مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

آنالیزفیلوژنتیکی جمعیت بزهای خلخالی با استفاده ژن سیتوکروم b

ویدادولتی قره درویشلو[۱]، نعمت هدایت ایوریق[۲*]، سعید نیک بین[۲]، رضابهمرام[۲]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
[۲] استادیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۵

چکیده

بز خلخالی یکی از بزهای بومی ایران است که درحال حاضرجمعیت آن به‌شدت کاهش یافته است. برای حفظ و بهبود تولیدات این گونه مطالعات کاربردی ژنتیکی ضروری است. تحقیق حاضر باهدف توالی‌یابی ژن میتوکندریایی سیتوکروم b در ۱۰۰ رأس بز خلخالی و آنالیز بیوانفورماتیک این ژن در گونه-های مختلف بز (با استفاده از ۲۶ نمونه توالی NCBI) انجام شده است. جهت انجام آنالیز از روش توالی یابی ژن و مقایسه آن با اطلاعات موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI استفاده گردید. نتایج آنالیز تنوع ژنتیکی درجمعیت بز خلخالی منجر به شناسایی ۵ جهش با ۶ هاپلوتایپ مختلف گردید میزان تنوع هاپلوتیپی، تنوع نوکلئوتیدی و میانگین تفاوت‌های نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۶۴۴، ۰/۰۰۲ و ۱/۸۲۲ برآورد شد. مقدار تاجیما D در جمعیت بزهای خلخالی مثبت ۰/۱۲۴ بدست آمد که ازلحاظ آماری معنی‌دار نبود. نتایج تجزیه تحلیل‌های بین گونه‌های مختلف بز نشان داد که تنوع نوکلئوتیدی در گونه‌های بز ایبکس، ایگاگروس و هیرکوس به ترتیب ۰/۰۴۷، ۰/۰۲۲ و ۰/۰۰۱ می‌باشد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین بزهای ایبکس و ایگاگروس و کمترین فاصله ژنتیکی بین گونه خلخالی و بز هیرکوس مشاهده شد. بزهای ایگاگروس در مقایسه با بزهای ایبکس ازلحاظ فاصله ژنتیکی به بزهای اهلی هیرکوس نزدیکتر بودند.

واژه‌های کلیدی: *آنالیز بیوانفورماتیک، بز خلخالی، تنوع ژنتیکی، توالی یابی، ژن سیتوکروم b.*

*نویسنده مسئول: نعمت هدایت ایوریق تلفن: ۰۴۵۳۳۱۵۰۵۱۵۴ Email: nhedayat@uma.ac.ir

مقدمه

حدود ۳۰ میلیون رأس بز کرکی در سراسر جهان وجود دارد که ۴/۵ تا ۵ میلیون رأس از آن‌ها (حدود ۲۰ درصد بزهای جهان) در ایران پرورش داده می‌شوند (Baghizadeh *et al*., 2009). بز یک حیوان چندمنظوره است که علاوه بر تولید شیر، گوشت، پوست و الیاف نقش مهمی در اقتصاد پرورش‌دهندگان دارند. به‌غیراز تولید محصولات متنوع، نقل و انتقال آسان بز آن را به یک عنصر کلیدی برای تضمین پایداری زندگی انسان در محیط‌های نامساعد تبدیل کرده است (Rahman *et al*., 2008). بنابراین، اهلی سازی بز (Capra hircus) نقطه عطفی در تکامل روش زندگی انسان‌ها بوده است. این دام یکی از گونه‌های بسیار مناسب است که در کره خاکی بیشترین توزیع جغرافیایی داشته و از تنوع نژادی بالایی برخوردار است. بر اساس آمارهای فائو ۱۷٪ از نژادهای بز دنیا در وضعیت بحرانی بوده و در معرض خطر انقراض قرار دارند (Fao, 2004). وجود تنوع، لازمه انجام برنامه اصلاح نژادی و بهره‌گیری از توان تولیدی حیوانات و گیاهان در هر منطقه است (Gholizadeh *et al*., 2008)، زیرا اصلاحگران از تنوع ژنتیکی برای رسیدن به حیوانات اهلی منطبق بر احتیاجاتشان بهره‌گیری می‌نمایند. فقدان تنوع، قدرت انتخاب موجود برای رفع نیازهای غیرقابل پیش‌بینی آتی را محدود می‌سازد، بنابراین حفاظت از تنوع ژنتیکی فاکتوری کلیدی برای محافظت از حیات گونه‌ها در طولانی‌مدت است (Rout *et al*, 2012). حفاظت و مدیریت تنوع ژنتیکی در گونه‌ها بر اساس یک دانش جامع از ساختار جمعیت شامل تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها و داخل گونه‌ها است. مطالعه تنوع ژنتیکی دام‌های محلی و بومی در درک منشأ، تمایز، رابطه ژنتیکی، حفاظت و بهره‌برداری از نژادهای بومی مفید خواهد بود. بنابراین ضروری است این منابع ژنتیکی محافظت، تقویت و مدیریت شود (Liu *et al*., 2009).

از طرفی در حوزه ژنتیک و اصلاح، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه‌ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد (Alinaghizadeh *et al*., 2010; Moghadaszadeh *et al*., 2015). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei *et al*., 2010; Zamani *et al*., 2013). در سال‌های اخیر محققین از ژن‌های مختلفی برای شناسایی گونه‌ها استفاده کرده‌اند. DNA میتوکندریایی به دلیل ویژگی‌هایی مثل داشتن نسخه‌های متعدد در هر سلول، نرخ بالای جهش، وراثت مادری، عدم وجود نوترکیبی، وجود نواحی حفاظت‌شده و حفاظت نشده، نداشتن اینترون و همپوشانی بعضی از ژن‌های آن، به عنوان یک ابزار قدرتمند در مطالعات تکاملی داخل گونه‌ها، بررسی سطح تنوع ژنتیکی، رابطه

فیلوژنتیکی و فیلوژئوگرافی بین اقوام و جمعیت‌ها و گونه‌ها، کاربرد دارد. از بین ژن‌های میتوکندریایی ژن سیتوکروم b به دلیل ساختار شناخته شده آن به صورت گسترده‌تری برای مطالعه و شناسایی گونه‌ها استفاده می‌شود (Parson *et al*., 2000; Sawaimul *et al*., 2014; Shabthar *et al*., 2013). توالی ژن سیتوکروم b برای به دست آوردن دانش اجمالی از زیست شناسی تکاملی مورد استفاده قرار گرفته است (Wisnievska *et al*., 2010). به دلیل تنوع بیشتر این ژن، با بررسی قطعه کوچکی از آن می‌توان گونه‌های مختلف پستانداران را شناسایی کرد (Tobe & Linacre, 2008).

در پژوهشی Wisnievska *et al*. (2010) چندشکلی‌های ژن سیتوکروم b را برای شناسایی مواد بیولوژیکی به‌دست‌آمده (شامل پوست، خون، نمونه‌های گوشت و استخوان فک و دندان) از گونه‌های مختلف شامل گاو شیری، گوسفند، بز، گوزن و گوزن سرخ مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که این روش می‌تواند برای شناسایی سریع و تمایز چندین گونه از پستانداران با استفاده از روش بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد.

با وجود نژادهای مختلف بز بومی در ایران متأسفانه جمعیت بسیاری از آن‌ها کاهش یافته است. در ایران بررسی ساختار ژنتیکی و تعیین قرابت جمعیت‌های مختلف جانوران به‌صورت پراکنده انجام شده و حتی تاکنون هیچ مطالعه مدونی در راستای تعیین ساختار برخی از گونه‌های جانوری حائز اهمیت، انجام نپذیرفته است. بز خلخالی یکی از بزهای بومی ایران است که یک بز شیری محسوب شده و عمده محل پرورش آن دشت مغان، روستاهای اطراف شهرستان خلخال در استان اردبیل و بخش‌هایی از آذربایجان شرقی می‌باشد (Sepehri & Seyedabadi 2015; Karimi et al., 2017). در حال حاضرجمعیت بز خلخالی به‌شدت کاهش یافته و روند کاهش خود را ادامه می‌دهد(Dolati Garehdarvishlu et al 2017). تحقیق حاضر باهدف توالی یابی ژن سیتوکروم b جهت بررسی ساختار جمعیت بز خلخالی و آنالیز بیوانفورماتیک و فیلوژنتیکی این ژن با سایر گونه‌های بز انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

از چهار گله مختلف تعداد ۱۰۰ رأس از بزهای خلخالی (۲۵ رأس غیرخویشاوند از هرگله) اردبیل با استفاده از ونوجکت حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ وداج نمونه‌گیری خون به حجم ۴ میلی‌لیتر به عمل آمد؛ و DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراجی DNA (ATP bioscience از کشور کره جنوبی) از خون پستانداران استخراج گردید. سپس با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی شامل پرایمر رفت 5`-CTGCTCTTCCTCCACGAAAC -3 و پرایمر برگشت 5`-TGGCTATTCTCCTTTTCTGGTT -3`

جایگاه ژن سیتوکروم b تکثیر گردید (Kim *et al*., 2013).

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن به ترتیب؛ دمای واسرشت شدن اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم و انجام شد. غلظت‌های مورد استفاده از مواد بعد از بهینه‌سازی برای غلظت مواد در حجم PCR ۲۵µLبه ترتیب ۱/۵ میلی مولار MgCl2، 1x میکرولیتر بافر PCR، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۲۰ پیکومول از هر جفت پرایمر،۱ واحد Taq DNA Polymerase، ۸۰ نانوگرم DNA ژنومی استفاده شد.

بعد از تکثیر جایگاه‌های مختلف ژن سیتوکروم b جهت بررسی تنوع موجود در این جایگاه‌ها و شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) از طریق شرکت پیشگام با استفاده از تکنیک سنگر توالی‌یابی گردید. همه توالی‌ها با استفاده از روش Clustal W در نرم‌افزار MEGA 6.0 همردیف شده و تک نوکلئوتیدهای چندشکلی شناسایی شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار DnaSp 5.10 هاپلوتیپ‌ها و پارامترهای مربوط به تنوع ژنتیکی شامل تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیپی، متوسط تعداد نوکلئوتیدی و تاجیما D به دست آمدند. بر اساس هاپلوتیپ به دست آمده بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتید در نرم‌افزار MEGA 6.0 (Tamura *et al*., 2011) شناسایی و با استفاده از روش حداکثر درستنمایی، درخت فیلوژنتیکی با بیشترین درستنمایی بین هاپلوتیپهای مختلف ترسیم گردید. آماره تاجیما D جهت بررسی تنوع نوکلئوتیدی حاصل از مشاهدات با استفاده از تنوع حاصل از فراوانی آللی در جایگاه‌های چند شکل انجام گرفت (Tajima, 1989). فراسنجه‌های تمایز ژنتیکی، فاصله ژنتیکی و خلوص ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 به دست آمد. جهت آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپ‌های بدست آمده از نرم‌افزار Network 4.613 (fluxus-engineering.com) استفاده شد (Bandelt *et al*., 1999). توالی سیتوکرومb مربوط به بز اهلی و بزهای وحشی از بانک ژن بدست آمده و به همراه توالی‌های بز خلخالی در این تحقیق برای آنالیزهای فیلوژنی استفاده شد توالی مورد نظر در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج و بحث

قطعه ۴۷۸ جفت بازی ژن سیتوکروم b بز خلخالی با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی طراحی شده تکثیر و سپس توالی یابی شد و با توالی ثبت شده آن‌ها (جدول ۱) در پایگاه NCBI مقایسه شد. با تجزیه و تحلیل توالی‌یابی‌های انجام گرفته در بز خلخالی در کل منجر به شناسایی ۵ جایگاه جهش در موقعیت‌های ۶۲، ۶۹، ۱۷۲، ۴۷۸ و ۴۷۹ شد جهش‌های ایجاد شده منجر به ایجاد ۶ هاپلوتیپ در جمعیت بزهای

خلخالی شد که متفاوت با نتیجه Karimi et al. (2017) با استفاده از d-loop بود. از جهش‌های مشاهده شده، جایگاه‌های ۶۲ و ۱۷۲ مربوط به جهش‌های معنی‌دار بود. درحالی‌که در تحقیق Amer (2014) بر روی بزهای بومی عربستان هیچ جهش معنی‌داری گزارش نشد. در مطالعه‌ای Jianto et al. (2014) تنوع ژن سیتوکروم b بزهای بومی جاوا را دریک قطعه ۷۷۹ جفت بازی از جایگاه ۲۳۸ تا ۱۰۱۶ بررسی کردند. نتایج تحقیق آن‌ها ۷ جایگاه متنوع را مشخص کرد که دو مورد از آن‌ها تغییر اسیدآمینه‌ای در جایگاه‌های ۱۶۵ و ۲۱۵ را به دنبال داشت. در تحقیقی دیگر که یک توالی ۶۴۲ جفت بازی از توالی ژن سیتوکروم b مطالعه شده بود، ۴۴ جایگاه متغیر و ۴۶ هاپلوتایپ شناسایی شد که همه آن‌ها در نتیجه تغییرات تک نوکلئوتیدی ایجاد شده بودند (Chen *et al*., 2006). هیچ کدام از جهش‌های گزارش شده در مطالعه Chen *et al*. (2006) و Jianto *et al*. (2014) در این بررسی مشاهده نشد. از ۵ جهش مشاهده شده در مطالعه فقط یک مورد جهش متقاطع در جایگاه ۶۲ اتفاق افتاده بود که در آن باز C جایگزین باز A شده بود؛ اما بیشتر جهش‌های اتفاق افتاده از نوع جهش‌های انتقالی بود که سه مورد از آن‌ها جایگزینی باز A با G در جایگاه‌های ۱۷۲، ۴۷۸ و ۴۷۹ و یک مورد جایگزینی باز C با T در جایگاه ۶۹ را شامل می‌شد. این نتایج با بررسی‌های دیگران که بر روی ژن سیتوکروم b در بز و گونه‌های دیگر از دام‌ها انجام شده است (Baber *et al*., 2014; Chen *et al*., 2006) مطابقت دارد.

در تحقیق حاضر علاوه بر بررسی تنوع توالی تکثیر شده ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌های به دست آمده نیز مورد محاسبه قرار گرفت. فراوانی نوکلئوتیدهای آدنین، گوانین، سیتوزین و تیمین به ترتیب برابر ۳۳/۲، ۱۲/۸، ۲۷/۶ و ۲۶/۴ نوکلئوتید بود که با نتایج به دست آمده در تحقیق Chen *et al*. (2006) با ۵۶ درصد آدنین به‌علاوه تیمین مطابقت ندارد. به‌طور کلی در ژن سیتوکروم b محتوی آدنین به‌علاوه تیمین بیشتر از محتوای گوانین به‌علاوه سیتوزین است (Chen *et al*., 2006). تست تاجیما D به منظور شناسایی هر گونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر ژن‌ها محاسبه می‌گردد (Hedayat et al., 2016). مقدار تاجیما D در جمعیت بزهای خلخالی مثبت ۰/۱۲۴ بدست آمد ازلحاظ آماری معنی‌دار نبود که نشان دهنده عدم وجود انتخاب در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد.

به منظور بررسی رابطه فیلوژنی بز خلخالی با بزهای کاپرا هیرکوس، کاپرا ایبکس و کاپرا ایگاگروس[1] درخت فیلوژنی توالی‌های تکثیر شده از بز خلخالی به همراه توالی‌های ثبت شده از این بزها ترسیم شد (شکل ۱). در ساختار درخت فیلوژنی بز خلخالی به همراه کاپرا هیرکوس در یک گروه قرار گرفت بز کاپرا ایبکس نیز به صورت مجزایی گروه تشکیل داده و در یک مورد با بز کاپرا ایگاگروس گروه‌بندی

[1] Capra hircus ،Capra ibex and Capra aegagrus

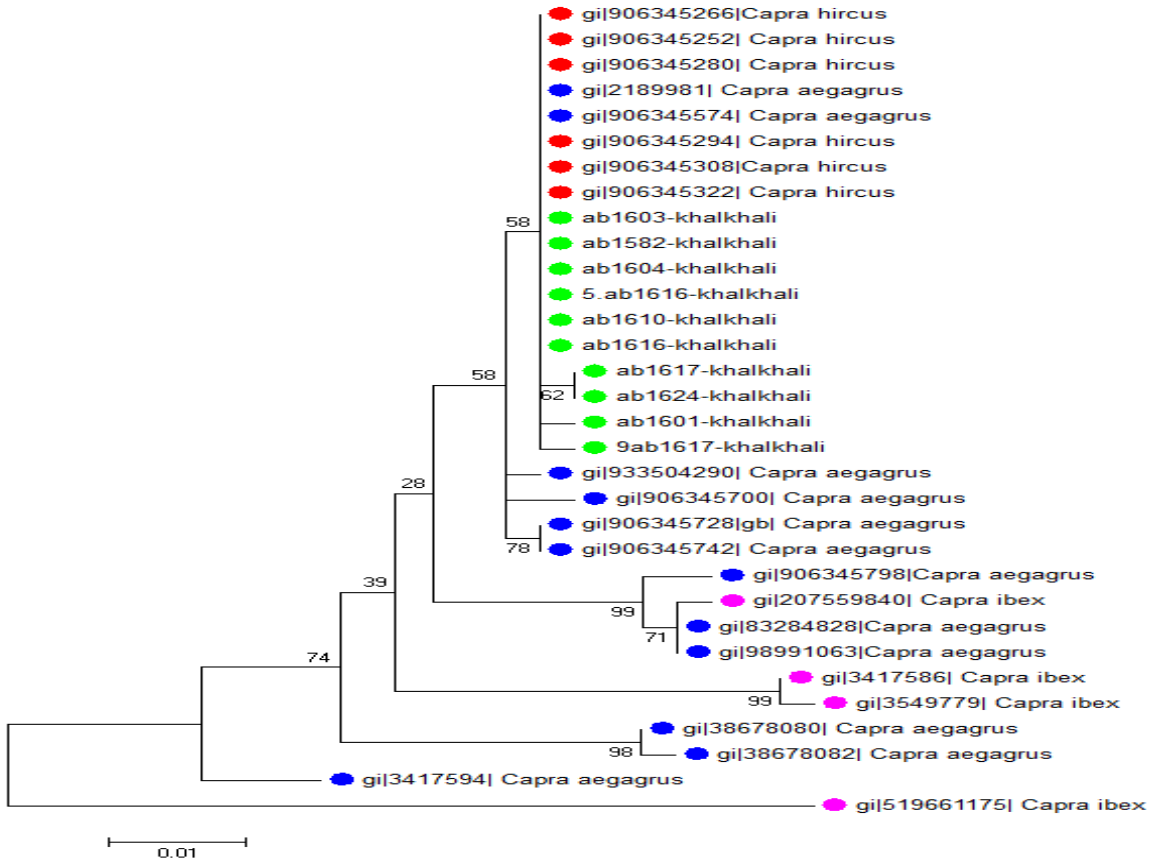
شد. تنها بز ایگاگروس بود که در ساختار فیلوژنی وضعیت پایداری نداشته و در همه گروه‌ها قرار می‌گرفت. الگوی گروه‌بندی پیچیده که در ساختار درخت فیلوژنی هاپلوتیپ‌های ایگاگروس مشاهده شد می‌تواند مربوط به مهاجرت افراد بین جمعیت‌ها باشد و نشان دهنده جریان ژنی ناشی از آمیخته گری بین بزهای نژادهای مختلف است که در دام‌ها بسیار معمول می‌باشد این نتیجه با نتایج Pidancier *et al.* (2006) مطابقت دارد که نشان دادند بز ایگاگروس با بزهای اهلی در یک گروه قرار می‌گیرند. نتایج تجزیه تحلیل‌های بین گونه‌های مختلف بز نشان داد که تنوع نوکلئوتیدی در گونه‌های بز ایبکس، ایگاگروس و هیرکوس به ترتیب ۰/۰۴۷، ۰/۰۲۲ و ۰/۰۰۱ می‌باشد. آنالیز بیوانفورماتیک توالی ۴۷۸ جفت بازی مربوط به توالی گونه‌های مورد مطالعه منجر به شناسایی ۶۲ جهش گردید که این تعداد جهش باعث ایجاد ۲۰ هاپلوتیپ مختلف در گونه‌های مورد مطالعه گردید. بزرگترین گروه هاپلوتیپی مربوط هاپلوتیپ H_7 بود که مربوط به بزهای هیرکوس و جمعیت بزهای خلخالی می‌باشد (شکل ۲).

بررسی تنوع هاپلوتیپی در داخل گونه‌ها منجر به شناسایی ۴، ۳، ۹ و ۶ هاپلوتیپ به ترتیب در بزهای هیرکوس، ایبکس، ایگاگروس و خلخالی گردید میزان وقوع جهش در ژن سیتوکروم b در مقایسه با سایر ژن‌های کد کننده بالا است (Chen *et al.*, 2006) نتایج این مطالعه نشان داد که میزان تنوع ژنتیکی و جهش نسبتاً بالا می‌باشد.

جدول ۱- توالی‌های ژن سیتوکروم b استخراج شده از پایگاه اطلاعاتی NCBI و کد دسترسی آن‌ها.

Table 1- Sequences of cyt-b gene with accession code in NCBI.

گونه دام species	تعداد توالی No. of Sequences	طول CDS CDS length	شماره دسترسی در بانک ژن No. of accession code
کاپراهیرکوس Capra hircus	10	478	KR059205.1–KR059203.1–KR059201.1–KR059200.1–KR059199.1–KR059198.1–KR059197.1–KR059196.1–KR059195.1–KR059194.1
کاپرا ایبکس Capra ibex	4	478	AF034735.1-AJ010055.1-AB743826.1- AB743826.2
کاپرا ایگاگروس Capra aegagrus	12	478	KR059210.1-KR059221.1-KT290893.1-KR059219.1-KR059222.1-KR059226.1-AB004069.1-DQ246781.1-DQ514541.1-DQ514542.1-AF034739.1-AB110592.1-AB110593.1-FJ207526.1



شکل ۱- درخت فیلوژنی (با ۱۰۰۰ بوتستراپ) مربوط به ژن سیتوکروم b در بز.

Figure 1- Phylogenetic tree (with 1000 bootstraps) in goats using cyt-b gene.

در بین بزهای مورد بررسی میزان تنوع نوکلئوتیدی در بزهای ایبکس بیشترین (۰/۰۴۷) و بزهای هیرکوس کمترین (۰/۰۰۱) حاصل شد. مقادیر تاجیما D برای نمونه‌های ایبکس و ایگاگروس منفی و برای بزهای هیرکوس و خلخالی مثبت بدست آمد، ولی ازلحاظ آماری در سطح ۹۵ درصد معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۲).

فواصل ژنتیکی نمایانگر میزان جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی‌های مورد بررسی می‌باشد. فاصله ژنتیکی بین دامنه ۰ تا ۱ تعریف شده است تمایز ژنتیکی FST و فاصله ژنتیکی D_{XY} میان گونه‌ها برای ژن سیتوکروم b به‌وسیله نرم‌افزار DnaSp محاسبه شد.

جدول ۲- آماره‌های جمعیتی بین گونه‌های مختلف گونه‌های بز بر اساس ژن سیتوکروم b.

Table 2- Population statistics between between goat species using cyt-b gene.

گونه Species	تعداد جهش No. of mutations	تعداد هاپلوتیپ No. of Haplotypes	تنوع هاپلوتیپ Haplotype Diversity	تنوع نوکلئوتیدی Nucleotide Diversity	متوسط تفاوت نوکلئوتیدی Average Nucleotide Difference	مقدار تاجیما Tajima D
بز کاپراهیرکوس Capra hircus	3	4	0.546	0.001	0.650	0.115
بز کاپرا ایبکس Capra Ibex	38	3	0.833	0.047	19	-0.864
بز کاپرا ایگاگروس Capra aegagrus	62	9	0.808	0.022	9.036	-0.070
بز خلخالی Khalkhali goat	5	6	0.644	0.002	1.822	0.124

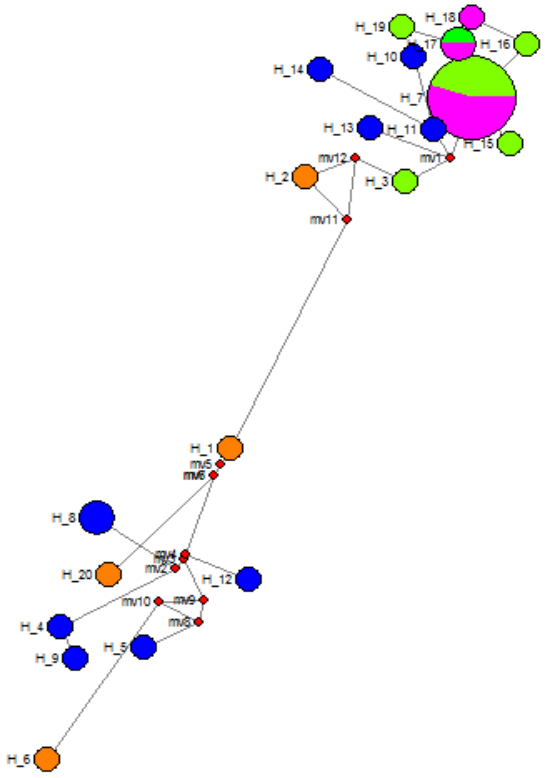
همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود بیشترین فاصله ژنتیکی بین بزهای ایبکس و ایگاگروس و کمترین فاصله ژنتیکی بین گونه خلخالی و بز هیرکوس مشاهده شد. بزهای ایگاگروس در مقایسه با بزهای ایبکس ازلحاظ فاصله ژنتیکی به بزهای اهلی هیرکوس نزدیکتر بودند.

جدول ۳- مقایسه مربوط به تمایز ژنتیکی F_{st} (مثلث بالایی) و فاصله ژنتیکی D_{XY} (مثلث پایینی).

Table 3- Comparison of genetic differentiation (upper) and genetic distance (down).

F_{ST}/D_{XY}	کاپراهیرکوس Capra hircus	بز کاپرا ایبکس Capra Ibex	کاپرا ایگاگروس Capra aegagrus	بزخلخالی Khalkhali goat
کاپراهیرکوس Capra hircus	0	0.525	0.294	0.056
کاپرا ایبکس Capra Ibex	0.049	0	0.338	0.507
کاپرا ایگاگروس Capra aegagrus	0.017	0.053	0	0.277
بز خلخالی Khalkhali goat	0.001	0.049	0.017	0

به منظور تائید نتایج حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی، آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپ‌های شناسایی شده در توالی مورد مطالعه ترسیم شد (شکل۲). شبکه از طریق خوشه‌های مجزا هاپلوتایپ مشخص می‌شود. هاپلوتیپ با فراوانی بالا دایره بزرگتر و هاپلوتایپ‌های با فراوانی پایین دایره کمتر را نشان دادند. ساختار شبکه روابط هاپلوتیپی نشان داد که گونه‌های بز کاپراهیرکوس و بز خلخالی در یک هاپلوگروه ولی بزهای ایبکس و ایگاگروس در دو هاپلو گروه قرار گرفتند در بین توالی‌های بخشی از نمونه‌های ایگاگروس به صورت مشترک با هاپلوگروه متعلق به هیرکوس قرار گرفتند در حالی که بخش دیگر در هاپلوگروه متعلق به بزهای ایبکس قرار گرفت.



بزخلخالی ● ایبکس ● هیرکوس ● ایگاگروس

شکل ۲- شبکه به هم پیوسته هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در بز.

Figure 2- Network analysis of observed haplotype in goats.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه ۵ جهش با ۶ هاپلوتایپ در بز خلخالی شناسایی شد همچنین بررسی فاصله ژنتیکی بین گونه‌ها نشان داد که بز خلخالی متعلق به گروه هیرکوس است هرچند آنالیز شبکه‌ای نشان داد که شباهت‌هایی با بزهای ایگاگروس نیز دارد. نتایج این مطالعات منجر به یافتن اطلاعاتی

شد که ممکن است در آینده در مطالعات فیلوژنتیکی مؤثر باشد و می‌تواند در درک بهتر رابطه ژنتیکی بین بزهای بومی و غیربومی و طراحی سیاست‌های اصلاحی به محققین و پرورش‌دهندگان کمک کند.

منابع

Alinaghizadeh H, Mohammad Abadi MR, Zakizadeh S (2010). Exon 2 of BMP15 gene polymorphismin Jabal Barez Red Goat. Journal of Agricultural Biotechnology 2: 69-80 (In Farsi).

Amer SAM (2014). Mitochodrial DNA variability among some Saudi Arabian Goat Breeds. British Biotechnology Journal 4: 877-882.

Babar ME, Hussain T, Sadia H, Nadeem S, Kamran MZ, Badshah N (2014). Mitochondrial cytochrome b gene based phylogeny of Lohi and Thalli sheep breed of Pakistan. The Journal of Animal and Plant Sciences 24: 1260-1262.

Baghizadeh A, Bahaaddini M, Mohamadabadi MR. Askari N (2009). Allelic Variations in Exon 2 of Caprine MHC Class II DRB3 Gene in Raeini Cashmere Goat. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 6 (4): 454-459.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37-48.

Chen S, Fan B, Liu B, Yu M, Zhao S, Zhu M, Xiong T, Li K (2006). Genetic variations of 13 indigenous Chinese goat breeds based on cytochrome b gene sequences. Biochemical Genetics 44: 87-97.

Dolati Garehdarvishlu V, Hedayat Evrigh N, Nikbin S, Behmaram R, Fathi B, Seyedsharifi R (2017). Animal Science Journal (Pajouhesh and Sazandegi) 115: 117-126 (In Farsi).

FAO Statistical Databases (2004). FAOSTAT Agriculture (Available at:http://www.fao.org)

Gholizadeh M, Mianji GR, Zadeh HS (2008). Potential use of molecular markers in the genetic improvement of livestock. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 3: 120-128.

Hedayat-Evrigh N, Vahedi V, Seyed Sharifi R, Boustan A (2016). Sequencing and identification of single nucleotide polymorphisms of Partial myostatin gene in dromedary and Bactrian camels. Journal of Agricultural Biotechnology 8 (3):119-124.

Jiyanto J, Sutopo S, Kurnianto E (2014). The genetic diversity of Kejobong goat based on Cytochrome b gene. Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture 39: 75-82.

Karimi V, Hedayet Evrigh N, Seyed Sharifi R, Nikbin S (2017). Invetigation of genetic structure of Khalkhali goat using mitochondrial genome. Modern Genetic 2:1-11 (In Farsi).

Karimi V, Hedayet Evrigh N, Seyed Sharifi R, Nikbin S, Zahedi Y (2017) Detection of Polymorphism of Kappa Casein Gene in Iranian Khalkhali Goats. Iranian Journal of Animal Science Research: 229-239 (In Farsi).

Kim JH, Byun MJ, Kim MJ, Suh SW, Kim YS, Ko YG, Kim SW, Jung KS, Kim DH, Choi SB (2013). Phylogenetic analysis of Korean black cattle Based on the mitochondrial cytochrome b gene. Journal of Life Science 23: 24-30.

Liu YP, Cao SX, Chen SY, Yao YG, Liu TZ (2009). Genetic diversity of Chinese domestic goat based on the mitochondrial DNA sequence variation. Journal of Animal Breeding and Genetics 126: 80-89.

Moghadaszadeh M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh Koshkoieh A (2015). Association of Exon 2 of BMP15 gene with the litter size in the Raini cashmere goat. Genetics in the 3rd Millennium. 13: 4062-4067.

Parson W, Pegoraro K, Niederstatter H, Fofer M, Teil¬echner M (2000). Species identification by means of the cyto¬chrome b gene. International journal of legal medicine 114: 23-28.

Pidancier N, Jordan S, Gordon Luikart G, Pierre Taberlet P (2006). Evolutionary history of the genus Capra (Mammalia, Artiodactyla): Discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies. Molecular Phylogenetics and Evolution 40: 739–749.

Rahman ANMA, Ramli A, Wan Embong W (2008). A review of reproductive biotechnologies and their application in goat. Biotechnology 7(2): 371-384.

Rout P, Thangraj K, Mamdal A, Roy R (2012). Genetic variation and population structure in Jamunapari goats using microsatellites, mitochondrial DNA, and milk protein genes. The Scientific World Journal 2:9-12.

Sawaimul AD, Sahare MG, Ali SZ, Sirothia AR, Kumar S (2014). Assessment of genetic variability among Indian sheep breeds using mitochondrial DNA cytochrome-b region. Veterinary World 7: 852-855.

Sepehri B, Seyedabadi HR (2015). Molecular analysis of khalkhali goat population based on cytb region of mitochondrial DNA. Biological Forum 7(1):1311-1316.

Shabthar SMN, Rosli MKN, Mohd-Zin NAA, Romaino SMN, Fazly-Ann ZN, Mahani MC, and Abas-Mazni O (2013). The molecular phylogenetic signature of Bali cattle revealed by maternal and paternal markers. Molecular Biology Reports 40:5 165–5176.

Shojaei M, Mohammad Abadi MR, Asadi Fozi M, Dayani O, Khezri A, Akhondi M (2010). Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Journal of Cell and Molecular Research 2: 67-73.

Song X, Xu C, Yue Z, Wang L, Wang G, Yang F (2015). Bioinformatic analysis based on the complete coding region of the MSTN gene within and among different species. Genetics and Molecular Research 15: 1-11.

Tajima F (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, maximum parsimony methods. Molecular Biology Evolution 28: 2731-2739.

Tobe SS, Linacre AM (2008). A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. Electrophoresis 29: 340-347.

Wisnieska MN, Slota E, Kalisz B (2010). Use of cytochrome b polymorphism for species identification of biological material derived from cattle, sheep, goqt, deer and red deer. Folia Biologica 58: 47-50.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, Saki AA, Ershadi A, Banabazi MH, Abdolmohammadi AR (2013). Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology 10: 1812-1817.

Phylogenetic analyzing of Khalkhali goats using cytochrome b gene

Dolati V. [1], Evrigh N.*[2], Nikbin S.[2], Behmaram R.[2]

[1]MSc student of Animal Science, Faculty of Agricultural and natural Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
[2]Assistant professor of Animal Science, Faculty of Agricultural Science and natural, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Abstract

Khalkhali goat is an Iranian indigenous goat that the number of population has been decreasing nowadays. Study about the practical genetic structure is necessary for biodiversity conservation of native breeds. The aim of this study was the sequencing of Cytochrome b gene of 100 Khalkhali goat and comparison with other goat species using bioinformatics data (26 samples). we used the sequences of NCBI data to compare between goat species. The results of sequencing led to the identification of 5 mutations with 6 Haplotypes in Iranian Khalkhali goat samples. The haplotype diversity, nucleotide diversity and the average of a different nucleotide were 0.644, 0.002 and 1.822 respectively. Tajima D was obtaining 0.124 that was not significant. The result of comparison analysis between goat species indicates that nucleotide diversity in Capra hircus, Capra ibex, and Capra aegagrus were 0.047, 0.022 and 0.001 respectively. The highest genetic distance observed between Ibex and aegagrus, while the lowest was between Khalkhli goat and Capra hircus. In compare with aegagrus goat, the ibex goat was closer to Capra hircus.

Keywords: *Bioinformatics analysis, Khalkhali goat, Genetic diversity, Sequencing, Cytochrome b gene.*

* Corresponding Author: Evrigh Nemat Tel: 045-331505154 Email: nhedayat@uma.ac.ir