زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۹۳-۸۳

مقاله پژوهشی

تجزیه و تحلیل مولکولی جمعیتی از بز نجدی با استفاده از توالی HVR1 ژنوم میتوکندری

روح‌الله خادمی[۱]، سیده ام‌البنین قاسمیان*[۲]، حمیدرضا سیدآبادی[۳]، امین کاظمی‌زاده[٤]

۱- گروه علوم دامی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران

۲- گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران

۳- موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

٤- بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، خرم آباد، ایران

* مسئول مکاتبات: ghasemian1249@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۱

DOI: 10.22034/ascij.2023.1999044.1550

چکیده

این مطالعه با هدف تعیین توالی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری بز نجدی انجام گرفت. برای انجام این تحقیق تعداد ۳۰ عدد نمونه خون از هر دو جنس از بزهای غیر خویشاوند جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، ناحیه مورد نظر توسط پرایمرهای اختصاصی با تکنیک PCR تکثیر شد و تعیین توالی شد. برای مقایسه، فیلوژنی توالی ناحیه HVR1 بدست آمده از بز نجدی با سایر نژادها در جهان برای تعیین گروه هاپلوتیپی رسم گردید. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای نمونه‌ها نشان داد که همگی از یک جمعیت منشأ گرفته‌اند و تعداد ۵ هاپلوتیپ مختلف بر اساس ۲۰ نوکلئوتید چند شکل (SNP) برای ناحیه HVR1 موجود در توالی‌ها تعیین گردید. همچنین توالی ناحیه HVR1 نمونه مورد بررسی با ۱۱ توالی ثبت شده از ٦ گروه هاپلوتیپی از کشورهای مختلف موجود در پایگاه NCBI نشان داد که بز نجدی جز گروه هاپلوتیپی A می باشد. مقایسه توالی ناحیه HVR1 با توالی‌های موجود در بانک ژن می‌تواند به اطلاعات ما درباره نژادهای بز نجدی کمک کند و زمینه را برای استفاده بهتر از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی باز کند. بر اساس نتایج بدست آمده تنوع ژنتیکی بز نجدی در طی سال‌های متمادی افزایش یافته است، که این افزایش تنوع ژنتیکی می‌تواند به دلیل آمیخته‌گری این نژاد با نژادهای دیگر باشد که می‌تواند در آینده منجر به انقراض بز نجدی گردد، که نیازمند توجه بیشتر به این موضوع می‌باشد.

کلمات کلیدی: ژنوم میتوکندری، ناحیه HVR1 ، تعیین توالی، فیلوژنی، بز نجدی.

مقدمه

نژادهای بومی به عنوان سرمایه ملی و محصول استراتژیک هستند و حفظ آنها بسیار ضروری است. شناخت دقیق این ذخایر ژنتیکی می‌تواند مبنای دقیق‌تری برای برنامه‌های اصلاح نژادی در آینده و به نتیجه رسیدن در زمان کوتاه‌تر و استفاده بهینه از منابع موجود در جهت تولید بیشتر گردد (۲). بز نجدی یکی از نژادهای بومی غرب و جنوب غربی ایران است. بز نجدی یک نژاد دو منظوره شیری و گوشتی است که تولید اصلی آن شیر است. این نژاد دو بار در سال زایش دارد و اغلب زایش‌ها با دوقلوزایی توأم است (۳). بز نجدی برای قرن‌ها نقش مهمی در تامین منابع غذایی

مردمان سرزمین فلات ایران بر عهده داشته است. بنابراین شناخت دقیق این نژاد برای حفظ و تکثیر آن بسیاری ضروری است (۱۸). حفاظت ژنتیکی از یک گونه خاص باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی آن نژاد باشد، بنابراین تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی از اهمیت زیادی برخوردار است. یکی از راه‌های شناسایی این نژاد استفاده از ژنوم میتوکندری است. میتوکندری اندامکی سیتوپلاسمی است که در بیشتر سلول‌های بدن وجود دارند. این اندامک که قادر به تولید انرژی برای سلول است، که دارای DNA حلقوی اختصاصی و مستقل از DNA هسته‌ای است. DNA میتوکندری در گونه‌های جانوری ۳۷ ژن را کد می‌کند که شامل ۱۳ ژن کدکننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کد کننده tRNA و ۲ ژن کد کننده rRNA است و طول تقریبی آن ۱۶ کیلو جفت باز می‌باشد (۱۱). ژنوم میتوکندری به دلیل داشتن ویژگی‌هایی از جمله عدم نوترکیبی، تعداد کپی بالا، نرخ جایگزینی بالا و وراثت مادری، یک ابزار قدرتمند در تکامل می‌باشد (۷). پیشرفت‌های ایجاد شده در حوزه بیولوژی مولکولی این امکان را به وجود آورده که از طریق نشانگرهای ژنتیکی در سطح مولکول DNA، ژن‌های مسئول ایجاد تفاوت ژنتیکی بین افراد و جمعیت‌ها تعیین شوند. در بین نشانگرهای ژنتیکی، توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از بهترین و رایج-ترین روش‌ها برای طبقه‌بندی ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم، تشخیص هویت، بررسی امکان اشتقاق گونه‌های مختلف از یک جد مشترک، مطالعه رابطه فیلوژنی هر موجود با سایر گونه‌ها و نژادها و دست‌یابی به راه‌کارهایی برای حفظ ذخایر ژنتیکی می‌باشد (٦). همچنین از ژنوم میتوکندری می‌توان برای تشخیص هم‌زمان گونه‌های مختلف گوشت مثل گاو، گاو میش، گوسفند و بز در مخلوط گوشت استفاده نمود (۱). حدود دو دهه است که از ژنوم میتوکندری، به دلیل نرخ جهش بالا و سیر تکاملی ۵ تا ۱۰ برابری نسبت به ژنوم سلولی به عنوان مارکر مولکولی در ژنتیک جمعیت استفاده می‌شود. بخشی از ژنوم میتوکندری، منطقه (Displacemen- D-Loop loop) منطقه آغاز همانندسازی ژنوم میتوکندری است. این ناحیه به دلیل اینکه ژن رمزکننده پروتئین ندارد، جهش در آن تجمع می‌یابد. همچنین از آنجایی که این ناحیه در کنترل رونویسی نقش مهمی ندارد، جهش‌های صورت گرفته در آن ابقاء می‌شوند و بدون تغییر به نسل‌های بعد منتقل می‌شوند. منطقه D-Loop دارای دو ناحیه بسیار متغیر HVR1 و HVR2 است (۱۵). از آنجایی که در ناحیه HVR1 میزان بروز تنوع نسبت به سایر قسمت‌های دیگر ژنوم میتوکندری بالاتری است، بسیاری از مطالعات در این ناحیه صورت گرفته است (۹، ۱۵، ۱۹). مطالعه‌ای بر روی ناحیه HVR1 بزهای آلبانی نشان داد که تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی این ناحیه در درون جمعیت ۹۸/۷ درصد و بین جمعیت‌ها ۱/۳ درصد می‌باشد (۸). همچنین تجزیه واریانس ملکولی ناحیه ژنوم میتوکندری تعدادی از بزهای بومی ایران نشان داد که بیشترین تغییرات ژنتیکی ناحیه HVR1 مربوط به درون جمعیت‌هاست و تنها ۳/۰۸ درصد تغییرات در بین جمعیت‌ها مشاهده می‌شود (۱۷). بنابراین شناسایی توالی این ناحیه به عنوان مشخصه ژنتیکی ثابت محسوب می‌شود و به تهیه شناسنامه ژنتیکی و نگه‌داری خلوص نژادهای بومی کمک می‌کند و با مقایسه گونه‌ها و نژادهای دیگر که در سال‌های مختلف مطالعه شده است و توالی آن‌ها در بانک ژن موجود است، امکان مطالعات فیلوژنتیکی، بررسی اشتقاق گونه‌ها و فاصله نسلی را فراهم می‌کند. از طرفی توالی‌یابی این مناطق شاخص مناسبی را از میزان تنوع موجود در جمعیت ارائه می‌دهد و امکان تشخیص گونه‌ها و نژادها را فراهم می‌کند و به حفظ گونه‌های بومی از خطر انقراض و اختلاط ژنتیکی با سایر نژادها کمک می‌کند (١٤). بنابراین این مطالعه با هدف تعیین توالی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری برای تعیین ساختار ژنتیکی، رابطه فیلوژنتیکی و بررسی انشقاق جمعیت‌ها در بز نجدی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از تعداد ۳۰ رأس بز نجدی موجود در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد مستقر در استان خوزستان نمونه‌گیری صورت گرفت. نمونه‌های خون به مقدار ۵ میلی‌لیتر از سیاهرگ وداج گردنی، در تیوب‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA اخذ و بلافاصله به آزمایشگاه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور انتقال و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰C°- نگه‌داری شدند. استخراج DNA از خون کامل با استفاده از روش اصلاح شده نمکی (۱۲) صورت گرفت. الکتروفورز برای آگاهی از حضور یا عدم حضور DNA در محلول استخراج شده و بررسی کیفیت DNA استفاده شد. در این روش DNA استخراج شده را بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید ران شد و سپس به مدت ۱/۵ ساعت با ولتاژ۱۰۰ میلی ولت در کنار یک DNA استاندارد (λDNA) الکتروفورز شد. با مشاهده درخشندگی و حجم باند ایجاد شده در مقایسه با DNA استاندارد (λDNA) که دارای غلظت مشخصی است، کیفیت DNA را مشخص کردیم. در مرحله بعد با استفاد از دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ ۱۰۰۰MD- جذب نمونه‌ها در موج‌های ۲۶۰ نانومتر (A260) و ۲۸۰ نانومتر (A280) اندازه‌گیری گردید، و کمیت DNA استخراج شده مشخص شد، که این نسبت در محدوده ۲ – ۱/۸ برای DNA ایده‌آل می‌باشد. سپس نمونه‌های DNA در غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد و در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. برای انجام واکنش PCR از بافر PCR در غلظت ۱۰X که شامل KCL (۵۰۰mM) و Tris-HCL (۲۰۰mM) با pH= ۸/٤ می‌باشد و برای فعالیت از آنزیم Taq پلیمراز استفاده شد. جهت بررسی صحت PCR محصول بدست آمده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ران گردید. پرایمرهای اختصاصی برای انجام PCR برای توالی ژن HVR1 از mtDNA با استفاده از نرم افزار Primer premier 5 (Premier Biosoft, USA) و ژنوم کامل میتوکندری بز اهلی (شماره دسترسی KR866125.1) صورت گرفت (جدول ۱). پس از الکترفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز و اطمینان از عدم وجود باند غیر اختصاصی، شکستگی و داشتن اندازه مورد نظر، نمونه‌ها جهت حذف قطعات کوچک DNA و پرایمر دایمر احتمالی تخلیص شدند. به این منظور از کیت خالص‌سازی NucleoSpin Extract II محصول شرکت Macherey-Nagel MN آلمان که برای خالص‌سازی DNA از ژل آگارز TAE/TBE و محصولات مستقیم PCR طراحی شده است، استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر(٤۰۰ نانوگرم) از محصولات PCR خالص‌سازی شده به همراه ۲۰ میکرولیتر(۳۰ پیکو مول) از هر یک از رشته‌های آغازگر رفت یا برگشت مورد استفاده در PCR به ازای هر نمونه در تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به طور جداگانه برای هر نمونه جهت توالی‌یابی به کره جنوبی فرستاده شد و با سرویس Value Read به طور اتوماتیک توالی‌یابی شد. جهت توالی‌یابی در دو رشته سمت ´۵ به ´۳ توسط پرایمر مستقیم از رشته پیش‌رو و توسط پرایمر معکوس از رشته پیرو است. به همین دلیل توالی‌های حاصل از پرایمر معکوس باید مکمل‌سازی شوند تا هر دو رشته به درستی زیر هم چیده شوند. توالی‌یابی به روش کاملا اتوماتیک انجام گرفت. در کل ۳۰ نمونه توالی‌یابی گردید. توالی‌ها با ۳ فرمت متفاوت (ab1, pdf, seq) و توسط پست الکترونیک از کره جنوبی دریافت گردید. کیفیت توالی‌یابی مناسب بود و موارد خوانش نشده تنها در ابتدای توالی که محل اتصال پرایمر است و معمولا به‌دلیل اتصال پرایمر خوانش نمی‌شود مشاهده شد. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از برنامه Chromas Lite 2.01 تجزیه و تحلیل گردید. جهت تعیین بالاترین همولوژی توالی بز نجدی از رویه Blast تحت پایگاه NCBI استفاده شد. مقایسه توالی‌ها و هم‌ردیف کردن آن‌ها با استفاده از رویه ClastalW صورت گرفت. توالیConsensus برای بز نجدی با استفاده از برنامه نرم افزاری Bioedit تعیین شد و این توالی توسط برنامه Sequin پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید. جهت رسم

نمودار فیلوژنی از روش Neighbor- joining نرم افزار MEGA5 استفاده شد و برای مقایسات فیلوژنی توالی ناحیه HVR1، یک فیلوژنی با توالی بز نجدی با سایر نژادها در جهان برای تعیین گروه هاپلوتیپی رسم گردید.

جدول ۱- توالی‌های پرایمر مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR

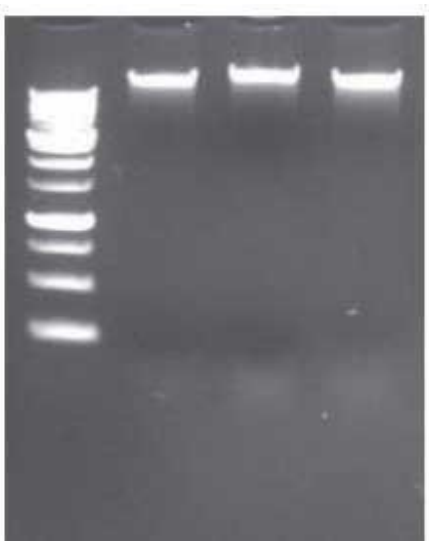
Gene	Primer	Sequences (5'→3')
HVR1	Forward	ACTCCACAAGCCTACAGA
	Reverse	GGAAAGGTGGAGCGGATG

نتایج

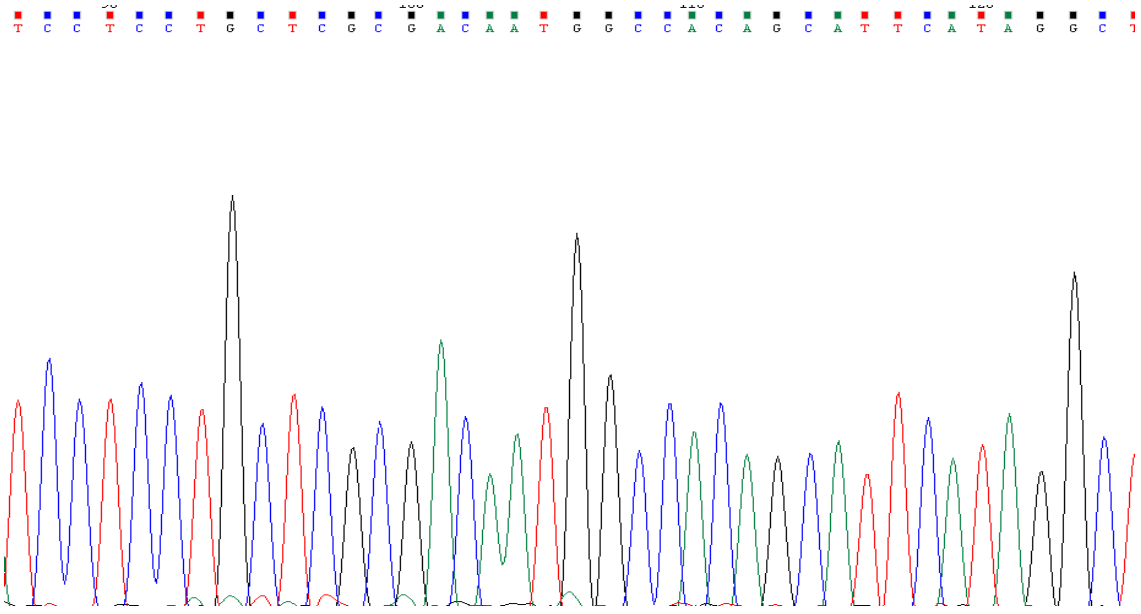
استخراج DNA از خون در تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. الکتروفورز تمام نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان دهنده باندهای کاملا شفاف و روشن، فاقد شکستگی و بدون کشیدگی در اثر آلودگی با نمک یا RNA بودند. هم‌چنین شفاف و متراکم بودن باندها بیانگر غلظت بالای DNA می‌باشد این امر نشان دهنده موفقیت این روش در استخراج DNA از خون کامل در بز نجدی می‌باشد (شکل ۱). همچنین نتایج نورسنجی با دستگاه اسپکتوفتومتری نانودراپ نشان داد که DNA استخراج شده از خون بز نجدی دارای کیفیت و کمیت مناسبی است. توالی‌یابی به روش کاملا اتوماتیک انجام گرفت. در شکل ۲، توالی‌های خوانش شده با فرمت ABI به صوت منحنی و قله‌های رنگی نشان داده شده است (شکل ۲). به منظور توالی یابی، همه نمونه‌ها توسط رویه ClustalW نرم افزاز BioEdit هم‌ردیف شدند. همان‌طور که در بخشی از توالی‌های هم‌ردیف شده در شکل ۳ مشاهده می‌شود پس از هم‌ردیف کردن نمونه‌ها قسمت‌های مشترک بین همه نمونه‌ها را با علامت " . " مشخص شدند و قسمت‌های متفاوت با نام نوکلئوتید در آن جایگاه مشخص تعیین گردیدند. نتایج نشان داد هم‌ریف شدن قطعات مورد آنالیز به خوبی صورت گرفته است و نمونه‌ها در سطح ۱۰۰ درصد با هم هم‌پوشانی داشتند. همچنین نتایج نورسنجی با دستگاه اسپکتوفتومتری نانودراپ نشان داد که DNA استخراج شده از خون بز نجدی دارای کیفیت و کمیت مناسبی است. توالی‌یابی به روش کاملا اتوماتیک انجام گرفت. در شکل ۲، توالی‌های خوانش شده با فرمت ABI به صوت منحنی و قله‌های رنگی نشان داده شده است (شکل ۲). نتایج حاصل از هم‌ریف کردن توالی‌های ناحیه HVRI بز نجدی، که گویای نوکلئوتیدهای متفاوت در یک جایگاه مشخص برای تمام جایگاه‌های متفاوت پس از هم‌ردیف کردن نمونه‌ها است در جدول ۲ آورده شده است. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود ۵ هاپلوتیپ در بین ۳۰ نمونه دیده می‌شود و در بین هاپلوتیپ‌ها ۲۰ جایگاه SNPs وجود دارد. به منظور تعیین توالیConsensus، نمونه‌های هم‌ردیف شده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و توالی Consensus به صورت شکل ٤ با طول تقریبا ۸۳۰ جفت باز به عنوان توالی شاخص برای این نژاد به‌دست آمد. آنالیزها به کمک روش Composition برنامه BioEdit نشان داد، این توالی برای ناحیه HVR1 شامل ۲٦۸ نوکلئوتید A، ۲۲٤ نوکلئوتید C، ۱٤۳ نوکلئوتید G و ۲٦٤ نوکلئوتید T می‌باشد. که نسبت C+G ۳۹/۲ درصد و A+T ٥٦/٦٤ درصد است و وزن مولکولی یک رشته از این توالی ۲۸٥۳٥۸ دالتون و وزن مولکولی دو رشته آن ٥٦۷٦۰٤ دالتون می‌باشد. تعدادی توالی HVR1 ژنوم میتوکندریایی بز از کشورهای مختلف که با نواحی مورد مطالعه هم‌پوشانی داشتند از پایگاه NCBI دریافت و تحت رویه Clustal برنامه MEGA5 با توالی‌های به‌دست آمده در این مطالعه هم‌ردیف‌سازی شدند. مقایسه توالی HVR1 با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI تحت فرآیند BLAST نشان داد، که طی این فرآیند فواصل ژنتیکی بین توالی گونه‌های مورد مطالعه که به وسیله نرم‌افزار CLC Workbench 5 محاسبه گردید، به میزان ۹۸ درصد بیشترین هم‌پوشانی را داشته‌اند. درخت فواصل ژنتیکی در شکل ٥ نشان داده شده است.

جدول۲- نوکلئوتیدهای متفاوت در بین نمونه‌های توالی‌یابی شده و تعیین هاپلوتیپ‌های مختلف ناحیه HVR1

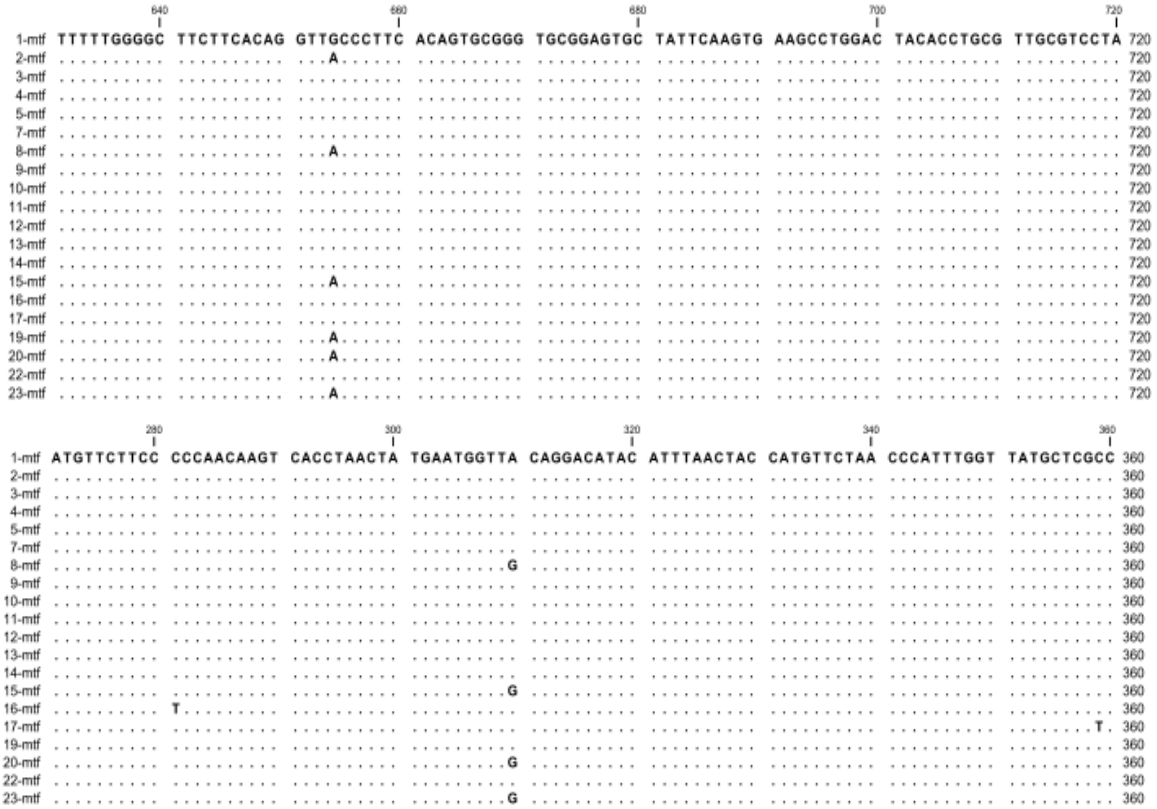
haplotype	Frequency of 30	Position																			
		189	247	324	346	366	387	409	411	415	422	424	442	447	458	492	473	487	591	668	876
1	8	A	T	C	G	T	T	G	C	C	T	G	T	T	C	A	C	T	C	C	G
2	2	G	C	T	A	C	C	A	T	C	C	G	T	T	C	G	T	T	C	T	G
3	7	G	T	T	A	T	C	G	T	T	T	G	T	C	T	A	C	C	C	C	A
4	6	G	T	C	A	T	T	G	T	T	C	A	C	T	C	A	C	C	T	C	A
5	7	G	T	C	A	T	T	G	T	C	C	G	T	T	C	A	C	T	C	C	A



شکل ۱- نمونه‌های DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد

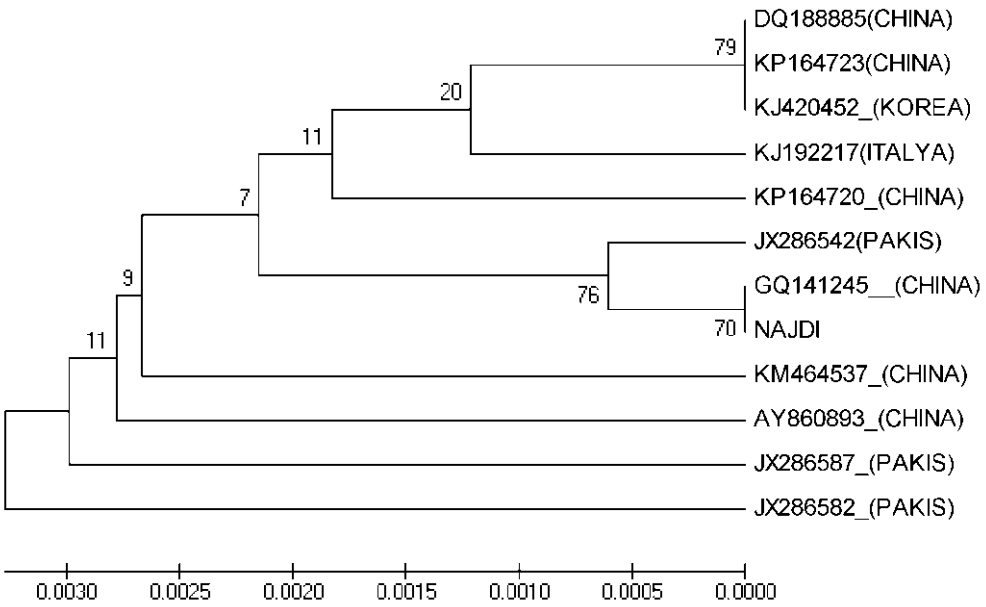


شکل ۲- بررسی صحت توالی‌یابی نمونه‌ها



شکل۳- توالی‌های هم‌ردیف شده برای تعیین جایگاه نوکلئوتیدهای متفاوت در نمونه‌ها

شکل ٤- توالی Consensus شده برای ناحیه HVRI



شکل۵- مقایسه توالی Consensus به دست آمده برای ناحیه HVR1 با توالی‌های موجود در NCBI

بحث

لازمه تنوع ژنتیکی انجام برنامه اصلاح نژادی در حیوانات هر منطقه می‌باشد. در نتیجه حفاظت از تنوع ژنتیکی هر منطقه عامل کلیدی حفاظت از حیات گونه آن منطقه در طولانی مدت می‌باشد. همچنین بررسی وضعیت تکاملی جمعیت‌ها نیازمند شناخت صحیح ساختار ژنتیکی آن جمعیت را دارد. از سوی دیگر شناسایی ساختار جمعیت‌ها در جهت توسعه برنامه‌های حفاظتی و مدیریت پایدار منابع ژنتیکی اهمیت دارد (۱۹). روحی پور و همکاران میزان تنوع هاپلوتیپی را در جمعت بزهای عدنی ۰/۵۷ برآورد کردند (۱۶). در مطالعه‌ای دیگر شریعت و همکاران (۱۷) میزان تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتیپی بر حسب جفت باز در جمعیت بزهای بومی ایران را به ترتیب ۰/۰۲۹۲۹ و ۱ گزارش کردند. که نتایج بدست آمده نشان دهنده میزان تنوع بسیار بالا و عدم وجود مناطق محافظت شده در ناحیه HVR1 می‌باشد (۱۷). بررسی ساختار ژنتیکی بز خلخالی نشان داد که تعداد کل جهش ۶۲، تعداد هاپلوتایپ ۳۷، تنوع هاپلوتیپی ۰/۸۳۴ می‌باشد (۱۰). نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که در ژنوم میتوکندری بز نجدی ۵ هاپلوتیپ و ۲۰ جایگاه چند شکل وجود دارد. از آنجایی که تعداد جایگاه‌های چند شکل وابسته به تعداد نمونه هستند، بنابراین در بعضی از مطالعات از پارامتر تنوع نوکلئوتیدی (π) یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید نیز استفاده شده است، که تحت تاثیر طول DNA و اندازه نمونه نیست. بر همین اساس تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۱۴۲۷ درصدی حاصل شد که در محدوده متوسط تنوع نوکلئوتیدی در یوکاریوت‌ها که بین ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۱۹ می‌باشد قرار گرفت (۴). همچنین تنوع هاپلوتیپی بدست آمده در جمعیت مورد مطالعه ۰/۹۸۹ بدست آمد که این نتایج بیانگر تنوع ژنتیکی بالای بز نجدی می‌باشد. تجزیه و تحلیل DNA میتوکندری در ۴۴۳ بز هندی، ۳۴۱ هاپلوتیپ متمایز متعلق به چهار هاپلوگروپ مادری A، B، C و D را نشان داد. هاپلوگروه A در ۹۰ درصد بزها مشاهده شده است، همچنین شاخص‌های هاپلوتیپ و تنوع نوکلئوتیدی بزهای هندی به ترتیب ۰/۹۹۸ و ۰/۰۲۸ بود که نشان دهنده تنوع ژنتیکی فراوان است (۵). با این حال، دقیق‌ترین تجزیه و تحلیل تنوع DNA میتوکندریایی بزها توسط

نادری و همکاران انجام شده است. آن‌ها چشم انداز کاملی از تنوع ژنتیکی بز را در سراسر جهان ارائه کردند و ٦ هاپلوگروپ میتوکندری (A، B، C، D، F و G) را در بزهای اهلی شناسایی کردند. همچنین ۲۲ هاپلوتیپ را شناسایی کردند که نماینده این ٦ هاپلوگروپ هستند و می‌توانند توسط محققان برای شناسایی هاپلوگروه‌های جدید یا طبقه بندی هاپلوتیپ‌های جدید بز به هاپلوگروه‌های موجود استفاده شوند (۱۳). با مقایسه توالیD-Loop نژاد افشاری با توالی‌های مربوط به این شش گروه هاپلوتایپی به عنوان توالی‌های مرجع، و همچنین ۵ توالی دیگر مربوط به ژنوم میتوکندری نژادهای مختلف بز از سراسر جهان می‌توان موقعیت این نژاد در بین نژادهای دیگر را تعیین نمود و در نهایت برخی تغییرات در خصوصیات مورفولوژیکی نژادها را توجیه نمود. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود بز نجدی و بزهای پاکستانی و چینی در یک گروه قرار دارند. در تحقیقات گذشته نیز بزهای نژاد پاکستانی و هندی در هاپلوگروپ A قرار داشتند که این گزارش نیز می‌تواند قرار گرفتن بز نجدی در گروه هاپلوتایپی A را توجیه کند. ارتباط تکاملی بین موجودات به وسیله درخت فیلوژنتیک نمایش داده می‌شود. از آن‌جا که تکامل در طول دوره‌های زمانی طولانی به طور مستقیم قابل مشاهده نیست، زیست‌شناسان باید فیلوژنی‌ها را با استنباط روابط تکاملی میان جانداران امروزی بازسازی کنند. امروزه، داده‌های مولکولی، شامل پروتئین و رشته‌های DNA، برای تشخیص روابط تبارزایی و ساخت درخت‌های فیلوژنتیک استفاده می‌شوند. شریعت و همکاران نتایج حاصل از درخت فیلوژنی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 در بز بومی ایران را به دو شاخه اصلی و تعداد ۷ زیر شاخه فرعی معرفی نمودند (۱۷). همچنین کریمی و همکاران براساس آنالیز فیلوژنی بزهای ایرانی عنوان کردند که این بزها به یکدیگر نزدیکی بیشتری دارند که این امر می‌تواند نشان دهنده دلیل منشاء مشترک یا جریان ژنی بالا بین این اکوتیپ‌ها با توجه به منطقه جغرافیایی محل زندگی آن‌ها باشد (۱۰). در مطالعه حاضر درخت فیلوژنی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری بز نجدی ثبت شده از ۱۱ توالی در ٦ گروه هاپلوتیپی از کشورهای مختلف موجود در پایگاه NCBI نشان داد که بزهای نجدی همگی از یک جمعیت منشأ گرفته‌اند و جز گروه هاپلوتیپی A می‌باشد.

نتیجه‌گیری

انتخاب توالی بخش‌هایی از ژن که توالی آن‌ها در بانک ژن موجود است و مقایسه توالی‌های به دست آمده با آن‌ها می‌تواند به اطلاعات ما درباره نژادهای بومی کمک کند و زمینه را برای استفاده بهتر از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی باز کند. با توجه به اینکه هیچ اطلاعاتی از توالی‌های مربوط به بز نجدی در بانک جهانی ژن وجود ندارد، با انجام این مطالعه بر روی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری بز نجدی علاوه بر ثبت این توالی در بانک جهانی ژن، این نژاد به دیگر کشورها معرفی می‌شود. در این مطالعه اطلاعاتی در مورد این ناحیه از ژنوم میتوکندری بدست آمد. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای نمونه‌ها نشان داد که همگی از یک جمعیت منشأ گرفته‌اند و تعداد ۵ هاپلوتیپ مختلف بر اساس ۲۰ نوکلئوتید چند شکل (SNP) برای ناحیه HVR1 تعیین گردید. همچنین توالی ناحیه HVR1 نمونه مورد بررسی با ۱۱ توالی ثبت شده از ٦ گروه هاپلوتیپی از کشورهای مختلف موجود در پایگاه NCBI مقایسه شد و نتیجه نشان داد که بز نجدی جز گروه هاپلوتیپی A می‌باشد.

منابع

1. Asadollahpour N.H., Kharrati-Koopaee H., Esmailizadeh A. 2022. Genetic diversity and signatures of selection for heat tolerance and immune response in Iranian native chickens. *BMC Genomics*, 23(1):1-13.

2. Azizi Z., Abbasi M.A., Kazemi A., Mohammad Nazari B., Taheri A., Hasani Bafarani A. 2021. A review of the status of the native cattle and its conservation strategies in Iran. *Agricultural Biotechnology Journal*, 12(4):142-166.

3. Bashiri A., Rooshanfekr H.A., Salabi F. 2020. The genetic and phylogenetic analysis of the D-Loop region in mitochondrial genome of Najdi goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, 12(3):45-66.

4. DeBenedictis E.A., Chory E.J., Gretton D.W., Wang B., Golas S., Esvelt K.M. 2022. Systematic molecular evolution enables robust biomolecule discovery. *Nature Methods*, 19(1):55-64.

5. Diwedi J., Singh A.W., Ahlawat S., Sharma R., Arora R., Sharma H., Raja K., Verma N., Tantia M. 2020. Comprehensive analysis of mitochondrial DNA based genetic diversity in Indian goats. *Gene*, 756:144910.

6. Gammage P.A., Frezza C. 2019. Mitochondrial DNA: the overlooked oncogenome? *BMC Biology*, 17(1):1-10.

7. Hahn A., Zuryn S. 2019. The cellular mitochondrial genome landscape in disease. *Trends in Cell Biology*, 29(3):227-240.

8. Hoda A., Biçoku Y., Dobi P. 2014. "Genetic diversity of Albanian goat breeds revealed by mtDNA sequence variation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 28(1):77-81.

9. Kamalakkannan R., Jose J., Thomas S., Prabhu V.R., Nagarajan M. 2018. Genetic diversity and maternal lineages of south Indian goats. *Molecular Biology Reports*, 45(6):2741-2748.

10. Karimi V., Hedayat Evrigh N., Seyed Sharifi N.S. 2017. Invetigation of genetic structure of Khalkhali goat using mitochondrial genome. *Novin Genetic Journal*, 12(2):217-227.

11. Li L., Goel A., Wang X. 2022. Novel paradigms of mitochondrial biology and function: potential clinical significance in the era of precision medicine, Springer: 1-5.

12. Mohammadpour A. 2018. Evaluation of a modified salt-out method for DNA extraction from whole blood lymphocytes: A simple and economical method for gene polymorphism. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 4(2):28-32.

13. Naderi S., Rezaei H.R., Taberlet P., Zundel S., Rafat S.A., Naghash H.R., El-Barody M.A., Ertugrul O., Pompanon F., Consortium E. 2007. Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. *Plos One*, 2(10): 1012-1024..

14. Nazari M., Mohamadi Ahvazi G. 2022. Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial D-loop HVR I region in three breeds of native sheep Iran (Taleshi, Shal and Makui). *Veterinary Researches and Biological Products*, 35(1):31-39.

15. Pakpahan S., Artama W.T., Widayanti R., Suparta I. 2015. Genetic variations and the origin of native Indonesian goat breeds based on mtDNA D-Loop sequences. *Asian Journal of Animal Sciences*, 9(6):34-50.

16. Rohipoor M., Nazari M. 2019. Genetic and phylogenetic analysis of Adani Goat population based on cytochrome B gene. *Research On Animal Production*, 10(26):84-89.

17. Shariat M., Dashab G.R., Vafaye Valleh M. 2019. Comparison of phylogenetic and evolutionary of nucleotide squences of HVR1 region of mitochondria genom in goats and other livestock species. *Research On Animal Production*, 10(23):133-143.

18. Sharifi R.S., Sofla S.S., Seyedabadi H.R. 2018. Genetic diversity and molecular phylogeny of iranian goats based on cytochrome oxidase I (COXI) gene sequences. *Jurnal Veteriner*, 18(4):565-570.

19. Yi G., Ying G., HE Y.M., Yang B.G., Zhang W.Y., Chen B.E., Huang Y.F., Zhao

Y.J., Zhang D.P., Chu M.X. 2022. Investigation of mitochondrial DNA genetic diversity and phylogeny of goats worldwide. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(6):1830-1837.

Molecular Analysis of Najdi Goat Population Using HVR1 Sequence of Mitochondrial Genome

Rouhollah Khademi[1], Seyedeh Ommolbanin Ghasemian[2]*, Hamid Reza Seyyed Abadi[3], Amin Kazemizadeh[4]

1- Department of Animal Sciences, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran
2- Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, Iran
3- Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4-Animal Science Research Department, Lorestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Khorramabad, Iran

Abstract

This study was conducted to determine the sequence of the HVR1 region of the mitochondrial genome of the Najdi goat. To conduct this study, 30 blood samples of both gender were collected from unrelated goats. After DNA extraction, the desired region was amplified by specific primers by PCR technique, and the sequence was determined. For comparison, the phylogeny of the HVR1 region sequence obtained from Najdi goat was drawn with other breeds worldwide to determine the haplotype group. The phylogenetic tree drawn for the samples showed that they all originated from the same population and the number of 5 different haplotypes was determined based on 20 nucleotide polymorphisms (SNP) for the HVR1 region in the sequences. Also, the sequence of the HVR1 region of the studied sample with 11 sequences recorded from 6 haplotype groups from different countries in the NCBI database showed that the Najdi goat belongs to haplotype group A. Comparing the sequence of the HVR1 region with the sequences in the gene bank can contribute to our information about the Najdi goat breeds and open the ground for their better use in breeding programs. According to the obtained results, the genetic diversity of the Najdi goat has increased over many years, and this increase in genetic diversity can be due to the mixing of this breed with other breeds, which can lead to the extinction of the Najdi goat in the future, which requires more attention to this issue.

Keywords: Mitochondrial genome, HVR1 region, DNA sequencing, phylogeny, Najdi goat.