیدند. جهت بررسی سطح پوشش ترانسکریپتومی از نرم‌افزار IGB نسخه ۶ استفاده شد. جهت محاسبه نواحی چندشکل و همچنین محاسبه درصد جایگزینی نوکلئوتیدها و هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها از نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد. برای تعیین انواع چندشکلی‌های به وقوع پیوسته در ژنوم میتوکندری هلشتاین و کلیستانی با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی و همچنین بلوک‌های هاپلوتیپی، تعیین نواحی حذف و اضافه، درج و مناطق حفاظت شده در ژنوم از نرم‌افزار Dnasp5 استفاده گردید.

یافته‌ها: تعداد نواحی حذف در نژاد هلشتاین در سه جایگاه ژنی ATP6، ATP8، و CYTB به ترتیب ۲۸، ۹۶، و ۹۱ موقعیت حذف بودند که بیشتر از تعداد نقاط حذف نژاد کلیستانی (در مقابل ۸۴، ۹، و ۵۷) بودند. در نژاد کلیستانی در جایگاه ژنی ATP6 موقعیت ۸۷۳۳ جفت بازی یک درج به طول ۶۴ جفت‌بازی و در جایگاه ژنی CYTB دو ناحیه درج در موقعیت‌های ۱۵۸۴۶ و ۱۴۷۷۹ جفت‌بازی به طول ۱۷ و ۲۴ جفت رخ داد. در جایگاه ATP8 در نژاد کلیستانی هیچ درجی مشاهده نشد. در نژاد هلشتاین در جایگاه ATP8 یک ناحیه درج در موقعیت ۸۱۸۵ به طول ۱۶ جفت‌بازی، در جایگاه ژنی ATP6 یک ناحیه درج در موقعیت ۸۷۳۳ جفت‌بازی به طول ۲۰ جفت‌بازی و در جایگاه CYTB سه ناحیه درج در موقعیت‌های ۱۴۷۷۹، ۱۵۳۵۵ و ۱۵۳۵۶ به ترتیب درج‌های به طول ۲۷، ۴۲، و ۱۶ جفت‌بازی مشاهده شدند. از بین سه جایگاه ژنی، جایگاه ATP6 بالاترین سطح پوشش و ATP8 کمترین پوشش را داشت و جایگاه CYTB در حدواسط دو جایگاه دیگر قرار داشت. مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی ATP6 با طول ۶۷۸ جفت‌بازی در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی، هشت ناحیه چندشکلی و براساس توالی آمینواسیدی سه ناحیه چندشکلی شامل دو تبدیل ترئونین به آلانین و یک موقعیت تبدیل ایزولوسین به والین را نشان داد. مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی ATP8 با طول ۱۹۸ جفت‌بازی در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی، شش ناحیه چندشکلی و براساس توالی آمینواسیدی، دو ناحیه چندشکلی را نشان داد. تغییرات آمینواسیدی شامل تبدیل والین به ایزولوسین و ترئونین به آلانین بودند. مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی CYTB با طول ۱۱۳۷ جفت‌بازی در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی، ۱۹ ناحیه چندشکلی و براساس توالی آمینواسیدی تنها دو ناحیه چندشکلی را نشان داد که آمینواسید والین به ایزولوسین و ایزولوسین به والین تبدیل شدند. در نهایت، نتایج حاصل از تجزیه نواحی حفاظت شده در قطعه هم‌تراز شده از ژن‌های ATP8، ATP6، و CYTB نشان داد که از توالی ژن‌های ذکر شده، ژن ATP6 دارای یک قطعه ۲۱۷ جفت‌بازی حفاظت شده بود، و ژن ATP8 بدون منطقه حفاظت‌شده بود. ژن‌های غیر حفاظت‌شده مستعد به تغییرهای نوکلئوتیدی و جهش هستند، که سبب به‌وجود آمدن پروتئین‌های جدید و همچنین عملکردهای جدید آن‌ها شده است و بیشتر مناطق ژن CYTB حفاظت‌شده بود. ژن CYTB دارای بیشترین نواحی حفاظت‌شده در DNA به طول ۶۰۵ جفت‌بازی بود. همچنین، نتایج نشان دادند که جانشینی انتقالی در تمام ژن‌ها بیشتر از جانشینی تقاطعی بود.

نتیجه‌گیری: نتایج مقایسه تجزیه ترانسکریپتومی دو نژاد هلشتاین و کلیستانی، علاوه بر بیان متفاوت در ژن‌های مختلف از جمله ژنوم میتوکندری و تجزیه تکمیلی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن‌های ATP6، ATP8، و CYTB، نشان داد که عوامل تکامل از جمله جهش‌ها، انتخاب و مهاجرت سه عامل از مهم‌ترین عواملی بودند که موجب تغییر در ساختار ژنتیکی نژادها و از جمله هلشتاین شدند، به‌نحوی که تغییرات مذکور موجب بیان متفاوت در ژن‌های میتوکندری در دو نژاد شدند. لذا به‌منظور بهبود سازگاری نژادهای تجاری می‌توان با طراحی برنامه‌های مناسب آمیخته‌گری و انتخاب ژنومیک موجب ترکیب واریانت‌های تأثیرگذار شده، طول عمر اقتصادی دام‌های تجاری را در ترکیب با دام‌های بومی افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: ترانسکریپتوم، جایگزینی نوکلئوتیدی، کلیستانی، واریانت ژنتیکی، هلشتاین

مقدمه

انتخاب طبیعی در طی سالیان متمادی موجب شده است که دام‌های بومی در مقایسه با نژادهای تجاری از مقاومت ژنتیکی و قدرت سازگاری بالاتری برخوردار باشند (Hoffmann, 2010). وجود این نوع تنوع ژنتیکی لازمه اجرای اهداف اصلاح نژادی پیشرو و سازگاری سریع نسبت به تغییرات محیطی خواهد بود. به همین جهت، حفاظت از منابع ژنتیکی دام‌های بومی دارای اهمیت است و تغییر نگرش جهانی در جهت حفاظت از دام‌های بومی مناطق مختلف ضروری به نظر می‌رسد (Herrero-Medrano *et al.*, 2013). مطالعه وضعیت اکولوژیکی و تکاملی جمعیت‌ها به دلیل توزیع جغرافیایی غیرتصادفی آن‌ها نیازمند شناخت صحیح ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، گامی در جهت توسعه برنامه‌های حفاظتی و مدیریت منابع ژنتیکی محسوب می‌شود (Groeneveld *et al.*, 2010).

گزارش شده است که تغییر DNA میتوکندریایی (mtDNA) با برخی بیماری‌ها، توانایی ورزشی و سازگاری آب و هوایی (اقلیمی) مرتبط است (Pickrell and Youle, 2007; Ruiz-Pesini, 2015). میتوکندری در متابولیسم یوکاریوتی، آپوپتوز، بیماری و پیری نقش اصلی دارد (Tuppen, 2010). فسفوریلاسیون اکسیداتیو که برای تولید ATP و بسیاری از توابع بیوشیمیایی دیگر ضروری است، در میتوکندری رخ می‌دهد.

ژنوم میتوکندری mtDNA حلقوی دو رشته‌ای و فاقد اینترون است (Tuppen, 2010). همانندسازی DNA میتوکندری به کمک آنزیم‌های اختصاصی درون میتوکندری و مستقل از هسته انجام می‌شود. یک سلول دارای هزاران نسخه از mtDNA دو رشته‌ای در ماتریکس داخلی میتوکندری است که در مرحله اول همانندسازی احتیاج به توالی‌های کوتاه RNA دارد که به کمک RNA پلی‌مرازهای میتوکندریایی تولید شده‌اند و می‌توانند پرایمرهای ضروری در همانندسازی را فراهم کنند (Tuppen, 2010).

به دلیل هاپلوئید بودن ژنوم میتوکندری و در نتیجه انجام نشدن فرآیند میوز، ژنوم میتوکندری قابلیت بالایی در مطالعات فیلوژنتیکی دارد. منطقه‌ای در ژنوم میتوکندری وجود دارد که کدکننده پروتئین نیست و جهش در آن منطقه می‌تواند تجمع پیدا کند. این منطقه در ناحیه D-Loop قرار دارد. D-Loop ناحیه پیشبر برای آغاز همانندسازی ژنوم میتوکندری است (Anderson *et al.*, 1981).

ژنوم میتوکندری شامل پنج کمپلکس آنزیمی است که واحد ۵، ATPase - F1O از نیروی محرک پروتون استفاده می‌کند تا ADP و فسفات را به ATP تبدیل کند، در نتیجه، انتقال الکترون و پروتون به سنتز ATP منجر شود (Fontanesi, 2001). این مجتمع در پستانداران شامل ۱۶ زیر واحد مختلف است که دو واحد آن توسط ژن‌های میتوکندری کدگذاری می‌شود و بیش از ۵۰۰ کیلوالتون وزن دارد (Rubinstein *et al.*, 2003). ATPase توسط کاتالیزور چرخشی عمل می‌کند. انرژی رایگان حمل و نقل الکترونی برای پمپ کردن پروتون‌ها از بخش ماتریکس به فضای

میانی و ایجاد یک شیب الکتروشیمیایی در سراسر غشای داخلی استفاده می‌گردد. سپس این گرادیان ATPase را قادر به سنتز ATP می‌کند (Noji *et al.*, 1997).

mtDNAهای حیوانی حاوی ژن‌هایی هستند که RNAهای ریبوزومی زیرواحد بزرگ و کوچک، ۲۲ RNA (tRNA) و ۱۳ پروتئین را که همه اجزای فرآیند فسفوریلاسیون اکسیداتیو هستند را رمزگذاری می‌کنند. زیرواحد‌های ATPase (ATP6 و ATP8)، سیتوکروم b (CYTB)، زیرواحد‌های سیتوکروم c اکسیداز (Cox1-3) و NADH دهیدروژناز زیرواحد ۱-۶، 4L، ND1-6 هستند. در برخی از گونه‌هایی که ژن میتوکندری را از دست می‌دهند، واحدهایی مانند ATPase6 و ATPase8 در هسته کدگذاری می‌شوند (Faure & Casanova, 2006).

در میتوکندری یوکاریوت‌ها و در پروکاریوت‌های هوازی، سیتوکروم b جزء مجموعه زنجیره تنفسی III است، همچنین به‌عنوان کمپلکس bc1 یا ubiquinol-cytochrome c ردوکتاز شناخته می‌شود. این کمپلکس‌ها در انتقال الکترون و پمپاژ پروتون‌ها برای ایجاد نیروی محرکه پروتون (PMF) نقش دارند (Fontanesi, 2001).

نتایج فیلوژنی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن CYTB به طول ۱۴۰ جفت‌باز در نژادهای مختلف گاو چینی منجر به طبقه بندی نژادها در دو گروه تائورین (بوس تائوروس) و زبو (بوس ایندیکوس) شدند. تجزیه و تحلیل‌ها در جایگاه سیتوکروم b نشان داده است که گاوهای چینی تنوع نوکلئوتیدی (۰/۰۰۹۲۳) و هاپلویتیپی (۰/۸۴۸) بالاتر از سایر گزارشات دارند. همچنین گزارش شده است که حیوانات از نوع تائورین تنوع نوکلئوتیدی (۰/۰۰۳۳۰) و هاپلویتیپی (۰/۷۴۶) بالاتری نسبت به یکی از دودمان‌های زبو دارند (۰/۰۰۱۳۶؛ ۰/۶۶۱). ژنوم میتوکندری گاوهای زبو در نژادهای جنوبی غالب هستند، در حالی ژنوم میتوکندری تائورین در نژادهای شمالی غالب است (Cai *et al.*, 2007).

در مطالعه‌ای به منظور بررسی تجزیه تفریقی ژن‌ها در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی، تفاوت بیان معنی‌داری در برخی از ژن‌های میتوکندری، از جمله ژن‌های کدکننده کمپلکس آنزیمی ATPase شامل ATP6 و ATP8 و سیتوکروم b در بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی گزارش گردید که نقش مهمی در تنظیم چرخه کربس و انرژی سلولی دارند (Salimpour *et al.*, 2012, 2013). با توجه به این که نتایج بیان افتراقی دو نژاد در تعدادی از ژن‌های میتوکندری بیان متفاوتی را نشان دادند و بخشی از اختلافات مربوط به ساختار ژنتیکی متفاوت آن‌ها در دو نژاد است، هدف مطالعه حاضر قرار گرفت. لذا، به منظور بررسی دلایل بیان متفاوت این ژن‌ها از دیدگاه ساختار ژنتیکی و شناسایی واریانت‌های مهم مورد کاوش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

و کلیستانی (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRS454433) قابل دریافت است.

اطلاعات تجزیه بیان افتراقی داده‌های مذکور در مطالعات مختلف گزارش شده است (Salimpour *et al.*, 2016; 2019; Banabazi *et al.*, 2013; Varkoohi *et al.*, 2021).

با استفاده از پایگاه‌های داده ژنومی NCBI به آدرس (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) و Ensembl به آدرس (https://asia.ensembl.org/index.html)، توالی‌های سه ژن میتوکندریایی شامل ATP6، ATP8 و CYTB برای نژاد گاو هلشتاین (*Bos taurus*) و نژاد گاو کلیستانی (*Bos indicus*) استخراج و به فرمت FASTA ذخیره گردیدند. اطلاعات مربوط به سه ژن در جدول ۱ ارائه شده است.

در مطالعه حاضر، از داده‌های ترانسکریپتوم (RNA-Seq) با دسترسی آزاد ۴۰ نمونه از گاوهای شیری دانشگاه ویسکانسین آمریکا و ۴۵ گاو ماده کلیستانی از واحد گاو شیری گوجاتیپیر شهر باهاولپور واقع در ایالت پنجاب پاکستان استفاده گردید (Huange *et al.*, 2012). کتابخانه‌های RNA آماده شده برای هر نژاد روی یک خط دستگاه IlluminaGenome Analyzer IIx با پلتفرم Hiseq2000 توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی به ترتیب تولید ۲۱۰۷۸۴۷۷ و ۲۰۹۴۰۰۶۳ خوانش کوتاه به طول متوسط ۷۵ جفت باز برای نژادهای هلشتاین و کلیستانی بودند. داده‌های خام برای هر نژاد در تاریخ ۲۲ جولای ۲۰۱۳ آرشیو خوانش‌های کوتاه (SRA) بانک ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) ثبت و با فرمت sra به صورت رایگان و عمومی از لینک‌های ذیل برای نژاد هلشتاین (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRS454432)

جدول ۱- مشخصات مربوط به سه ژن میتوکندریایی در گاوهای هلشتاین (*Bos taurus*) و کلیستانی (*Bos indicus*)

Table 1. Specifications of three mitochondrial genes in Holstein (*Bos taurus*) and Cholistani (*Bos indicus*) cattle

شماره دسترسی Accession number	نام ژن Gene name	چایگاه* Locus	طول Length	پوشش ترانسکریپتوم Coverage#	متوسط سطح بیان ژن FPKM ⁵	حداقل سطح بیان FPKM conf-L	حداکثر سطح بیان FPKM conf-H
گاو هلشتاین (<i>Bos taurus</i>)							
ENSBTAG00000043584	ATP6	MT:8289-8970	681	9113.65	4674.56	4476.07	4873.05
ENSBTAG00000043564	ATP8	MT:8128-8329	201	10747.3	5512.44	5253.91	5770.98
ENSBTAG00000043550	CYTB	MT:14513-15653	1140	5742.67	2896.36	2868.55	2924.17
گاو کلیستانی (<i>Bos indicus</i>)							
ENSBTAG00000043584	ATP6	MT:8289-8970	681	13538.4	6262.04	5998.11	6525.97
ENSBTAG00000043564	ATP8	MT:8128-8329	201	5245.46	2426.24	2249.02	2603.45
ENSBTAG00000043550	CYTB	MT:14513-15653	1140	4099.87	2211.77	2188.27	2235.27

کاراکتر سمت چپ بیانگر ژنوم میتوکندری و اعداد بعد از آن شماره نوکلئوتید شروع و پایان ژن را نشان می‌دهند. ⁵شاخصی است که برای محاسبه بیان ژن به کار می‌رود که معمولاً مقدار کمتری از شاخص RPKM دارد و به جای استفاده از شمارش خوانش‌ها، تعداد نسبی رونوشت‌ها را از لحاظ قطعات مشاهده شده از یک آزمایش RNA-Seq تخمین می‌زند. [#]پوشش ترانسکریپتوم

*The character on the left indicates the mitochondrial genome, and the numbers after that indicate the start and end nucleotide numbers of the gene. ⁵ is an index that is used to calculate gene expression, which usually has a lower value than the RPKM index, and instead of using reading counts, it measures the relative number of transcripts in terms of fragments observed from an RNA-Seq experiment. [#]Coverage

تعیین انواع چندشکلی‌های به‌وقوع پیوسته در ژنوم میتوکندری هلشتاین و کلیستانی با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی و همچنین بلوک‌های هاپلوتیپی، تعیین نواحی حذف و اضافه، مناطق حفاظت‌شده در ژنوم از نرم‌افزار Dnasp نسخه ۵ (Librado & Rozas, 2009) استفاده شد. برای انجام تجزیه‌های مذکور، ابتدا نواحی ORF هر ژن استخراج، در قالب FASTA ذخیره و پس از هم‌ردیف‌سازی برای تحلیل‌های ذکر شده استفاده شدند.

نتایج و بحث

حذف یا Deletion: نتایج تغییر در ساختار ژنتیکی ژنوم میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی به‌واسطه حذف نقطه‌ای در جدول ۲ ارائه شده‌اند. تعداد نواحی حذف در نژاد هلشتاین در سه جایگاه ژنی ATP6، ATP8 و CYTB به ترتیب ۹۶، ۲۸ و ۹۱ موقعیت حذف بودند که بیشتر از تعداد نقاط حذف نژاد کلیستانی (در مقابل ۸۴، ۹ و ۵۷) هستند. تغییرات حذف در تعدادی از بازهای DNA موجب می‌شود تا طول DNA تغییر کند. جهش‌های حذفی کوچک یک یا چند

جهت بررسی سطح پوشش (کاوریج) ژن‌های میتوکندری و تعیین اختلافات ژنتیکی در سه ژن میتوکندریایی در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی از برنامه IGB نسخه 9.1.0 استفاده شد (https://www.arabidopsis.org/doc/tools/igb/91). بارگذاری فایل داده‌های کمی بیان افتراقی ژن‌ها در قالب فرمت gtf به همراه ژنوم مرجع و سپس تجزیه سطح پوشش ژنومی یا کاوریج به صورت گرافیکی انجام شد.

جهت محاسبه نواحی چندشکل و همچنین محاسبه درصد جایگزینی نوکلئوتیدها از برنامه MEGA نسخه 6 استفاده شد (Tamura *et al.*, 2013). به این منظور، نواحی ORF سه ژن میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی از برنامه IGB استخراج و ویرایش گردیدند، در قالب فرمت FASTA در تجزیه با MEGA6 مورد استفاده قرار گرفتند، و به‌منظور تعیین نواحی چندشکل توالی دو گونه با ژنوم مرجع هم‌ردیف شدند. همچنین، نواحی ORF به توالی اسیدآمینه نیز ترجمه شدند و سپس برای محاسبه شاخص‌هایی مانند درصد جایگزینی تقاطعی و انتقالی و نسبت آن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

شناسایی واریانتهای مهم ژنهای کدکننده آنزیم ATPase و سیتوکروم b ژنوم میتوکندری ۱۶۴

جفتباز را از ژن حذف می کنند، در حالی که جهش های حذفی بزرگتر می توانند کل یک ژن یا چندین ژن مجاور را نیز حذف کنند. حذف موجب می شود تا تغییر ترتیب بازها و انواع کدونها و عملکرد پروتئین یا پروتئینهای حاصله نیز تغییر یابند.

جدول ۲- نواحی حذف در ژنوم میتوکندری نژادهای هلشتاین و کلیستانی

Table 2. Deletion regions in the mitochondrial genome of Holstein and Cholistani breeds

ردیف Number	نام ژن Gene name	هلشتاین (Holstein)		کلیستانی (Cholistani)	
		تعداد نواحی The number of regions	تعداد حذفها (جفت باز) Number of Deletion (bp)	تعداد نواحی The number of regions	تعداد حذفها (جفت باز) Number of Deletion (bp)
1	ATP6	96	112	81	84
2	ATP8	28	30	9	9
3	CYTB	91	99	53	57

در نژاد هلشتاین به ترتیب ۵ و ۹ موقعیت اتصال و در نژاد کلیستانی ۱ و ۲۲ موقعیت اتصال شناسایی گردیدند که به ترتیب باعث تغییر ۵۵ و ۷۴ جفتباز در ژنوم نژاد هلشتاین و ۱۱ و ۲۲ جفت باز در ژنوم نژاد کلیستانی شدند.

نواحی اتصال^۱ در ژنوم میتوکندری: نتایج نواحی اتصال در ژنهای میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۳ ارائه شده اند. در جایگاه ژنی ATP8 در هیچ کدام از نژادها موقعیت اتصال یافت نشد، اما در دو جایگاه ATP6 و CYTB

جدول ۳- تعیین نواحی جانک در DNA نژاد هلشتاین و کلیستانی

Table 3. Determining the junk regions in the DNA of Holstein and Cholistani breeds

ردیف Number	ژن Gene	هلشتاین (Holstein)		کلیستانی (Cholistani)	
		تعداد نواحی Number of regions	اتصال (جفت باز) Junk (bp)	تعداد نواحی Number of regions	اتصال (جفت باز) Junk (bp)
۱	ATP6	5	55	1	11
۲	ATP8	-	-	-	-
۳	CYTB	9	74	22	22

به طول ۱۶ جفتباز، در جایگاه ژنی ATP6 یک ناحیه درج در موقعیت ۸۷۳۳ جفتبازی به طول ۲۰ جفتباز و در جایگاه CYTB سه ناحیه درج در موقعیت های ۱۴۷۷۹، ۱۵۳۵۵ و ۱۵۳۵۶ به ترتیب درج های به طول ۲۷، ۴۲ و ۱۶ جفت باز مشاهده شدند. این جهش با افزودن قطعه ای از DNA، تعداد بازهای DNA را در یک ژن تغییر می دهد و در نتیجه پروتئین ساخته شده توسط این ژن به درستی عمل نمی کند.

درج و اضافه شدن: نتایج تغییرات در ژنوم میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در مقایسه با ژنوم مرجع در جدول ۴ ارائه شده اند. در نژاد کلیستانی در جایگاه ژنی ATP6 در موقعیت ۸۷۳۳ جفتبازی یک درج به طول ۶۴ جفتباز و در جایگاه ژنی CYTB دو ناحیه درج در موقعیت های ۱۵۸۴۶ و ۱۴۷۷۹ جفتبازی به طول ۱۷ و ۲۴ جفت رخ داده اند. در جایگاه ATP8 در نژاد کلیستانی هیچ درجی مشاهده نشد. در نژاد هلشتاین در جایگاه ATP8 یک ناحیه درج در موقعیت ۸۱۸۵

جدول ۴- نواحی درج و اضافه در ژنهای میتوکندری در نژادهای هلشتاین و کلیستانی

Table 4. Insertion and addition regions in mitochondrial genes in Holstein and Cholistani breeds

ردیف Number	نام ژن Gene name	درج Insertions	منطقه گرم Top hat	
			درج Insertions	منطقه گرم Top hat
کلیستانی (Cholistani)				
1	ATP6	8733	T	64
2	CYTB	15846	A	17
3	CYTB	14779	T	24
هلشتاین (Holstein)				
1	ATP8	8185	T	16
2	ATP6	8733	T	20
3	CYTB	14779	T	28
4	CYTB	15355	C	42
5	CYTB	15356	A	16

سطح پوشش (کاوریج) در این ژن در نواحی نوکلئوتیدی G به شماره توالی ۸۶۲۵ الی نوکلئوتید A به شماره ۸۶۴۹ قرار داشت.

نتایج سطح پوشش ترانسکریپتومی در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۵ آورده شده اند.

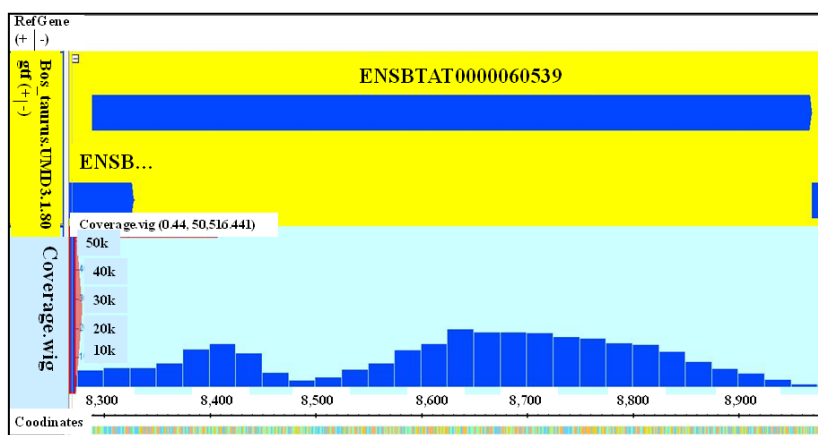
نتایج پوشش ترانسکریپتومی در جایگاه ژن ATP6 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در شکل ۱ ارائه شده اند. بیشترین

جدول ۵- نتایج پوشش ترانسکریپتومی یا کاوریج در بین ژنهای میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

Table 5. Results of the genomic coverage among mitochondrial genes in Holstein and Cholistani breeds

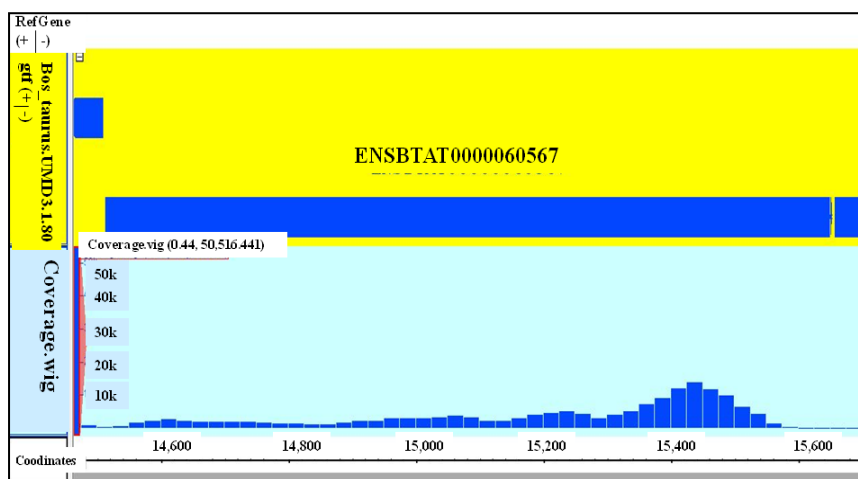
ردیف Number	ژن Gene	شروع Start	خاتمه End	طول Length	نتیجه Strand
1	ATP6	8289	8967	678	+
2	CYTB	14513	15650	1137	+
3	ATP8	8128	8326	198	+

1 Junk



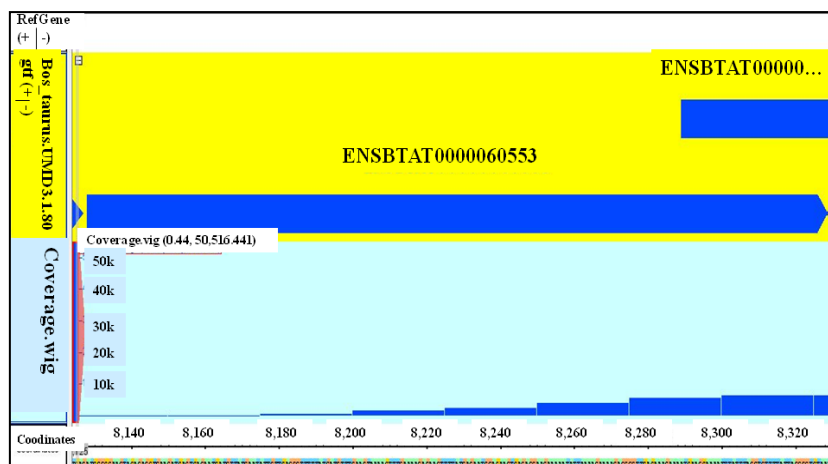
شکل ۱- نتایج پوشش یا کاوریج در جایگاه ژنی ATP6 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 1. The coverage results of the ATP6 gene locus in Holstein and Cholistani breeds

نتایج پوشش ترانسکریپتومی در جایگاه ژنی CYTB در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در شکل ۲ ارائه شده‌اند. بیشترین سطح پوشش یا کاوریج در این ژن در نواحی نوکلئوتیدی C به شماره توالی ۱۵۴۲۵ الی نوکلئوتید C به شماره ۱۵۴۴۹ بود.



شکل ۲- نتایج پوشش یا کاوریج در جایگاه ژنی CYTB در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 2. The coverage results of the CYTB gene locus in Holstein and Cholistani breeds

نتایج پوشش ترانسکریپتومی در جایگاه ژنی ATP8 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در شکل ۳ ارائه شده‌اند. بیشترین سطح پوشش یا کاوریج در این ژن در نواحی نوکلئوتیدی T به شماره توالی ۸۳۰۰ الی نوکلئوتید A به شماره ۸۳۲۸ قرار داشت.



شکل ۳- نتایج پوشش یا کاوریج در جایگاه ژنی ATP8 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 3. The coverage results of the ATP8 gene locus in Holstein and Cholistani breeds

یافت. همچنین، گزارش شد که بسته به عمق خوانشها سطح پوشش ترانسکریپتومی هم تغییر کرد. با عمق ۱۰ مگا جفتباز (طول ترانسکریپت ۷۵ جفتباز) سطح پوشش ۸۰ درصد و با عمق ۳۰ مگا جفتباز (۷۵ جفتباز طول) سطح پوشش ترانسکریپتومی تا ۹۰ درصد افزایش پیدا کرد که در تهیه نقشه‌های ژنی بسیار مفیدتر هستند (Wang *et al.*, 2011).

تغییرات ژنتیکی به واسطه جهش‌های نقطه‌ای:

مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی ATP6 با طول ۶۷۸ جفتباز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی مشتمل بر هشت ناحیه چندشکلی و براساس توالی آمینواسیدی سه ناحیه چندشکلی را نشان داد (شکل‌های ۴ و ۵).

از بین سه جایگاه ژنی، جایگاه ATP6 بالاترین سطح پوشش و ATP8 کمترین پوشش را داشت و جایگاه CYTB در حد واسطه دو جایگاه دیگر قرار داشت. در مطالعه‌ای، به‌منظور ارزیابی پوشش و عمق ترانسکریپتومی توسط RNA-Seq در مرغ، RNA-Seq با استفاده از دو نمونه cDNA مرغ در طی دو مرحله مجزا انجام شد. اولین اجرای RNA-seq تعداد کمتری خوانش و تنوع بیشتری از نظر تعداد کل خوانشها در بین نمونه‌ها مشاهده گردید، در حالی که در مرحله دوم تعداد خوانشها بیشتر، اما تنوع بسیار کم بود. نتایج تجزیه و تحلیل نشان دادند که پیشرفت قابل توجهی در پوشش ترانسکریپت‌ها از ۱/۶ به ۴/۹ مگا جفتباز و از ۲۰ به ۳۰ مگا جفتباز تغییر

```

ATGAACGAAA ATTTATTTAC CTCTTTTATT ACCCCTGTAA TTTTAGGCTC CCCTCTCGTA ACCCTTATCG TACTATTCCC
.....
.....G.....
AAGCCTACTA TTCCCAACAT CAAACCGACT AGTAAGCAAT CGCTTTGTAA CCCTCCAACA ATGAATACTT CAACTTGTAT
.....
.....C.....
CAAAACAAAT AATGAGTATC CACAATTCTA AAGGACAAC ATGAACATTA ATATTAATAT CTCTGATCCT ATTTATTGGA
.....
.....C.....G.....C.....A.....
TCAACAAACC TACTAGGCCT ATTACCCCAT TCATTACAC CAACAACACA ACTATCAATA AACCTAGGCA TAGCCATCCC
.....
.....G.....
CCACTCCACT AATCCCAATA CTAGTAATTA TTGAAACTAT CAGCCTTTTT ATTCAACCTA TAGCCCTCGC CGTGCGGTAA
.....
.....G.....
    
```

شکل ۴- نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی ATP6 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 4. Polymorphic regions based on nucleotide sequences in ATP6 gene locus comparing Holstein and Cholistani breeds

```

MNENLFTSFI TPVILGLPLV TLIVLFPSSL FPTS NRLVSN RFVTLQQ*IL QLVSKQIMSI HNSKGQT*TL ILISLILFIG
.....
.....A.....A.....
STNLLGLLPH SFTPTTQLSI NLGIAIPL*A GAVITGFRNK TKASLAHFLP QGTPTPLIPI LVIIETISLF IQPIALAVRL
.....
.....V.....
    
```

شکل ۵- نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های آمینواسیدی در جایگاه ژنی ATP6 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 5. Polymorphic regions based on amino acid sequences in the ATP6 gene locus comparing Holstein and Cholistani breeds

است. نسبت‌های بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در جایگاه مذکور به‌ترتیب برابر با ۳۳/۲۸، ۲۷/۷۸، ۲۷/۷۳ و ۱۱/۲۱ درصد بودند.

جایگزینی‌های آمینواسیدی شامل دو تبدیل ترئونین به آلانین و یک موقعیت تبدیل ایزولوسین به والین بودند. الگوی جایگزینی بازها در جایگاه ژنی ATP6 با طول ۶۷۸ جفتباز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۶ ارائه شده

جدول ۶- درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن ATP6 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Table 6. The percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of the ATP6 gene in Holstein and Cholistani breeds

نوکلئوتید Nucleotide	A	T/U	C	G
A	-	1.35	1.35	18.37
T/U	1.62	-	8.67	0.54
C	1.62	8.69	-	0.54
G	54.56	1.35	1.35	-

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. الگوی و نرخ جایگزینی تحت مدل تامورا نئی (۱۹۹۳) برآورد شده است. در جدول، نرخ جهش انتقالی به‌صورت ضخیم و جهش تقاطعی به صورت *یتالیک* نشان داده شده‌اند.

Each entry shows the probability of substitution (τ) from one base (row) to another base (column). The Tamura and Nei (1993) model estimated substitution patterns and rates. Rates of transitional substitutions are in bold, and those of transversional substitutions are in *italics*.

جایگزینی تقاطعی بازهای پورینی به پرمیدینی ۲/۷ درصد و پرمیدینی به پورینی ۲/۱۶ درصد محاسبه شدند. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی ۹/۲۹ بود. مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی ATP8 با طول ۱۹۸ جفت باز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی، شش ناحیه چندشکلی و بر اساس توالی آمینواسیدی دو ناحیه چندشکلی را نشان داد (شکل‌های ۶ و ۷). تغییرات آمینواسیدی شامل تبدیل والین به ایزولوسین و ترئونین به آلانین بودند.

نتایج حاصل از درصد جایگزینی در توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژن ATP6 نشان دادند که مقدار بالای جانشینی انتقالی مربوط به بازهای پورینی به میزان ۷۹/۹۳ درصد بود. به این صورت که در بازهای پورینی تبدیل آدنین به گوانین ۱۸/۳۷ درصد و گوانین به آدنین ۵۴/۵۶ درصد بودند و مجموع جانشینی انتقالی در بازهای پرمیدینی ۱۷/۳۶ درصد بود. در بازهای پرمیدینی، مقادیر تبدیل سیتوزین به تیمین ۸/۶۹ درصد و تیمین به سیتوزین ۸/۶۷ درصد بودند. همچنین، مقادیر

```

ATGCCGCAAC TAGACACGTC AACATGACTG ACAATGATCT TATCAATATT CTTGACCCTT TTTATCATCT TTCAACTAAA
.....C.....C.....T.....
AGTTTCAAAA CACAACTTTT ATCACAATCC AGAACTGACA CCAACAAAAA TATTAACA AAACACCCCT TGAGAAACAA
.....A.....G.....
AATGAACGAA AATTTATTTA CCTCTTTTAT TACCCCTG
.....G.....
    
```

شکل ۶- نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی ATP8 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 6. Polymorphic regions based on nucleotide sequences in the ATP8 gene locus comparing the Holstein and Cholistani breeds

```

MPQLDTST*L TMILSIFLTL FIIFQLKVKV HNFYHNPELT PTKILKQNTP *ETK*TKIYL PLLLLPL
.....I.....A.....
    
```

شکل ۷- نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های آمینواسیدی در جایگاه ژنی ATP8 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 7. Polymorphic regions based on amino acid sequences in the ATP8 gene locus comparing Holstein and Cholistani breeds

الگوی جایگزینی بازها در جایگاه ژنی ATP8 با طول ۱۹۸ جفت‌باز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۷ ارائه شده است. نسبت‌های بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در

جدول ۷- درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن ATP8 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Table 7. The percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of the ATP8 gene position in Holstein and Cholistani breeds.

نوکلئوتید Nucleotide	A	T/U	C	G
A	-	0.01	0.01	11.50
T/U	0.01	-	15.69	0.00
C	0.01	18.07	-	0.00
G	54.70	0.01	0.01	-

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. الگوی و نرخ جایگزینی تحت مدل تامورا نئی (۱۹۹۳) برآورد شده است. در جدول، نرخ جهش انتقالی به صورت ضخیم و جهش تقاطعی به صورت *یتالیک* نشان داده شده‌اند.

Each entry is the probability of substitution (*r*) from one base (row) to another base (column). Substitution patterns and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in bold, and those of transversional substitutions are shown in *italics*.

پورینی به پرمیدینی ۰/۰۲ درصد و پرمیدینی به پورینی ۰/۰۱ درصد بودند. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی برابر با ۱۶۶۶ بود.

مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی CYTB با طول ۱۱۳۷ جفت باز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی نشان دهنده ۱۹ ناحیه چندشکلی و براساس توالی آمینواسیدی تنها دو ناحیه چندشکلی بود که آمینواسید والین به ایزولوسین و ایزولوسین به والین تبدیل شدند (شکل‌های ۸ و ۹).

نتایج حاصل از درصد جایگزینی در توالی‌های نوکلئوتیدی ژن ATP8 نشان دادند که مقدار بالای جایگزینی انتقالی مربوط به بازهای پورینی به میزان ۶۶/۲ درصد بود. به این صورت که در بازهای پورینی تبدیل آدنین به گوانین ۱۱/۵ درصد و گوانین به آدنین ۵۴/۷ درصد بود. مجموع جایگزینی انتقالی در بازهای پرمیدینی ۳۳/۷۶ درصد بود. در بازهای پرمیدینی، مقادیر تبدیل سیتوزین به تیمین ۱۸/۰۷ درصد و تیمین به سیتوزین ۱۵/۶۹ درصد بودند. همچنین، مقادیر جایگزینی تقاطعی بازهای

```

TTCATCATGA TGA AATTTCG GTTCCCTCCT GGAATCTGC CTAATCCTAC AAATCCTCAC AGGCCTATTC CTAGCAATAC
.....G.....
TACATACACG CAAACGGAGC TTCAATGTTT TTTATCTGCT TATATATGCA CGTAGGACGA GCCTTATATT ACGGGTCTTA
.....T.....
CACTTTTCTA GAAACATGAA ATATTGGAGT AATCCTCTCG CTCACAGTAA TAGCCACAGC ATTTATAGGA TAGCTCTAC
.....C.....
TATCATCATA GCAATTGCCA TAGTCCACCT ACTATTCTC CACGAAACAG GCTCCAACAA CCCAACAGGA ATTTCTCAG
.....T.....
CTACTAGTAC TATTTCGACC CGACTCTCTC GGAGACCAG ATAACTACAC CCCAGCCAAT CCACTCAACA CACCCCTCTA
.....G.....
CATCAAACCC GAGTGATACT TCTTATTTCG ATACGCAATC TTACGATCAA TCCCAACAA ACTAGGAGGA GTA CTAGCC
.....A.....
AGCCAATGCC TATTCTGAGC CCTAGTAGCA GACCTATTGA CACTCACATG AATTGGAGGA CAACCAAGTCG AACACCCATA
.....C.....
TATCACCATC GGACAACATG CATCTGCTCT ATACTTCTC CTCATCCTAG TGCTAATACC AACGGCCGGC ACAATCGAAA
.....T.....
.....A.....
.....T.....
.....A.....
.....A.....
.....G.T.....
    
```

شکل ۸- نواحی چندشکل بر اساس توالیهای نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی CYTB در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 8. Polymorphic regions based on nucleotide sequences in the CYTB gene locus comparing Holstein and Cholistani breeds

```

MTNIRKSHPL IKIVNNAFID LPAPSNISS* *NFGSLLGIC LILQILTGLF LAIHYTSDTT TAFSSVTHIC RDVNYG*IIIR
.....W.....
SQCLF*ALVA DLLTLT*IGG QPVEHPYITI GQLASVLYFL LILVLIPTAG TIENKLLK*
.....I.....
.....V.....
    
```

شکل ۹- نواحی چندشکل بر اساس توالیهای آمینواسیدی در جایگاه ژنی CYTB در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 9. Polymorphic regions based on amino acid sequences in the CYTB gene locus comparing Holstein and Cholistani breeds

الگوی جایگزینی توالیهای نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی
CYTB با طول ۱۱۳۷ جفتباز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
در جدول ۸ ارائه شده است. نسبتهای بازهای آدنین، تیمین،
سیتوزین و گوانین در جایگاه مذکور به ترتیب برابر با ۳۱/۱۶،
۲۵/۴۵، ۳۰/۰۵ و ۱۳/۳۴ درصد بودند.

جدول ۸- درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن CYTB در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Table 8. The percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of the CYTB gene locus in Holstein and Cholistani breeds

نوکلئوتید Nucleotide	A	T/U	C	G
A	-	0.00	0.00	13.83
T/U	0.01	-	29.14	0.00
C	0.01	24.67	-	0.00
G	32.32	0.00	0.00	-

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. الگوی و نرخ جایگزینی تحت مدل تامورا-ئی (۱۹۹۳) برآورد شده است. در جدول، نرخهای جهش انتقالی به صورت ضخیم و جهش تقاطعی به صورت *ایتالیک* نشان داده شدهاند.

Each entry is the probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column). Substitution patterns and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in bold, and those of transversional substitutions are shown in *italics*.

نتایج حاصل از درصد جایگزینی در توالیهای نوکلئوتیدی
جایگاه ژنی CYTB نشان دادند که مقدار بالای جایگزینی
انتقالی مربوط به بازهای پریمیدینی به میزان ۵۳/۸۱ درصد بود.
به این صورت که در بازهای پریمیدینی تبدیل سیتوزین به
تیمین ۲۴/۶۷ درصد و تیمین به سیتوزین ۲۹/۱۴ درصد بود.
مجموع جایگزینی انتقالی در بازهای پورینی ۴۶/۱۵ درصد بود
که میزان تبدیل گوانین به آدنین ۳۲/۳۲ درصد و آدنین به
گوانین ۱۳/۸۳ درصد را شامل می‌شد. همچنین، مقادیر
جایگزینی تقاطعی بازهای پورینی به پریمیدینی صفر درصد و
پریمیدینی به پورینی ۰/۰۱ درصد بودند. نسبت جایگزینی
انتقالی به تقاطعی برابر با ۴،۹۹۸ بود.

جدول ۹- نواحی چندشکل در ژنهای واقع بر ژنوم میتوکندری بر اساس توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Table 9. Polymorphic regions in the genes located on the mitochondrial genome based on nucleotide and amino acid sequences in Holstein and Cholistani breeds

نام ژن Gene name	توالی نوکلئوتیدی Nucleotide sequence	طول بر حسب جفت باز Nucleotide sequence length in base pairs	تعداد نواحی چندشکلی The number of Polymorphic sites	توالی آمینواسیدی Amino acid sequences	طول رشته پروتئینی Protein length	تعداد نواحی چندشکلی The number of Polymorphic sites
ATP6	Nucleotide	678	8	Protein	226	3
ATP8	Nucleotide	198	6	Protein	66	2
CYTB	Nucleotide	1137	19	Protein	379	3

جایگزینی پورین با پیریمیدین و خلاف آن، جهش تقاطعی (Transversion) نام دارد. جهش در ژن‌هایی که به نتاج می‌رسند و حضور همزمان آن‌ها با ژن‌های اصلی به چندریختی (Polymorphism) می‌انجامد. تکامل پیامد دگرگونی در فراوانی آلل‌ها است که فراوانی ژن نام دارد. نظر به این که برخی آلل‌ها در طول زمان از دست می‌روند و فراوانی سایر آلل‌ها تا ۱۰۰ درصد افزایش می‌یابد، این آلل‌ها در جمعیت تثبیت می‌شوند. تکامل بلندمدت یک گونه از تثبیت و شکل‌گیری درست آلل‌های خاص حاصل می‌شود که بازتاب پایداری جهش‌ها است. ماندگاری این جهش‌ها در جمعیت، نرخ تکاملی یا نرخ پایداری خوانده می‌شود.

اطلاعات مربوط به نواحی حفاظت شده در ژن‌های واقع بر روی ژنوم میتوکندری در جدول ۱۰ ارائه شده است.

جدول ۱۰- نواحی حفاظت‌شده ژن‌های واقع بر ژنوم میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

شماره Number	ژن Gene	ناحیه: شروع - خاتمه Region: start-end	طول Length	سطح احتمال P-value
1	ATP6	461-678	217	0.0440
2	CYTB	94-311	217	0.0169
3	CYTB	385-591	206	0.0212
4	CYTB	814-996	182	0.0346

به عنوان نشانگری جهت تشخیص گونه معرفی شد (Pfeiffer *et al.*, 2004). در مطالعه بررسی چندشکلی در موقعیت ۱۴۷۱۶ جفت بازی سیتوکروم b (C>T) در نژادهای مختلف گاو بومی هندوستان، نتایج بیانگر این بودند که ال و وحشی C در تمام نژادها به جزء نژاد Kangeyam تثبیت شد و نتایج فیلوژنی نژادهای بومی با ژنوم مرجع نشان دادند که تمام نژادها در گونه *Bos indicus* قرار داشتند (Ratnam *et al.*, 2022).

در مقایسه توالی سیتوکروم b در گاوهای بالی (Bali) و لومبوک (Lombok) کشور اندونزی، نتایج بیانگر تنوع نوکلئوتیدی بالا در دامنه بین ۱۲ تا ۸۴ جهش در بین و درون نژادهای مختلف بودند که موجب گروه‌بندی متفاوت دو نژاد در تجزیه فیلوژنی گردید (Rahmatullaili *et al.*, 2019). در مطالعه دیگر در بررسی چندشکلی سیتوکروم b در گاوهای بومی اندونزی و آمیخته‌های آن‌ها با نژاد لیموزین با روش RFLP، نتایج بیانگر دو هاپلوتیپ A و B مختلف در بین گروه‌های مختلف بودند. به این نحو که گاوهای Pesisir و Aceh تنها هاپلوتیپ B و گاوهای بالی و لیموزین تنها حاوی هاپلوتیپ A بودند و سایر نژادها شامل مدورا و جاوا هر دو هاپلوتیپ A و B را داشتند. تفاوت‌ها در بین جمعیت‌های گاو بیانگر اختلاف محیط خاص پرورش دام‌ها است و جهت کنترل جمعیت گونه‌ها ضروری است (Hartatik *et al.*, 2014).

برخی گزارشات بیانگر ارتباط برخی از جهش‌ها در ناحیه سیتوکروم b با باروری در گاوهای نر هستند. در مطالعه‌ای که به‌منظور مقایسه تنوع ژنتیکی سیتوکروم b در بین گاوهای خالص مدورا و لیموزین و آمیخته‌های آن‌ها در کشور اندونزی انجام گرفت، ۱۳ ناحیه چندشکل در بین گاوهای مدورا و آمیخته‌های مدورا لیموزین و ۱۴ ناحیه چندشکلی بین لیموزین و آمیخته مدورا لیموزین گزارش گردیدند که منجر به طبقه‌بندی

بیشترین تعداد نواحی چندشکلی در بین ژن‌های واقع بر ژنوم میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی مربوط به جایگاه ژنی CYTB با ۱۹ ناحیه و کمترین آن مربوط به ATP6 بود. از نظر تعداد نواحی چندشکلی آمینواسیدی در زنجیره پروتئینی، بیشترین جایگزینی آمینواسیدی در هر سه جایگاه بین ۲ تا ۳ ناحیه متغیر بود.

معمولا تنوع نوکلئوتیدی بالا مناسب‌ترین روش برای انتخاب طبیعی است. تنوع نوکلئوتیدی بالا در ژن CYTB ممکن است نتیجه انتخاب طبیعی وسازگاری بهتر و بقای مربوط به جایگاه چندشکلی آن باشد (Jin *et al.*, 2008).

اشتباه در جایگزینی یک پورین با پورین دیگر و یک پیریمیدین با پیریمیدین دیگر حالتی است که به سادگی اتفاق می‌افتد. این جهش‌ها، جهش انتقالی (Transition) نامیده می‌شوند.

نتایج حاصل از تجزیه نواحی حفاظت‌شده در قطعه هم‌تراز شده از ژن‌های ATP6، ATP8، و CYTB نشان دادند که از توالی ژن‌های ذکرشده، ژن ATP6 دارای یک قطعه ۲۱۷ جفت‌بازی حفاظت شده است، و ژن ATP8 بدون منطقه حفاظت‌شده و مستعد تغییرهای نوکلئوتیدی و جهش است، که سبب به‌وجود آمدن پروتئین‌های جدید و همچنین عملکردهای جدید آن‌ها شده است و بیشتر مناطق ژن CYTB حفاظت‌شده هستند.

از دیدگاه متخصصین ژنتیک جمعیت، تمایز بین جمعیت‌ها با تعادل بین رانش (Genetic drift) و جریان ژنی (Gene flow) رخ می‌دهد (Schlotterer & Pemberton, 1998). ژنوم میتوکندری گاو ساختار حلقوی، پیچ‌خورده، چندکپی و خارج هسته با سرعت جهش بالا و سرعت تکامل پنج تا ده برابر بالاتر از DNA هسته‌ای است که منجر شده است تا تنوع بسیار بالا ایجاد شود و به‌عنوانی ابزاری در تحقیقات بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنی مورد استفاده قرار گیرد (Ratnam *et al.*, 2022). بر خلاف DNA هسته، ژنوم میتوکندری فاقد نوترکیبی اینترون است، اما وراثت مادری منحصر به فرد دارد و تحت تأثیر عوامل جهش‌زا از جمله شکل‌های فعال اکسیژن شکسته می‌شود و با مکانیسم‌های مختلف ترمیم می‌گردد (Andalib *et al.*, 2017).

ژنوم میتوکندری و به‌طور خاص سیتوکروم b و سیتوکروم اکسیداز از جمله نشانگرهای بالقوه هستند که جهت شناسایی گونه‌ها، تاکسونومی و مطالعات تنوع و فیلوژنتیک به‌کار گرفته می‌شوند (Rimayanti *et al.*, 2023). مقایسه‌ای به‌منظور بررسی چندشکلی توالی سیتوکروم b با روش RFLP انجام گرفت. نتایج الگوی باندهای منجر به تمایز گونه‌ها از جمله گاو اهلی، گوسفند، بز و سایر گونه‌ها گردیدند و به این ترتیب

چندشکل در نواحی ژنهای *CYTb*، *ATP6* و *ATP8* به ترتیب ۴، ۲ و ۲ ناحیه چندشکلی بودند (Chung, ۲۰۱۳). در مطالعه حاضر، در نواحی ژنهای *ATP6*، *ATP8* و *CTYB* به ترتیب مشتمل بر ۸، ۶ و ۱۹ ناحیه چندشکلی بود که با توجه به فاصله ژنتیکی بین گاوهای زیرگونه هندی (کلیستانی) و اروپایی (هلشتاین) در محدوده گزارش شده سایر نژادها بودند و مسیر تکاملی مجزای دو نژاد را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری کلی

یکی از اهداف مطالعه حاضر، پیدا کردن دلایل اختلاف معنی‌دار ژنهای میتوکندری در گاوهای کلیستانی و هلشتاین بود که محیط جغرافیایی زیست کاملاً متمایز دارند. با توجه به تنوع ژنتیکی و نواحی چندشکل مشاهده شده در بین نژادهای مختلف، احتمالاً یکی از دلایل اصلی این بیان متفاوت، مربوط به تغییرات ژنتیکی اتفاق افتاده در ژنوم میتوکندری نژادها است و بخش دیگر، تأثیر محیط زندگی در جهت سازگاری با محیط و حفظ تولیدات است. بنابراین، با شناسایی واریانتهای مفید در دو نژاد و استفاده از توان ترکیبی آنها در طراحی برنامه‌های آمیخته‌گری، می‌توان دام‌هایی با توان تولید مطلوب و از طرف دیگر مقاوم به شرایط نامساعد محیطی ایجاد کرد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از همکاران در مرکز بیوانفورماتیک دانشگاه و مرکز زیست‌فناوری دانشگاه زابل در فراهم کردن شرایط انجام آزمایش قدردانی می‌گردد. هزینه انجام پژوهش از محل گرنت به شماره IR-UOZ-4398 تأمین گردیده است.

مجزای گاوهای خالص و آمیخته در فیلوژنی گردید (Rimayanti et al., 2023).

در میان کمپلکس‌های آنزیمی زنجیره انتقال الکترون، آنزیم ATPsynthase که بخشی از کمپلکس پنج است، سنتز ATP را از ADP هدایت می‌کند. از ۱۵ زیرواحد مختلف پروتئین ATPase، زیرواحدهای ۶ و ۸ به ترتیب توسط ژنهای *ATP6* و *ATP8* ژنوم میتوکندری کد می‌شوند (Detmer and Chan, 2007). بنا بر این، تغییرات در ژنوم میتوکندری در نواحی ژنهای مذکور می‌توانند تأثیرات متعددی بر متابولیسم انرژی و عملکردهای بیولوژیکی داشته باشند. شواهدی از ارتباط بین چندشکلی‌ها در نواحی ATPase با میزان تولید شیر و کیفیت آن، تولیدمثل و صفات رشد گزارش شده‌اند (Pradhan et al., 2018؛ Zhang et al., 2008). ناکافی بودن فعالیت میتوکندری سبب کاهش سطح ATP و توقف رشد یا مرگ جنین می‌گردد (Van Blerkom, 2011). در مطالعه‌ای که به منظور بررسی چندشکلی‌های ژنهای *ATP6* و *ATP8* و ارتباط آنها با میزان بلوغ برون‌تنی تخمک‌ها و کشت برون‌تنی جنین در گوسفندان سنجانی انجام گرفت، پنج الگوی باندی با روش SSCP گزارش گردید که ارتباط معنی‌داری با صفات مذکور نداشتند (Mardani et al., 2021).

در مطالعه‌ای جامع که در بین گاوهای بومی کره‌ای در کل ژنوم میتوکندری انجام گرفت، تعداد ۶۹ ناحیه چندشکل (SNP) در کل ژنوم گزارش گردید که کمتر از میانگین تعداد ناحیه چندشکلی گزارش شده در سایر نژادها بودند. تعداد نواحی

References

- Andalib, S., Divani, A. A., Michel, T. M., Hoilund-Carlsen, P. F., Vafaee, M. S., & Gjedde, A. (2017). Pandora's Box: mitochondrial defects in ischaemic heart disease and stroke. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 19, e5.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J. and Schreier, P. H. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290 (5806), 457-465.
- Banabazi, M. H., Ghaderi-Zefrehei, M., Imumorin, I. and Peters, S. (2013). Whole Transcriptome Value Index (WTVI): A methodology for integrating functional sequences from RNA-Seq data into animal selection. *21st International Conference on Plant and Animal Genome*, 12-16, San Diego, United States.
- Chung, H. (2013). Phylogenetic analysis and characterization of mitochondrial DNA for Korean native cattle. *Genetics*, 3, 12-23.
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 870-879.
- Faure, E., and Casanova, J. P. (2006). Comparison of chaetognath mitochondrial genomes and phylogenetical implications. *Mitochondrion*, 6(5), 258-262.
- Fontanesi, F. (2001). Mitochondria: structure and role in respiration. *eLS*, 1-13.
- Groeneveld, L. F., Lenstra, J. A., Eding, H., Toro, M. A., Scherf, B., Pilling, D., & Weigend, S. (2010). Genetic diversity in farm animals—a review. *Animal Genetics*, 41, 6-31.
- Groeneveld, L. F., Lenstra, J. A., Eding, H., Toro, M. A., Scherf, B., Pilling, D., Negrini, Finlay, E. K., Jianlin, H., Groeneveld, E., Weigend, S., & Consortium, G. (2010). Genetic diversity in farm animals—a review. *Animal Genetics*, 41, 6-31.
- Hartatika, T., Putraab, W. B. P., Volkandaria, S. D., & Sumadi, N. (2014). Polymorphism mtDNA cytochrome b gene of local cattle in Indonesia. *5th International Conference on Sustainable Future for Human Security*, Sustai.
- Helt, G., Nicol, J. W., Erwin, E., & Blossom, E. (2009). Genoviz software development kit: Java tool kit for building genomics visualization applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 266. DOI: 10.1186/1471-2105-10-266.
- Herrero-Medrano, J. M., Megens, H. J., Groenen, M. A., Ramis, G., Bosse, M., Pérez-Enciso, M., & Crooijmans, R. P. (2013). Conservation genomic analysis of domestic and wild pig populations from the Iberian Peninsula. *BMC Genetics*, 14(1), 106.
- Hoffmann, I. (2010). Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, 41, 32-46.
- Huang, W., Nadeem, A., Zhang, B., Babar, M., Soller, M., & Khatib, H. (2012). Characterization and comparison of the leukocyte transcriptomes of three cattle breeds. *PLoS One*, 7(1), e30244.

- Jin, Y. T., Brown, R. P., & Liu, N. F. (2008). Cladogenesis and phylogeography of the lizard *Phrynocephalus vlangalii* (Agamidae) on the Tibetan plateau. *Molecular Ecology*, 17(8), 1971-1982.
- Lee, J., Lee, K. T., Ahn, S., Lee, S., Lim, D., Kim, Y. J., Cho, E. S., Kim, K. S., Dadi, H., & Kim, T. H. (2012). Genetic characterization of Northeast Asian cattle based on sequence polymorphisms in the complete mitochondrial genome. *Journal of Animal Sciences*, 2, 217-223.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Mardani, P., Teymouri, F., Foroutanifar, S., Abdolmohammadi, A., & Hajarian, H. (2021). Effects of polymorphism of ATPase6 and ATPase8 genes on in vitro oocyte maturation and embryo culture of Sanjabi sheep. *Agricultural Biotechnology Journal*, 13(3), 155-169.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. and Kinoshita J. K. (1997). Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, 386(6622), 299.
- Pfeiffer, I., Burger, J., & Brenig, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. *BMC Genetics*, 5, 30.
- Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, 85, 257-273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>
- Rahmatullaili, S., Fatmawati, D., Nisa, C., Winaya, A., Chamisijatin, L., & Hindun, L. (2019). Genetic diversity of Bali cattle: Cytochrome b sequence variation. *Earth and Environmental Science*, 276, 012048. doi:10.1088/1755-1315/276/1/012048.
- Ratnam, M. T. S., Gopinathan, A., Jawahar, K. T. P., Azhahianambi, P., Vani, S., Madhuri, B. J., & Karthickeyan, S. M. K. (2022). Single nucleotide polymorphism in cytochrome B oxidase gene among indigenous cattle breeds of Tamil Nadu. *Indian Journal of Animal Sciences*, 92(9), 1129-1132. <https://doi.org/10.56093/ijans.v92i9.124457>
- Rimayanti, R., Utomo, B., Pradana, D. K., Triana, I. N., Akintunde, A. O., & Mustofa, I. (2023). Polymorphism in the mitochondrial Cytochrome b of crossbred Madura-Limousine cattle. *Archives of Veterinary Science*, 13, 1-9.
- Rubinstein, J. L., Walker, J. E., & Henderson, R. (2003). Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *The EMBO Journal*, 22(23), 6182-6192.
- Ruiz-Pesini, E., Lott, M. T., Procaccio, V., Poole, J. C., Brandon, M. C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., & Wallace, D. C. (2007). An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research*, 35, 823-828.
- Salimpour, M. (2016). Differential Gene Expression Analysis Between the Holstein and Cholistani (a Pakistani Bbreed) Population Using RNA Sequencing (RNA-Seq). M. Sc. Thesis, University of Tehran, IRAN. [In Persian]
- Salimpour, M., Miraei-Ashtiani, S. R., & Banabazi, M. H. (2019). Differential gene expression of two bovine *Bos Taurus* (Holstein) and *Bos Indicus* (Cholistani) sub-species using RNA-Seq data. *Iranian Journal of Animal Science*, 50(1), 47-55. [In Persian]
- Schlötterer, C. and Pemberton, J. (1998). The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations — a critical review. *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*, 71-86.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tuppen, H. A., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1797, 113-128.
- Van Blerkom, J. (2011). Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, 11, 797-813.
- Varkoohi, S., Banabazi, M. H. and Ghasemi-Siab, M. (2021). Allele specific expression (ASE) analysis between *Bos Taurus* and *Bos Indicus* cows using RNA-Seq data at SNP level and gene level. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93, e20191453.
- Wang, Y., Ghaffari, N., Johnson, C. D., Braga-Neto, U. M., Wang, H., Chen, R., & Zhou, H. (2011). Evaluation of the coverage and depth of transcriptome by RNA-Seq in chickens. *BMC Bioinformatics*, 12(10), S5.
- Zhang, B., Chen, H., & Hua, L. (2008). Novel SNPs of the mtDNA ND5 gene and their associations with several growth traits in the Nanyang cattle breed. *Biochemical Genetic*, 46, 362-368.