



مقایسه روند تکاملی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در بز و سایر گونه‌های دامی

مریم شریعت^۱، غلامرضا داشاب^۲ و مهدی وفای‌واله^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار اصلاح نژاد 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)

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۳۰

صفحه: ۱۲۳ تا ۱۴۳

چکیده

حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بومی بز در نقاط مختلف ایران برای انجام برنامه‌های اصلاح نژادی، افزایش تولید، بقاء، مقاومت به بیماری‌ها و تغییرات شرایط محیطی مختلف ضروری است. هدف از مطالعه حاضر تعیین توالی ناحیه HVR1 از ژنوم میتوکندری از بزهای بومی ایران شامل اکوتیپ‌های سیستانی، پاکستانی، لری سیاه و عدنی (هر کدام ۴ رأس)، بررسی میزان تنوع محتمل در این جمعیت‌ها و ترسیم رابطه فیلوژنی آن‌ها در مقایسه با برخی گونه‌های حیوانی بود. استخراج DNA کل به روش فنل-کلروفرم انجام شد و به عنوان الگو جهت تکثیر ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری مورد استفاده قرار گرفت و باندهای بدست آمده به روش سانگر تعیین توالی شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی مذکور به همراه ۳۰ توالی از ناحیه مشابه ژنوم میتوکندری مربوط به برخی گونه‌های حیوانی بدست آمده از بانک جهانی ژن (NCBI) جهت تجزیه ژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. میانگین تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی در بین گونه‌ها به ترتیب ۰/۹۹۴ و ۰/۱۲۸۹۱ و در اکوتیپ‌های مورد بررسی ۱ و ۰/۲۹۲۹ محاسبه شد. میزان عددی نسبت جایگزینی dn/ds برای اکوتیپ‌های مورد بررسی و سایر گونه‌ها به ترتیب ۱/۱۷ و ۱/۱۲ محاسبه شد که نشان دهنده انتخاب مثبت در فرایند تکامل این ژن است. نتایج حاصل از درخت فیلوژنی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 شامل دو شاخه اصلی و تعداد ۷ زیر شاخه فرعی بودند. در بین گونه‌های مورد بررسی اکوتیپ‌های بز با گونه گوسفند شباهت بیشتری داشتند. تجزیه ژنتیکی و فیلوژنی گونه‌های مورد بررسی بیانگر تمایز و مسیر تکاملی متفاوت هر گونه است و ناحیه HVR1 می‌تواند موجب گروه‌بندی صحیح گونه‌ها و زیر گونه‌های انشقاق یافته از آنها شود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ناحیه دی لوپ، روابط فیلوژنتیکی، هاپلوتیپ، بز سیستانی، بز عدنی

مقدمه

در کشور ایران تنوع شرایط اقلیمی و به تبع آن انتخاب طبیعی، در طی سالیان متمادی سبب تمایز بیش از یکصد توده بومی دام و طیور شده است که از نظر ژنتیکی متنوع و از ذخایر ژنتیکی ایران محسوب می‌شوند (۱، ۸). بز (*Capra hircus*) گونه‌ای از دام‌های اهلی با قابلیت سازگاری با اقلیم‌های متنوع در جهان است. این حیوان به دلیل تولید محصولات متنوع یکی از مفیدترین دام‌های اهلی شده به شمار می‌آید (۲۱). نخستین نشانه‌های اهلی‌سازی بز در ایران مربوط به حدود ده هزار سال پیش از میلاد است (۲۳). شواهد باستان‌شناسی نشان می‌دهد بز در سرزمینی که امروزه قسمتی از آن به نام لرستان و خوزستان خوانده می‌شوند اهلی و پرورش یافته است (۹). بز به دلیل اندازه متوسط بدن و توانایی سازگاری با محیط‌های گوناگون برای نقل و انتقال‌های بین قاره‌ها بسیار مناسب بوده است و جریان ژنی بالا در جمعیت‌های مختلف بز در روش‌هایی مثل چوپانی فصلی، مهاجرت‌های سالانه در فواصل دور و همین‌طور تسهیل و گسترش بازرگانی منجر به الگوی درهم در مخزن ژنی بزهای مناطق مختلف شده است (۱۰).

در ایران ۱۲ نژاد بز گزارش شده است، پایه و اساس طبقه‌بندی این نژادها بیشتر صفات ظاهری، پراکندگی جغرافیایی، شرایط اکولوژیکی و نیز شواهد تاریخی بوده و این در حالی است که اطلاعات کمی درباره منشأ، مهاجرت، تکامل و وضعیت ژنتیکی نژادهای بز ایران در دسترس است (۲۱).

تعیین توالی DNA میتوکندریایی به منظور مشخص کردن منشأ بسیاری از گونه‌های دام‌های اهلی مورد استفاده قرار گرفته است (۵). ژنوم میتوکندری (mtDNA) نقش مهمی را به عنوان یک نشانگر ژنتیکی در مطالعات جمعیتی و بیولوژی تکاملی ایفا می‌نماید. محبوبیت این مولکول بخشی به خاطر سادگی نسبی آن است که توالی‌های همولوگ به راحتی می‌توانند جدا شده و مقایسه شوند. از طرفی، توارث مادری و فقدان نوترکیبی این نشانگر را برای ردیابی و مطالعه شجره مادری بسیار مطلوب و ایده‌آل نموده است (۴). در بیشتر گونه‌های حیوانی میتوکندری اسپرماتوزوئید جدا شده و سلول تخم تنها میتوکندری مادری را به ارث خواهد برد. بدین ترتیب برخلاف DNA، هسته ژنوم میتوکندریایی در طی نسل‌های مختلف حفاظت شده و به دلیل نرخ پایین تغییرات ابزار مناسبی برای مطالعه تکامل ارگانیسم خواهد بود.

ژنوم میتوکندری دارای بخش‌های متفاوتی می‌باشد. ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری حاوی دو منطقه به نام‌های HVR1 و HVR2 است که به دو دلیل زیر میانگین جهش در آنها بیشتر از سایر قسمت‌های ژنوم میتوکندری است؛ اول اینکه این دو ناحیه کدکننده هیچ پروتئینی نیستند، دوم اینکه در ناحیه D-LOOP که پیش‌بر رونویسی است نقش مهمی ندارند و از این رو جهش‌های صورت گرفته در آن ایفاء می‌شوند (۱۵، ۱۷). بسیاری از این مطالعات در ناحیه HVR1 میتوکندری صورت می‌گیرد، چرا که این ناحیه میزان بالاتری از تنوع را نسبت به دیگر قسمت‌های ژنوم میتوکندری نشان می‌دهد (۷).

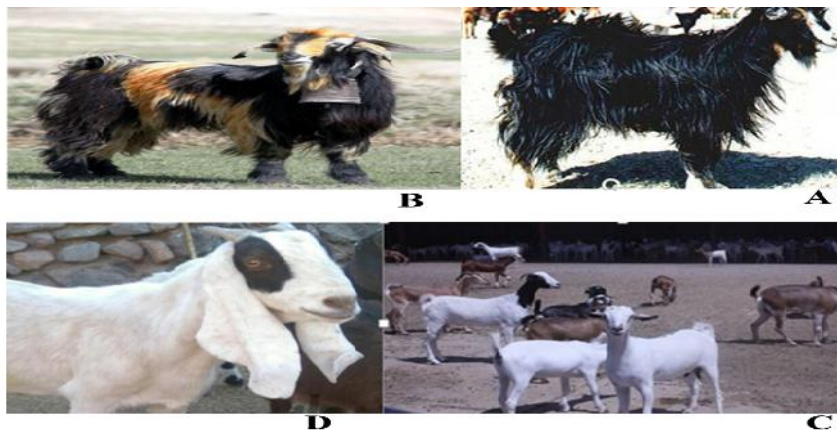
مطالعه تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی منطقه HVR1 ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری در بزهای البانی نشان داد که ۹۸/۷ درصد از تنوع ژنتیکی در این ناحیه در درون جمعیت‌ها و تنها ۱/۳ درصد از تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها است و تجزیه هاپلوگروهی اکوتیپ‌های کشور البانی را در گروه A دسته‌بندی نمود (۶). نتایج حاصل از تجزیه واریانس ملکولی ناحیه ژنوم میتوکندری تعدادی از اکوتیپ‌های بومی ایران شامل بزهای بومی آباد، خلخال و قزوین نشان داد که بیشترین تغییرات ژنتیکی مربوط به درون جمعیت‌ها بوده و تنها ۳/۰۸ درصد تغییرات را در بین جمعیت‌ها گزارش نمودند (۱۴). کریمی و همکاران (۸) در مطالعه ساختار ژنتیکی بزهای خلخال بر اساس توالی ژنوم میتوکندری، ۷۷ درصد تنوع را در درون جمعیت‌ها و ۲۳ درصد تنوع را در بین جمعیت‌ها گزارش نمودند. مطالعه و شناسایی توالی ژنوم میتوکندری می‌تواند در تهیه شناسنامه ژنتیکی و حفظ خلوص نژادهای بومی مورد استفاده قرار گیرد. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی ساختار ژنتیکی و فیلوژنتیکی توده‌های جمعیتی بزهای بومی ایران و برخی از گونه‌های مهم حیوانی می‌باشد.

مواد روش‌ها

در این پژوهش از تعداد ۱۶ رأس بز از اکوتیپ‌های پاکستانی، سیستانی، عدنی و لری سیاه (هر کدام ۴ رأس) به طور تصادفی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). خونگیری از ورید گردنی به مقدار ۳ میلی لیتر در لوله‌های تحت خلاء و حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA ۰/۵ درصد) انجام گرفت و نمونه‌های خون بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA کل از خون کامل به روش فنل-کلروفرم انجام گرفت.

سیتوکروم b دو قطبی با پنج بخش بار منفی گیرنده پروتون و چهار بخش بار مثبت‌دهنده پروتون و هشت بخش درون غشایی است. بیشتر اسیدآمینه‌های متغیر در سمت منفی و بعد از آن در منطقه درون غشایی است و سمت مثبت کمترین تغییر را دارد. به نظر می‌رسد ثبات سمت مثبت به خاطر محدودیت‌های وظیفه‌ای آن است. زیرا انتهای مثبت مولکول در طی اکسیداسیون یوبیکینون با زیربخش گوگردی- آهنی مرتبط است. سیتوکروم b چون یک ژن کدکننده است و اطلاعات فیلوژنی مفیدی را در خیلی از سطوح تاکسونومی ارائه می‌کند، محدودیت‌های وظیفه‌ای، جهش‌های تصادفی در نوکلئوتیدهای سیتوکروم b را متعادل می‌کند و سرعت‌های مختلف جایجایی‌های مترادف یا غیرمترادف در بخش کدون، دلیل به‌کارگیری این ژن به عنوان یک نشانگر نشان‌دهنده مراحل تکامل است. ژن سیتوکروم b دارای کدون‌هایی با سرعت تکاملی بالا و کدون‌های با سرعت تکاملی پایین می‌باشد و نیز دارای بخش‌هایی خیلی متغیر و هم خیلی حفاظت شده است. بنابراین، این ژن برای پاسخ به انواع سؤالات سیستماتیک از فیلوژنی در سطح بالا تا جمعیت‌ها و سطوح تازه جدا شده بکار برده می‌شود (۱۲، ۱۳).

از بین نواحی مختلف ژنوم میتوکندری سیتوکروم b، ۱۶sRNA و ۱۲sRNA به عنوان نشانگرهای تشخیص گونه مطرح هستند (۳). Fajardo و همکاران (۲) بر اساس اطلاعات توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b توانستند گونه‌های گاو، گوسفند، بز و آهو را به خوبی تمایز دهند. ژنوم میتوکندری (mtDNA) نشانگر بسیار مناسبی برای تشخیص بین گونه‌های گروه‌هایی است که ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سال از هم جدا بوده‌اند (۱۵). بسیاری از تحقیقات انجام شده در زمینه خاستگاه احشام (به ویژه بز) بر روی ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری تمرکز داشته‌اند (۲۳).



شکل ۱- چهار اکوتیپ استفاده شده در مطالعه A: بز سیستانی، B: بز سیاه لری، C: بز عدنی و D: بز پاکستانی
Figure 1. Four ecotypes used in this study A: Sistani goat, B: Black Lori goat, C: Adani goat and D: Pakistani goat

نرم افزار Primer-3 (۲۲) یک جفت پرایمر مناسب جهت تکثیر قطعه ۹۷۶ ناحیه HVR1 طراحی گردید و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen Co.) سنتز شدند (جدول ۱).

برای تکثیر قطعه‌ای از ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری به طول ۹۷۶ جفت باز از یک جفت پرایمر اختصاصی استفاده شد. بدین منظور توالی ناحیه مذکور در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی NC005044 شناسایی گردید و با

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه ۹۷۶ جفت باز از منطقه HVR1 ژنوم میتوکندری
Table 1. The sequence of specific primers for proliferation of 978bp segment of HVR1 region of mitochondrial genome

آغازگر	توالی	اندازه قطعه (bp)	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)
پیشرو	5'-ACTCCACAAGCCTACAGA-3	۹۷۶	۶۰/۳
دنباله رو	5'-GGAAAGGTGGAGCGGATG-3		

تست تاجیما، به منظور شناسایی هرگونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف برآورد و مورد استفاده قرار گرفت (۸). نسبت dn/ds با نرم‌افزار آنالیز (www.hiv.lanl.gov/content/index) محاسبه شد. آزمون dn/ds اغلب برای نمونه‌های از یک جمعیت مشخص استفاده می‌شود و یک روش سودمند و بسیار کارآمد برای تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد. با استفاده از ارزیابی شاخص dn/ds می‌توان به فشار انتخاب در نمونه‌های یک جمعیت مشخص پی برد (۱۶).

شاخص‌های تنوع ملکولی از قبیل جهش‌ها، تعداد هاپلوتیپ‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، مکان‌های چندشکلی، چندشکلی حذف و اضافه، شاخص‌های نواحی حفاظت شده، تعداد جایگاه‌هایی که در آن جایگزینی مشابه اتفاق افتاده و بررسی تنوع با استفاده از نرم‌افزار DnaspV5.1 (۱۹) انجام گرفت.

تعداد ۳۰ توالی ژنوم میتوکندری مربوط به ناحیه HVR1 مربوط به سایر گونه‌های دامی از بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) استخراج گردید که شماره دسترسی آنها مطابق با جدول ۲ است. در نهایت ترسیم درخت فیلوژنتیکی به روش اتصال-همسایگی (NJ) با روش آماری Bootstrap و ۱۰۰۰۰ تکرار از نرم‌افزار MEGA6 (۲۰) استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم نهایی ۴۵ میکرولیتر شامل ۶ میکرولیتر DNA نمونه، ۱۳/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۵ میکرولیتر مخلوط پرایمرهای رفت و برگشت و ۲۴ میکرولیتر بافر واکنش تکثیر (Master mix) در طی ۳۵ چرخه و در دستگاه ترموسیکلر (Eppendorf) انجام شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر در سه مرحله شامل: مرحله اول در طی یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه دو رشته DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه، مرحله دوم در طی ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰/۳ به مدت ۵۰ ثانیه و بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه انجام شد. در نهایت مرحله سوم در طی یک چرخه شامل بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. در نهایت محصولات واکنش تکثیر بر روی ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند. قطعه ۹۷۶ جفت بازی تکثیر شده بر اساس آغازگرهای رفت و برگشت به روش سانگر و شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی شدند.

بازنگری و بررسی کیفیت توالی‌های مورد بررسی و تشخیص هم‌پوشانی‌ها (هتروپلاسمی و هموپلاسمی) و نمایش خودکار نقاط دارای ابهام برای ویرایش و حذف داده‌های با کیفیت پایین با استفاده از نرم‌افزار Chromas version 2.4.1 انجام شد (۱۱). سپس از ابزار BLAST در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی‌ها استفاده شد.

جدول ۲- توالی ناحیه HVR1 و نام گونه‌های حیوانی در بانک ژن (NCBI) جهت استفاده در تجزیه تنوع ژنتیکی و فیلوژنی
Table 2. The sequence of HVR1 region and name of animal species in gene bank (NCBI) for using in analysis of genetic variation and phylogenetic

اسم گونه	نام علمی	شماره دسترسی
گوسفند	Ovis aëris	KP000591, JX545682, KF677192, JX545536, JX545502
شتر	Camelus	KF835429, KF835432, KF835435, KF835444, KF835443
گاو کوهان دار	Bos indicus	KR008972, KR008909, KR008723, KR008253, KR009050
گاو میش	Bubalus bubalis	AB177774, AB065127, AB177776, AB177769, EU281351
گاو اروپایی	Bos taurus	AY246200, AY246259, AY246252, AY246174, AY246209
اسب	Equus caballus	AF172947, AF172948, AF172949, AF172950, AF172951

نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه‌ها با روش فنل-کلروفرم با موفقیت انجام گرفت. تعیین توالی قطعه ۹۷۶ جفت بازی ناحیه HVR1 برای ۱۶ نمونه انجام شد. میانگین درصد فراوانی نوکلئوتیدهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در اکوتیپ‌های مختلف بز بومی ایران شامل سیستانی، عدنی، پاکستانی و لری سیاه به ترتیب برابر با ۲۹/۶، ۲۹، ۲۵/۳ و ۱۶/۱ درصد بودند. در برآورد میانگین درصد فراوانی نوکلئوتیدی در توالی ژنوم میتوکندری سایر گونه‌ها، باز آدنین

بیشترین فراوانی و باز گوانین کمترین فراوانی را داشت (جدول ۳). البته اختلافات معنی‌داری در فراوانی نوکلئوتیدهای مختلف ژنوم میتوکندری در درون و بین جمعیت‌ها مشاهده نگردید. در بین گونه‌ها گوسفند با فراوانی ۳۴/۵ و شتر با فراوانی ۲۷/۲ به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی نوکلئوتید A را به خود اختصاص دادند. در بررسی فراوانی سایر نوکلئوتیدها گاو میش و گاو کوهاندار، خرگوش و شتر به ترتیب دارای بیشترین فراوانی تیمین، سیتوزین و گوانین بودند.

جدول ۳- فراوانی نوکلئوتیدهای مختلف منطقه HVR1 ژنوم میتوکندری در بین گونه‌های مختلف حیوانی
Table 3. Frequency of different nucleotides HVR1 region of mitochondrial genome in different species of animal

گونه	تعداد نمونه	A	T	C	G
بز	۱۶	۲۹/۶	۲۹	۲۵/۳	۱۶/۱
اسب	۵	۳۰/۷	۲۶/۵	۲۹/۴	۱۳/۴
گوسفند	۵	۳۴/۵	۲۸/۶	۲۲/۲	۱۴/۷
شتر	۵	۲۷/۲	۲۶/۱	۲۸/۰	۱۸/۷
گاو میش	۵	۳۰/۹	۲۷/۹	۲۵/۹	۱۵/۳
گاو کوهاندار	۵	۳۲/۸	۲۸/۹	۲۴/۵	۱۳/۸
گاو اروپایی	۵	۳۲/۵	۲۸/۶	۲۵/۲	۱۳/۶

با تجزیه و تحلیل توالی‌های ژن HVR1، وجود ۱۶ هابلوتایپ در چهار اکوتیپ بز مورد مطالعه شناسایی شد که محتوای توالی مورد توافق برای تبدیل بازهای آدنین به گوانین و گوانین به آدنین ۱۱/۱۴ و ۲۰/۴ درصد بودند. مجموع سیتوزین و گوانین ۴۱/۴ درصد بود و مجموع آدنین و تیمین ۵۸/۶ درصد را شامل گردید. سیتوزین و گوانین داری

سه پیوند هیدروژنی می‌باشند. بالا بودن آدنین و تیمین باعث متمایز بودن نرخ ژنتیکی این ژن شده و همچنین پایین بودن مجموع سیتوزین و گوانین باعث شده نرخ جهش در این ژن بالا و تنوع ژنتیکی بالایی داشته باشد. نتایج حاصل حاکی از این است که جانشینی انتقالی در چهار اکوتیپ مورد بررسی و در مقایسه با سایر گونه‌ها بیشتر بوده است (جدول ۴).

جدول ۴- فراوانی جهش‌های انتقالی و تقاطعی منطقه HVR1 ژنوم میتوکندری اکوتیپ بزهای بومی ایران و سایر گونه‌های حیوانی
Table 4. Frequency of transitional and transversionsal mutations of HVR1 region of mitochondrial genome in different ecotype of Iranian native goats and others animal species

	A (%)	T (%)	C (%)	G (%)
اکوتیپ های بز بومی ایران				
A	—	۴/۹۹	۴/۳۳	۱۱/۱۴
T	۵/۱۲	—	۱۵/۷۲	۲/۷۸
C	۵/۱۲	۱۸/۱۶	—	۲/۷۸
G	۲۰/۵۴	۴/۹۹	۴/۳۳	—
گوسفند				
A	—	۰/۰۴	۰/۰۳	۲۰/۵۵
T	۰/۰۵	—	۱۳/۵۷	۰/۰۲
C	۰/۰۵	۱۷/۵۸	—	۰/۰۲
G	۴۸/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۳	—
اسب				
A	—	۰/۲۳	۰/۲۵	۱۶/۲۴
T	۰/۲۷	—	۲۳/۵۲	۰/۱۲
C	۰/۲۷	۲۱/۴۰	—	۰/۱۲
G	۳۷/۱۱	۰/۲۳	۰/۲۵	—
شتر				
A	—	۳/۹۵	۴/۰۶	۱۲/۰۹
T	۳/۹۴	—	۲۰/۹	۲/۷۶
C	۳/۹۴	۲۰/۳۴	—	۲/۷۶
G	۱۷/۲۶	۳/۹۵	۴/۰۶	—
گاو میش				
A	—	۰/۰۳	۰/۰۳	۱۴/۸۱
T	۰/۰۳	—	۲۶/۱۹	۰/۰۲
C	۰/۰۳	۲۸/۲۴	—	۰/۰۲
G	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۳	—
گاوهای کوهان‌دار				
A	—	۰/۰۳	۰/۰۳	۱۲/۷۳
T	۰/۰۳	—	۲۶/۱۹	۰/۰۱
C	۰/۰۳	۳۰/۶۴	—	۰/۰۱
G	۳۰/۳۹	۰/۰۳	۰/۰۳	—
گاوهای اروپایی				
A	—	۰/۹۳	۰/۸۱	۱۵/۷۵
T	۱/۰۶	—	۱۸/۸	۰/۴۴
C	۱/۰۶	۲۱/۴۷	—	۰/۴۴
G	۳۷/۴۹	۰/۹۳	۰/۸۱	—

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصد جهش‌های انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به صورت ضخیم و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به صورت ایتالیک نشان داده شده‌اند. الگوی جایگزینی تحت مدل تامورا-ئی و با استفاده از روش آماری ML برآورد شده است (۲۰).

میزان تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتیپی بر حسب جفت باز در جمعیت بزهای بومی ایران به ترتیب ۰/۰۲۹۲۹ و ۱ تخمین زده شد. نتایج به دست آمده حاکی از سطح تنوع بسیار بالا و عدم وجود مناطق حفاظت شده در ناحیه HVR1 در چهار اکوتیپ مورد بررسی است (جدول ۵). میانگین اختلاف نوکلئوتیدها بین اکوتیپ‌ها ۲۶/۸۵۸ جفت باز محاسبه شد. همچنین، در بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران با توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه مذکور در سایر گونه‌ها بدست

آمده از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)، ۲۰۰ جهش نقطه‌ای شناسایی شد که توزیع آن‌ها در طول ژنوم میتوکندری متفاوت بودند. در پژوهشی که به منظور بررسی ساختار ژنتیکی ۱۰۰ نمونه بز خلخال صورت گرفت، تعداد جهش کل ۶۲، تعداد هاپلوتا‌یپ ۳۷، تنوع هاپلوتیپی ۰/۸۳۴ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۸ گزارش شدند (۸). در بین گونه‌های مورد بررسی اسب و شتر دارای بیشترین جایگاه چندشکلی و جهش کل بودند (جدول ۵). گاو میش دارای کمترین تنوع ژنتیکی، تعداد هاپلوتا‌یپ، تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپی بود.

جدول ۵- شاخص‌های تنوع ژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در بین و درون جمعیتی چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران و برخی گونه‌های حیوانی

جمعیت	S	H	Hd	Pi	Eta	k
سیستانی	۱۰۴	۴	۱	۰/۰۶۴۰۰	۱۲۷	۶۱/۵
عدنی	۵۰	۴	۱	۰/۰۳۰۲۹	۵۴	۲۸/۵۰
لری سیاه	۵۶	۴	۱	۰/۰۳۲۱۹	۵۹	۳۰/۰۰
پاکستانی	۴۶	۴	۱	۰/۰۲۹۸۸	۵۸	۲۸/۸۳۳
میانگین چهار اکوتیپ بز بومی ایران	۱۲۳	۱۶	۱	۰/۰۲۹۲۹	۱۳۸	۲۶/۸۵۸
گوسفند	۴۲	۵	۱	۰/۰۲۴۷۲	۴۲	۱۷/۸۰۰
اسب	۴۶	۵	۱	۰/۰۲۱۵۶	۴۶	۲۲/۱۰۰
شتر	۴۶	۵	۱	۰/۰۳۷۳۹	۵۱	۱۷/۰۰۰
گاو میش	۵	۴	۰/۹۰۰	۰/۰۰۲۸۰	۵	۲/۶۰۰
گاو اروپایی	۳۹	۵	۱	۰/۰۱۸۴۳	۳۹	۱۶/۴۰۰
گاو کوهان دار	۱۱	۵	۱	۰/۰۰۶۱۵	۱۱	۵/۶۰۰
میانگین کل گونه‌های حیوانی	۱۵۴	۴۱	۰/۹۹۴	۰/۱۲۸۹۱	۲۰۰	۵۰/۹۰۴

S: تعداد جایگاه چندشکلی، H: تعداد هاپلوتیپ‌ها، Hd: فراوانی هاپلوتیپی، Pi: تنوع نوکلئوتیدی، Eta: تعداد کل جهش‌ها، K: تفاوت نوکلئوتیدها بین جمعیت یا گونه‌ها (واگرایی نوکلئوتیدی).

شاخص‌های تجزیه نواحی حفاظت شده ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران (عدنی، لری سیاه، پاکستانی، سیستانی) در جدول ۶ آورده شده است. کمترین حد آستانه حفاظت، طول حفاظت و حفاظت توالی مربوط به اکوتیپ سیستانی (به ترتیب برابر با ۰/۹۸، ۴۰ و

۰/۸۸) و بیشترین آن‌ها مربوط به اکوتیپ پاکستانی (به ترتیب ۱، ۵۸ و ۰/۹۵۱) بود. در بین گونه‌های مورد بررسی شتر و گاو میش به ترتیب دارای کمترین و بیشترین میانگین حداقل طول حفاظت شده و حفاظت توالی در گونه‌ها را به خود اختصاص دادند.

جدول ۶- شاخص‌های تجزیه مناطق حفاظت شده ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران (درون و بین جمعیتی در مقایسه با سایر گونه‌ها حیوانی)

Table 6. The indexes of conserved regions of HVR1 region of mitochondrial genome of four ecotypes of Iranian native goats compared with others animal species

جمعیت	C	MWL	CT
سیستانی	۰/۸۸۸	۴۰	۰/۹۸
عدنی	۰/۹۴۷	۵۴	۱
لری سیاه	۰/۹۳۶	۴۵	۱
پاکستانی	۰/۹۵۱	۵۸	۱
میانگین اکوتیپ‌ها	۰/۸۴۶	۴۸	۱
گوسفند	۰/۹۴۲	۴۹	۱
اسب	۰/۹۵۳	۶۱	۱
شتر	۰/۸۹۸	۴۴	۱
گاو میش	۰/۹۹۵	۴۱۹	۱
گاو اروپایی	۰/۹۵۶	۶۵	۱
گاو کوهان دار	۰/۹۸۸	۲۱۶	۱
میانگین گونه‌ها	۰/۲۶۵	۷۳	۰/۳۶

C: حفاظت توالی، MWL: حداقل طول حفاظت، CT: حد آستانه حفاظت

ژنتیکی و یا اثر متعادل کننده در طول تاریخ تکاملی جمعیت است. نتایج این مطالعه نشان داد که گونه‌های بز، گوسفند، اسب، و گاو اروپایی دارای مقادیر D منفی و معنی‌دار بودند ($P < 0.05$). رانش ژنتیکی منجر به افزایش همگنی و حذف آلل‌ها به ویژه آلل‌های مغلوب می‌گردد که در نهایت منجر به کاهش تنوع و کاهش توانایی جمعیت‌ها در تطابق با محیط و تغییرات محیطی می‌شود که اغلب این اتفاق در جمعیت‌های کوچک‌تر و همگن‌تر رخ می‌دهد (۱).

تست‌های Neutrality شامل Tajima's D به منظور شناسایی هرگونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها در جمعیت‌های بز محاسبه شد (جدول ۷). جمعیت‌هایی که دچار گسترش اخیر و یا افزایش معنی‌دار در اندازه جمعیت مؤثر شده باشند و یا انتخاب جهت‌دار بر روی آنها عمل کرده باشد، مقادیر D منفی و معنی‌دار تولید می‌کنند، در حالی که مقادیر مثبت و معنی‌دار D نشان دهنده اثرات مربوط به رانش ژنتیکی، تنگنای

جدول ۷- آماره D از تجزیه (Neutrality Tajima Test) اکوتیپ‌های بز بومی ایران در مقایسه با برخی گونه‌های حیوانی
Table 7. The statistical of D from analysis of Neutrality Tajima Test for Iranian native ecotypes of goats compared with some of animal species

گونه	D Tajima Test
بز	-۱/۱۴۶۰۴۶
گوسفند	-۰/۸۸۱۰۵۰
اسب	-۰/۳۶۸۶۶۴
شتر	۰/۰۰۶۸۲۷
گاو میش	۰/۵۶۱۹۸۷
گاو کوهاندار	۰/۴۳۶۲۰۱
گاو اروپایی	-۰/۹۳۱۵۵۳

نشان می‌دهد (۱۸). این شاخص برای اکوتیپ‌های مورد بررسی و گونه‌های گوسفند، اسب، شتر، گاو میش و گاو اروپایی بیشتر از یک برآورد شد که نشان دهنده انتخاب مثبت این ژن در این گونه‌ها می‌باشد. در گونه گاو کوهان‌دار کمتر از یک برآورد شد که نشان دهنده انتخاب خالص این ژن در طی تکامل این گونه‌ها می‌باشد.

یک روش کارآمد و مفید جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول زمان، نسبت جهش‌هایی که موجب تغییر در ترکیب اسیدآمینه می‌شود به جهش‌هایی که تغییری در ترکیب اسیدآمینه ایجاد نمی‌کنند (d_N/d_S) است. این نسبت بیشتر از یک باشد انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد انتخاب خنثی در طی تکامل این ژن‌ها را

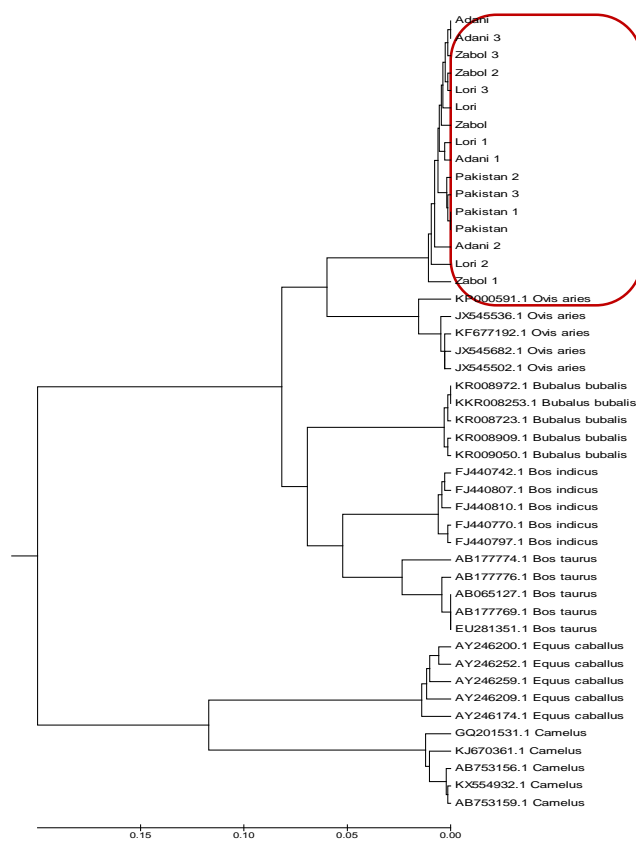
جدول ۸- شاخص انتخاب طبیعی توالی نوکلئوتیدی منطقه HVR1 ژنوم میتوکندری در بین چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران و سایر گونه‌های حیوانی

Table 8. The indexes of neutral selection of nucleotide sequences of HVR1 region of mitochondrial genome in between four Iranian native ecotype and other animal species

شاخص‌های روند انتخاب طبیعی			جمعیت
d_N/d_S	d_S	d_N	
۱/۱۷	۲/۲۱۷۴	۲/۵۹۷۳	میانگین اکوتیپ‌های بومی ایران
۱/۰۹	۱/۰۱۵۳	۱/۱۱۶۶	گوسفند
۱/۰۱	۰/۱۲۹۹	۰/۱۳۱۹	اسب
۱/۱۸	۲/۷۱۱۷	۳/۱۸۳۰	شتر
۱/۰۹	۰/۷۶۳۶	۰/۸۳۵۲	گاو میش
۱/۱۸	۰/۷۸۳۰	۰/۹۲۱۷	گاو اروپایی
۰/۴۰۷	۰/۰۱۰۳	۰/۰۰۴۲	گاو کوهان‌دار
۱/۱۲	۰/۹۰۲۱	۱/۰۳۲۱	میانگین سایر گونه‌ها

بود (شکل ۲). اکوتیپ‌های بز بومی ایران با گونه گوسفند که دارای بیشترین شباهت از لحاظ فنوتیپی هستند، با سر شاخه مشترک هم‌گروه شدند. گاو کوهان‌دار تعداد زیر شاخه‌های فرعی بیشتری نسبت به سایر گونه‌های داشت. چهار اکوتیپ بز بومی ایران در یک زیر شاخه قرار گرفتند. نتایج آنالیز فیلوژنی نشان داد که بزهای ایرانی به یکدیگر نزدیکی بیشتری دارند که این امر می‌تواند نشان‌دهنده بدلیل منشاء مشترک یا جریان ژنی بالا بین این اکوتیپ‌ها با توجه به منطقه جغرافیایی محل زندگی آن‌ها باشد. گاو کوهان‌دار، گاو اروپایی و گاو میش و اسب از یک شاخه منشا گرفته و نمونه‌های دیگر در شاخه‌های مجزا قرار گرفتند. نتایج حاصل تقریباً مشابه نتایج کریمی و همکاران (۸) بود.

در مطالعات تکاملی، طبقه‌بندی شامل تشکیل فیلوژنی نیز است، درختان فیلوژنتیک مسیرهای تکاملی را نشان می‌دهند و می‌توان از آنها برای درک روابط تکاملی استفاده نمود. به عبارت دیگر هر چه موجودات مورد بررسی مشابهت بیشتری در مولکول‌های توارثی داشته باشند، خویشاوندی نزدیکتری دارند. در بیش‌تر موجودات از داده‌های مربوط به توالی DNA برای تعیین روابط تکاملی استفاده می‌شود. از آنجایی که چنین داده‌هایی کمتر تحت تأثیر نتایج انتخاب قرار می‌گیرند، بهتر می‌توانند روابط فیلوژنتیکی واقعی را منعکس کنند. وجود تعداد بیشتر شاخه‌های درخت نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالاست (۸). نتایج حاصل از درخت فیلوژنی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 شامل دو شاخه اصلی و تعداد ۷ زیرشاخه فرعی



شکل ۲- درخت فیلوژنی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری اکوتیپهای مختلف بز ایران و برخی گونه های حیوانی
Figure 2. Phylogenetic tree of nucleotide sequences of HVR1 region of mitochondrial genome of different ecotypes of Iranian native goats and some of animal species

ناحیه HVR1 منجر به تمایز و گروه بندی های مختلف گونه ها شد و مسیرهای متفاوت تکاملی هر گونه را نشان داد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ناحیه HVR1 نشانگر خوبی برای تجربه تفرق گونه ها و زمان واگرایی گونه ها می باشد.

ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری نواحی چندشکلی بالایی با ۲۰۰ ناحیه چندشکل با حداقل مناطق حفاظت شده را نشان داد. میزان تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی بالا بود. نسبت dn/ds در اکثر گونه ها مثبت و روند تغییرات تکاملی را نشان داد. ترسیم درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی های ناحیه

منابع

1. Ahmadian, K., G. Rahimi Mianji, H. Savahzadeh and H. Deldar. 2017. Assessment of Genetic diversity and phylogenetic relationship of Iranian indigenous chickens based on mitochondrial D-Loop sequences. Research on Animal Production, 8(17): 140-148 (In Persian).
2. Fajardo, V., I. González, I. López-Calleja, I. Martín, P.E. Hernández, T. García and R. Martín, R. 2006. PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). Journal of agricultural and food chemistry, 54(4): 1144-1150.
3. Guha, S., S.P. Goyal and V.K. Kashyap. 2006. Genomic variation in the mitochondrially encoded cytochrome b (MT-CYB) and 16S rRNA (MT-RNR2) genes: characterization of eight endangered Pecoran species. Animal Genetics, 37(3): 262-265.
4. Harrison, R.G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. Trends in Ecology & Evolution, 4(1): 6-11.
5. Hiendleder, S., K. Mainz, Y. Plante and H. Lewalski. 1998. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. Journal of Heredity, 89(2): 113-120.

6. Hoda, A., Y. Biçoku and P. Dobi. 2014. Genetic diversity of Albanian goat breeds revealed by mtDNA sequence variation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(1): 77-81.
7. Joshi, M.B., P.K. Rout, A.K. Mandal, C. Tyler-Smith, L. Singh and K. Thangaraj. 2004. Phylogeography and origin of Indian domestic goats. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3): 454-462.
8. Karimi, V., N. Hedayat Evrigh, R. Seyed Sharifi and S. Nikbin. 2017. Invetigation of genetic structure of Khalkhali goat using mitochondrial genome. *Novin Genetic Journal*, 12(2): 217-227. (In Persian)
9. Khaldari, M. 2011. Principles of breeding sheep and goats. Jihad University Press, Second edition. (In Persian)
10. Liu, Y.P., S.X. Cao, S.Y. Chen, Y.G. Yao and T.Z. Liu. 2009. Genetic diversity of Chinese domestic goat based on the mitochondrial DNA sequence variation. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126(1): 80-89.
11. Lopez, A. and M.G. Bonasora. 2017. Phylogeography, genetic diversity and population structure in a Patagonian endemic plant. *AoB Plants*, 16(4): 275-285.
12. Mohammadi, P., J. Nazemi Rafie and J. Rostamzadeh. 2018. Evaluation of phylogenetic characteristics of Iranian honeybee (*Apis mellifera meda*) populations based on mitochondrial ND gene. *Research on Animal Production*, 9(21): 93-104 (In Persian).
13. Morovati, S. and M. Modaresi. 2005. Study of the HV1 region of mtDNA for use in identity recognition through maternal generations. *Journal of Military Medicine*, 20: 113-119 (In Persian).
14. Muezzini, F., S. Afraz, F. Vahid and A. Toligiyani. 2015. Study of mitochondrial DNA diversity in native goat populations of Khalkhal and Qazvini. The 9th National Conference of the Islamic Republic of Iran, pp: 66-89 (In Persian).
15. Naderi, S., H.R. Rezaei, P. Taberlet, S. Zundel, S.A. Rafat, H.R. Naghash, M.A.A. Elbarody, O. Ertugrul, F. Pompanon. 2007. Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. *Plos One*, 2(10): 1-12.
16. Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press.
17. Pakpahan S., W. Tunas Artama, R. Widayanti and G. Suparta. 2015. Genetic variations and the origin of native Indonesian goat breeds based on mtDNA D-Loop sequences. *Asia Journal of Animal Science*, 9: 341-350.
18. Phuphuakrat, A and P. Auewarakul. 2003. Heterogeneity of HIV-1 Rev response element. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 19: 569-574.
19. Rozas J., J.C. Sached-Delbarrio, X. Messeguer and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.
20. Tamura, K., M. Nei and S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30): 11030-11035.
21. Tavakolian, J. 1999. An attitude to the genetic resources of indigenous livestock and poultry. National Animal Science Research Institute, Karaj, Iran (In Persian).
22. Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm and S.G. Rozen. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15): e115.
23. Zeder, M.A. and H.A. Lapham. 2010. Assessing the reliability of criteria used to identify postcranial bones in sheep, *Ovis* and goats, *Capra*. *Journal of Archaeological Science*, 37(11): 2887-2905.

Comparison of Phylogenetic and Evolutionary of Nucleotide Sequences of HVR1 region of Mitochondria Genom in Goats and Other Livestock Species

Maryam Shariat¹, Gholam Reza Dashab² and Mehdi Vafaye Valle³

1 and 3- Graduated M.Sc. Student and Assistant Professor of Animal Breeding, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

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

Received: December 1, 2018

Accepted: February 19, 2019

Abstract

Maintaining genomic diversity in goat populations in different parts of Iran is essential for breeding programs, increasing production, survival, resistance to diseases, and various environmental changing conditions. The aim of the present study was to determine the sequence of HVR1 from the mitochondrial genome of Iranian native goats including Sistani, Pakistani, Black and Lorry ecotypes (each of 4 heads), examine the probable variation in these populations, and plotting their phylogen relationship in comparison with some animal species. Total DNA extraction was performed using phenol-chloroform method. The extracted DNA was used as template for proliferation of HVR1 region of mitochondrial genome was used and the obtained bands were sequenced by Sanger method. The nucleotide sequences with 30 sequences from the same region of the mitochondrial genome related to other animal species derived from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) were used for genetic analysis and phylogenetic tree mapping. The average of haplotype diversity and nucleotide diversity among species were 0.994 and 0.12891, and, in the ecotypes were 1 and 0.09299, respectively. The numerical value of the replacement rate of dn/ds for the studied ecotypes and other species was calculated at 1.17 and 1.12, respectively, which indicates a positive selection in the process of evolution of this gene. The results of phylogenetic tree of nucleotide sequence of HVR1 region were estimated from two major branches and 7 subspaces. Among the studied species, goat ecotypes were similar to sheep species. The genetic and phylogenetic analysis of the studied species indicates the distinction and evolutionary path of each species and the HVR1 region can lead to the proper grouping of the species and sub-species that are split from them.

Keywords: Adni goat, D-Loop region, Genetic variation, Haplotype, Phylogenetic relations, Sistani goat