Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Genetic and Phylogenetic Analysis of the Mitochondrial Genome in Khuzestan Buffalo

Hamid Reza Seyedabadi

Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: h_seyedabadi@yahoo.com

Sima Savar Sofla

*Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Tel: +989123307118, Email: simasavar@gmail.com

Cyrus Eidivandi

Animal Science Department, Islamic Azad University, Behbahan Unit, Behbahan, Iran. Emai: sirouseidivandi@gmail.com

Iman Harasi

Graduated of Ms. From Islamic Azad University, Behbahan Unit, Behbahan, Iran. Emai:h_seyedabadi@yahoo.com

Abstract

Objective

A molecular study of the buffalo genetic structure can be effective for better understanding the origin of this animal. Among the molecular markers, mitochondrial genomic sequencing is one of the best and most commonly used methods for genetic classification of populations and species close together, studying the possibility of deriving different species from a common ancestor, studying the phylogenic relationship of each species with other species and races, and obtaining solutions for conservation genetic resources. The purpose of this research was to determine the sequence of 12s rRNA and 16s rRNA regions of Khouzestan buffalo.

Materials and methods

For this study, 30 blood samples collected from both sexes of unrelated Khuzestan buffalo. After DNA extraction, the target regions amplified by corresponding specific primers by PCR technique and sequenced after purification.

Results

The results of matching the sequences of 12srRNA and 16srRNA regions of Khuzestan buffalo showed that there was no mutation in this population, which indicates low diversity in Khuzestan buffalo population. According to this study, the 12srRNA and 16srRNA regions are encoding regions and the mutation and diversity are low. The results of the phylogenetic test using UPGMA for both sites showed that the buffaloes of Iran with Indian and Italian buffaloes are in a closely spaced cluster.

Conclusions

Finally, the sequences generated from these regions were the first recorded in the gene bank with MG650115 access code and the name of the Khuzestan buffalo brought to the World Bank Gene, and this race introduced to international associations.

Keywords: Khuzestan buffalo, mitochondrial genome, sequencing, 12s rRNA ,16s rRNA.

Citation: Seyedabadi HR, Savar Sofla S, Eydivandi C, Harasi I (2019) Genetic and Phylogenetic Analysis of the Mitochondrial Genome in Khuzestan Buffalo. Agricultural Biotechnology Journal 11(3), 175-190.

Agricultural Biotechnology Journal 11(3), 175-190.

DOI: 10.22103/jab.2019.14114.1133

Received: August 3, 2019; Accepted: September 28, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی بخشی از ژنوم میتوکندری در گاومیش‌های خوزستان

حمیدرضا سیدآبادی

موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. ایمیل: h_seyedabadi@yahoo.com.

سیما ساورسفلی

* موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۳۳۰۷۱۱۸، ایمیل: simasavar@gmail.com.

سیروس عیدی وندی

گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بهبهان، بهبهان، ایران. ایمیل: sirouseidivandi@gmail.com.

ایمان حرسی

فارغ التحصیل مقطع کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بهبهان، بهبهان، ایران. ایمیل: h_seyedabadi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۶

چکیده

هدف: مطالعه مولکولی ساختار ژنتیکی گاومیش برای شناخت دقیق‌تر خا ستگاه این حیوان می‌تواند موثر با شد. در بین ن شانگرهای مولکولی، توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از بهترین و رایج‌ترین روش‌ها برای طبقه‌بندی ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم، 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. هدف از این تحقیق تعیین توالی نواحی 12s rRNA و 16s rRNA ژنوم میتوکندری گاومیش خوزستان و تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی بخشی از آن بود.

مواد و روش‌ها: برای انجام این تحقیق تعداد ۳۰ عدد نمونه خون از هر دو جنس از گاومیش‌های غیرخویشاوند جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA از آن‌ها، ناحیه مورد نظر توسط پرایمرهای اختصاصی با تکنیک PCR تکثیر و پس از خالص‌سازی توالی‌یابی شدند.

نتایج: نتایج حاصل از هم‌ردیف کردن توالی‌های نواحی 12srRNA و 16srRNA گاومیش خوزستان نشان داد که هیچگونه جهشی در جمعیت مذکور وجود ندارد که این امر بیانگر سطح تنوع پایین در جمعیت گاومیش خوزستان می‌باشد. براساس این تحقیق، نواحی 12srRNA و 16srRNA ناحیه کد کننده می‌باشد و میزان جهش و تنوع در آن پایین است. نتایج آزمون فیلوژنتیکی با استفاده از UPGMA برای هر دو جایگاه نشان داد که گاومیش‌های ایران با گاومیش‌های هندی و ایتالیایی در یک خوشه و نزدیک به هم می‌باشند.

نتیجه‌گیری: توالی حا صل از این مناطق برای اولین بار در بانک ژن با کد د ستر سی MG650115 ثبت شد و با ا ضافه شدن نام گاومیش خوزستان در بانک جهانی ژن، این نژاد به انجمن‌های بین‌المللی معرفی شد.

کلمات کلیدی: تعیین توالی، ژنوم میتوکندری، گاومیش خوزستان، نواحی12s rRNA و 16s rRNA.

مقدمه

گاومیش آسیایی به دو زیرگونه گاومیش رودخانه‌ای و گاومیش باتلاقی تقسیم می‌شود که از نظر مورفولوژی، ژنتیکی و نیز نوع بهره‌برداری با یکدیگر تفاوت دارند. عمدتا در ایران ۳ اکوتیپ مختلف گاومیش در شمال، شمال‌غرب و جنوب‌غرب کشور دیده می‌شود. اکوتیپ آذری با بیش‌ترین جمعیت (۷۰ درصد کل گاومیش‌های کشور) در شمال غرب و پس از آن اکوتیپ‌های خوزستانی (۲۲ درصد کل گاومیش‌های کشور) و مازندرانی و گیلانی (۸ درصد کل گاومیش‌های کشور) به ترتیب در جنوب غرب و شمال کشور دیده می‌شوند (Moioli 2005). گاومیش‌های بومی ایران از جمله ذخائر ژنتیکی مهم کشور محسوب می‌شوند که نقش مهمی در اقتصاد روستائیان دارند. این دام با مزایایی چون مقاومت زیاد نسبت به بیماریها، تطابق‌پذیری مناسب با شرایط پرورش و نیروی کار فراوان، تولید شیر با درصد پروتئین، چربی، لاکتوز و امگا۳ بالا نسبت به شیر گاو و تولید گوشت با چربی و کلسترول پایین‌تر در مقایسه با گاو شیرده نقش زیادی در بهبود و توسعه اقتصاد خانواده های روستایی دارد (Baharizadeh and Vaez Torshizi 2011). طبق آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی، تعداد ۱۸۸۳۰ واحد صنعتی گاوداری با ظرفیت ۲۰۴۸۵۶۳ راس گاو شیرده در کشور مشغول فعالیت هستند. طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۷ تولید شیر دارای یک روند رو به رشد بوده است (Kharrati Koopaei, et al., 2011). با وجود روند افزایشی تولید شیر در کشور اما هنوز سرانه مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین‌تر است.

سرانه مصرف شیر در کشور برای هر نفر برابر با ۹۵ کیلوگرم می‌باشد، در حالی که سرانه مصرف شیر در جهان برابر با ۱۶۹ کیلوگرم و در اروپا برابر با ۳۵۰ کیلوگرم در سال است (Kharrati Koopaei, et al., 2011). با توجه به آمار و اطلاعات موجود می‌توان دریافت که اهداف اصلاح نژادی در ایران بایستی برای افزایش تولید شیر در کشور برنامه‌ریزی شود. لذا مطالعه و بررسی عواملی که روی تولید دام‌ها نقش موثری دارند اهمیتی دو چندان می‌یابد (Kharrati Koopaei, et al., 2012).

در بین مارکرهای ژنتیکی، توالی‌یابی ژنوم میتوکندری امکان مطالعه تنوع ژنتیکی حیوانات در طبقه‌بندی ژنتیکی جمعیت‌ها و تشخیص گونه‌ها و نژادها را فراهم می‌کند و یکی از بهترین روش‌ها برای بررسی خلوص نژادهای بومی است. استفاده از نشانگرهای ژنتیکی توالی‌یابی ژنوم میتوکنـدری، یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تشـخیص گونه‌ها و تعیین رابطه فیلوژنی بین جمعیـت‌هـا و گونه‌های نزدیک به هم تشخیص شده است؛ همچنین می‌تواند نقش مهمی در حفظ نژادهای بومی در معرض خطر انقراض و بررسی اختلاط ژنتیکی آن‌ها با سایر نژادها داشته باشد (Hiendleder et al. 1998). از بین نواحی مختلف ژنوم میتوکندری، سیتوکروم b، 12sRNA و 16sRNA به عنوان نشانگرهای تشخیص گونه مطرح هستند (Guha et al. 2006). با توجه به این‌که میتوکندری منشا مادری دارد، این خاصیت باعث تشخیص بهتر اختلافات ژنتیکی در ژنوم میتوکندریایی نسبت به ژنوم هسته شده است. در گونه‌های جانوری ژنوم میتوکندریایی ۳۷ ژن را کد می‌کند که شامل ۱۳ ژن کد کننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کد کننده tRNA و ۲ ژن کد کننده rRNA می‌باشد. کد کردن tRNA و rRNA نشان دهنده سنتز پروتئین در میتوکندری است. ژنوم میتوکندری به طور مستقل تکثیر و رونویسی و ترجمه می‌شود (Denver et al. 2000).

در تحقیقی از ناحیه 16s rRNA میتوکندری (Ramadan 2011) و در تحقیقی دیگر از ناحیه 12s rRNA میتوکندری به عنوان مشخصه ژنتیکی گونه‌های مختلف گاو، گاومیش، گوسفند و بز استفاده شده است (Ramadan and Mahfoz 2008). با طراحی آغازگرهای اختصاصی از نواحی متفاوت DNA میتوکندری (12s rRNA و 16s rRNA) برای تشخیص تقلب در خوراک چهار دسته از حیوانات (۳ گونه نشخوار کننده، ۲ گونه پرنده، خوک سانان و ۱۲ گونه ماهی) که نتایج وجود تقلب در مواد خوراکی را اثبات کردند، استفاده شده است (Dalmasso et al. 2004). در تحقیقی با تأکید بر نواحی ژنی متفاوت DNA میتوکندری (12s rRNA و 16s rRNA) و آزمودن نمونه‌های مواد غذایی (سوسیس، کالباس و گوشت چرخ‌کرده) نسبت به شناسایی و ردیابی گونه‌ای حیوانی استفاده شده اقدام نمودند که نتایج نشان از اعمال تقلب در برخی از این فرآورده‌های غذایی صنعتی داشت (Ghovvati et al. 2008). از سوی دیگر، با پیشرفت علم ژنتیک، ژن به عامل اصلی در برنامه‌ریزی عملکرد سلول و به دنبال آن کنترل ویژگی‌های موجود زنده شناخته شد. به این ترتیب تمایل برای شناخت هرچه بیشتر ژن‌ها به منظور توجیه پدیده‌های زیستی افزایش یافت؛ تا حدی که در چند دهه اخیر، تجهیزات مورد نیاز در تحقیقات مولکولی به طور گسترده‌ای افزایش یافته است و امروزه تحقیقات مولکولی جزو مطالعات رایج آزمایشگاه‌های زیستی است. اطلاعات به دست آمده از تحلیل داده‌های زیستی به وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی‌ها در

بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش‌گویی ساختار و عملکرد محصولات ژنها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژنها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند (Hadizadeh et al. 2013; Hadizadeh et al. 2014). از طرف دیگر، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه‌ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد (Mohammadabadi et al. 2017). روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید، زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به دست می‌دهد می‌تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش‌های آماری به دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است که آنها را رد کند (Alinaghizadeh et al. 2010). به علاوه، استفاده از ژنتیک ملکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی‌دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (Vajed Ebrahimi et al. 2016) همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به طور مهیجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (Mohammadabadi 2017). همچنین مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (Mohammadi et al. 2009; Vajed Ebrahimi et al. 2017). 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 (Khodabakhshzadeh et al. 2016; Zamani et al. 2015). لذا، تحقیق حاضر با هدف تعیین توالی نواحی 12s rRNA و 16s rRNA ژنوم میتوکندری گاومیش خوزستان و تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی بخشی از آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از سیاهرگ وداج گردنی ۱۰ رأس گاومیش موجود در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گاومیش صفی آباد خوزستان و ۲۰ رأس گله‌های مردمی تحت پوشش امور دام استان خوزستان نمونه‌های خون به مقدار ۵ میلی‌لیتر در تیوب‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شد و بلافاصله به آزمایشگاه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور انتقال و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰-^{oc} نگه‌داری شدند. استخراج DNA از خون کامل با استفاده از روش اصلاح شده نمکی (Miller et al. 1998) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر Nano Drop-ND (Thermo، آمریکا) سنجیده شد. آغازگرهای اختصاصی ناحیه 12s rRNA و 16s rRNA از روی ژنوم کامل گاومیش با شماره دسترسی AY195591 و با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 (Lalitha 2000) طراحی شد (جدول ۱).

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده و طول قطعه تکثیر شده.

Table 1. Primer Sequence used and Product Length PCR.

ناحیه Region	توالی آغازگر Primer Sequence		طول قطعه تکثیر شده Product Length PCR (bp)
12s rRNA	5'-GGTTTGGTCCCAGCCTTCC-3'	آغازگر رفت Forward	859
	5'-TTTACTTGAGGAGGGTGA -3'	آغازگر برگشت Reverse	
16s rRNA	5'–ACCGCAAGGGAACGATGA-3'	آغازگر رفت Forward	925
	5'-CATTCCCGCCTCTTCACG-3'	آغازگر برگشت Reverse	

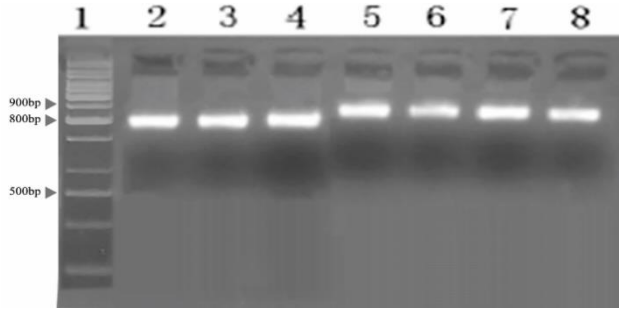
با استفاده از رویه Blast موجود در پایگاه بانک جهانی ژن، میزان همپوشانی آن‌ها با توالی‌های موجود، مقایسه شد. پس از آزمایش غلظت‌های مختلف اجزا PCR، شرایط بهینه PCR با حجم نهایی ۱۵ µl به صورت ۱x بافر PCR، ۲ mM $Mgcl_2$ ، ۰/۲۵mM آغازگر، ۲۰۰mM dNTPs، ۰/۶ واحد آنزیم Taq پلیمراز و DNA الگو به میزان ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانوگرم به دست آمد. برنامه حرارتی مناسب برای آغازگر مورد مطالعه به صورت: واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۸ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل: واسرشته‌سازی ثانویه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌های پلیمراز روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. ۲۰ میکرولیتر (۴۰۰ نانوگرم) از محصولات واکنش زنجیره‌های پلیمراز، خالص‌سازی با استفاده از کیت BIONNER و 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 توالی‌یابی به شرکت ماکروژن در کره جنوبی فرستاده شد. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از برنامه Chromas Lite 2.01 تجزیه و تحلیل شد. برای تعیین بالاترین همولوژی توالی گاومیش از رویه Blast تحت پایگاه NCBI استفاده شد. مقایسه توالی‌ها و هم‌ردیف کردن آن‌ها با استفاده از رویه ClastalW صورت گرفت. توالیConsensus برای گاومیش با استفاده از برنامه نرم افزاری Bioedit تعیین و این توالی توسط برنامه Sequin پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد. برای رسم نمودار فیلوژنی از رویه Neighbor- joining نرم افزار MEGA6 استفاده شد و برای مقایسات فیلوژنی توالی ناحیه 12s rRNA و 16s rRNA، یک فیلوژنی با توالی گاومیش خوزستان با سایر نژادها در جهان برای تعیین گروه هاپلوتیپی رسم شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از خون در تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد کهDNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار است (شکل ۱). الکتروفورز محصولات واکنش زنجیرهای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان داد که پرایمرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعات اختصاصی برای ژن‌های 12s rRNA و 16s rRNA به طول ۸۵۹ و ۹۲۵ جفت باز به ترتیب تولید نمودند (شکل ۲). 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. با استفاده از نرم افزار Chromas Lite توالی‌های خوانش‌شده با فرمت ABI به صوت منحنی و قله‌های رنگی قابل مشاهده شدند. توالی‌یابی با کیفیت بسیار مناسبی صورت گرفته بود. به طور کلی کیفیت توالی‌یابی مناسب بود که ناشی از خالص‌سازی قطعات تکثیری قبل از ارسال نمونه‌ها می‌باشد.

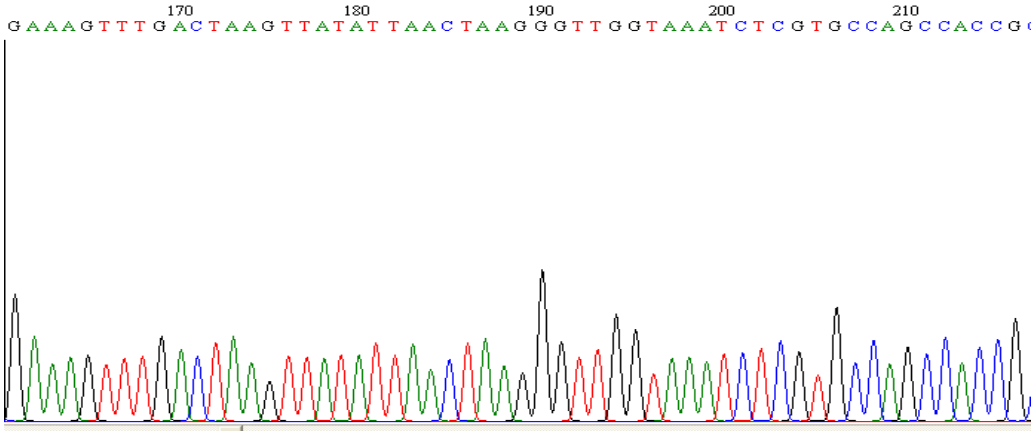
شکل ۱. تعیین کیفیت DNA **استخراج شده به روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ . شماره های ۱ تا ۷، نمونه‌های** DNA **و** M **نشانگر اندازهٔ شمارهٔ** XVII (500bp) **شرکت** Roche **آلمان می‌باشد.**

Figure 1. Determination of DNA quality extracted by electrophoresis on 1% agarose gel. Numbers 1 to 7 represent DNA and M samples of Roche's XVII number (500 bp).



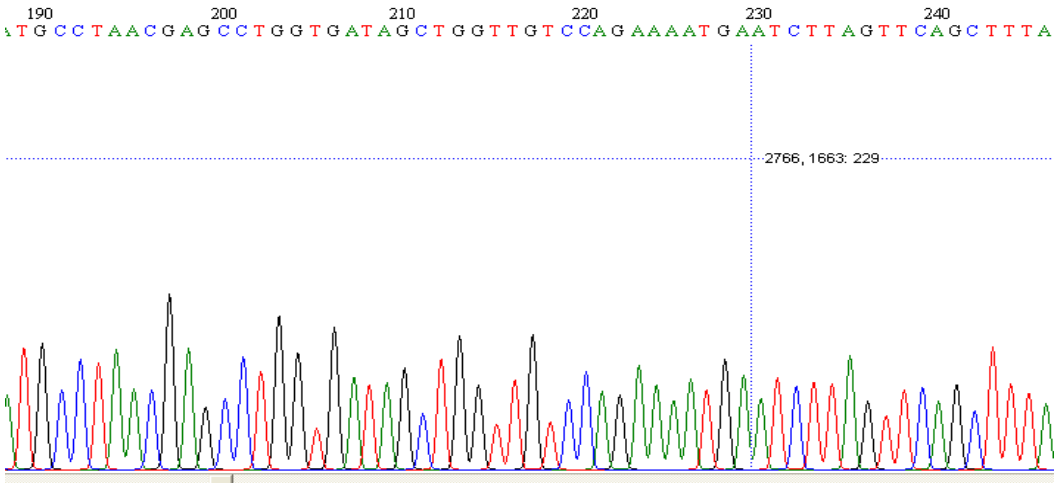
شکل ۲. قطعه ۹۲۵ و ۸۵۹ جفت بازی حاصل از الکتروفورز محصولات PCR.

Figure 2. 925 and 859 bp fragments obtained by electrophoresis of PCR product.



شکل ۳. بررسی صحت توالی‌یابی نمونه‌ها برای ژن 12s rRNA.

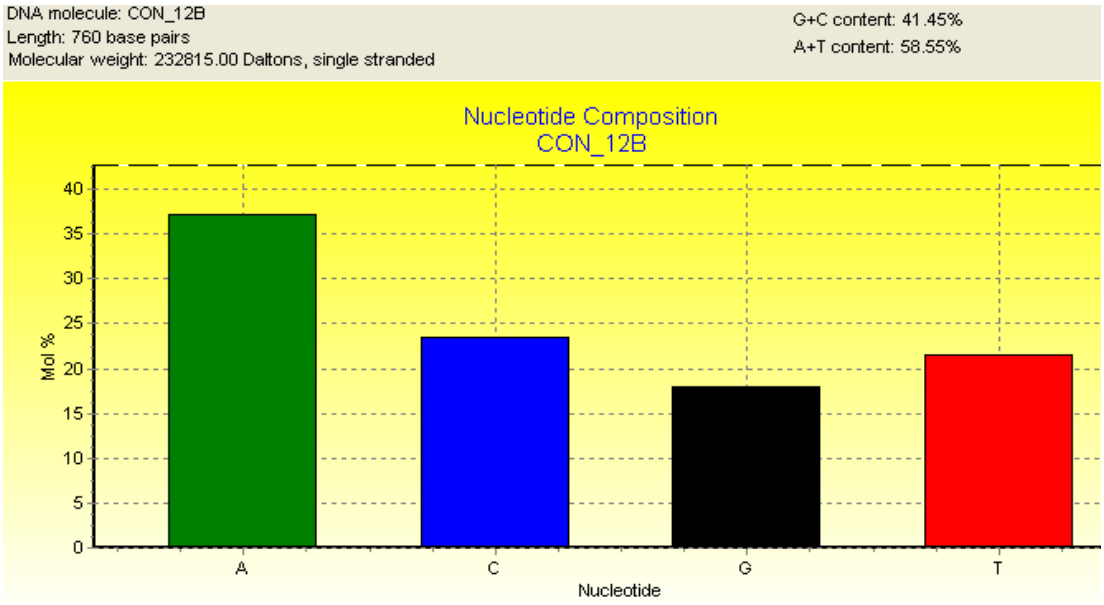
Figure 3. Check the accuracy of sample sequences for the 12s rRNA gene.



شکل ٤. بررسی صحت توالی‌یابی نمونه‌ها برای ژن 16s rRNA.

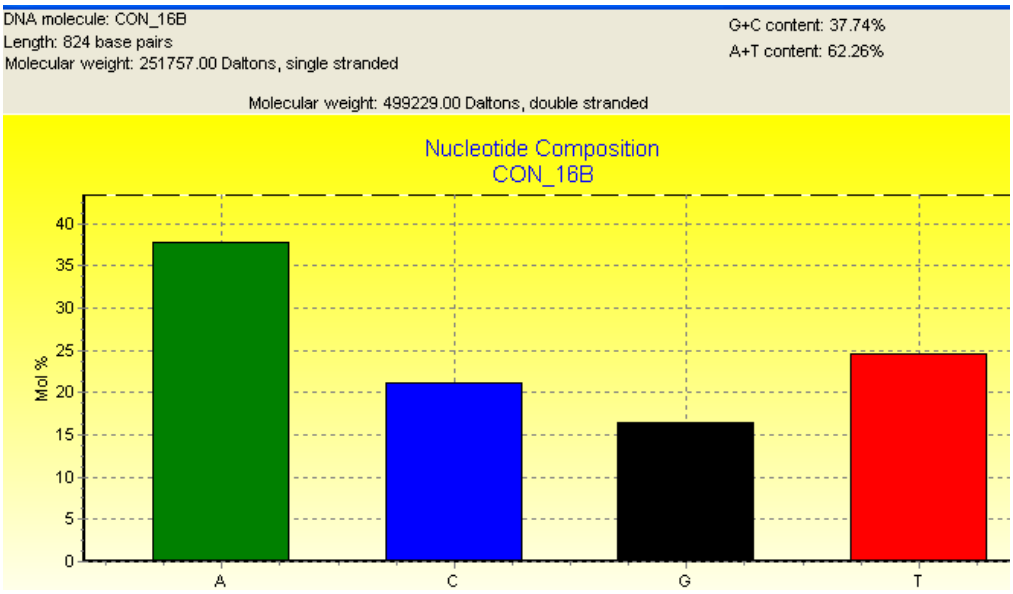
Figure 4. Check the accuracy of sample sequences for the 16s rRNA gene.

نتایج نشان داد هم‌ردیف شدن قطعات مورد آنالیز به خوبی صورت گرفته است و نمونه‌ها در سطح ۱۰۰ درصد با هم هم‌پوشانی داشتند. براساس نتایج حاصل از هم‌ردیف کردن توالی نواحی12s rRNA و 16srRNA گاومیش خوزستان، هیچگونه جهشی در این نواحی مشاهده نشد. این نتایج با نتایج تحقیق Nagarajan et al. (2015) که روی تنوع ژنتیکی DNA میتوکندری گاومیش‌های بومی رودخانه‌ای از هند، پاکستان، مصر و ایران تحقیق نمودند مطابقت دارد. این محققین، مشابه با تحقیق حاضر هیچگونه جهشی در ناحیه 12s rRNA و 16srRNA مشاهده ننمودند. همچنین Manea et al. (2013)، در تحقیق خود که روی مقایسه توالی ناحیه16srRNA در گاو، گاومیش، گوسفند، بز و خوک انجام گرفت پیشنهاد نمودند به دلیل اینکه ناحیه16srRNA یک ناحیه حفاظت شده می‌باشد می‌توان از این ناحیه در تشخیص تقلبات قصابی استفاده نمود. تعیین توالی‌های مورد توافق یکی از روش‌های معمول برای ثبت و شناسایی نژادهای مختلف می‌باشد. به این منظور نمونه‌های هم‌ردیف شده برای تعیین توالی Consensus با استفاده از نرم افزار BioEdit و با طول تقریباً ۷۵۵ جفت باز برای ژن 12srRNA و ۸۲۵ جفت باز برای ژن 16srRNA به عنوان توالی شاخص برای این نژاد به‌دست آمد. محتوای توالی مورد توافق به دست آمده از هاپلوتایپ‌ها برای ناحیه 12srRNA شامل ۲۸۲ نوکلئوتید آدنین، ۱۷۹ نوکلئوتید سیتوزین، ۱۳۶ نوکلئوتید گوانین و ۱۶۳ نوکلئوتید تیمین می‌باشد (شکل ۵). برای ناحیه 16srRNA شامل ۳۱۱ نوکلئوتید آدنین، ۱۷۵ نوکلئوتید سیتوزین، ۱۳۶ نوکلئوتید گوانین و ۲۰۲ نوکلئوتید تیمین می‌باشد (شکل ۶).



شکل ۵. درصد ترکیب نوکلئوتیدی توالی Consensus **برای ناحیه12srRNA.**

Figure 5. The percentage of nucleotide composition of the Consensus sequence for region 12srRNA.



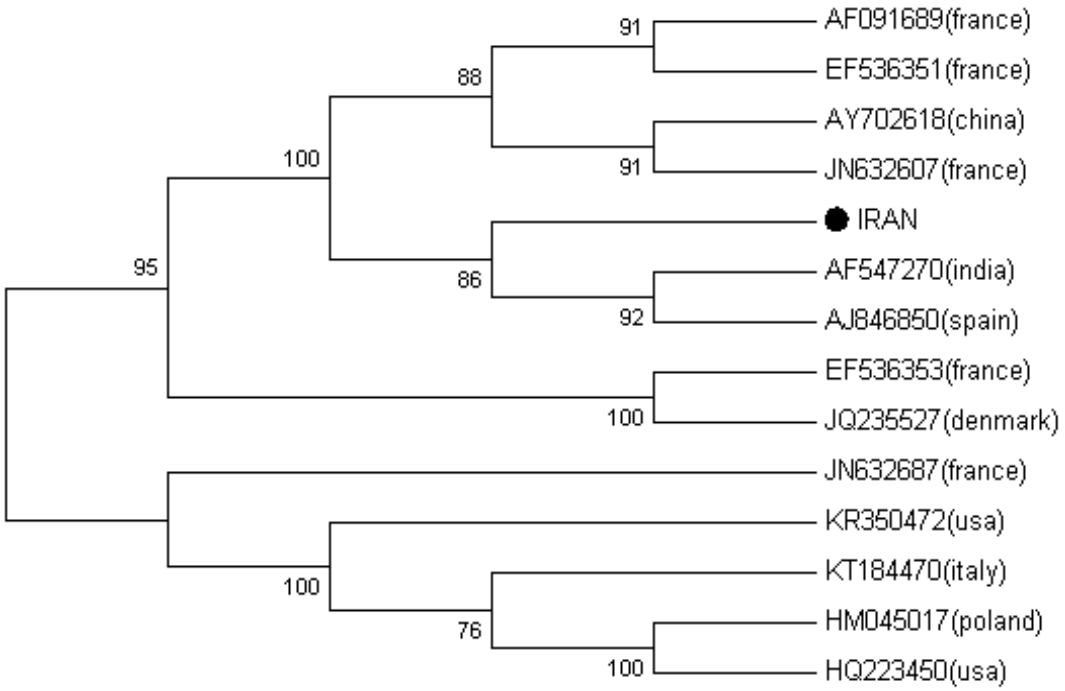
شکل ٦. درصد ترکیب نوکلئوتیدی توالی Consensus **برای ناحیه16srRNA.**

Figure 6. The percentage of nucleotide composition of the Consensus sequence for region 16srRNA.

ارتباط تکاملی بین موجودات به وسیله درخت فیلوژنتیک نمایش داده می‌شود. از آن‌جا که تکامل در طول دوره‌های زمانی طولانی که به طور مستقیم قابل مشاهده نیست اتفاق می‌افتد، زیست‌شناسان باید فیلوژنی‌ها را با استنباط روابط تکاملی میان جانداران امروزی بازسازی کنند. امروزه، داده‌های مولکولی، شامل پروتئین و رشته‌هایDNA، برای تشخیص روابط تبارزایی و ساخت درخت‌های فیلوژنتیک استفاده می‌شوند. در این مطالعه از توالی نواحی 12srRNA و 16srRNA ژنوم میتوکندریایی گاومیش خوزستان برای بررسی روابط فیلوژنتیکی استفاده شده است. بدین شکل که در مرحله اول توالی مورد توافق این نواحی با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI تحت فرآیند BLAST مورد مقایسه قرار گرفتند. طی این فرآیند تعدادی توالی نواحی 12srRNA و 16srRNA ژنوم میتوکندریایی گاومیش از نژادهای مختلف که با نواحی مورد مطالعه هم‌پوشانی داشتند از این پایگاه دریافت و تحت رویه Clustal برنامه MEGA6 با توالی‌های به‌دست آمده در این مطالعه هم‌ردیف‌سازی شدند. درخت فواصل ژنتیکی در شکل ۷ و ۸ نشان داده شده است. نتایج آزمون فیلوژنتیکی با استفاده از UPGMA برای هر دو جایگاه نشان داد که گاومیش‌های ایران با گاومیش‌های هندی و ایتالیایی در یک خوشه و نزدیک به هم می‌باشند. این نتایج با نتایج تحقیق Nagarajan et al. (2015) مطابقت ندارد. این محققین در مطالعه خود گزارش کردند که گاومیش‌های هندی، پاکستانی و مصری در یک خوشه نزدیک به هم و با فاصله زیاد از گاومیش‌های ایرانی قرار دارند.

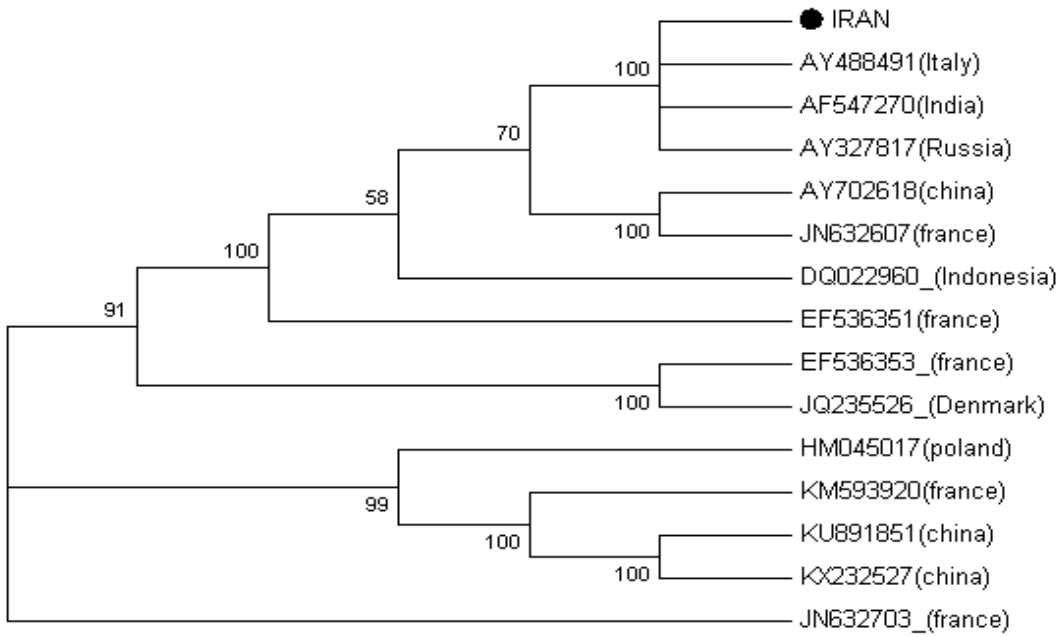
به طور کلی نتایج حاصل از هم‌ردیف کردن توالی‌های نواحی 12srRNA و 16srRNA گاومیش خوزستان نشان داد هیچگونه جهشی در جمعیت مذکور وجود نداشت که بیانگر سطح تنوع پایین در جمعیت گاومیش خوزستان باشد. نتایج مطالعه اخیر دلالت بر این دارد، که نواحی 12srRNA و 16srRNA کد کننده می‌باشند و میزان جهش و تنوع در آن پایین است (Ramadan and Mahfoz, 2008). لذا می‌توان نتیجه گرفت که این نواحی به عنوان نشانگرهایی بالقوه، امکان شناسایی و تمایز بین گونه‌ها را ممکن می‌سازند.

با توجه به اینکه هیچ اطلاعاتی از توالی‌های مربوط به گاومیش استان خوزستان در بانک جهانی ژن وجود ندارد، با انجام این مطالعه ثبت توالی نواحی 12srRNA و 16srRNA ژنوم میتوکندری گاومیش خوزستان در بانک جهانی ژن به نام گاومیش خوزستان انجام شد (MG650115).



شکل ۷. مقایسه توالی Consensus **به دست آمده برای ناحیه** 12srRNA **با توالی‌های موجود در NCBI.**

Figure 7. Comparison of the consensus sequence for the 12srRNA region with the sequences in the NCBI.



شکل ۸. مقایسه توالی Consensus **به دست آمده برای ناحیه** 16srRNA **با توالی‌های موجود در NCBI.**

Figure 8. Comparison of the consensus sequence for the 16srRNA region with the sequences in the NCBI.

منابع

بهاری زاده مریم، واعظ ترشیزی رسول (۱۳۹۰) بررسی عوامل محیطی موثر بر صفات مهم تولیدی گاومیش های ایران. پژوهشهای علوم دامی ۲۱ (۱)، ۱۳۸-۱۲۷.

خراتی کوپایی حامد، محمدآبادی محمدرضا، ترنگ علیرضا و همکاران (۱۳۹۱) بررسی ارتباط بین تغییرات آلل ژن DGAT1 با ورم پستان در گاوهای هولشتاین ایران. مجله ژنتیک نوین ۷ (۱)، ۱۰۱-۱۰۴.

خراتی کوپایی حامد، محمدآبادی محمدرضا، انصاری مهیاری سعید و همکاران (۱۳۹۰) تغییرات ژنتیکی ژن DGAT1 و ارتباط آن با تولید شیر در جمعیت گاو هلشتاین ایران. مجله علمی پژوهشی ایران ۳ (۲)، ۱۹۲-۱۸۵.

محمدی اکرم، محمدآبادی محمدرضا، میرزایی حمیدرضا و همکاران (۱۳۸۶) مطالعه ژن کاپاکازئین گاوهای بومی و هلشتاین در استان کرمان با استفاده از روش PCR_RFLP. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۱۶، ۱۲۵-۱۳۲.

علینقی‌زاده روح الله، محمدآبادی محمدرضا، زکی‌زاده سونیا (۱۳۸۹) چندشکلی اگزون ۲ ژن BMP15 در بز قرمز جبال بارز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۲ (۱)، ۸۰-۶۹.

واجد ابراهیمی محمدتقی، محمدآبادی محمدرضا، اسماعیلی کشکوئیه علی (۱۳۹۴) بررسی تنوع ژنتیکی پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره‌ای. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۷ (۴)، ۱۵۸-۱۴۳.

هادی‌زاده مرتضی، محمدآبادی محمدرضا، اسماعیلی زاده علی و همکاران (۱۳۹۳) تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک از اگزون ۲ ژن BMP15 در بزهای تالی و بیتال. مجله ژنتیک نوین ۹ (۱)، ۱۲۰-۱۱۷.

هادی‌زاده مرتضی، محمدآبادی محمدرضا، نیازی علی و همکاران (۱۳۹۲) استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک برای مطالعه اگزون شماره ۲ ژن GDF9 در بزهای تالی و بیتال. مجله ژنتیکی نوین ۸ (۳)، ۲۸۸-۲۸۳.

References

Alinaghizadeh H, Mohammad Abadi MR, Zakizadeh S (2010) Exon 2 of BMP15 gene polymorphismin Jabal Barez Red Goat. Agric Biotechnol J 2, 69-80 (In Persian).

Baharizadeh M, VAez Torshizi R (2011) Investigation of environmental effects on production traits in Iranian buffalo. Anim Sci Res 21,127-138 (In Persian).

Dalmasso A, Fontanella E, Piatti P et al. (2004) A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Mol Cell Probe 18, 81–87.

Denver DR, Morris K, Lynch M et al. (2000) High direct estimate of the mutation rate in the mitochondrial genome of Caenorhabditis elegans. Sci 289, 23-42.

Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ et al. (2008) Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. Food Control 20, 696-699.

Guha S, Goyal SP, Kashyap VK (2006) Genomic variation in the mitochondrially encoded cytochorome b and 12s RNA genes. Characterization of eight endsngered pecorn species. Anim Genet 37, 262-265.

Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Niazi A et al. (2013) Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetal goats. Modern Genet J 8, 283-288 (In Persian).

Hadizadeh M, Niazi A, Mohammad Abadi M et al. (2014). Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. Modern Genet J 9, 117-120 (In Persian).

Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R et al. (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (Ovis aries) and comparison with the other major ovine haplotype. Mol Bio Evol 47, 441-448.

Kharrati Koopaei H, Mohammad Abadi MR, Ansari Mehyari S et al. (2012) Effect of DGAT1 variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. Anim Sci Papers Report 30, 231-240.

Kharrati Koopaei H, Mohammadabadi MR, Ansari Mehyari S et al. (2011) Genetic Variation of DGAT1 Gene and its Association with Milk Production in Iranian Holstein Cattle Breed Population. Iran J Anim Sci Res 3, 185-192 (In Persian).

Kharrati koopaei H, Mohammadabadi MR, Tarang A et al. (2012) Study of the association between the allelic variations in DGAT1 gene with mastitis in Iranian Holstein cattle. Modern Genet J 7, 101-104 (In Persian).

Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh Koshkoieh A et al. (2016b) Identification of point mutations in exon 2 of *GDF*9 gene in Kermani sheep. Polish J Vet Sci 19, 281–289.

Lalitha S (2000) Primer premier 5. Biotech Software & Internet Report: The Com Software J Sci 1, 270-272.

Manea BG, Mendirattaa SK, Tiwarib AK et al. (2013) Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA gene to identify meat species. J Appl Anim Res 41, 7781.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1998) A Simple salting out pro cedure for extraction of DNA from human nucleated cell. Nucl Acid Res 16, 12-15.

Mohammadabadi MR (2017) Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. J Adv Agri 7, 1117-1121.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep J Res Dev 5, 154-157.

Mohammadi A, Mohammadabadi MR, Mirzaei H et al. (2009) Study of Kappa Casein gene of local and Holstein dairy cattle in Kerman province using PCR-RFLP method. J Agri Sci Nat Res 16, 125-132 (In Persian).

Moioli B (2005) Breeding and selection of dairy buffalo. FAO press. Italy.

Nagarajan M, Nimisha K, Kumar S (2015) Mitochondrial DNA Variability of Domestic River Buffalo (Bubalus bubalis) Populations: Genetic Evidence for Domestication of River Buffalo in Indian Subcontinent. Gen Bio Evol Adv Acce pub 1-18.

Ramadan H (2011) Sequence of specific mitochondrial 16S rRNA gene fragment from Egyptian buffalo is used as a pattern for discrimination between river buffaloes, cattle, sheep and goats. Mol Biol Rep 38, 3929–3934.

Ramadan HAI, Mahfoz I (2008) Phylogenetic analysis and comparison between cow and buffalo (including Egyptian buffaloes) mitochondrial displacement-loop regions. Mitochondrial DNA 19, 401–410.

Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2016) Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers. J Agri Biotech 7, 143-158 (In Persian).

Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2017) Using microsatellite markers to analyze genetic diversity in 14 sheep types in Iran. Arch Anim Breed 60, 183-189.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. Small Rum Res 132, 123-127.