



"مقاله پژوهشی"

مطالعه بیوانفورماتیکی ژنوم میتوکندری در دو زیرگونه گاو هلشتاین (*Bos taurus*) و کلیستانی (*Bos indicus*) با استفاده از داده‌های RNA-Seqاحمد تمروسى^۱، غلامرضا داشاب^۲، محمد حسین بناء‌بازی^۳ و علی مقصودی^۴

- کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
 - دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، (نویسنده مسؤول) (dashab@uoz.ac.ir)
 - استادیار ژنتیک و اصلاح دام، پخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات، آزمایش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
 - دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی و بیوانفورماتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۰

صفحه: ۱۷۲ تا ۱۸۴

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: ظهور نسل جدید توالی‌بایی ترانسکریپتوم به بهبود صحت کلی پیش‌بینی ییان ژن‌های مختلف با استفاده از توالی‌های کوتاه RNA-Seq کمک کرده است. این فناوری می‌تواند یک ییدگاه جامع‌تری نسبت به ژنومیک عملکردی در بسیاری از گونه‌ها با یک توالی ژن منحصر به فرد داشته باشد.

هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی دلایل ساختاری ییان متفاوت ژن‌های میتوکندری در دو زیرگونه گاو هلشتاین و کلیستانی شامل ژن‌های ND4، ND3، ND4L، ND5 و ND6 بود که در فرآیندهای مهمی از جمله متabolیسم انرژی در مقایله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی و نیز مقاومت به بیماری نقش دارند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از داده‌های RNA-Seq مربوط به ادغام ۴۰ نمونه از مرکز گاو شیری دانشگاه ویسکانتانی آمریکا (*Bos taurus*) و ۴۵ گاو ماده کلیستانی (*Bos indicus*) در مزرعه گوجاتیپر شهر باهالاپور واقع در ایالت پنجاب پاکستان استفاده شد. برای انجام این مطالعه جهت بررسی سطح پوشش ترانسکریپتومی و اختلافات ژنتیکی در بین پنج ژن میتوکندری که شامل نواحی چندشکلی، نواحی حذف و اضافه، نواحی اتصال و درصد انواع جایگزینی‌های نوکلئوتیدی انتقالی و تقاطعی از نرم‌افزارهای IGB، MEGA6 و MEGA5 استفاده شد.

یافته‌ها: بیشترین ناحیه و طول حذف در تمام ژن‌های مورد مطالعه مربوط به ژنوم هلشتاین و بیشترین طول و ناحیه اتصال مربوط به گاو کلیستانی بود. بیشترین تعداد نواحی حذف در گاوهاهی هلشتاین و کلیستانی مربوط به ژن ND4 و کمترین نواحی حذف مربوط به ND4L به ترتیب با ۶۶ و ۴۶ ناحیه حذف بودند. ژن‌های ND4 و ND4L و هیچ ناحیه اتصال نداشتند، اما ژن‌های ND5 و ND6 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی به ترتیب با ۱ و ۲ ناحیه اتصال موجب افزایش ژنوم به ترتیب با ۲۲ و ۱۱ چفت باز شدند. با این سطح پوشش ترانسکریپتومی در ژن‌های ND3 و ND4 و ND5 کمترین پوشش در جایگاه ژن ND6 مشاهده شد. تعداد نواحی چندشکل در جایگاه ND5 بیشتر از سایر ژن‌ها و برابر با ۳۸ ناحیه چندشکلی بود. همچنین، نتایج نشان داد که درصد جانشینی انتقالی در بازها بیشتر از جانشینی تقاطعی هست که می‌تواند دلیل پایداری تغییرات در طی تکامل باشند. بنابراین، برخی از دلایل ساختاری ژن‌های میتوکندری که در دو زیرگونه گاو هلشتاین و کلیستانی ییان متفاوت داشته‌اند، نواحی چندشکلی، سطح پوشش ترانسکریپتومی و نوع و میزان جایگزینی‌های انتقالی و تقاطعی باشند که در طی تکامل دو زیرگونه بوجود آمده است.

نتیجه‌گیری: انتخاب شدید برای تولید شیر در گاوهاهی هلشتاین نسبت به نژاد کلیستانی منجر به کاهش طول ژنوم میتوکندری و تغییرات در ساختار نوکلئوتیدی برخی ژن‌های میتوکندری شده که نتیجه آن تغییر ییان ژن‌ها و عکس العمل متفاوت به شرایط متفاوت محیطی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ییان ژن، پوشش ترانسکریپتومی، حذف و اضافه، کلیستانی، هلشتاین

مقدمه نوع mtDNA گاوهاهی کوهان دار در شبکه‌جزیره هند با توجه به مناطق فراگیر، نشان‌دهنده اهلی شدن *Bos indicus* در هند و پس از مهاجرت به جنوب غرب آسیا، چین و جنوب شرق آسیا است (۶). به طور مشابه، *Bos taurus* دارای بیشترین نوع در جنوب غربی آسیا با چهار هاپلوگروه mtDNA مختلف شامل T1، T2، T3 و T4 می‌باشدند (۳۰). عملکرد ژنتیکی DNA میتوکندری برای اولین بار در دهه ۱۹۸۰ به کمک توالی‌بایی کامل ژنوم میتوکندری چند گونه از پستانداران گزارش شد. نتایج این مطالعات نشان داد که DNA میتوکندری دارای یک ناحیه غیرکدشونده (D-Loop) و نواحی کد شونده متشکل از ۳۷ ژن، شامل ۱۳ پروتئین و ۲۲ tRNA که ۲۰ اسید‌آمینه را شناسایی می‌کنند و ۲ rRNA و فاقد پروتئین‌های هیستون و ایتررون است (۲۰،۱۶).

ژنوم میتوکندری کدکننده تعداد محدودی پروتئین است که تمامی آن‌ها از اجزای اصلی سیستم فسفوریل‌اسیون اکسیداتیو می‌باشند، علاوه بر این تمام tRNAهای ریبوزومی و بسیاری از rRNAهای مورد نیاز برای ترجمه این پروتئین‌ها در میتوکندری نیز، توسط ژنوم این اندامک کد می‌شود؛ دیگر پروتئین‌های میتوکندری توسط ژنوم هسته کد شده، که تصور

شواهد باستان‌شناسی و ژنتیکی حاکی از آن است که گاوهاهی مدرن ممکن است ناشی از دو رویداد اهلی کردن گاو (بوس پریمنیگوس) در جنوب غربی آسیا باشد که به ترتیب باعث به وجود آمدن گاوهاهی تائورین (بوس تائوروس) و زبو (بوس ایندیکوس) شدند (۱۴،۲۱). با این حال، اهلی شدن مستقل در آفریقا (۴،۱۳) و شرق آسیا (۲۲) نیز فرض شده است و داده‌های DNA باستانی امکان تداخل ژنی از گاو وحشی را افزایش می‌دهند.

زیرگونه‌ها و نژادهای گاو به لحاظ مورفولوژیکی متفاوت بوده‌اند و در ابتدا با حضور یا عدم حضور یک کوهان از همه متمایز می‌شوند (۱۸). داده‌های مولکولی به ترتیب نشانگر دوگانگی عمدۀ تائورین-زبوین (taurine-zebuine) برای نژادهای گاو در آسیا است، اما شواهد نشان می‌دهد که گاوهاهی زبی آفریقایی از گونه‌های بوس تائوروس اولیه بوسیله تلاقی اجدادی و اجتناب از نرها با واسطه ژنتیک بوس ایندیکوس نشأت گرفته است (۴).

توالی DNA میتوکندری (mtDNA) می‌تواند یک ابزار زنده برای استقرار محل‌های اهلی‌سازی باشد. نقطه کانونی

بررسی دلایل بیان متفاوت در ژنوم میتوکندری در بین دو نژاد هاشتاین و کلیستاینی و پیدا کردن دلایل احتمالی بیان متفاوت می باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از داده‌های *RNA-Seq* مربوط به ادغام ۴۰ نمونه از مرکز گاو شیری دانشگاه ویسکانسین آمریکا (*Bos taurus*) و ۴۵ گاو ماده کلیستاینی (*Bos indicus*) در مزرعه گوجایتپیر شهر باهالاپور واقع در ایالت پنجاب پاکستان استفاده شد. این داده‌ها در مطالعه Huang و همکاران (۱۵) تولید شدند. به طور خلاصه، تهیه کتابخانه‌های مذکور شامل مراحل برش mRNA به قطعات کوچکتر، رونویسی معکوس آنها (ساخت cDNA)، اتصال آغازگرهای توالی‌یابی، انتخاب قطعات با اندازه مناسب (حدود ۳۰۰ جفت باز) و غنی سازی از طریق PCR بود.

کتابخانه آماده شده برای هر نژاد روی یک خط دستگاه Illumina Genome Analyzer IIx. توالی‌یابی شد. نتیجه توالی‌یابی تولید ۲۰،۹۴۰،۶۳ و ۲۱،۰۷۸،۴۷۷ جفت باز به طول ۷۵ جفت باز به ترتیب برای نژادهای هاشتاین و کلیستاینی بود. داده‌های خام برای هر نژاد در تاریخ ۲۲ زوای ۲۰۱۳ در بخش آرشیو خوانش‌های کوتاه (Read Archive Short sequence) Read Archive (SRA) (بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)) منتشر شده و با فرمت sra بصورت رایگان و عمومی از لینک‌های زیر قابل دریافت است: نژاد کلیستاینی: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRS454433> و نژاد هاشتاین:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRS454432> تجزیه و بیان اختلافی ژن‌ها و فراخوانی ترانسکریپتوم نمونه جمعیت گاو هاشتاین آمریکا و گاو کلیستاینی پاکستان بیانگر اختلافات بیان ژن‌های میتوکندری (mtDNA) در دو نژاد حکایت داشت که هدف مطالعه حاضر قرار گرفت تا دلایل بیان متفاوت آنها توضیح داده شود (۱،۲۵،۲۶). لذا اطلاعات توالی ترانسکریپتوم ژن‌های مذکور استخراج و با ژنوم مرجع دو زیرگونه گاو شامل *Bos taurus* و *Bos indicus* مقایسه و تفاوت ساختار ساختمانی ژن‌ها و سطح پوشش ژن‌ها تحلیل شدند.

استخراج ژن‌های میتوکندری

با استفاده از پایگاه‌های داده ژنومی NCBI به آدرس: آدرس: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) و Ensembl آدرس: (<https://asia.ensembl.org/index.html>) توالی پنج ژن میتوکندری برای گاو هاشتاین (*Bos taurus*) و گاو کلیستاینی (*Bos indicus*) استخراج و به فرمت FASTA ذخیره گردید. اطلاعات مربوط به شماره دسترسی، نام ژن، موقعیت در ژنوم میتوکندری در دو نژاد هاشتاین و کلیستاینی در جداول ۱ ارائه شده است.

بر این است که این ژن‌ها از ژنوم میتوکندری‌های اجدادی به هسته منتقل شده‌اند (۸).

هسته mtDNA های حیوانی حاوی ژن‌هایی هستند که RNA ریبوزومی زیرواحد بزرگ و کوچک، بیست و دو tRNA (tRNA) و ۱۳ پروتئین که همه اجزای فرآیند فسفوفریلاسیون اکسیداتیو هستند را رمزگذاری می‌کنند. زیر واحدهای ATPase سیتوکروم b (cytb)، زیرواحدهای سیتوکروم c اکسیداز (COX1، COX2، COX3) و دهیدروژنаз ND1، ND2، ND3، ND4، ND4L، (ND5، ND6) شامل هفت زیرواحد (۹) هستند.

ظهور نسل جدید توالی‌یابی ترانسکریپتوم به بهبود صحت کلی پیش‌بینی ژن با استفاده از توالی‌یابی کوتاه کمک کرده است. علاوه بر این، این فناوری می‌تواند یک دیدگاه جامع تری نسبت به ژنومیک عملکردی در بسیاری از گونه‌های ناشناخته با یک توالی ژنی منحصر به فرد با طول کامل و تفسیر ژن با دقت ارائه دهد. در نتیجه در توسعه منابع داده‌های ترانسکریپتوم از منابع ژنتیکی مفید و کارآمدتر هستند (۱۷). ترانسکریپتوم مطالعه کاتالوگ‌های رونوشت در یک سلوول، بافت، یا ارگانیسم برای یک مرحله توسعه خاصی یا شرایط فیزیولوژیکی است (۲۹).

پوشش ترانسکریپتوم یا عمق توالی مورد نیاز برای یک مطالعه خاص می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله اندازه ژنوم، پیچیدگی متن و اهداف مطالعه باشد. به طور کلی، هرچه متن پیچیده‌تر باشد، برای پوشش مناسب، عمق توالی بیشتر لازم است (۷). بسته به هدف تجزیه و تحلیل رونوشت، نیاز به عمق توالی متفاوت است.

در مطالعه‌ای به منظور بررسی منشأ و میزان تنوع ژنتیکی نژادهای گاو بومی در چین، با استفاده از چندشکلی ژنوم میتوکندری، نتایج فیلوزنیک توالی‌های نوکلئوتیدی ژن CYTB به طول ۱۴۰ جفت باز نشان داد که توالی ژن مذکور به دو سلسله ژنتیکی متمایز شامل تائورین (بوس تائوروس) و زب (بوس/یندیکوس) طبقه‌بندی شدند. ژنوم میتوکندری گاوهای زب در نژادهای جنوبی غالب هستند، در حالی ژنوم میتوکندری تائورین در نژادهای شمالی غالب است (۵).

نژاد کلیستاینی (*Bos indicus*) شیاهت بسیار زیادی با نژاد سیستاینی دارد و به تحمل حرارت و مقاومت در برابر کنه و بیماری مشهور است (۱۱). در مقابل گاو هاشتاین جزء نژادهای غالب در صنعت گاو شیری است. علت انتخاب این دو نژاد تفاوت فنوتیپی قابل توجه بین این دو نژاد است (۲۳،۱۹). از آنجایی که در برخی از ژن‌های میتوکندری مشاهد شده و با بیان ژن بین دو زیرگونه هاشتاین و کلیستاین موجود در فرآیندهای مهمی از جمله توجه به اهمیت ژن‌های موجود در فرآیندهای زیستی و متابولیسم انرژی که در مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی و نیز مقاومت به بیماری نقش دارند، انجام یک مطالعه که پوشش ترانسکریپتومی را در ژنوم میتوکندری را بررسی کند، ضروری می‌باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر

جدول ۱- مشخصات مربوط به پنج ژن میتوکندری در گاو هلشتاین (*Bos taurus*) و کلیستانی (*Bos indicus*)

ردیف	شماره حاشیه نویسی ژن	نام ژن	جایگاه ژن	نوع ژن	p_value	q_value
هلشتاین						
۱	ENSBTAG0000043568	MT-ND3	MT:9822-10168	کدکننده پروتئین	.۰۰۰۱	.۰۰۱
۲	ENSBTAG0000043577	MT-ND4	MT:10238-11906	کدکننده پروتئین	.۰۰۱۵	.۰۱
۳	ENSBTAG0000043563	ND5	MT:12108-14440	کدکننده پروتئین	.۰۰۲	.۰۲
۴	ENSBTAG0000043546	MT-ND6	MT:12108-14440	کدکننده پروتئین	.۰۰۰۰۰۱	.۰۰۰۱
۵	ENSBTAG0000043559	MT-ND4L	MT:10238-11906	کدکننده پروتئین	.۰۰۰۱	.۰۰۱
کلیستانی						
۱	ENSBTAG0000043568	MT-ND3	MT:9822-10168	کدکننده پروتئین	.۰۰۱	.۰۱
۲	ENSBTAG0000043577	MT-ND4	MT:10238-11906	کدکننده پروتئین	.۰۰۲	.۰۰۵
۳	ENSBTAG0000043563	ND5	MT:12108-14440	کدکننده پروتئین	.۰۰۱	.۰۰۱۵
۴	ENSBTAG0000043546	MT-ND6	MT:12108-14440	کدکننده پروتئین	.۰۰۲	.۰۰۵
۵	ENSBTAG0000043559	MT-ND4L	MT:10238-11906	کدکننده پروتئین	.۰۰۵	.۰۰۱

است. اطلاعات حاضر از تجزیه بیان افتراقی گاوهای هلشتاین و کلیستانی از مطالعه سلیمپور (۲۵) استخراج شدند.

بیان کمی ژن‌های میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی که در مطالعه حاضر استفاده شدند، در جداول ۲ ارائه شده

جدول ۲- بیان کمی ایزوفرم‌های ژن‌های میتوکندری در گاو هلشتاین (*Bos taurus*) و گاو کلیستانی (*Bos indicus*)

ردیف	شماره حاشیه نویسی ژن	نام ژن	جایگاه ژن	طول	سطح پوشش	FPKM	FPKM conf-lo	FPKM conf-hi
هلشتاین								
۱	ENSBTAG0000043568	ND3	MT:9822-10168	۳۴۶	۱۲۹۴۰/۲	۶۴۵۳/۸۴	۶۳۶۸/۱۷	۶۵۳۹/۵۲
۲	ENSBTAG0000043577	ND4	MT:10528-11906	۱۳۷۸	۳۰۱۳/۴۸	۱۵۱۳/۲۷	۱۴۹۸/۲۷	۱۵۷۸/۲۶
۳	ENSBTAG0000043559	ND4L	MT:10238-10535	۲۹۷	۳۱۳۶/۸۸	۱۵۷۵/۲۳	۱۴۹۴/۹۲	۱۶۵۵/۵۴
۴	ENSBTAG0000043563	ND5	MT:12108-13929	۱۸۲۱	۱۶۴۳/۴۵	۸۳۴/۵۹۸	۷۹۸/۲۶۸	۸۷۰/۹۲۷
۵	ENSBTAG0000043546	ND6	MT:13912-14440	۵۲۸	۲۱۴۵/۸۷	۱۰۸۹/۷۴	۱۰۳۷/۴۹	۱۱۴۲
کلیستانی								
۱	ENSBTAG0000043568	ND3	MT:9822-10168	۳۴۶	۲۵۲۴۲/۴	۱۱۶۱/۹	۱۱۵۳۳/۱	۱۱۷۹۰/۷
۲	ENSBTAG0000043577	ND4	MT:10528-11906	۱۳۷۸	۴۲۴۲/۳	۱۹۱۰/۲۹	۱۸۲۹/۱۳	۱۹۹۱/۴۵
۳	ENSBTAG0000043559	ND4L	MT:10238-10535	۲۹۷	۲۰۴۰/۹۴	۹۳۱/۲۷۷	۸۶۳/۹۰۴	۹۷۸/۶۵
۴	ENSBTAG0000043563	ND5	MT:12108-13929	۱۸۲۱	۱۱۳۳/۱۲	۶۰/۲۹۳۹	۵۷۶/۲۶۱	۶۲۹/۵۱۸
۵	ENSBTAG0000043546	ND6	MT:13912-14440	۵۲۸	۲۰۷۳/۹۷	۱۱۰۳/۵۷	۱۰۵۰/۳۸	۱۱۵۶/۷۷

در قالب فرمت FASTA در تجزیه با MEGA6 و DnaSPV.5 مورد استفاده قرار گرفت، به منظور توالی ژن‌های میتوکندری دو زیرگونه با ژنوم مرجع همدمیف شدند. همچنین نواحی ORF به توالی اسیدآمینه نیز ترجمه شده و سپس برای محاسبه شاخص‌هایی مانند درصد جایگزینی تقاطعی و انتقالی و نسبت آنها مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج و بحث

دانش تنوع، تمایز و ساختار ژنتیکی جمعیت اطلاعات حیاتی برای حفاظت و مدیریت منابع ژنتیکی حیوانی را فراهم می‌نماید (۲۶). اگر فنوتیپ و ژنوتیپ هیچ تقاضاتی بین افراد نشان نداشته باشد، انتخاب برای ویژگی‌های پرورشی مهم موفق نخواهد بود. بنابراین، حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت گاو جهان برای تأمین منابع ژنتیکی برای مواجهه با چالش‌های اجتماعی در آینده از جمله امنیت غذایی، افزایش رقابت برای پرورش و تنوع بیشتر در شرایط آب و هوایی متفاوت حائز اهمیت می‌باشد (۳).

تغییرات حذف در تعدادی از بازه‌های DNA موجب می‌شود تا طول DNA تغییر کند. جهش‌های حذفی کوچک یک یا چند

محاسبه سطح پوشش ژنومی یا کاوریج جهت بررسی سطح پوشش ترانسکریپتومی ژن‌های میتوکندری و تعیین اختلافات ژنتیکی در پنج ژن میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی از برنامه IGB نسخه ۹.1.0 استفاده شد (۱۰) که مراحل انجام کار و تجزیه‌ها به شرح ذیل می‌باشند: بارگذاری فایل داده‌های کمی بیان افتراقی ژن‌ها در قالب فرمت gtf به همراه ژنوم مرجع و سپس تجزیه سطح پوشش ژنومی می‌باشد. همچنین در قالب برنامه مذکور اختلافات ساختار ژنتیکی هر کدام از ژن‌ها شامل نواحی چندشکل، نواحی حذف و اضافه و نواحی اتصال به تفکیک برای هر ژن میتوکندری بررسی گردید. مقایسه دقیق‌تر توالی نوکلئوتیدی ژن‌های میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی به منظور تعیین مکان نواحی چندشکل (SNP) و همچنین محاسبه درصد انواع جایگزینی‌های مختلف انتقالی و تقاطعی از برنامه MEGA6 (۲۷) و DnaSPV.5 (۲۸) استفاده شدند. بدین منظور نواحی چندشکل، نواحی حذف و اضافه و نواحی اتصال به تفکیک برای هر ژن میتوکندری Open reading frame (ORF) پنج ژن میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی از برنامه IGB به همراه ژنوم مرجع نواحی مذکور به عنوان رفرنس استخراج و ویرایش گردید و

و در نژاد کلیستانی در ۶۶ ناحیه ۶۹ باز نسبت به ژنوم مرجع تغییرات به واسطه حذف داشتند. همچنین، در ناحیه *ND4L* تعداد بازهای حذف شده در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی به ترتیب ۱۰ و ۵ باز بودند. نتایج بیانگر این هست که در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در تمام جایگاه ژنی، هم تعداد نواحی حذف و هم تعداد بازهای حذف شده در نژاد هلشتاین بیشتر از نژاد کلیستانی بودند. لذا یکی از دلایل سازگاری بیشتر نژاد کلیستانی نسبت به تغییرات شرایط محیطی و حساسیت کمتر به بیماری‌ها و همچنین تفاوت بیان بیشتر در ژن‌های مذکور به واسطه ژنوم بزرگتر باشد.

جفت باز را از ژن حذف می‌کنند، در حالیکه جهش‌های حذف بزرگتر می‌توانند کل یک ژن یا چندین ژن مجاور را نیز حذف کنند. حذف موجب می‌شود تا عملکرد پروتئین یا پروتئین‌های حاصله نیز تغییر یابند. نتایج تغییرات به واسطه حذف در ساختار ژنتیکی ژنوم میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی به واسطه حذف نقطه‌ای در جدول ۳ ارائه شده است. بیشترین تعداد نواحی حذف در گاوهای هلشتاین و کلیستانی مربوط به ژن *ND4* به ترتیب با ۷۴ و ۶۶ نقطه و کمترین نواحی حذف مربوط به *ND4L* به ترتیب با ۹ و ۴ ناحیه حذف بودند. در جایگاه *ND4* در ۷۴ ناحیه حذف ۸۶ باز

جدول ۳- نواحی حذف در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در ژنوم میتوکندری

Table 3. Deletion regions in *Holstein* and *Cholistani* breeds in the mitochondrial genome

ردیف	نام ژن	هلشتاین		کلیستانی		تعداد حذف
		تعداد ناحیه	تعداد حذف	تعداد ناحیه	تعداد حذف	
۱	<i>ND3</i>	۴۲	۴۸	۲۲	۲۲	
۲	<i>ND4</i>	۷۴	۸۶	۶۶	۶۹	
۳	<i>ND4L</i>	۹	۱۰	۴	۵	
۴	<i>ND5</i>	۵۹	۶۸	۲۰	۲۴	
۵	<i>ND6</i>	۳۶	۳۹	۱۳	۱۳	

جفت باز شدند. بنابراین، همان‌طور که ملاحظه می‌شود، نژاد کلیستانی علی‌رغم این که تعداد ناحیه حذف کمتری داشت، همچنین با افزایش طول ژنوم با اتصال در سه تا از ژن‌های مورد مطالعه شامل *ND5* و *ND6* و *ND3* به ترتیب با طول ۱۱ و ۲۲ و ۱۱ جفت باز همراه بود.

نواحی اتصال یا جانک در ژنوم میتوکندری نتایج نواحی اتصال در ژن‌های میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۴ ارائه شده است. ژن‌های *ND5* و *ND4* همچنین اتصال نداشتند، اما ژن‌های *ND4L* و *ND6* در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی به ترتیب با ۱ و ۲ ناحیه اتصال موجب افزایش ژنوم به ترتیب با طول ۱۱ و ۱۱ جفت باز همراه بود.

جدول ۴- تعیین نواحی اتصال یا جانک در mtDNA نژادهای هلشتاین و کلیستانی

Table 4. Determination of junk regions in mtDNA in *Holstein* and *Cholistani* breeds

ردیف	نام ژن	هلشتاین		کلیستانی		تعداد اتصال
		تعداد ناحیه	تعداد اتصال	تعداد ناحیه	تعداد اتصال	
۱	<i>ND3</i>	-	-	۱	۱	۱۱
۲	<i>ND4</i>	-	-	-	-	-
۳	<i>ND4L</i>	-	-	-	-	-
۴	<i>ND5</i>	۱	۱۱	۲	۲۲	
۵	<i>ND6</i>	۱	۱۱	۲	۲۲	

توالی‌بایی و مهم‌تر از آن برای تشخیص هتروزیگوستی لازم است. از دیدگاه اقتصادی مطلوب است که سطح پوشش مناطق توالی‌بایی شده پیوسته باشد و گستنگی (وجود نواحی با کاوریج بسیار بالا یا بسیار پایین) در آن نباشد. نتایج سطح پوشش ترانسکریپتومی در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۵ و تصاویر نواحی کاوریج در شکل ۱ ارائه شده است.

مهم‌ترین ویژگی توالی‌بایی نسل جدید *RNA-seq* این است که هر باز از کتابخانه cDNA چندین بار توالی‌بایی می‌شود. تعداد دفعاتی که یک موقعیت در آزمایش توالی‌بایی می‌شود (به عبارت دیگر تعداد خوانش‌هایی که شامل این موقعیت هستند) کاوریج (عمق توالی‌بایی) نامیده می‌شوند. وجود چندین خوانش در یک موقعیت یکسان برای حذف خطاهای

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

Table 5. Results of coverage transcriptome among mitochondrial genes in *Holstein* and *Cholistani* breeds

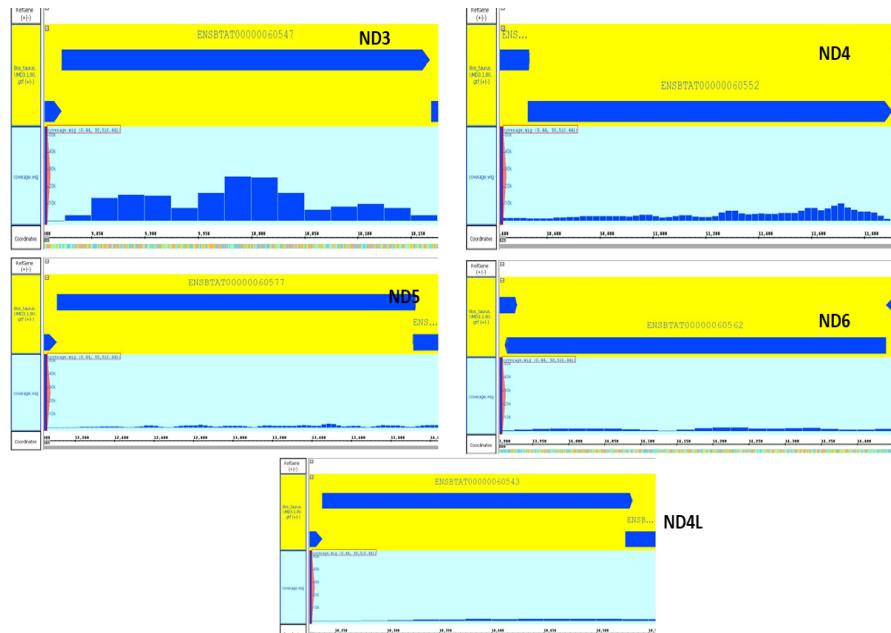
ردیف	نام ژن	نقشه شروع	نقشه پایان	طول	فرافوای
۱	<i>ND3</i>	۹۸۲۲	۱۰۱۶۸	۳۶	+
۲	<i>ND4</i>	۱۰۵۲۸	۱۱۹۰۶	۱۳۷۸	+
۳	<i>ND5</i>	۱۲۰۰۸	۱۳۹۲۶	۱۸۱۸	+
۴	<i>ND6</i>	۱۴۴۴۰	۱۳۹۱۵	۵۲۵	-
۵	<i>ND4L</i>	۱۰۲۳۸	۱۰۵۳۲	۲۹۴	+

نوکلتوتیدی T به شماره توالی ۹۹۷۵ الی نوکلتوتید A به شماره ۹۹۹۹ قرار داشت. بیشترین پوشش ترانسکریپتومی در جایگاه ژنی *ND4* در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در نواحی

نتایج پوشش ترانسکریپتومی در پنج جایگاه ژن میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در شکل ۱ ارائه شده است. بیشترین سطح پوشش در ژن *ND3* در نواحی

همچنین، بیشترین سطح پوشش در ژن *ND5* در نواحی نوکلئوتیدی C به شماره توالی ۱۳۴۷۵ ای نوکلئوتید A به شماره ۱۳۴۹۹ قرار داشت و در نهایت نتایج پوشش ترانسکریپتومی در جایگاه ژنی *ND4L* در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی بیانگر بیشترین سطح پوشش در نواحی نوکلئوتیدی A به شماره توالی ۱۰۳۷۵ ای نوکلئوتید T به شماره ۱۰۵۲۴ بودند.

نوکلئوتیدی T به شماره توالی ۱۱۷۰۰ ای نوکلئوتید T به شماره ۱۱۷۲۴ و در انتهای ژن بود و نواحی ابتدایی ژن سطح پوشش کمتر از ۱۰k داشت، اما همچنان پیوستگی در سرتاسر ژن برقرار است. بیشترین سطح پوشش در ژن *ND6* در نواحی نوکلئوتیدی A به شماره توالی ۱۴۲۰۰ ای نوکلئوتید A به شماره ۱۴۲۴۹ قرار داشت. در جایگاه مذکور علی‌رغم سطح پوشش بسیار پایین، اما در سرتاسر ژن گسترده شده است.



شکل ۱- نتایج پوشش کاوریج در پنج جایگاه ژن میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

Figure 1. Results of coverage transcriptome at the five mtDNA gene locus in *Holstein* and *Cholistani* breeds

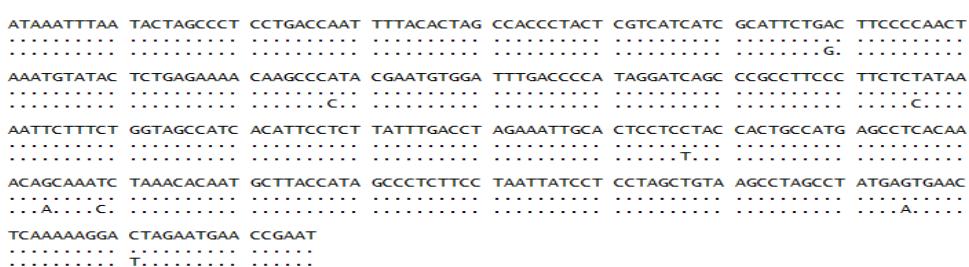
گروه دیگر را جهش یا جایگزینی تقاطعی می‌گویند. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی به عنوان شاخصی در تکامل استفاده می‌شود (۲۷).

جایگزینی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جایگاه ژن *ND3*

مقایسه توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژنی *ND3* با طول ۳۴۶ جفت باز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی شامل ۸ ناحیه چندشکل و بر اساس توالی آمینواسیدی مشتمل بر یک ناحیه چندشکلی بود که در جایگاه مذکور آمینواسید آلانین با ترئونین جایگزین شده است (شکل‌های ۲ و ۳).

نتایج پوشش ترانسکریپتومی بیانگر این است که دو ژن *ND4* و *ND3* دارای بالاترین سطح پوشش ترانسکریپتومی بودند، اما سایر جایگاه‌های ژنی سطح پوشش و عمق توالی‌بایی پایین بود.

تفییر در هر جفت باز، چندشکلی یا نواحی چندشکل (SNP) اطلاق می‌شود. تغییر در بازها ممکن است هم‌شکل باشند، یعنی یک باز از گروه پیریمیدین به باز دیگر از همین گروه تبدیل شده و همچنین باز از گروه پورین به باز دیگری از همین گروه تبدیل شود، به این نوع تغییرات جهش‌های انتقالی یا جایگزینی انتقالی و تبدیل باز از یک گروه با بازی از



شکل ۲- نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی *ND3* در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

Figure 2. Polymorphic regions based on nucleotide sequences at the *ND3* gene locus in comparison between *Holstein* and *Cholistani* breeds

```

INLILALLTN FTLATLLVII AF*LPQLNVY SEKTSPYECG FDPIGSARLP FSIKFFLVAI TFLLFDLEIA LLLPLP*ASQ
..... .W.... ....
TANLNNTMLTI ALFLIILLAV SLAYE*TQKG LE*TE
..... .T.... ....

```

شکل ۳- نواحی چندشکل بر اساس توالی های آمینواسیدی در جایگاه ژنی *ND3* در مقایسه دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Figure 3. Polymorphic regions based on amino acid sequences at the *ND3* gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds

جایگاه مذکور به ترتیب برابر با ۳۰/۳۵، ۳۰/۱۷، ۲۷/۱۷ و ۳۰/۱۵ و ۱۲/۳۳ درصد بودند.

الگوی جایگزینی بازها در جایگاه ژنی *ND3* با طول ۳۴۶ جفت باز در دو نژاد کلیستانی و هاشتاین در جدول ۶ ارائه شده است. نسبت بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در

جدول ۶- درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن *ND3* در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Table 6. Percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of *ND3* gene locus in Holstein and Cholistani

باز	A	T/U	C	G
A	-	۱/۵۵	۱/۷۲	۱۴/۱۳
T/U	۱/۷۳	-	۲۰/۸۹	.۷۰
C	۱/۷۳	۱۸/۸۲	-	.۷۰
G	۳۴/۷۸	۱/۵۵	۱/۷۲	-

*: نسبت جایگزینی از یک ردیف به ستون می باشد. اعداد روی قطر (پر رنگ) جهش تقاطعی و اعداد روی قطر (ایتالیک) جهش انتقالی را نشان می دهند.

پرمیدینی ۳/۲۷ درصد و پرمیدینی به پورینی ۲/۴۳ درصد محاسبه شد. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی برابر با ۷/۷۸ درصد محاسبه شد.

جایگزینی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جایگاه ژن *ND4*

نتایج مقایسه توالی های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی *ND4* با طول ۱۳۷۸ جفت باز در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی بیانگر ۱۶ ناجیه چندشکلی و بر اساس توالی آمینواسیدی دو ناجیه چندشکلی را نشان داد (شکل های ۴ و ۵).

نتایج حاصل از درصد جایگزینی توالی های نوکلئوتیدی ژن *ND3* نشان داد که مقدار بالای جایگزینی انتقالی مربوط به بازهای پورینی به میزان ۴۸/۹۱ درصد بود. بدین صورت که در بازهای پورینی تبدیل آدنین به گوانین ۱۴/۱۳ درصد و گوانین به آدنین ۳۴/۷۸ درصد بودند و مجموع جایگزینی انتقالی بازهای پرمیدینی ۳۹/۷۱ درصد بود. در جایگزینی انتقالی بازهای پرمیدینی میزان تبدیل تیمین به سیتوزین ۲۰/۸۹ درصد و سیتوزین به تیمین ۱۸/۸۲ درصد بودند. همچنین میزان جایگزینی تقاطعی بازهای پورینی به

```

ATGCTAAAAT ACATTATTCC AACAAATTATA CTTATACCCC TAACCTGGTT ATCAAAAAAT AATATAATT GGGTTAACTC
..... .G.... ....
CACAGCACAC AGCCCTTCAA TTAGCTTTAC AAEGCTCCCTC CTACATAAACC AGTTTGCGGA CAACAGCCCTT AATTTTTCAC
..... .T.... ....
TACTATTTTT CTCCGACTCC CTATCCACTC CACTACTAA TTTAACCATATA TGCTCCTCC CTCTAATACT AATAGCTAGC
..... .G.... ....
TATAACCTTT ACCGCCATGG AACTAACTT ATTATTAATT CTATTTGAAG CAACACTAGT CCCAACACTC ATTATTATTAA
..... .C.... ....
CCCGATGAGG AAACCAAACA GAACGCCTAA ACGCCGGACT CTATTCCTA TTCTATACAC TAGCTGGCTC CCTACCCCTA
..... .T.... ....
TTAGTCGAC TAATTTATAT CCAAAACACA GTAGGATCCC TAAATTTCTT AATATTACAG TACTGAGTAC AACCTGTTCA
..... .T.... ....
TAACCTTGTG TCTAAATGTCT TCATATGACT AGCATGTATA ATAGCTTTCA TAGTAAAAT ACCACTATAT GGCCTCCACC
..... .C.... ....
TTTGACTTAC TAAAGCTCAC GTAGAACGCC CCATCGCAGG CTCCATAGTC CTTGCAGCAG TCTGCTAAA ACTAGGGGGG
..... .T.... ....
TACGGTATGC TACGAATCAC ACTAATTCTA AACCTATGAA CGCAGTTAT AGCATACCCA TTCATTATAC TCTCCCTATG
..... .T.... ....
AGGCATAATT ATAACCGAGT CAATCTGCCT CGCTCAAACG GACCTAAAAT CACTCATGG ATACTCCCTCT GTAAGCCACA
..... .G.... ....
TAGCACTCGT TATCGTAGCC ATCCTTATCC AGACACCTTG AAGCTACATA GGAGCAACGG CCCTTATGAT TGCCCCAGGC
..... .C.... ....
GTAATCACCG CCCTATATTG TCTATACATG CTAATTATAA CCCAACGAGG AAAATATACC TACCACTTA ATAATATCTC
..... .C.... ....
GCCTTCCCTT ACACGGAAA ATGCACTCAT ATCATTACAC ATCCTACCC TACTACTCCT AACCTAAAC CCAAAATTA

```

شکل ۴- نواحی چندشکل بر اساس توالی های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی *ND4* در مقایسه دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Figure 4. Polymorphic regions based on nucleotide sequences at the *ND4* gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds

```

MLKYIIPPTII LIPLTWLSKN NIIWVNSTAH SLLISFTSLL LINQFGDNL NFSLLFFSDS LSTPLLILTI WLLPLILIAS
..... S..... V..... .
YGMRLRITLIL NPMTDFIAYP FIILSL*GII ITSSICLRQT DLKSLIAYSS VSHIALVIVA ILIQTP*SYI GATALMIAHG
..... W.... .

```

شکل ۵- نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های آمینواسیدی در جایگاه ژنی *ND4* در مقایسه دو نژاد هاشتاین و کلیستانیFigure 5. Polymorphic regions based on amino acid sequences at the *ND4* gene locus in comparison between *Holstein* and *Cholistani* breeds

هاشتاین و کلیستانی در جدول ۷ ارائه شده است. نسبت بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در جایگاه مذکور به ترتیب برابر با $۲۸/۰۸$ ، $۳۲/۲۰$ ، $۶۴/۲۸$ و $۱۱/۰۸$ درصد بودند.

جایگزینی آمینواسیدی در جایگاه مذکور شامل تبدیل لوسین به والین و آسپارژین به سرین بودند. الگوی جایگزینی بازها در جایگاه ژنی *ND4* با طول ۱۳۷۸ جفت باز در دو نژاد

جدول ۷- درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوكلئوتیدی جایگاه ژن *ND4* در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Table 7. Percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of *ND4* gene locus in *Holstein* and *Cholistani*

باز	A	T/U	C	G
A	-	.۰/۸۳	.۰/۱۱	۱۱/۱۴
T/U	.۹۳	-	۲۵/۱۰	.۰/۳۳
C	.۹۳	۲۵/۶۰	-	.۰/۳۳
G	۳۲/۳۸	.۰/۱۳	.۰/۱۱	-

*: نسبت جایگزینی از یک ردیف به ستون می‌باشد. اعداد خارج قطر(ایتالیک) جهش تقاطعی و اعداد روی قطر(پر رنگ) جانشینی انتقالی را نشان می‌دهند.

پرمیدینی به پورینی $۱/۲۵$ درصد بودند. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی برابر با $۱۷/۲۵$ بود.

جایگزینی در توالی نوكلئوتیدی و آمینواسیدی جایگاه ژن *ND4L* مقایسه توالی نوكلئوتیدی جایگاه ژنی *ND4L* با طول ۲۹۴ جفت باز در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی ۴ ناحیه چندشکلی و بر اساس توالی آمینواسیدی یک ناحیه چندشکلی بود (شکل‌های ۶ و ۷).

نتایج حاصل از درصد جایگزینی در توالی‌های نوكلئوتیدی ژن *ND4* نشان داد که مقدار بالای جانشینی انتقالی مربوط به بازهای پرمیدینی به میزان $۵۰/۷$ درصد بود. بدین صورت که در بازهای پرمیدینی تبدیل سیتوزین به تیمین $۲۵/۶۰$ درصد و تیمین به سیتوزین $۲۵/۱۰$ درصد بودند. مجموع جایگزینی انتقالی بازهای پورینی $۴۳/۵۲$ درصد بود و برای بازهای پورینی میزان تبدیل آدنین به گوانین $۱۱/۱۴$ درصد و گوانین به آدنین $۳۲/۳۸$ درصد بودند. همچنین میزان جایگزینی تقاطعی بازهای پورینی به پرمیدینی $۱/۶۴$ درصد و

```

#B_taurus_Jun_2014_.chrM
#NC_006853.1:10239-10535_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#NC_005971.1:10242-10538_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

#B_taurus_Jun_2014_.chrM
#NC_006853.1:10239-10535_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#NC_005971.1:10242-10538_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

#B_taurus_Jun_2014_.chrM
#NC_006853.1:10239-10535_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#NC_005971.1:10242-10538_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

#B_taurus_Jun_2014_.chrM
#NC_006853.1:10239-10535_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#NC_005971.1:10242-10538_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

```

```

ATGTCTATAG TATACATAAA CATTATAATA GCATTCACAG TATCTCTGT AGGACTACTA ATATACCGAT CCCACCTAAT
..... ..... G .. .
ATCCTCCCTT CTATGCTTAG AGGAATAAT GCTATCCCTA TTTCGTTATAG CAGCCCTAAC AATCCCTAAC TCACATTTTA
..... T .. G .. .
CATAGCTAG CATAATACCT ATTATCCTAC TAGTCTTCAC AGCCCTGTGAA GCAGCCCTAG GTCTATCTCT ACTAGTAATA
..... .. . C ..
GTATCAAATA CATATGGTAC TGATTATGTA CAAACCTCA ACTTACTCCA ATGC
..... .. .

```

شکل ۶- نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های نوكلئوتیدی در جایگاه ژنی *ND4L* در مقایسه دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Figure 6. Polymorphic regions based on nucleotide sequences at the *ND4L* gene locus in comparison between *Holstein* and *Cholistani* breeds

```

#B_taurus_Jun_2014_.chrM
#NC_006853.1:10239-10535_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#NC_005971.1:10242-10538_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

#B_taurus_Jun_2014_.chrM
#NC_006853.1:10239-10535_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#NC_005971.1:10242-10538_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

```

```

MSIVYINIII AFTVSLVGLL IYRSHLISSL LCLEGIMLSL FVIAALTLN SHFTLASIIP IIIILVFAACE AALGLSLLVI
..... .. M .. .
VSNTYGTDYV QNLNLQ
..... .

```

شکل ۷- نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های آمینواسیدی در جایگاه ژنی *ND4L* در مقایسه دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Figure 7. Polymorphic regions based on amino acid sequences at the *ND4L* gene locus in comparison between *Holstein* and *Cholistani* breeds

کلیستانی در جدول ۸ ارائه شده است. نسبت بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در جایگاه مذکور به ترتیب ۳۱/۷۵، ۳۱/۶۳، ۲۴/۸۳ و ۱۱/۷۹ درصد بودند.

جدول ۸- درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن *ND4L* در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی

Table 8. Percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of *ND4L* gene locus in *Holstein* and *Cholistani*

باز	A	T/U	C	G
A	-	.۰۱	.۰۱	۱۶/۷۶
T/U	.۰۱	-	۱۶/۷۶	.۰۰
C	.۰۱	۲۱/۳۵	-	.۰۰
G	۴۵/۰۹	.۰۱	.۰۱	-

*: نسبت جایگزینی از یک ردیف به سوتون می باشد. اعداد خارج قطر (ایالیک) جانشینی انتقالی را نشان می دهند.

درصد و پرمیدینی به پورینی .۰۱ درصد بودند. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی ۲۴۹۹ محسوبه شد.

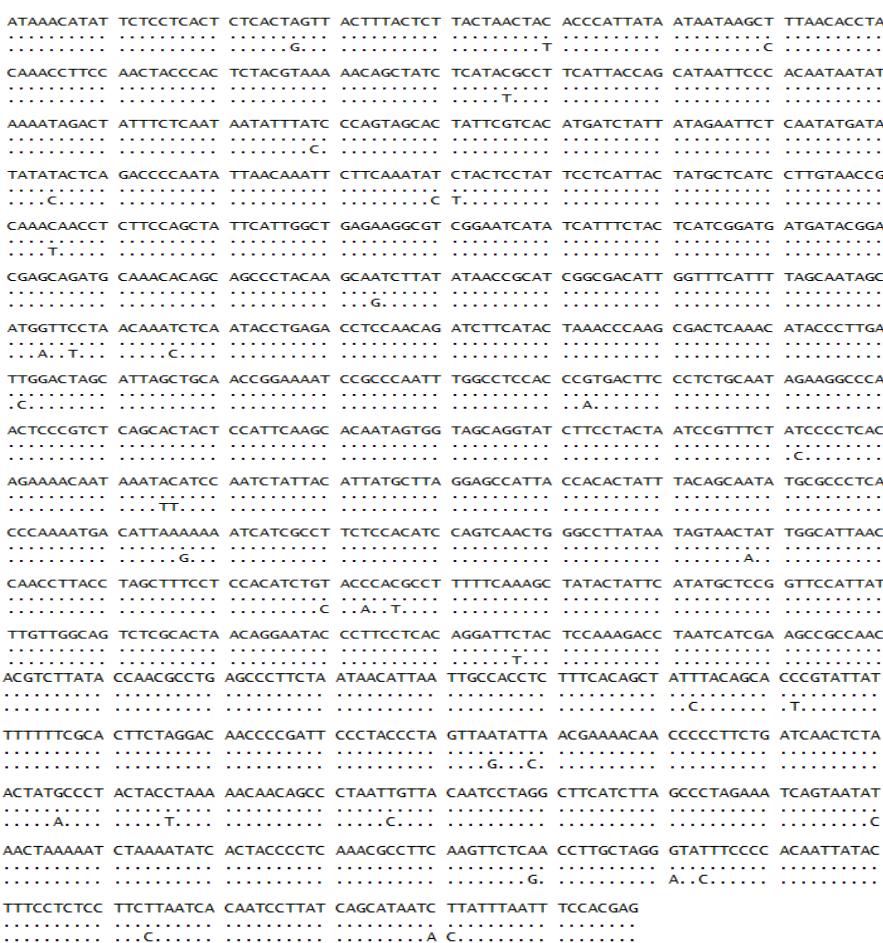
جایگزینی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جایگاه ژن *ND5*

مقایسه توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن *ND5* با ۱۸۱۸ جفت باز در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی مشتمل بر ۳۸ ناحیه چندشکلی و بر اساس توالی آمینواسیدی ۹ ناحیه چندشکلی را نشان داد (شکل های ۸ و ۹).

جایگزینی آمینواسیدی در جایگاه ژن *ND4L* شامل تبدیل ایزولوسین به میتوین بود. الگوی جایگزینی بازها در جایگاه ژن *ND4L* با طول ۲۹۴ جفت باز در دو نژاد هاشتاین و

جدول ۸- درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن *ND4L* در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی

نتایج حاصل از درصد جایگزینی در توالی های نوکلئوتیدی ژن *ND4L* نشان داد که مقدار بالای جایگزینی انتقالی مربوط به بازهای پورینی به میزان ۶۱/۸۵ درصد بود. بدین صورت که در بازهای پورینی تبدیل آدنین به گوانین ۱۶/۷۶ درصد و گوانین به آدنین ۴۵/۰۹ درصد بودند و مجموع جایگزینی انتقالی در بازهای پرمیدینی ۳۸/۱۱ درصد بود. در بازهای پرمیدینی میزان تبدیل تیمین به سیتوزین ۱۶/۷۶ درصد و سیتوزین به تیمین ۲۱/۳۵ درصد بودند. همچنین میزان جایگزینی تقاطعی بازهای پورینی به پرمیدینی ۰/۰۲



شکل ۸- ناحیه چندشکل بر اساس توالی های نوکلئوتیدی در جایگاه ژن *ND5* در مقایسه دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Figure 8. Polymorphic regions based on nucleotide sequences at the *ND5* gene locus in comparison between *Holstein* and *Cholistani* breeds

INIFSSLSLV TLLLLTTPII IIISFNTYKPS NYPLLYVKTAI SYAFITSIIP TIIIFIHSGQE LIISN^H^LT IQLTLKSLSF
.....I.....L.....
KIDYFSIIIFI PVALFVT^*SI IEFSI^*YIIS DPNIINKFFKY LLLLFLITMLI LVTANNFLQL FIG^*EGVGII SFLLIG^*YG
.....T.....
RADANTAALQ AILYNRIGDI GFILIAIAWFL TNLNT^*DLQQ IFILNPDSDN IPLIGLALAA TGKSQAQFLH P^*LPSAIEGP
.....V..... * .
TPVSALLHSS TIVVAGIFLL IRFYPLTEENN KYIQSITLCL GAITTLLFTAI CALTQNNDIKK IIAFSTSSQL GLIIVTIGIN
.....F.....
TSYTNA^*ALL ITLIATSFTA IYSTRIIFFA LLGQPRFPPTL VNINENNNPL INSIKRLLIG SLFAGYIISN NIPPTTIPOI
.....
TMPYYLKTIA LIVTILGFIL ALEISNITKN LKYHYPNSNAF KFSTLLLGYFP TIIHRLAAPYI NLSISQKSAS SLDDLI^*LEA
I..... .

شکل ۹- نواحی چندشکل بر اساس توالی های آمینو اسیدی در جایگاه زنی *ND5* در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 9. Polymorphic regions based on amino acid sequences at the *ND5* gene locus in comparison between *Holstein* and *Cholistani* breeds

جایگاه مذکور به ترتیب برابر با $\frac{27}{47}$, $\frac{32}{64}$, $\frac{3}{7}$ و $\frac{29}{37}$ درصد بودند.

الگوی جایگزینی بازها در جایگاه ژنی *ND5* با طول ۱۸۱۸ جفت باز در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی در جدول ۹ ارائه شده است. نسبت بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در

جدول ۹- درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن *ND5* در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Table 9. Percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of *ND5* gene locus in *Holstein* and *Cholistani*.

Holstein and Chontstant					
نام	A	T/U	C	G	
A	-	1/۳۷	1/۴۶		۸/۵۳
T/U	۱/۶۲	-	۲۸/۴۵		.۰۲
C	۱/۶۲	۲۶/۶۱	-		.۰۲
G	۲۶/۴۶	۱/۳۷	1/۴۶		-

*: نیست جایگزین، از یک (دیف به ستو)، م باشد. اعداد خارج قطر (اتالک) جهش، تقاطع، و اعداد روی قطر (بیر و نگ) جانشینی، انتقال، را نشان، م دهنده

بورینی ۲/۱۴ درصد بودند. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی ۴/۴۵ بود.

نتایج حاصل از درصد جایگزینی در توالی های نوکلئوتیدی زن *ND5* نشان داد که مقدار بالای جایگزینی انتقالی مربوط به بازهای پرمیدینی به میزان ۵۵/۰۶ درصد بود. بدین صورت که در بازهای پرمیدینی تبدیل سیتوزین به تیمین ۲۶/۶۱ درصد و تیمین به سیتوزین ۴۵/۲۸ درصد بودند. مجموع جانشینی انتقالی در بازهای پورینی ۹۹/۳۴ درصد بود که تبدیل آدنین به گوانین ۴۶/۲۶ و گوانین به آدنین ۵۳/۸ درصد را شامل می شد. همچنین میزان جایگزینی تقاطعی بازهای پورینی، به پرمیدین، ۸۳/۲ درصد و پرمیدینی، به

جايگزینی در توالی نوکلئوتیدی و آمينواسیدی جایگاه *ND6* ژن

مقایسه توالی‌های نوکلوتیدی جایگاه ژنی *ND6* با طول ۵۱۹ جفت باز در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی مشتمل بر ۹ ناجیه چندشکلی و بر اساس توالی آمینواسیدی ۳ ناجیه چندشکلی بود (شکل‌های ۱۰ و ۱۱).

_NC_006853.1:c14440-13913_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#_Btaurus_Jun_2014:_chrM
_NC_005971.1:c14443-13916_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

_NC_006853.1:c14440-13913_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#_Btaurus_Jun_2014:_chrM
_NC_005971.1:c14443-13916_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

_NC_006853.1:c14440-13913_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#_Btaurus_Jun_2014:_chrM
_NC_005971.1:c14443-13916_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

_NC_006853.1:c14440-13913_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#_Btaurus_Jun_2014:_chrM
_NC_005971.1:c14443-13916_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

_NC_006853.1:c14440-13913_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#_Btaurus_Jun_2014:_chrM
_NC_005971.1:c14443-13916_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

TATTCCTAACG GTTATTTCG TGATAGTTT TGTGGGGTTT TCTTCGAAAC CCTCACCTAT TTATGGGGGG TTAGGGT--
.....T.....T.....
TAATTTTGAG TGGTGGGGTTT GGCTGTGGAA TTGT-ATTGA ATTTTGGTGG ATCCTTTTG GGGTTGATGG TCTTTTTAAT
.....G.....
TTATTTGGGA GGATGATGG TAGTTTTTG TTATACAACG GCTATGGCTA CAGAACAGTA TCCTGAAATT TGGCTCTCA
.....G.....
ATAAGGCCTGT TTAGGGGCA TTGTGACTG GCTTGTGATG GGAGGT-CT TTATGGT-CT ATTATGTAT- -TAAAGGAT
.....-T.....-T.....G-.....
AAAGAAGTTG AGGTTGTGTT TGATGTTAAT GGTTTGGGG ATTGGTGTGAT TTATGATACA GGGGATTCTG GGTCCTTAG
.....A.....T.....

شکل ۱۰- نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی *ND6* در مقایسه دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Figure 10. Polymorphic regions based on nucleotide sequences at the *ND6* gene locus in comparison between *Holstein* and *Cholistani* breeds

```

#B_taurus_Jun_2014_:_chrM
#NC_006853_1:8290-8970_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#NC_005971_1:8293-8973_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

#B_taurus_Jun_2014_:_chrM
#NC_006853_1:8290-8970_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#NC_005971_1:8293-8973_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

#B_taurus_Jun_2014_:_chrM
#NC_006853_1:8290-8970_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome
#NC_005971_1:8293-8973_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome

```

MNENLFTSFI TPVILGLPLV TLIVLFPSSL FPTSNRLVSN RFVTLQQ⁸IL QLVSKQIMSI HNSKGQT⁹TL ILISLILFIG
.....A.....
STNLIGGLPH SFTPTTQLSI NLGIAITPL¹⁰A GAVITGFRNK TKASLAHFLP QGTPPLIPI LVIIETISLF IQPIALAVRL
.....V.....
TANITAGHLL IHLIGGATLA LISISTTAL ITFTILILLT ILEFAVAIQQ AYVFLLVSL YLHDNT
.....

شکل ۱۱- نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های آمینواسیدی در جایگاه ژنی *ND6* در مقایسه دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Figure 11. Polymorphic regions based on amino acid sequences at the *ND6* gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds

۱۰ ارائه شده است. نسبت بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در جایگاه مذکور به ترتیب برابر با ۲۱/۷۸، ۲۱/۴۶، ۸/۵۱ و ۸/۴۴ درصد بودند.

جایگزینی آمینواسیدی شامل تبدیل ترئونین به آلانین، ترئونین به والین و ایزوولوسین به والین بودند. الگوی جایگزینی بازها در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژنی *ND6* با طول ۵۲۵ جفت باز دو نژاد هاشتاین و کلیستانی در جدول

جدول ۱۰- درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن *ND6* در دو نژاد هاشتاین و کلیستانی
Table 10. Percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of *ND6* gene locus in Holstein and Cholistani

باز	A	T/U	C	G
A	-	.۰/۱	.۰/۰	۱۷/۳۶
T/U	.۰/۰	-	۱۱/۷۸	.۰/۰
C	.۰/۰	۵۷/۵۶	-	.۰/۰
G	۱۳/۲۶	.۰/۱	.۰/۰	-

*: نسبت جایگزینی از یک ردیف به ستون می‌باشد. اعداد خارج قطره‌ای (پر و نگ) جانشینی انتقالی را نشان می‌دهند.

بود. در بین ژن‌های میتوکندری، ژن *ND5* با ۳۸ ناحیه چندشکلی نوکلئوتیدی و ۹ تغییر آمینواسیدی در زنجیره پروتئینی بیشترین و جایگاه ژنی *ND6L* با ۹ جایگاه چندشکلی و سه تغییر آمینواسیدی کمترین نواحی چندشکلی را نشان دادند که این امر نشان دهنده این می‌باشد که شرایط محیطی و تغییرات تکاملی تا چه حدی بر میزان تغییرات و اختلافات ژنوم زیرگونه‌های مورد مطالعه مؤثر بوده و به طور کل مسیر بیوشیمیایی ژنوم را تا چه حد تحت تأثیر قرار داده است. همچنین، تفاوت‌های قابل توجهی در نسبت جایگزینی انتقالی و تقاطعی در جایگاه‌های مورد مطالعه مشاهده شد که بیشتر تغییرات مربوط به جانشینی انتقالی بودند و درصد جانشینی تقاطعی خیلی کم بود و این مسئله بیانگر پایداری تغییرات در ژنوم هست. نسبت تغییرات جایگزینی انتقالی به تقاطعی نیز در ژن *ND5* کمترین و در ژن *ND6* و *ND4L* بیشترین بود. بنابراین، دلیل ساختاری تفاوت بیان در بین جایگاه‌های ژنی میتوکندری می‌تواند عواملی مانند حذف و اضافه ژنوم، میزان نواحی چندشکلی و درصد پوشش ترانسکریپتومی باشد.

نتایج حاصل از درصد جایگزینی در توالی‌های نوکلئوتیدی ژن *ND6* نشان داد که مقدار بالای جانشینی انتقالی مربوط به بازهای پرمیدینی به میزان ۶۹/۳۴ درصد بود. بدین صورت که در بازهای پرمیدینی تبدیل سیتوزین به تیمین ۵۷/۵۶ درصد و تیمین به سیتوزین ۱۱/۷۸ درصد بودند. مجموع جانشینی انتقالی در بازهای پورینی ۳۰/۶۲ درصد محاسبه شد که میزان تبدیل آدنین به گوانین ۱۷/۳۶ درصد و گوانین به آدنین ۱۳/۲۶ درصد بودند. همچنان میزان جایگزینی تقاطعی بازهای پورینی به پرمیدینی ۰/۰ درصد و پرمیدینی به پورینی صفر درصد بودند. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی ۲۴۹۹ بود.

نتیجه‌گیری کلی بیشترین ناحیه و طول حذف در تمام ژن‌های میتوکندری در ژنوم هاشتاین و بیشترین طول و ناحیه اتصال مربوط به ژنوم کلیستانی بودند. نتایج بیانگر این بود که ژن‌های *ND3* و *ND4* به ترتیب با طول ۱۳۷۸ و ۱۳۴۶ جفت باز، بیشترین سطح پوشش ترانسکریپتومی در ژنوم میتوکندری را در بین دو نژاد هاشتاین و کلیستانی دارا بودند و کمترین سطح پوشش ترانسکریپتومی مربوط به ژن *ND6* با طول ۵۲۵ جفت باز

منابع

1. Banabazi, M.H., M. Ghaderi-Zefrehei, I. Imumorin and S. Peters. 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 pp, San Diego, United States.
2. Bao, H., C. Zhao, L. Zhang, J. Li and C. Wu. 2008. Single-nucleotide polymorphisms of mitochondrial-coded subunit genes of cytochrome c oxidase in five chicken breeds: Full-Length Research Paper. DNA Sequence, 19(5): 461-464.
3. Barazandeh, A., M.R. Mohammadabadi, M. Ghaderi-Zefrehei, F. Rafeied and I.G. Imumorin. 2019. Whole genome comparative analysis of CpG islands in camelid and other mammalian genomes. Mammalian Biology, 98: 73-79.
4. Bradley, D.G., D.E. MacHugh, P. Cunningham and R.T. Loftus. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. Proc. Natl Acad. Science, 93: 5131-5135.
5. Cai, X., H. Chen, C. Lei, S. Wang, K. Xue and B. Zhang. 2007. mtDNA diversity and genetic lineages of eighteen cattle breeds from *Bos taurus* and *Bos indicus* in China. Genetica, 131(2): 175-183.
6. Chen, Y.F., C.H. Kao, Y.T. Chen, C.H. Wang, C.Y. Wu, C.Y. Tsai, F.C. Liu, C.W. Yang, Y.H. Wei, M.T. Hsu, S.F. Tsai and T.F. Tsai. 2009. Cisd2 deficiency drives premature aging and causes mitochondria-mediated defects in mice. Genes & Development, 23(10): 1183-1194.
7. Cloonan, N., A.R. Forrest, G. Kolle, B.B.A. Gardiner, G.J. Faulkner, M.K. Brown, D.F. Taylor, A.L. Steptoe, S. Wani, G. Bethel, A.J. Robertson, A.C. Perkins, S.J. Bruce, C.C. Lee, S.S. Ranade, H.E. Peckham, J.M. Manning, K.J. McKernan and S.M. Grimmond. 2008. Stem cell transcriptome profiling via massivescale mRNA sequencing. Nature Methods, 5: 613-619.
8. Cooper, G.M. and R.E. Hausman. 2007. The cell: a molecular approach. 4th edition Washigton, D.C., Sunderland, Mass., ASM Press.
9. Faure, E. and J.P. Casanova. 2006. Comparison of chaetognath mitochondrial genomes and phylogenetical implications. Mitochondrion, 6(5): 258-262.
10. Freese, N.H., D.C. Norris and A.E. Loraine. 2016. Integrated genome browser: Visual analytics platform for genomics. Bioinformatics, 32(14): 2089-2095.
11. Fries, R. and A. Ruvinsky. 1999. The Genetics of Cattle. New York: CABI Publising.
12. Gray, M.W. 2012. Mitochondrial evolution. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(9): a011403.
13. Hanotte, O. and H. Jianlin. 2005. Genetic characterization of livestock populations and its use in conservation decision-making. Villa Gualino, Turin, Italy—5-7 March, 131-136.
14. Helmer, D., L. Gourichon, H. Monchot, J. Peters and M. Segui. 2005. Identifying early domestic cattle from Pre-Pottery Neolithic sites on the Midddle Euphratesusing sexual dimorphism. In The first steps of animal domestication: new archaeozoological approaches (eds J.-D. Vigne, D. Helmer & J. Peters), 86-95 pp. Oxford, UK: Oxbow Books.
15. Huang, W., A. Nadeem, B. Zhang, M. Babar, M. Soller and H. Khatib. 2012. Characterization and comparison of the leukocyte transcriptomes of three cattle breeds. PLoS One, 7(1): e30244.
16. Kujoth, G.C., P.C. Bradshaw, S. Haroon and T.A. Prolla. 2007. The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. PLoS Genetics, 3(2): e24.
17. Lee, D.J. and C.P. Hong. 2019. Transcriptome atlas by long-read RNA sequencing: Contribution to a reference transcriptome, transcriptome analysis, Miroslav Blumenberg, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.84920. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/65985>
18. Lenstra, J.A. and D.G. Bradley. 1999. Systematics and phylogeny of cattle. In: Fries, R., A. Ruvinsky (eds) The Genetics of Cattle, CAB Int: Wallingford, 1-14 pp.
19. Levin, J., X. Adiconis, M. Yassour, D. Thompson, M. Guttman, M. Berger and A. Regev. 2010. Development and evaluation of RNA-Seq methods. Genome Biology, 11(Suppl 1): 1-1.
20. Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Journal of Bioinformatics, 25: 1451-1452.
21. Loftus, R.T., D.E. MacHugh, D.G. Bradley, P.M. Sharp and P. Cunningham. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. Proc. National Academy of Sciences, 91: 2757-2761.
22. Mannen, H., M. Kohno, Y. Nagata, S. Tsuji, D.G. Bradley, J.S. Yeo, D. Nyamsamba, Y. Zagdsuren, M. Yokohama, K. Nomura and T. Amano. 2004. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in north eastern Asian cattle. Molecular Phylogenetic Evolution, 32: 539-544.
23. Marguerat, S. and A. Bähler. 2010. RNA-seq: from technology to biology. Cellular and Molecular Life Sciences, 67(4): 569-579.
24. Moradian, H., A.K. Esmailizadeh, M. Asadi and M.R. Mohammadabadi. 2019. Whole genome detection of recent selection signatures in Sarabi cattle: a unique Iranian taurine breed. Genes & Genomics, 96(11): 1-13.
25. Salimpour, M. 2016. Differential gene expression analysis between the *Holstein* and *Cholistani* (a Pakistani breed) population using RNA sequencing (RNA-seq). University of Tehran, IRAN.

26. Salimpour, M., S.R. Miraei-Ashtiani and M.H. Banabazi. 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).
27. Tamura, K. and M. Nei. 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.
28. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12): 2725-2729.
29. Tang, F., C. Barbacioru, Y. Wang, E. Nordman, C. Lee, N. Xu, X. Wang, J. Bodeau, B.B. Tuch, A.K. SiddiquiLao and and M.A. Surani. 2009. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. Nature Methods, 6(5): 377.
30. Troy, C.S., D.E. MacHugh, J.F. Bailey, D.A. Magee, R.T. Loftus, P. Cunningham, A.T. Chamberlain, B.C. Sykes and D. G. Bradley. 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. Nature, 410: 1088-1091.

Bioinformatics Study of mtDNA Genes in Two Subspecies of *Holstein* (*Bos taurus*) and *Cholistani* (*Bos indicus*) Cattle Using RNA-Seq Data

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

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

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

3- Assistant Professor, 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 Genetic, Department of Animal Science and Bioinformatic, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: 6 August, 2021

Accepted: 11 September, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: The advent of the new generation of transcriptome sequencing has helped to improve the overall accuracy of different gene expression predictions using short RNA-Seq sequences. This technology can provide a more comprehensive view of functional genomics in many species with a unique gene sequence. The aim of this study was to investigate the structural reasons for different expression of mitochondrial genes in two subspecies of *Holstein* and *Cholistani* cattle, including *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* and *ND6* genes, which are involved in important processes such as energy metabolism against stress. Biological and non-biological as well as disease resistance are involved.

Material and Methods: In this study, RNA-Seq data were used to integrate 40 samples from the University of Wisconsin Dairy Cattle Center (*Bos taurus*) and 45 Christian cows (*Bos indicus*) at the Gujaratpir farm in Bahawalpur, Punjab, Pakistan. IGB, MEGA6 and DnaSPV.5 software were used to investigate the level of transcriptome coverage and genetic differences among the five mitochondrial genes, which included polymorphic regions, deletion and addition regions, binding regions and the percentage of transitional and transversional nucleotide substitutions.

Results: The highest deletion region and length in all studied genes was related to *Holstein* genome and the highest length and binding region was related to *Cholistani* cattle. The highest number of deletions in *Holstein* and *Cleistian* cows were related to *ND4* gene with 74 and 66 points, respectively, and the lowest deletions were related to *ND4L* with 9 and 4 deletion sites, respectively. The *ND4* and *ND4L* genes had no binding regions, but the *ND5* and *ND6* genes in the *Holstein* and *Cleistian* breeds with 1 and 2 binding regions increased the genome by 11 and 22 bp, respectively. The highest level of transcriptome coverage was observed in *ND3* and *ND4* genes and the lowest level was observed in *ND6* gene locus. The number of polymorphic regions in *ND5* locus was more than other genes and equal to 38 polymorphic regions. The results also showed that the percentage of transitional substitution in bases is higher than transversional substitution which can be the reason for the stability of changes during evolution. Therefore, some of the structural reasons for mitochondrial genes that were expressed differently in both *Holstein* and *Cholistani* subspecies could be related to deletion and addition, polymorphic regions, transcriptome coverage level, and type and amount of transitional and intersecting substitutions during the evolution of the two subspecies.

Conclusion: Intense selection for milk production in *Holstein* cows compared to the *Cholistani* breed has led to a reduction in the length of the mitochondrial genome and changes in the nucleotide structure of some mitochondrial genes, resulting in altered gene expression and different responses to different environmental conditions.

Keywords: Addition and deletion, *Cholistani*, Gene Expression, *Holstein*, Transcriptome Coverage