

## تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی نواحی *Cyt-b* و *D-loop* توالی DNA میتوکندری در

### گاوهای سیستانی، سرابی و براون سوئیس ایران

رضا ولی‌زاده<sup>۱</sup> - محمدرضا نصیری<sup>۲\*</sup> - بلال صادقی<sup>۳</sup> - شاهرخ قوتی<sup>۴</sup> - علی جوادمش<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۱۹

#### چکیده

مطالعه مولکولی ساختار ژنتیکی گاو در جهت شناخت دقیق‌تر خاستگاه این حیوان می‌تواند در شناخت جنبه‌های نامشخص تاریخی آن موثر باشد. نژادهای گاو به دو گروه اصلی تائورس بدون کوهان (*Bos Taurus*) و ایندیکوس کوهان دار (*Bos indicus*) تقسیم می‌شوند. به نظر می‌رسد هر دو گروه گاوهای ذکر شده در جمعیت گاوهای ایران موجود می‌باشند. با مطالعات ملکولی می‌توان وابستگی گاوها را به هر یک از این گروه‌ها مشخص نمود. شناخت این وابستگی از نظر خاستگاه آن‌ها دارای اهمیت خاصی است. هدف از این مطالعه بررسی توالی نوکلئوتیدی جایگاه‌های ژنی *Cytochrome-b* و *HVR 1&2* ناحیه ژنی *D-loop* در DNA میتوکندریایی در سه گروه از گاوهای سیستانی، سرابی و براون سوئیس بود. استخراج DNA از تعداد ۲۰ نمونه خون از هر نژاد از بانک خون گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد با در نظر گرفتن عدم خویشاوندی بین نمونه‌ها گرفته و DNA آن‌ها به روش گوانیدین تیوسیانات-سیلیکاژل استخراج شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز با طراحی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعات ۷۵۱ و ۷۰۱ جفت بازی نواحی ژنی *HVR 1&2* و *Cyt-b* از توالی ژنوم میتوکندری براساس روش استاندارد انجام گردید. توالی یابی نواحی تکثیر شده از ژن‌های *Cyt-b* و *D-loop* با استفاده از دستگاه خودکار (ABI 3130) به روش سانگر صورت گرفت. تنوع نوکلئوتیدی به ترتیب برای نژادهای براون سوئیس، سرابی و سیستانی حدود ۰/۰۰۳۷، ۰/۰۰۲۴ و ۰/۰۰۲۹ برآورد شد. با توجه به مشاهده تفاوت‌های نوکلئوتیدی در نواحی ژنی *Cyt-b* و *HVR 1&2* نسبت به ثبت آن‌ها در ژن بانک جهانی اقدام شد. نتایج آزمون فیلوژنتیکی با استفاده از UPGMA برای هر دو جایگاه ژنی نشان داد که گاوهای سرابی و سیستانی در یک گروه و گاو نژاد براون سوئیس در گروه دیگر قرار دارند.

واژه‌های کلیدی: DNA میتوکندریایی، گاو بومی، *Cytochrome-b*، *D-loop*، *HVR 1&2*

#### مقدمه

mtDNA نشانگر بسیار مناسبی برای تشخیص بین گونه‌ای گروه‌هایی است که برای ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سال از هم جدا بوده‌اند. همچنین سرعت بالای تکامل mtDNA در مقایسه با DNA هسته‌ای، باعث شده که از آن برای مطالعات تکاملی استفاده گردد. سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در برخی از نواحی ژنی mtDNA مهره‌داران عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته‌ای است (۲۳). در بین نشانگرهای ژنتیکی، توالی یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روشها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (۸، ۹، ۱۰ و ۱۱).

توالی‌یابی میتوکندری با مقایسه نوکلئوتیدها و مشخص شدن اختلاف بین توالی‌های مختلف، تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپی تعیین می‌گردد. با استفاده از این اطلاعات، رابطه فیلوژنتیکی و فیلوژئوگرافی گونه‌ها ترسیم می‌شود. به کمک این روش و همچنین استفاده از اطلاعات بانک ژن<sup>۶</sup>، تشخیص گونه‌ها و بررسی فرایند اهلی سازی

DNA میتوکندریایی (mtDNA) در تشخیص گونه‌ها و ترسیم رابطه فیلوژنتیکی دارای مزایایی از جمله تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول (تقریباً ۱۰۰۰ نسخه و بیشتر)، اندازه کوچکتر آن از DNA ژنومی (۵، ۱۲ و ۲۷)، وراثت پذیری مادری (۲۸)، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی در آنها (۱۳ و ۲۳)، وجود نواحی حفاظت شده (۲۹)، و وجود نواحی حفاظت نشده‌ای مانند ناحیه *D-Loop* برای مطالعات تکاملی گونه‌های وابسته می‌باشد (۱، ۳، ۶، ۱۰ و ۱۹). از این رو

۱، ۳ و ۴- به ترتیب استاد، دانشجویان دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار پژوهشکده فناوری زیستی، و گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

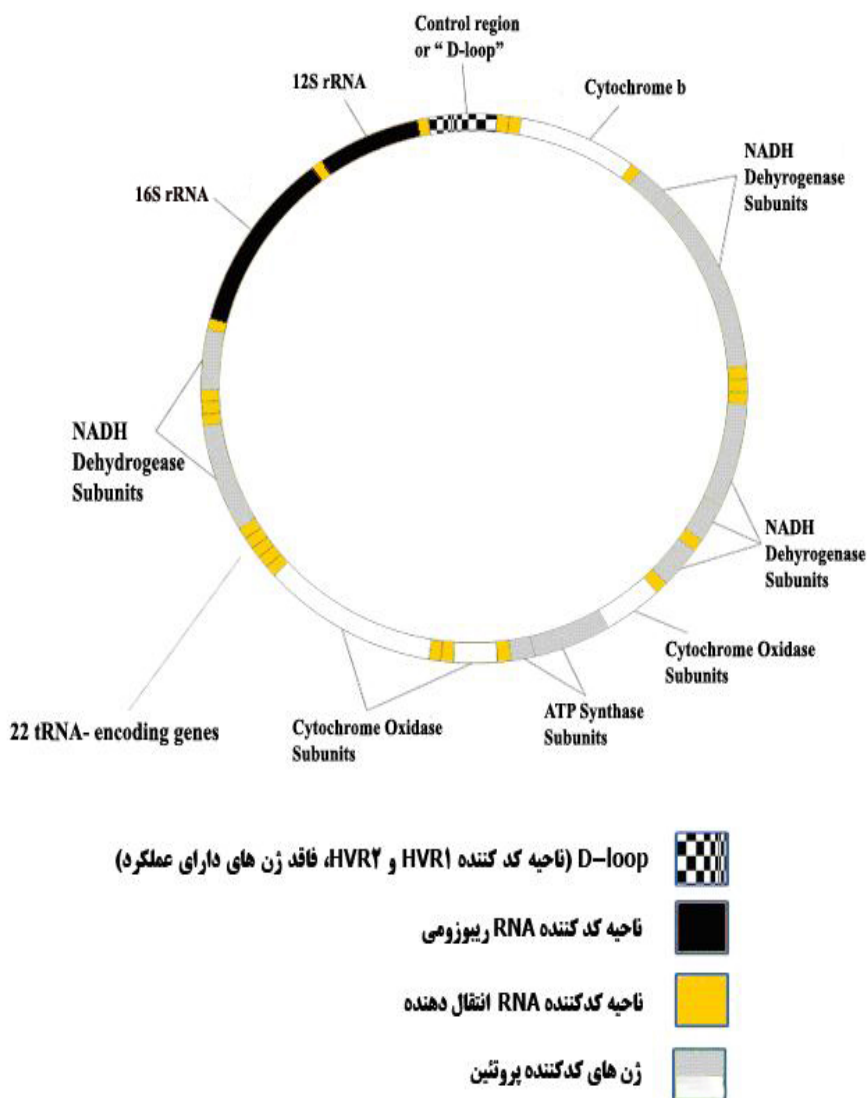
\*- نویسنده مسئول: (Email: nassiry@um.ac.ir)

۵- دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آدلاید استرالیا

رو جهش های صورت گرفته در آن ابقاء می شوند (۱۸). لافتاس و همکاران (۲۰)، با استفاده از تنوع DNA میتوکندریایی، شواهد مولکولی مبنی بر انشعاب گاوهای زبو و تائورین قبل از اهلی شدن، از یکدیگر را ارائه نموده و چگونگی وقوع این دو روند اهلی سازی مستقل از یکدیگر را نشان داده اند. چندشکلی توالی بین نژادهای کوهان دار و بدون کوهان در نواحی کمتر متغیر ژنهای tRNA و نیز در منشأ همانندسازی رشته سبک نیز شناسایی شده است (۲۴). در مطالعه ای دیگر مشخص شد که وجود تفاوت در توزیع توالی mtDNA نشان دهنده وجود خاستگاه های متفاوت جمعیت گاوهای بدون کوهان بومی آفریقا و اروپا می باشد (۷).

میسر می شود (۱۴، ۱۵، ۱۶، ۲۱ و ۲۲).

به دلیل هاپلوئید بودن ژنوم میتوکندری و در نتیجه انجام نشدن فرآیند میوز، ژنوم میتوکندری قابلیت بالایی در مطالعات فیلوژنتیکی دارد. منطقه ای در ژنوم میتوکندری وجود دارد که کد کننده پروتئین نبوده و جهش در آن منطقه می تواند تجمع پیدا کند. این منطقه در ناحیه D-Loop قرار دارد (شکل ۱). D-Loop ناحیه پیشبر برای آغاز همانند سازی ژنوم میتوکندری است (۲). دو منطقه به نامهای HVR 1 و HVR 2 در D-Loop وجود دارد که به دو دلیل زیر میانگین جهش در آنها بیشتر از سایر قسمتهای ژنوم میتوکندری است: اول اینکه این دو ناحیه کد کننده هیچ پروتئینی نیستند، دوم اینکه در ناحیه D-Loop که پیشبر رونویسی است نقش مهمی ندارند و از این



شکل ۱- تصویر شماتیک ساختار حلقوی DNA میتوکندری که حاوی ۲۲ ناحیه زنی کد کننده tRNA و ۱۳ ناحیه کد کننده پروتئین می باشد (۲).

میکرولیتر و غلظت مواد به شرح زیر بود: mM Tris-HCl (pH 8.8) ۱۰۰، ۱ U آنزیم *Taq* پلیمرز، ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر (BSA)، ۰/۲ mM از هر dNTP، ۱/۵ mM از  $MgCl_2$ ، ۵ pmol از پرایمر اختصاصی هر ژن و ۱۰۰ نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی ذکر شده در ۳۵ سیکل تکثیر شد (جدول ۲ و ۳). الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

### توالی یابی نواحی ژنی *Cyt-b*، D-loop و رسم درخت فیلوژنتیکی

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، خالص سازی شد و به همراه ۵۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده با غلظت ۱۰ پیکامول به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی گردید. سپس با استفاده از نرم افزار BioEdit نسخه ۳/۳ و ابزار قدرتمند BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) میزان همولوژی توالی‌های بدست آمده سنجیده شد. برای همچنین به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نژادهای مورد مطالعه، نمودار درختی با استفاده از رویه Neighbor-Joining توالی‌های هم‌مدیف شده، به کمک نرم افزار BioEdit رسم گردید (۱۷). برای تعیین هاپلوتیپ‌ها از رویه Disparity Index Analysis و جهت بررسی تنوع نوکلئوتیدی از رویه Tajimas test نرم افزار MEGA4 استفاده شد (۲۶). در این تحقیق به کمک یک آنالیز ایندکس عدم توافق بر اساس فاصله ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌ها، هاپلوتیپ‌ها را نیز می‌توان تشخیص داد.

### نتایج و بحث

استخراج DNA از خون در تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار است. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان داد که پرایمرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعات اختصاصی برای ژن‌های HVR 1&2 و *Cyt-b* به طول ۷۰۱ و ۷۵۱ جفت باز به ترتیب تولید نمودند. وجود کنترل منفی پاک و قطعات اختصاصی نشان از دقت و صحت انجام واکنش داشت. علاوه بر این وجود یک باند اختصاصی نشان داد که توالی مشابه‌ای برای جفت شدن آغازگرهای طراحی شده در محل‌های دیگر ژنوم وجود نداشته است.

در کشور تحقیقی که به منظور شناسایی جایگاه‌های mtDNA مبتنی بر توالی یابی ناحیه حفاظت شده D-loop صورت گرفته باشد، مشاهده نشده است. بنابراین مطالعه این جایگاه‌ها به منظور شناسایی بهتر نژادهای بومی کشور ضروری است. تنوع زیاد گونه‌ها و زیر گونه‌ها، اطلاعات ناقص در مورد منشا اهلی شدن و همچنین عدم انجام مطالعات ژنتیکی، مبنای انجام این پژوهش، به منظور بررسی میزان تنوع موجود در این دو جمعیت (کوهان دار و بدون کوهان) و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی این نژادها جهت بررسی توالی جایگاه‌های ژنی *Cyt-b* و D-loop از DNA میتوکندریایی در گاوهای سیستانی، سرابی و براون سوئیس بود.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه گیری خون و استخراج DNA

نمونه های خون از سه جمعیت گاوهای بومی ایران شامل گاوهای بدون کوهان سرابی و براون سوئیس و گاو کوهان‌دار سیستانی از بانک خون گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد که بانک ژنومی ایران نیز می‌باشد تهیه و از هر نژاد ۲۰ نمونه خون با اطمینان از عدم رابطه خویشاوندی بین نمونه‌ها انتخاب گردید. نمونه های خون تا زمان استخراج در لوله های حاوی EDTA<sup>۱</sup> در فریزر در دمای -۲۰ درجه نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از کیت DIAtom DNA Prep محصول شرکت Isogene کشور روسیه مبتنی بر روش بوم و همکاران (۵)، صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر Nano Drop- ND 2000 شرکت Thermo آمریکا سنجیده شد.

#### طراحی پرایمر

طراحی پرایمر برای تکثیر بخشی از توالی ژن HVR 1&2 و *Cyt-b* از mtDNA با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 صورت گرفت (جدول ۱). سپس با استفاده از رویه BLAST موجود در پایگاه بانک جهانی ژن، میزان همپوشانی آنها با توالی های موجود، مقایسه گردید.

#### واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر قطعات ۷۰۱ و ۷۵۱ جفت بازی نواحی ژنی HVR 1&2 و *Cyt-b* از mtDNA توسط دستگاه ترموسایکلر (T-personal, Biometra, Germany) براساس روش استاندارد انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی ژن های *Cyt-b* و *D-loop*

نام پرایمر	ناحیه ژنی	شماره دسترسی (دامنه تکثیر)	توالی پرایمر	قطعه تکثیر شده (bp)
Cyt-F	Cyt-b	AF492350*	CGCTTCCATAAAATACAAAGAGCCT	751
Cyt-R		(14375-15125)	CGCTTCCATAAAATACAAAGAGCCT	
HVR 1&2-F	D-loop	AF492350*	CGCTTCCATAAAATACAAAGAGCCT	701
HVR 1&2-R		(15444-16144)	CGCTTCCATAAAATACAAAGAGCCT	

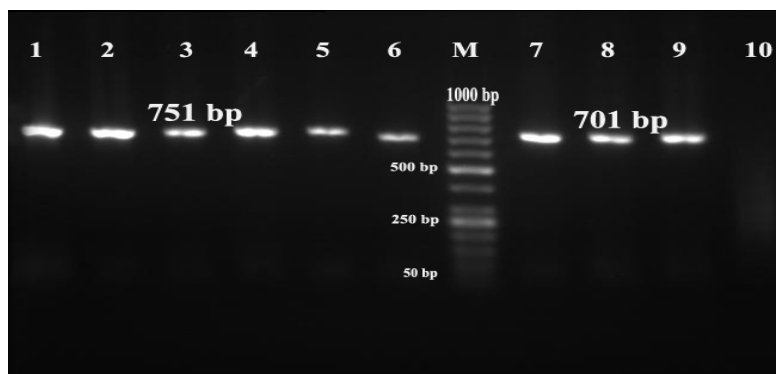
\*: شماره ثبت ژن در بانک جهانی ژن

جدول ۲- شرح برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر *HVR 1&2*

تعداد چرخه	تکثیر نهایی	اتصال	واسرشت
۱	-----	-----	۹۵ درجه ۵ دقیقه
۳۵	۹۵ درجه ۳۰ ثانیه	۶۰ درجه ۴۵ ثانیه	۷۲ درجه ۳۵ ثانیه
۱	۷۲ درجه ۵ دقیقه	-----	-----

جدول ۳- شرح برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جهت تکثیر *Cyt-b*

تعداد چرخه	تکثیر نهایی	اتصال	واسرشت
۱	-----	-----	۹۵ درجه ۵ دقیقه
۳۵	۹۵ درجه ۳۰ ثانیه	۶۷ درجه ۴۵ ثانیه	۷۲ درجه ۳۵ ثانیه
۱	۷۲ درجه ۵ دقیقه	-----	-----



شکل ۲- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن های *HVR 1&2* و *Cyt-b*. شماره ۵-۱: محصولات PCR ژن

*Cyt-b*, شماره ۶-۹: محصولات PCR ناحیه ژنی *HVR 1&2*, شماره ۱۰: کنترل منفی، M: نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی M50 از بالا به پایین برحسب جفت باز به قرار زیر می باشد (۱۰۰-۹۰۰-۸۰۰-۷۰۰-۶۰۰-۵۰۰-۴۰۰-۳۰۰-۲۵۰-۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۵۰).

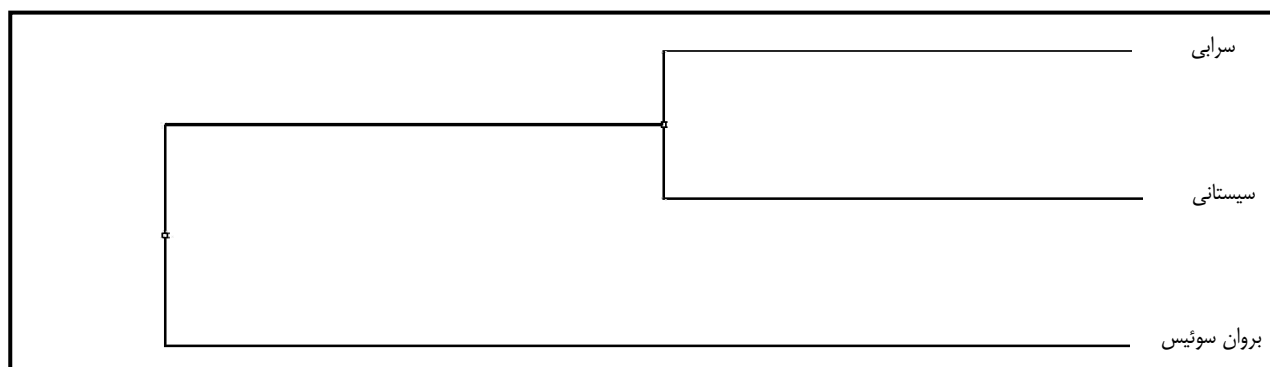
کوهان‌دار (سیستانی) و بدون کوهان ایران (سرابی) با اینکه در دو گروه هاپلو تیبی مجزا قرار دارند ولی دارای نزدیکی زیادی به هم می‌باشند. این امر ممکن است نشان دهنده نزدیکی منشا خاستگاه این دو نژاد باشد.

این نتایج با بررسی لی و همکاران (۲۵)، در سال ۲۰۰۶ که مطالعه‌ای بر روی جایگاه D-loop میتوکندریایی گاوهای چینی انجام داده اند، مطابقت دارد. آنالیز فیلوژنتیکی این توالی‌ها در هر دو نوع گاوهای بدون کوهان و کوهان‌دار چینی منجر به طبقه‌بندی آنها به دو گروه عمده گاوهای شمالی و جنوبی گردید.

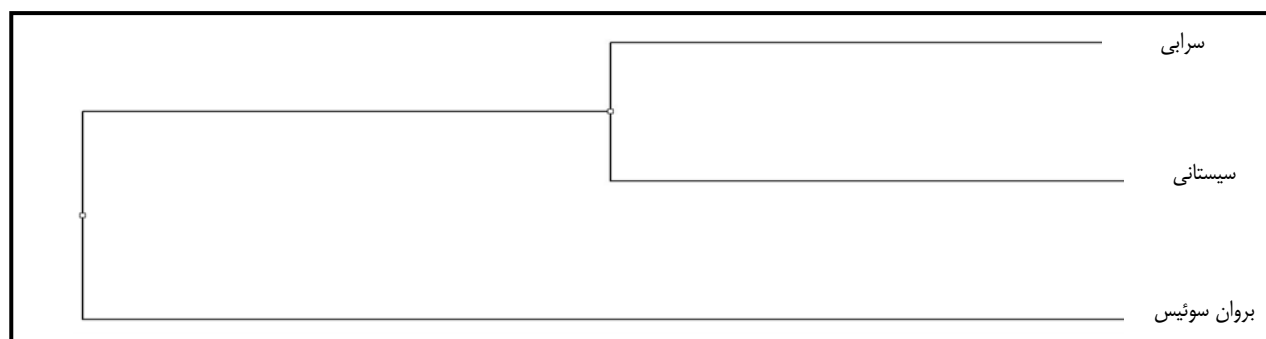
تعیین توالی‌های مورد توافق<sup>۱</sup> یکی از روش‌های معمول جهت ثبت و شناسایی نژادهای مختلف می باشد. توالی‌های برای *HVR 1&2* و *Cyt-b* به ترتیب به طول ۶۰۲ و ۶۵۱ جفت باز به عنوان توالی شاخص در نژادهای مورد مطالعه، تعیین گردید.

به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نژادهای مورد مطالعه، نمودار درختی با استفاده از توالی‌های هم‌مدیف شده، رسم گردید.

این تصاویر دسته بندی هاپلو تیبی نمونه‌ها را بر اساس هم‌مدیف شدن تایید کرد. آنالیز اطلاعات نشان داد که دو نژاد گاوهای



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی بر اساس رویه Neighbor-Joining گاوهای سرابی، سیستانی و براون سوئیس برای جایگاه *Cyt-b*



شکل ۴- رابطه فیلوژنتیکی بر اساس رویه Neighbor-Joining گاوهای سرابی، سیستانی و براون سوئیس برای جایگاه HVR 1&2

ژنوم میتوکندریایی دو نژاد بی کوهان و کوهان دار انجام دادند. توالی‌های بدست آمده به طول ۱۶۳۳۸ و ۱۶۳۳۹ نوکلئوتید بودند که در ۲۳۷ موقعیت با هم تفاوت داشتند. در مجموع تعداد ۲۱۰ هاپلوتیپ در این مطالعه مشاهده گردید. با اینکه در تحقیق ما تنها سه گروه هاپلوتیپی مشخص گردید اما می‌توان بر این امر تاکید نمود که با افزایش تعداد نمونه‌ها و گسترش ناحیه مورد مطالعه علاوه بر تعیین گروه‌های هاپلوتیپ بیشتر، می‌توان محل خاستگاه و تعداد جایگاه چندشکل را نیز در نژادهای بومی ایران تخمین زد.

بررسی تنوع ترکیب چهار باز موجود در جایگاه‌های HVR 1&2 *Cyt-b* برای سه نژاد سرابی، سیستانی و براون سوئیس در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. با استفاده از این ترکیب نوکلئوتیدی می‌توان به مقادیر A، T، C، G، نسبت G+C و A+T و وزن مولکولی یک رشته و دو رشته دسترسی پیدا کرد. همچنین امکان استفاده از این داده‌ها در آنالیزهای تنوع و بررسی هاپلوتیپ‌ها وجود دارد. لذا تفاوت ردیف نوکلئوتیدی نواحی *HVR* و *Cyt-b* به صورت مجزا در نژادهای براون سوئیس، سرابی و سیستانی با استفاده نرم افزار MultAlin بررسی گردید (شکل ۷ و ۸).

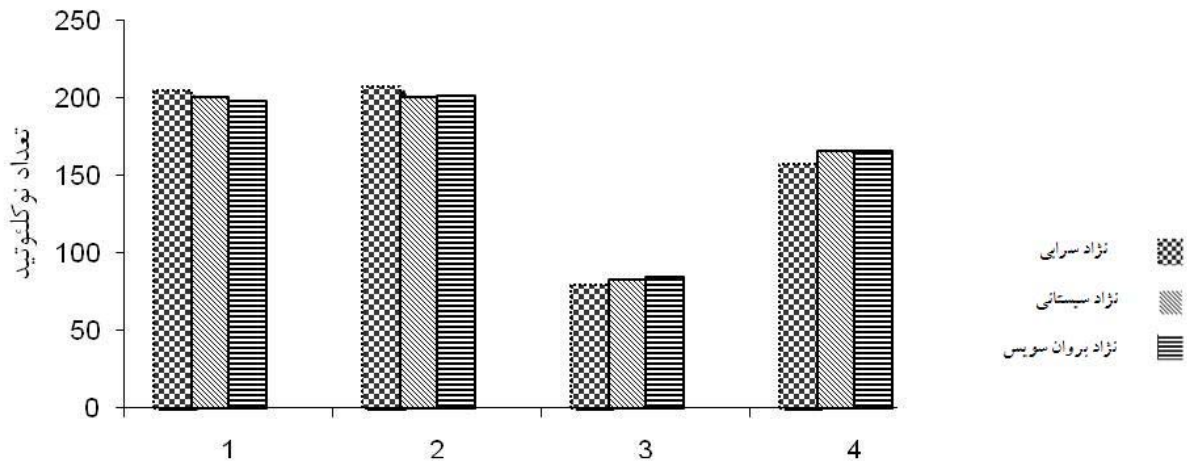
مطالعات ژنتیکی و ریخت شناسی نشان داده اند که گاو بومی ژاپن از نوع بدون کوهان بوده و نماینده نوع Turano-Mongolian می باشد (۲۵). در عین حال داده های ژنتیکی بیشتری در مورد خاستگاه بدون کوهان در شمال شرق آسیا وجود ندارد. علاوه بر این، برای اصلاح گاوهای بومی در چند کشور شرق آسیا از چند نژاد اروپایی استفاده شده است (۲۲). نتیجه این تحقیق نیز در مورد نژاد براون سوئیس بر این موضوع تاکید می‌کند که علاوه بر فاصله براون سوئیس از نژادهای بومی، برای تعیین خاستگاه اصلی و دقیق آن به داده‌های ژنتیکی بیشتری نیاز می‌باشد.

هر چند گسترش جغرافیایی گروه‌های کوهان دار و بی کوهان در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفت، اما آنالیزهای فیلوژنتیک بر داشتن فاصله بین نژادهای مورد مطالعه تاکید دارد. همچنین تحقیقات صورت گرفته بر روی گاوهای بومی چین به کمک توالی‌یابی *Cyt-b* نیز یک تنوع شیب دار از جنوب به سمت شمال چین را نشان داد به طوریکه سهم زبوی کوهان دار از جنوب به سمت شمال کمتر شده و سهم تائورین بدون کوهان بیشتر می شود (۲۸).

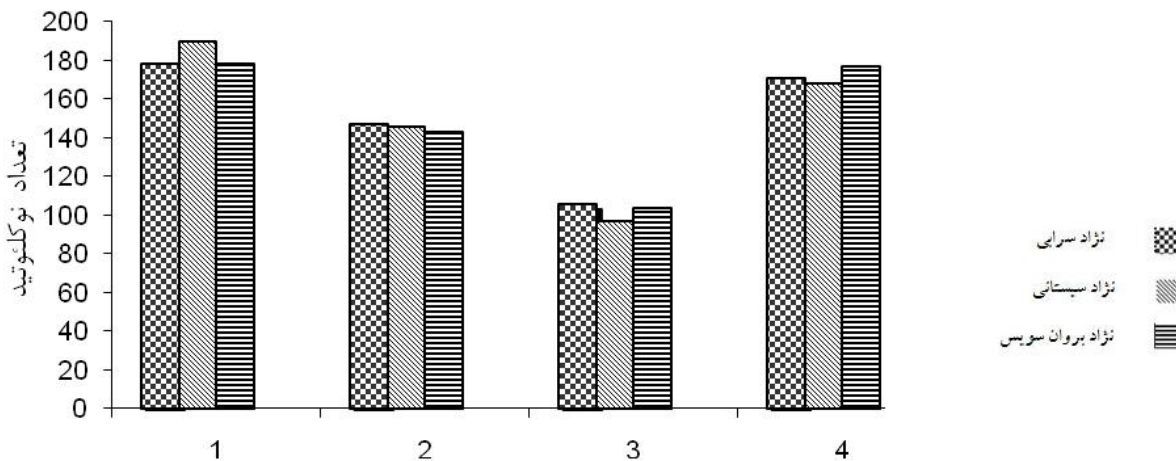
هندلر و همکاران در سال (۱۵)، تحقیقی را بر روی توالی کامل

فاصله میان نژادهای سرابی و براون سوئیس وجود دارد. همانطور که در ماتریکس جدول ۳ ملاحظه می‌شود در مجموع سه هاپلوتایپ برآورد گردید، که این مطلب رسم صحیح نمودار فیلوژنتیکی بر اساس رویه Neighbor-Joining برای نمونه‌ها و تعیین هاپلوتیپ‌ها را تایید می‌کند (جدول ۳).

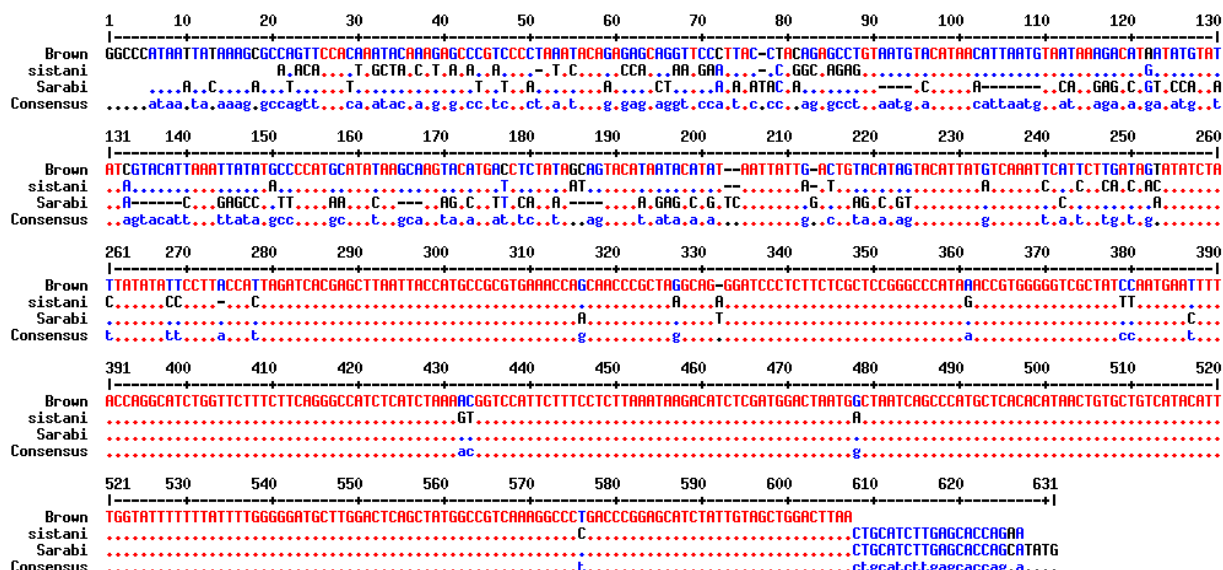
این توالی‌ها با بخش مشابه خود از توالی HVR 1&2 و Cyt-b در ژنوم‌های میتوکندری موجود در پایگاه NCBI در سطح ۹۹٪ دارای بیشترین همپوشانی بود. در مورد جایگاه HVR 1&2 و Cyt-b برای گاوهای سیستانی حداکثر مشابهت با نژادهای کوهان‌دار و برای گاوهای سرابی و براون سوئیس با گاوهای بدون کوهان بدست آمد. فاصله ترکیب نوکلئوتیدی در بین نمونه‌ها نشان داد که بیشترین



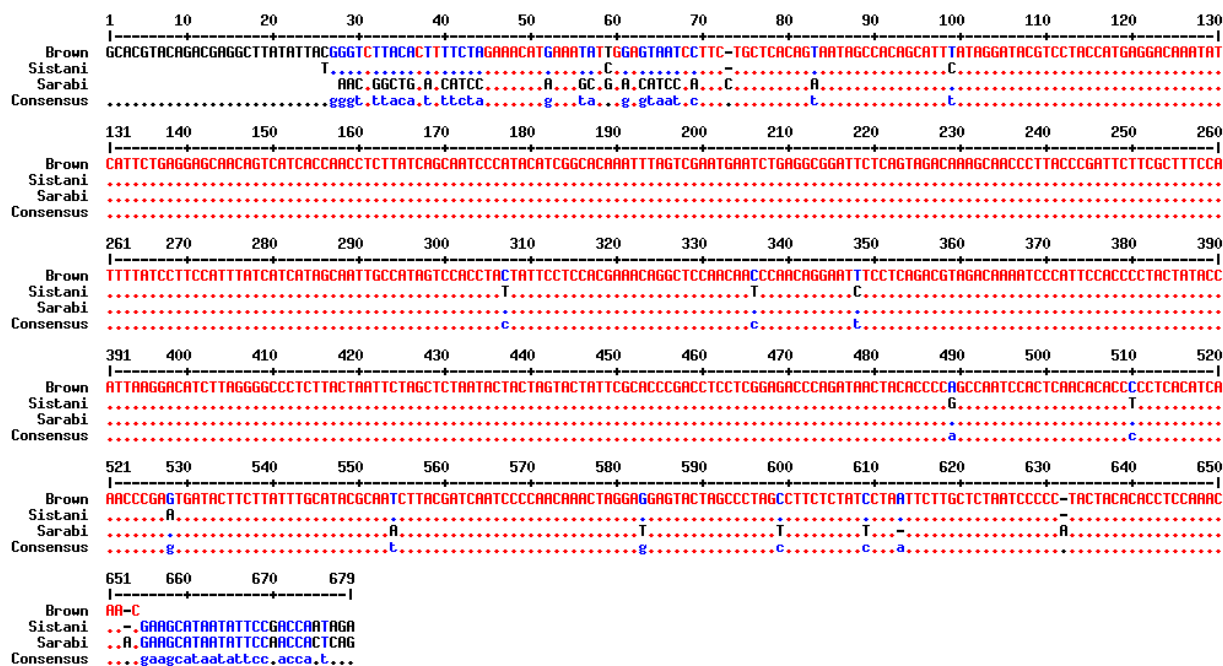
شکل ۵- تنوع نوکلئوتیدی جایگاه Cyt-b. شماره ۱: تعداد نوکلئوتید آدنین، ۲: تعداد نوکلئوتید سیتوزین، ۳: تعداد نوکلئوتید گوانیدین، ۴: تعداد نوکلئوتید تیمین



شکل ۶- تنوع نوکلئوتیدی جایگاه HVR 1&2. شماره ۱: تعداد نوکلئوتید آدنین، ۲: تعداد نوکلئوتید سیتوزین، ۳: تعداد نوکلئوتید گوانیدین، ۴: تعداد نوکلئوتید تیمین



شکل ۷- تفاوت ردیف نوکلئوتیدی ناحیه HVR از DNA میتوکندری



شکل ۸- تفاوت ردیف نوکلئوتیدی ناحیه Cyt-b از DNA میتوکندری

جدول ۳- ماتریکس آنالیز ایندکس عدم توافق برای نژادهای براون سوئیس، سرابی و سیستانی

نژاد	براون سوئیس	سرابی	سیستانی
براون سوئیس	۰	۰/۰۲۴	۰/۰۱۵
سرابی	۰/۰۲۴	۰	۰/۰۱۱
سیستانی	۰/۰۱۵	۰/۰۱۱	۰

بین گروه‌های هاپلوتیپی مورد مطالعه در این پژوهش به ترتیب برای نژادهای براون سوئیس، سرابی و سیستانی حدود ۰/۰۳۷، ۰/۰۲۴ و ۰/۰۰۳۷

یکی از شاخص‌هایی که برای تعیین رابطه بین نژادهای مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرد، تنوع نوکلئوتیدی می‌باشد. تنوع نوکلئوتیدی

از یک جمعیت منشا گرفته‌اند. همچنین دو نژاد سرابی و سیستانی به عنوان دو نژاد ایرانی در یک زیر گروه قرار گرفتند. اگرچه انجام مطالعه در مقیاس وسیع و با تعداد نمونه بالا در حال حاضر مقدور نیست اما انجام تحقیق در مقیاس کوچک و انتخاب توالی بخش‌هایی از ژن که توالی آنها در بانک ژن موجود بوده و مقایسه توالی‌های به دست آمده با آنها می‌تواند به اطلاعات بدست آمده برای گاوهای بومی ایران کمک نموده و زمینه را برای استفاده بهتر از آنها در برنامه‌های اصلاحی فراهم آورد.

### تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد که اعتبار انجام این پژوهش را تامین نمود و از آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی دانشکده کشاورزی که امکانات و تجهیزات مورد نیاز را در اختیار محققان قرار داد، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

۰/۰۰۲۹ برآورد شد. از مقایسه این میزان با مقدار تنوع مربوط به گاوهای نژاد چینی (۲۸)، و چند نژاد آسیایی (۲۵)، تنوع به دست آمده با توجه به اندازه نمونه، معقول به نظر می‌رسد. اگرچه تنوع نوکلئوتیدی محاسبه شده برای نژادهای ایرانی کمتر از مقادیر گزارش شده برای این سه گروه هاپلو تیبی است (۱۴)، اما میزان آن نسبت به گاوهای شمال چین (۲۸)، بیشتر می‌باشد. کم بودن میزان تنوع در جمعیت‌های مورد مطالعه ممکن است به دلیل کوچکی اندازه نمونه باشد (۱۴).

با توجه به اینکه اکثر گاوهای ایرانی از زیر گروه کوهان دار می‌باشند، لذا مطالعه گاو سیستانی به عنوان شاخص آنها از اهمیت خاصی برخوردار است. از طرف دیگر مطالعه نژادهای گاو زیر گروه تائورین بدون کوهان همانند گاوهای سرابی و بروان سوئیس نیز از نظر جایگاههای mtDNA به منظور تعیین فاصله با گاو سیستانی صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که در مجموع ۳ نژاد مورد بررسی به لحاظ فیلوژنتیکی به یکدیگر نزدیک بوده و احتمالاً همگی

### منابع

- 1- Amills, M., J. Capote, A. Tomas, L. Kelly, and G. Obexer-Ruff. 2004. Strong phylogeographic relationships among three goat breeds from the Canary Islands. *J. Dairy Res.* 71(3):257-262.
- 2- Anderson, S. A. T., G. Bankier, M. Barrell, A. De Bruijn, J. Couson, I. Drouin, B. Nierlich, F. Roe, P. H. Sanger, and I. G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- 3- Azor, P. J., L. V. Monteagudo, M. Luque, M. T. Tejedor, and E. Rodero. 2005. Phylogenetic relationships among Spanish goats breeds. *Anim. Genet.* 36(5): 423-425.
- 4- Bellagamba, F., V. M. Moretti, S. Comincini, and F. Valfare. 2001. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *J. Agr. Food Chem.* 49: 3775-3781.
- 5- Boom R, C J. A. Sol, M. M. M Salimans, C. L. Jasen, P. M. E. Wertheim Van Dillen, and J Van Der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clini. Microbiol.* 28(3): 495-503.
- 6- Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27:1767-1780.
- 7- Bradley, D., D. MacHugh, P. Cunningham, and R. Loftus. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5131-5135.
- 8- Bruford, M., D. Bradley, and G. Luikart. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat. Rev. Genet.* 3:900-910.
- 9- Colgan, S., L. Obrian, M. Maher, N. Shilton, K. McDonnell, and S. Ward. 2001. Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *J. Food Res. Hnt.* 34: 409-414.
- 10- Colombo, F., E. Marchisio, A. Pizzini, and C. Cantoni. 2002. Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian mortara salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. *J. Meat Sci.* 61:261-294.
- 11- Conrad, A. M., and S. K. Davis. 2001. Molecular Hnshgths into the Evolution of the Family Bovidae: A Nuclear DNA Perspective. *J. Mol. Biol. Evol.* 18:1220-1230.
- 12- Ghovvati, S., M. R. Nassiri, S. Z. Mirhoseini, A. H. Moussavi, and A. Javadmanesh. 2009. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control*, 20: 696-699.
- 13- Groves, T., P. Katis, Z. Madden, K. Manickam, D. Ramsdem, G. Wu, and C. J. Guidos. 1995. In vitro maturation of clonal CD4+CD8+ cell lines in response to TCR engagement. *J. Immunol.* 154: 5011-5022.
- 14- Hiendleder, S., B. Kaupe, and A. Janke. 2008. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intraspecies variation, taxonomy and domestication. *Cytogenet. Genome Res.* 120:150-156.



- 15- Hiendleder, S., H. Lewalski, R. Wassmuth, and A. Janke. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J. Mol. Evol.* 47:441-448.
- 16- Hiendleder, S., K. Mainz, Y. Plante, and H. Lewalski. 1998. Analysis of mtDNA indicate that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contribution from urial and argali sheep. *J. heredity*, 89:113-120.
- 17- <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- 18- Jazin, E., H. Soodyall, P. Jalonen, E. Lindholm, M. Stoneking, and U. Gyllensten. 1998. Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism. *Nature Genet.* 18:109-110.
- 19- Kim, K. H., and J. H. Lee. 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European Pig breeds determined by mitochondrial DNA D-LOOP sequence polymorphism. *J. Anim. Genet.* 33:19-25.
- 20- Loftus, R. T., D. E. Machugh, D. G. Bradley, P. M. Sharp, and P. Gunningham. 1994. Evidence for two independent domestication of Cattle. *J. Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:2757-2761.
- 21- Manjunath, B., K. Paramod, and K. Rout. 2003. Phelogeography and origin of Indian domestic goats. *Mol. Biol. Evol.* 21:223-233.
- 22- Mannen, H., M. Kohno, Y. Nagata, S. Tsuji, and D. G. Bradley. 2004. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32:539-544.
- 23- Naderi, S., H. R. Rezaei, P. Taberlet, S. Zundel, S. A. Rafat, H. R. Naghash, M. A. el-Barody, O. Ertugrul, F. Pompanon, and Econogene Consortium. 2007. Large-Scale Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Goat Reveals Six Haplogroups with High Diversity. *Plos one.* 10:1-10.
- 24- Pegoraro, L., Z. Yang, S. samake, and F. V. Meirelles. 1996. Sequence Comparison of Mitochondrial tRNA genes and origin of light strand replication in *Bos taurus* and Nellore (*Bos indicus*) breeds. *J. Anim. Genet.* 27(2):91-94.
- 25- Lai, S. J., S. Y. Chen, Y. P. Liu, and Y. G. Yao. 2006. Mitochondrial DNA sequence diversity and origin of Chinese domestic yak. *Anim. Genet.* 38:77-80.
- 26- Tamura K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).
- 27- Teletchea, F., C. Maudet, and C. Hanni. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol.* 23:359-366.
- 28- Xin C., 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*, 131:175-183.
- 29- Zeder, M., E. Emshwiller, B. Smith, and D. Bradley. 2006. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends Genet.* 22:139-155.