

## بررسی ساختار ژنتیکی و تجزیه فیلوژنتیکی جمعیت بز خلخالی با استفاده از ژنوم میتوکندری

### Investigation of genetic structure of Khalkhali goat using mitochondrial genome

وحیده کریمی عوری<sup>۱</sup>، نعمت هدایت ایوریق<sup>\*۱</sup>، رضا سید شریفی<sup>۱</sup>، سعید نیک‌بین<sup>۱</sup>  
۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

Karimi V<sup>1</sup>, Hedayat Evrigh N<sup>\*1</sup>, Seyed Sharifi R<sup>1</sup>, Nikbin S<sup>1</sup>

1- MSc Student, Assistant professors, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and natural resources, University of Mohaghegh Ardabili

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hedayatuma@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۱)

#### چکیده

گونه‌های بومی بخشی از سرمایه‌های ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب شده و به دلیل کاهش شدید جمعیت آن‌ها شناسایی، حفاظت و تکثیر این نژادها اهمیت زیادی دارد. در این تحقیق ناحیه کنترل میتوکندریایی (D\_LOOP) برای بررسی تنوع ژنتیکی، ساختار فیلوژنتیک و ژنتیک جمعیت بز خلخالی استفاده شد. نمونه‌های خونی از ۱۰۰ بز خلخالی جمع‌آوری شد. نمونه‌های DNA با استفاده از کیت استاندارد استخراج و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. بعد از تعیین ژنوتیپ از طریق تشخیص الگوهای متفاوت با استفاده از نشانگر SSCP توالی‌یابی شدند. توالی‌های مربوط به دیگر گونه‌های مزرعه‌ای که هم‌تراز با توالی‌های حاصل شده بودند به‌عنوان توالی برون‌گروهی از طریق NCBI به‌دست آمد. در ۱۲۶ توالی به‌دست آمده در حدود ۶۲ جهش و ۳۷ هاپلوتیپ شناسایی شد. تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی در بین گونه‌ها به ترتیب ۰/۸۳۴ و ۰/۰۰۸ به‌دست آمد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی کم در این نژاد می‌باشد. نتایج مربوط به مقایسه با سایر نژادهای بز نشان داد که جمعیت بز خلخالی جز هاپلو گروه A در بین انواع هاپلو گروه‌های شناخته شده در جهان می‌باشد.

#### واژه‌های کلیدی

بز خلخالی  
تنوع ژنتیکی  
توالی‌یابی  
هاپلوتیپ  
D-LOOP

آن‌ها می‌باشد (Pereira et al, 2009; Luikar et al, 2001; Liu et al 2006; Pereira et al, 2005; Naderi et al, 2007; Vacca et al, 2010; Wang et al, 2008; Wu et al, 2009).

این بخش از ژنوم سه ویژگی اصلی نشانگر مناسب، یعنی داشتن حفاظت‌شدگی کافی، تنوع و ساختاربندی در طیف وسیعی از گونه‌ها و سرعت تکامل پایدار را دارد (Bruford et al. 2003). ویژگی دیگر این بخش از ژنوم تعداد بالای نسخه در هر سلول می‌باشد که تجزیه در مقادیر بسیار ناچیزی از ماده جانوری را امکان‌پذیر می‌سازد (Naderi et al. 2007).

بز خلخالی از شاخص‌ترین نژادهای بز منطقه می‌باشد که به علت هزینه نگهداری نسبتاً کم و سازگاری با شرایط اقلیمی منطقه نگهداری و پرورش این بز به صورت رایج انجام می‌گیرد و از لحاظ اقتصادی اهمیت زیادی برای روستاییان و عشایر منطقه دارد. منطقه پراکنش این بز بیشتر در دشت مغان و اطراف شهرستان خلخال و بخش‌هایی از استان آذربایجان شرقی است. اگر چه پژوهش‌های زیادی روی بزهای ایران انجام شده است

(Alinaghizadeh et al. 2010; Askari et al. 2011; Hadizadeh et al. 2013; Mousavizadeh et al. 2009; Hadizadeh et al. 2014a; Askari et al. 2009; Hadizadeh et al. 2014b; Askari et al. 2010; Moghadaszadeh et al. 2015; Mohammadabadi et al. 2009; Shamsalddini et al. 2016; Mohammadabadi and Dastafkan, 2012; Askari et al. 2008; Hassani et al. 2010; Mohammadabadi et al. 2011; Abbaszadeh et al. 2011; Mohammadabadi, 2012; Tohidi nezhad et al. 2015).

ولی تاکنون جایگاه D-Loop میتوکندری در بزهای خلخالی مطالعه نشده است. لذا، این مطالعه با هدف بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی بزهای خلخالی اردبیل و بررسی ارتباط آن با هاپلوگروه‌های شناسایی شده در بز انجام گرفت.

### مواد و روش‌ها

جهت انجام تحقیق، تعداد ۱۰۰ راس بز به طور تصادفی از چهار گله بز خلخالی در شهرستان خلخال انتخاب و از آن‌ها نمونه‌گیری خون به عمل آمد. خون‌گیری از ناحیه سیاهرگ و داج گردن صورت گرفت. نمونه‌های خون به لوله‌های حاوی EDTA انتقال یافت و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (ATP bioscience) از

در حوزه ژنتیک و به‌نژادی، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه‌ریزی جهت استفاده در طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهم‌تر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد. روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید (Alinaghizadeh et al. 2010). استفاده از ژنتیک مولکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه‌های خاص است (Mousavizadeh et al. 2009) که در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به‌طور قابل توجهی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (Javanmard et al. 2008). گونه‌ها مشخص‌ترین واحدهای زیستی هستند که حفاظت و مدیریت تنوع ژنتیکی در آن‌ها بر اساس یک دانش جامع از ساختار جمعیت شامل تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها و داخل گونه‌ها انجام می‌پذیرد. حفاظت از تنوع ژنتیکی عاملی کلیدی برای محافظت از حیات گونه‌ها در طولانی مدت است (Rout et al. 2012). 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). پایین بودن تنوع ژنتیکی حساسیت جمعیت به بلایای طبیعی مثل شیوع بیماری‌ها را افزایش داده و باعث افزایش هم‌خونی می‌شود و به دنبال آن مشکلات ناشی از زوال خویش-آمیزی، افزایش آل‌های مضر و یا حذف حالت فوق غالبیت را خواهد داشت. تغییرات مربوط به الگوی توزیع ژنی، سازگاری به شرایط محیطی را از بین برده و باعث تفکیک کمپلکس‌های ژنی می‌شود. تمامی این عوامل دست به دست هم داده و باعث کاهش سازگاری دام‌ها با شرایط محیطی و در نهایت ممکن است باعث انقراض آن‌ها شود.

بر اساس آمارهای فائو ۱۷ درصد از نژادهای بز دنیا در وضعیت بحرانی و خطر قرار دارند (FAO 2007). ژنتیک بز اهلی اخیراً برای درک جنبه‌های مختلف اصلاحی آن مورد توجه قرار گرفته است. همانند گونه‌های دیگر، چند شکلی ناحیه کنترل میتوکندریایی (D-loop میتوکندریایی) ابزار مناسبی برای انتخاب و بررسی تنوع نژادهای موجود و تعیین زمان و مکان اهلی شدن

PCR بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد و رنگ آمیزی نترات نقره استفاده شد (شکل ۱).

سه نمونه از هر الگوی متفاوت شناسایی شده جهت توالی یابی از طریق شرکت پیشگام به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شد. توالی های به دست آمده برای بررسی چند شکلی های تک نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار (Tamura et al. 2011) MEGA 6.0 روش Clustal w همتراز شدند و با استفاده از روش حداکثر درست نمایی، درخت فیلوژنتیکی با بیشترین درست نمایی ترسیم شد. سپس با استفاده از نرم افزار DnaSp 5.10 هاپلوتیپ ها شناسایی شد و برای تجزیه شبکه ای هاپلوتیپ های به دست آمده از نرم افزار Network V.4.6.1.2 (fluxus-engineering.com) استفاده شد. جهت بررسی خنثی بودن یا اثر داشتن انتخاب (مصنوعی یا طبیعی) بر روی جهش یک ژن از آماره تاجیما D استفاده شد (Tajima 1989).

توالی های DNA میتوکندری مربوط به ناحیه کنترل به دست آمده از توالی یابی با توالی های دیگرگونه ها از بانک ژن موسسه اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) با کد دسترسی که در جدول ۱ آمده است (به عنوان توالی برون گروهی)<sup>۱</sup>، مورد مقایسه قرار گرفتند.

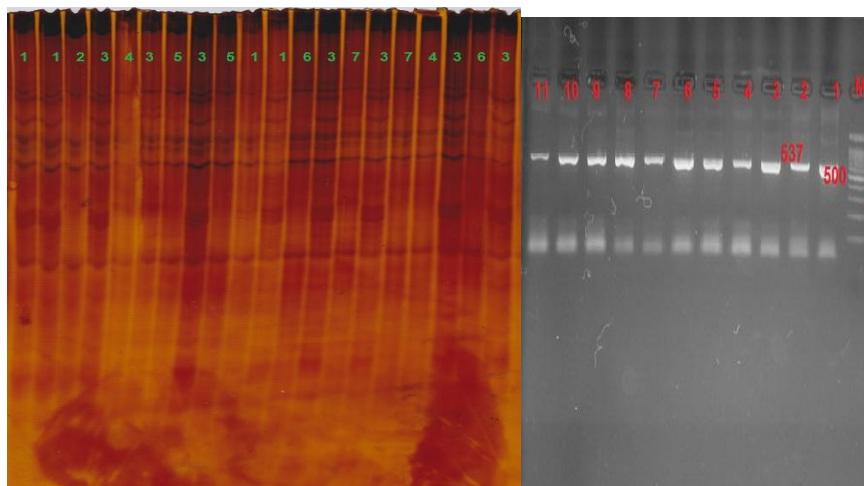
<sup>۱</sup> Outgroup

خون پستانداران انجام شد. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA، از ژل آگارز ۰/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید استفاده شد.

تکثیر قطعه ۵۳۷ جفت بازی از ناحیه D\_LOOP به کمک واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی زیر (Liu et al. 2006) صورت گرفت (شکل ۱)

F:5'-CGTGTATGCAAGTACATTAC-3'  
R:5'-CTGATTAGTCATTAGTCCATC-3'

چرخه های حرارتی PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر به صورت واسرشته سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد، و ۳۵ چرخه شامل به ترتیب واسرشته سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد، اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد، مرحله بسط به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد، و در نهایت مرحله بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد انجام گرفت. غلظت های مورد استفاده از مواد بعد از بهینه سازی برای انجام PCR به ترتیب ۰/۸ میکرولیتر 25 mM MgCl<sub>2</sub>، دو میکرولیتر بافر PCR 10X، ۰/۵ میکرولیتر 10 mM dNTP، یک پیکومول از هر جفت آغازگر، دو واحد TaqDNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر DNA ژنومی و مابقی تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر از آب-مقطر استفاده شد. برای اطمینان از عمل تکثیر، کیفیت و میزان توالی تکثیر شده در واکنش، از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. جهت تعیین ژنوتیپ از روش SSCP محصولات



شکل ۱- تکثیر قطعه ۵۳۷ جفت بازی (سمت راست) و الگوی مختلف ایجاد شده از SSCP (سمت چپ) در ناحیه D-Loop از ژنوم میتوکندریایی

جدول ۱- توالی‌های ژن D-LOOP استخراج شده از پایگاه اطلاعاتی NCBI و کد دسترسی آن‌ها جهت استفاده به‌عنوان توالی برون گروهی در تجزیه فیلوژنتیکی

شماره دسترسی در بانک ژن	تعداد توالی	گونه دام
FJ440807, FJ440810, FJ440770, FJ440742, FJ440800, FJ440783, AB570124, KU052783, KU052786, KU052785	۱۱	گاو کوهان‌دار
AB177769, AB065127, EU281351, AB177776, AB177774, AB973255, AY378139, KU052781, KU052782, KU052763, KU052778, KU052779, KU052773, KU052777, KU052770, KU052780, AB177775, KU052775	۱۸	گاو اروپایی
KR009050, KR008972, KR008723, KR008253, GQ260383, GQ260257, KR009023, KR009017, KR008985, KR008909, KR008838, KR008831, KR009022, KR008694, KR008978	۱۵	گاو میش
KM260512, KP671039, KP671040, KP671048, KP671049, KP671050, KP671059, KP671074, KP671133, KP671398, KP671403, KP671414, KP671422, KP671434, KP671436	۱۵	بز
JX101654, JN181255, KP000591, KF677192, JX545682, JX545536, BQ242111	۷	گوسفند
	۱۲۶	کل

جدول ۲- کد دسترسی توالی‌های مربوط به هاپلوگروه‌های مختلف شناسایی شده در بز

کد دسترسی	هاپلوگروه	ناحیه	رفرنس اول	رفرنس دوم
AY155721	A	India	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF618134	A	Italy	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF617779	A	France	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF618200	A	Jordan	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF617945	A	Iran	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF617965	A	Iran	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
AB044303	B	Laos	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF617706	B	Azerbaijan	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
AJ317833	B	Mongolia	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
DQ121578	B	China	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
AY155708	C	India	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
AJ317838	C	Switzerland	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF618413	C	Spain	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
DQ188892	C	China	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
AY155952	D	India	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF617701	D	Austria	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
DQ188893	D	China	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
DQ241349	F	Sicily	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
DQ241351	F	Sicily	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF618084	G	Iran	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF618535	G	Turkey	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010
EF617727	G	Egypt	Naderi et al. 2007	Han et al. 2010

آمده است با استفاده از کد دسترسی از سایت NCBI استخراج شده و با روش پیوند همجواری<sup>۱</sup> روابط فیلوژنتیکی با نمونه‌های توالی یابی شده ترسیم شد.

### نتایج و بحث

طول کلی توالی پس از ردیف‌بندی در تمام گونه‌های مورد بررسی ۵۳۷ جفت‌باز بود که در ۵۴ جایگاه چند شکلی مشاهده شد. تعداد جهش مشاهده شده در جمعیت بزهای خلخالی ۶ جهش بود که منجر به ایجاد ۷ هاپلوتیپ مختلف می‌شود که مطابق با الگوهای مشاهده شده از روش SSCP می‌باشد. بزرگ‌ترین گروه هاپلوتایپ ۲ و ۱ و ۷ به ترتیب ۲۷ و ۱۸ و ۱۳ فراوانی را در گونه‌های مختلف نشان دادند. بزهای خلخالی و گروه کاپرا

داده‌های مورد نظر برای ویرایش اولیه به نرم‌افزار MEGA 6.0 انتقال و همتراز شد. سپس درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی و مدل کیمورا ۲ (بهترین مدل توصیف‌کننده جایگزینی نوکلئوتیدی در داده‌های مورد بررسی) ترسیم شد. برای برآورد هاپلوتیپ‌ها، تنوع توالی، میانگین تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی و میانگین تعداد جانشینی‌های نوکلئوتیدی برای هر جایگاه بین نژادها از نرم‌افزار DnaSP 5.10 استفاده شد. فاصله‌های ژنتیکی بین هاپلوتیپ‌های مشاهده شده و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 و تجزیه شبکه‌ای هاپلوتیپ‌ها با نرم‌افزار NETWORK 4.163 انجام گرفت. در تحقیقاتی که بر روی mtDNA بز انجام داده شد حدود ۶ هاپلوگروه به نام‌های A,B,C,D,F,G شناسایی و گزارش شده است. برای تعیین هاپلوگروه جمعیت بز خلخالی، هاپلوگروه‌هایی که قبلاً شناسایی شده و در جدول ۲ (Mazdarani et al. 2014)

<sup>1</sup> Neighbor joining

فاصله ژنتیکی را به عنوان معیاری از اختلاف بین جمعیت‌ها تعریف می‌کنند که به صورت تابعی از فراوانی ژنی بیان می‌شود و یک معیار آماری استاندارد را (به صورت یک عدد) برای تعیین میزان تفاوت ژنتیکی فراهم می‌کند. اگر هیچ تفاوتی وجود نداشته باشد، فاصله صفر خواهد بود و در صورتی که جمعیت‌ها در هیچ جایگاهی آلل مشترک نداشته باشند، فاصله میان آن‌ها برابر با حداکثر مقدار خود یعنی یک خواهد بود. فاصله ژنتیکی و تمایز ژنتیکی حاصل از تجزیه توالی‌های مربوط به گونه‌های مختلف دام‌های اهلی در جدول ۵ ارائه شده است. کم‌ترین سطوح فاصله ژنتیکی را بز خلخال با توالی بزهای دیگر (استخراج شده از NCBI) دارد که نشان‌دهنده نزدیکی روابط فیلوژنتیکی است و بعد از آن گاو کوهان دار با گاو اروپایی کم‌ترین فاصله را نشان دادند و بیش‌ترین سطوح تمایز ژنتیکی را توالی‌های گاو میش با بز خلخال دارا می‌باشند.

اختصاصاً در گروه هاپلوتیپی ۲ قرار گرفته‌اند که ۱۳ نمونه مربوط به گله‌های ۱ و ۴ بز خلخال و ۱۴ نمونه مربوط به کاپرا هیرکوس است. نمونه‌های مربوط به گله ۲ بز خلخال در یک هاپلو گروه مجزا قرار گرفتند.

تنوع هاپلوتیپ، واریانس هاپلوتیپی، تنوع نوکلئوتیدی و تاجیما D در کل نمونه‌ها به ترتیب ۰/۹۱۵، ۰/۰۰۰۲، ۰/۰۶۹ و ۰/۴۰۸ به دست آمد. مقدار تاجیما D معنی‌دار نبود ( $P > 0/1$ )، که نشان‌دهنده عدم انتخاب در جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد (جدول ۳ و ۴) گاو اروپایی بالاترین تنوع نوکلئوتیدی را نشان داد و در بز خلخال تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی نسبتاً مناسب و به ترتیب ۰/۸۳۴ و ۰/۰۰۸ مشاهده شد. آزمون تاجیما D به منظور شناسایی هر گونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها انجام می‌شود. مقدار تاجیما D در گاو میش و گوسفند منفی و غیرمعنی دار بود که ممکن است به دلیل تعداد اندک نمونه‌های استفاده شده در این مطالعه باشد.

جدول ۳- اطلاعات مربوط به جایگاه D\_loop در توالی‌های مورد بررسی

گونه دام	تعداد جایگاه گمشده	تعداد جایگاه چندشکلی	تعداد جهش منفرد	تعداد جهش چندگانه
گاو کوهان دار	۱۶	۲۱	۳	۱۸
گاو اروپایی	۲۱	۲۹	۳	۲۶
گاو میش	۱۴	۲	۲	۰
بز	۱۴	۰	۰	۰
بز خلخال	۱۴	۶	۰	۶
گوسفند	۱۴	۱۶	۸	۸
کل	۲۱	۵۴	۴	۵۰

جدول ۴- آماره‌های جمعیتی بین توالی‌های مختلف مربوط به جایگاه D\_loop

گونه حیوان	تعداد هاپلوتایپ	تنوع هاپلوتایپی	واریانس تنوع هاپلوتایپی	تنوع نوکلئوتیدی	تاجیما D
گاو کوهان‌دار	۱۰	۰/۹۸۲	۰/۰۴۶	۰/۰۴۵	۰/۹۶۴
گاو اروپایی	۱۲	۰/۹۳۳	۰/۰۰۲	۰/۰۶۲	۱/۵۶۹
گاو میش	۳	۰/۲۵۷	۰/۰۲۰	۰/۰۰۳	-۱/۴۹۱
بز	۱	۰	۰	۰	۰
بز خلخال	۷	۰/۸۳۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۸	۰/۴۹۵
گوسفند	۶	۰/۹۵۲	۰/۰۰۹	۰/۰۳۲	-۰/۲۰۸
کل	۳۷	۰/۹۱۵	۰/۰۰۰۲	۰/۰۶۹	۰/۴۰۸

جدول ۵- مقایسه مربوط به تمایز ژنتیکی Fst و فاصله ژنتیکی Dxy

Dxy	Fst	بز خلخال	گاو میش	گاو کوهان دار	گاو اروپایی	بز	گوسفند
بز خلخال	-	-	۰/۹۵۲	۰/۷۷۶	۰/۶۹۱	۰/۲۲۷	۰/۶۹۳
گاو میش	۰/۱۰۰	-	-	۰/۸۴۰	۰/۷۸۳	۰/۹۹۳	۰/۸۶۱
گاو کوهان دار	۰/۱۱۵	۰/۱۱۵	۰/۱۴۰	-	۰/۱۶۲	۰/۸۰۶	۰/۷۱۵
گاو اروپایی	۰/۱۱۴	۰/۱۱۴	۰/۱۴۷	۰/۰۶۳	-	۰/۷۲۱	۰/۶۶۵
بز	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۹۹	۰/۱۱۲	۰/۱۱۱	-	۰/۷۴۹
گوسفند	۰/۰۶۳	۰/۰۶۳	۰/۱۱۵	۰/۱۳۰	۰/۱۳۹	۰/۰۶۱	-



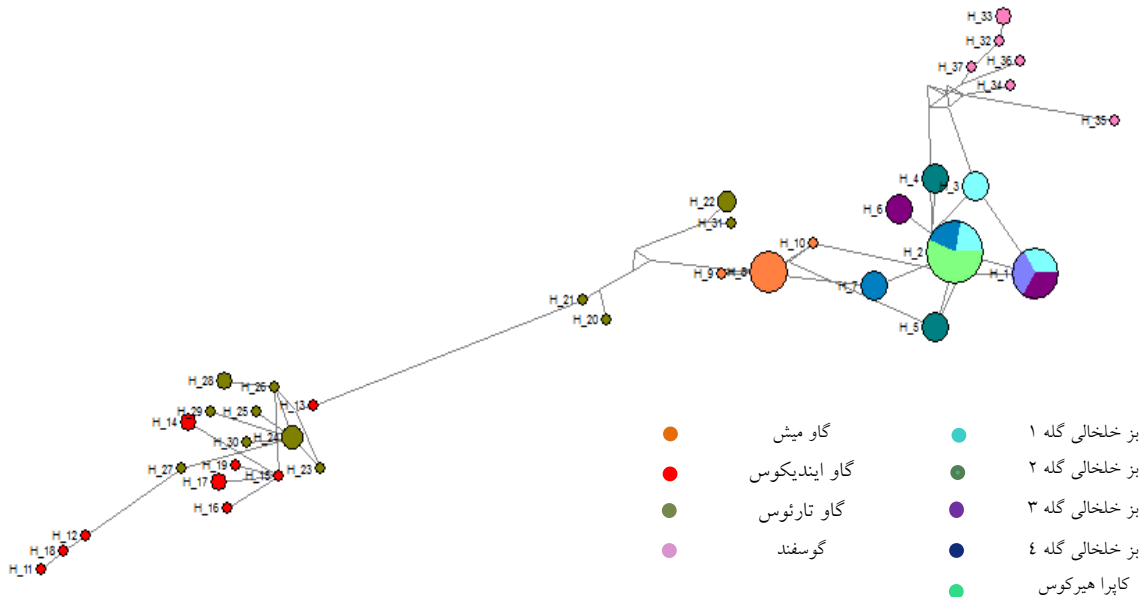
شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی مربوط به ناحیه میتوکندریایی D\_LOOP در بز خلخال و دام‌های اهلی (به‌عنوان برون گروهی)

تنوع ژنتیکی بالاست که مربوط به جمعیت گاو اروپایی می‌باشد. تنوع ژنتیکی نزدیک جمعیت‌ها بیانگر منشأ مشترک و یا وجود جریان ژنی میان آن‌ها و یا شرایط زیستگاهی مشابه می‌باشد. چهار گله بز خلخال در هفت شاخه مجزا قرار گرفتند. گاو اروپایی و گاو کوهان‌دار از یک شاخه منشأ گرفته و مجزا می‌شوند و گاو میش در شاخه دیگر قرار گرفتند (شکل ۲). همان‌طور که مشاهده می‌شود برای تجزیه‌های فیلوژنتیکی بز می‌توان از توالی حیوانات گوسفند، گاو میش و گاو به‌عنوان توالی برون گروهی جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی ریشه‌دار استفاده کرد. با توجه به اینکه فاصله ژنتیکی گوسفند نسبت به بز متوسط است به نظر می‌رسد

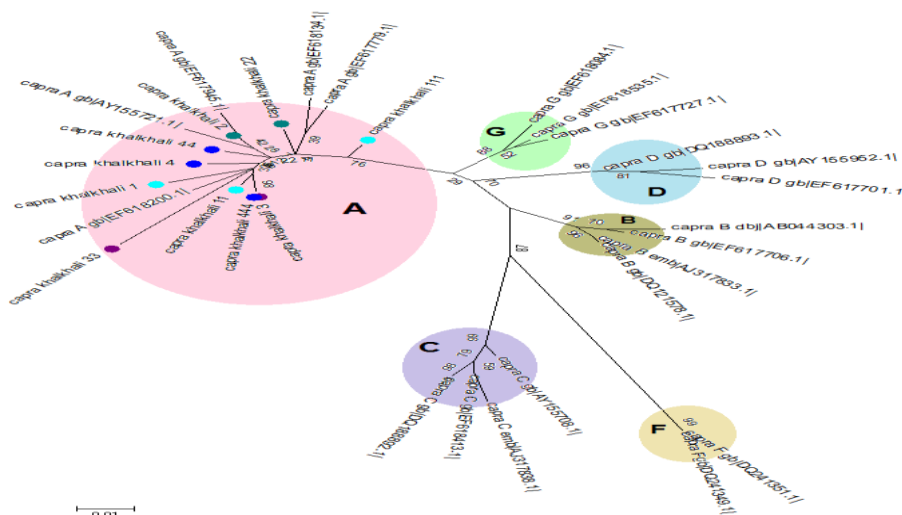
در مطالعات تکاملی، طبقه‌بندی شامل تشکیل فیلوژنی نیز می‌شود، درختان فیلوژنتیک مسیریهای تکاملی را نشان می‌دهند و می‌توان از آن‌ها برای درک روابط تکاملی استفاده نمود. به‌عبارت دیگر هر چه موجودات مورد بررسی مشابهت بیشتری در مولکول‌های توارثی داشته باشند، خویشاوندی نزدیک‌تری دارند. در بیش‌تر موجودات از داده‌های مربوط به توالی DNA برای تعیین روابط تکاملی استفاده می‌شود. از آنجایی که چنین داده‌هایی (در مقایسه با داده‌هایی مانند داده‌های ریخت‌شناختی) کمتر تحت تأثیر نتایج انتخاب قرار می‌گیرند، بهتر می‌توانند روابط فیلوژنتیکی واقعی را منعکس کنند. وجود تعداد بیشتر شاخه‌های درخت نشان‌دهنده

هاپلوتایپ مشخص شد. هاپلوتایپ‌های با فراوانی بالا دایره بزرگ‌تر و هاپلوتایپ‌های با فراوانی پایین دایره کوچک‌تر را به خود اختصاص داده‌اند. ترسیم درخت فیلوژنتیکی با روش پیوند همجواری نشان داد که جمعیت بز خلخال در هاپلوگروه A قرار می‌گیرد. این هاپلوگروه بزرگ‌ترین هاپلوگروه در انواع نژادهای مختلف بز در جهان می‌باشد (شکل ۴).

جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی ریشه‌دار در جمعیت بزها بهترین توالی به‌عنوان توالی برون گروهی باشد. همانطور که در درخت فیلوژنتیکی مشاهده می‌شود جمعیت یکی از بزهای خلخال در مقایسه با سایر جمعیت‌ها بیش‌ترین تنوع ژنتیکی را دارد. شبکه روابط هاپلوتیپی در توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Network در شکل ۳ آورده شده‌است. شبکه از طریق خوشه‌های مجزای



شکل ۳- شبکه بهم پیوسته ۳۷ هاپلوتایپ مربوط به D-LOOP میتوکندریایی (اندازه دایره‌ها متناسب با فراوانی آن‌هاست).



شکل ۴- رابطه فیلوژنتیکی بر اساس روش پیوند همجواری توالی ناحیه کنترل mtDNA بزهای خلخال و توالی‌های متعلق به هاپلوگروه‌های A,B,C,D,F,G شناسایی شده در گونه بز. فاصله‌ها بر اساس مدل Kimura 2-parameter (Kimura1980) اعداد روی شاخه‌ها مربوط به تست بوت استرپ بر اساس ۱۰۰۰ تکرار می‌باشد.

ژنتیکی و ساختار جمعیتی این نژاد مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه بیش تر این جمعیت یک انفجار جمعیتی در تاریخچه آن‌ها را نشان داد (Rout et al. 2012).

(Doro et al. 2014) برای بررسی تنوع داخل هاپلوگروه A و گسترش جهانی آن توالی کامل ژنوم میتوکندریایی ۲۸ بز از نژاد ساردینی ایتالیا را مطالعه کرده و ۲۰۶ چند شکلی را در ۳۰ جایگاه ژنی گزارش کردند. ۱۱۳ مورد از این چندشکلی‌ها مربوط به هاپلوگروه B و C بوده و ۹۳ مورد مربوط به هاپلوگروه A بود. یافته‌های این تحقیق گسترش جهانی هاپلو گروه A و تنوع بیشتر این هاپلوگروه را تایید کرد. (Gorkhali 2014) به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی و تکامل ژنتیکی بزهای بومی نپال توالی HVR1 ناحیه D-LOOP ژنوم میتوکندریایی ۹۳ حیوان از بزهای بومی نپال را مورد بررسی قرار دادند. در این ۹۳ فرد ۶۶ هاپلو تیپ مختلف تشخیص داده شد که در چهار هاپلوگروه A، B، C و D قرار گرفته که هاپلوگروه A در اغلب آن‌ها یافت شد. مقایسه توالی بزهای نپال با توالی‌های گزارش شده در کشورهای همسایه (بوتان، پاکستان، هندوستان و چین) جریان ژنی گسترده بین کشورهای همسایه را نشان داد. به نظر می‌رسد که روش چوپانی فصلی، مهاجرت‌های سالانه در فواصل دور در طول تاریخ و هم-چنین تجارت عامل این جریان ژنی باشد.

بررسی توالی کامل ناحیه D-LOOP ژنوم میتوکندریایی ۱۸۳ حیوان از ۱۳ نژاد مختلف چینی ۱۳۵ هاپلو تیپ در ۱۴۴ جایگاه چند شکلی را نشان داد. از بین افراد مطالعه شده ۱۴۵ فرد با ۱۰۹ هاپلو تیپ مربوط به هاپلو گروه A و ۳۸ فرد با ۲۱ هاپلو تیپ مربوط به هاپلوگروه B قرار گرفتند (Liu et al. 2006).

در یک مطالعه بررسی ساختار ژنتیکی و تکامل نژادی بزهای کره-ای با مطالعه توالی HVR1 ناحیه D-LOOP ژنوم میتوکندری انجام شد و نتایج به دست آمده در این تحقیق با توالی بزهای آسیایی مربوط به نژادهای چین، پاکستان، لائوس و هندوستان مقایسه شد. ۱۹ بز کره‌ای که در شش هاپلو تیپ گروه بندی شده بودند همگی مربوط به هاپلوگروه A بودند. تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی کمی در داخل جمعیت مشاهده شد که نشان دهنده هم-خونی بالا در آن‌ها بود (Odahara et al. 2006).

به طور مرسوم مطالعه تکامل ژنتیکی گونه‌های مختلف دام‌ها بر اساس مطالعه قطعه کوچکی از ناحیه کنترل موسوم به ناحیه D-LOOP انجام شده است. در بز اولین مطالعه‌ای که با این روش انجام شد وجود چند خط مادری کاملاً متمایز را مشخص کرد که ساختار ژئوگرافی آن‌ها کمتر از سایر گونه‌ها بود. طی این بررسی مشخص شد که خط مادری نژادهای امروزی بز مربوط به سه جمعیت پایه می‌باشد که امروزه با نام هاپلوگروه‌های A، B و C شناخته می‌شوند و ۲۰ هزار سال پیش از هم جدا شده‌اند. این امر نشان می‌دهد که بزهای مناطق مختلف جهان یک خط مادری مشترک نداشته و مربوط به تعداد معدودی از بزهای وحشی می‌باشند (Luikart et al. 2001). نتایج این تحقیق نشان داد که هاپلوگروه A به طور معمول در همه قاره‌ها یافت می‌شود و هاپلوگروه B نیز احتمالاً از آسیا منشا گرفته که مطالعات بعدی آن را ثابت کرد (Joshi et al. 2004). در ادامه با مطالعه بزهای بومی پاکستان هاپلوگروه دیگری با نام هاپلوگروه D نیز معرفی شد (Sultana et al. 2003).

(Naderi et al. 2007) در یک تحقیق وسیع شش نوع هاپلوگروه با تنوع هاپلو تیپی بالا با نام‌های A، B، C، D، F و G را مشخص کردند که پنج مورد از این هاپلوگروه‌ها توسط محققان قبلی گزارش شده بود (Luikart et al. 2001; Sultana et al. 2003; Chen et al. 2005) که در این مطالعه تنها هاپلوگروه G به آن‌ها اضافه شده است.

دو هاپلو تیپی که توسط (Joshi et al. 2004) به عنوان هاپلو گروه E معرفی شده بود نیز به این دلیل که حد واسط بین دو هاپلوگروه A و E بودند وارد هاپلوگروه A شدند. بنابراین، دیگر هاپلوگروهی به نام E نمی‌توانست بررسی شود. نتایج این مطالعه نشان داد که ۷۷ درصد از تنوع میتوکندری بزها داخل نژادی، ۱۱ درصد بین نژادی و ۱۲ درصد مربوط به مناطق جغرافیایی می‌باشد.

(Wu et al. 2009) یک قطعه از توالی HVR1 ناحیه D-LOOP برای ۱۴۵ نمونه حیوان از ۱۲ نژاد بومی چین و ۴ بز وحشی را مطالعه کرد. نتایج این تحقیق نشان داد که دو انفجار جمعیتی در تاریخچه تکامل تبار B اتفاق افتاده است. در تحقیق دیگری با مطالعه ۵۰ نمونه از جمعیت بز جاموناپاری هندوستان تنوع

تمام اروپا یافت شده است (Piras et al. 2012). با توجه به اینکه این هاپلوگروه گسترده‌ترین و متنوع‌ترین گروه می‌باشد، بنابراین بررسی فیلوژنتیکی آن بخش مهمی از گسترش اصلاح نژاد بز در مناطق غربی دنیای قدیم را تشکیل می‌دهد. دستیابی به این اهداف توسط فراوانی بالای جهش در برخی از نواحی بخش HVR محدود می‌شود. این آل‌های تولید شده در دودمان‌های متعدد یکسان بوده و اطلاعات اندکی را برای بررسی‌های فیلوژنتیکی فراهم می‌کند. یکی از شواهد مناسب برای تشخیص گروه‌های فیلوژنتیکی فراوانی نسبی هر کدام از توالی‌ها می‌باشد. در حقیقت، با رشد جمعیت، تعداد اجداد یا دودمان‌های حاصل افزایش سریع‌تری نسبت به تجمع جهش‌های جدید دارد و جهش‌های جدید از نظر تعداد کم هستند.

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج مربوط به بررسی جمعیت بزهای خلخال با استفاده از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی نشان داد که جمعیت بزهای خلخال از میزان تنوع نوکلئوتیدی و هاپلو تپیی مناسبی برخوردار است، لذا می‌توان از این تنوع ایجاد شده در برنامه‌های اصلاح نژادی و سیستم آمیزشی مناسب براساس اهداف مورد نظر استفاده کرد. از طرف دیگر، نتایج بررسی با سایر بزهای جهان نشان داد که این نژاد جز هاپلو گروه A می‌باشد و در صورتی که اهداف دورگ-گیری در این جمعیت‌ها وجود داشته باشد پیشنهاد می‌شود از نژادهای اصیل و پرتولید از هاپلوگروه A استفاده شود تا در سازگاری به شرایط محیط دچار مشکل نشوند.

Mazdarani et al. (2014) توالی ژنوم میتوکندریایی مربوط به بزهای دوران نوسنگی در جایگاه باستانی منطقه کیاسبز در مرکز زاگرس در ایران را مورد بررسی قرار دادند. استخوان‌های مربوط به پنج حیوان این دوره از این جایگاه باستانی در ساحل رودخانه سمیره در استان لرستان نمونه‌برداری شد. توالی HVR1 در این بزها ۵۳۴ تا ۶۳۲ جفت‌باز را شامل شده و با توالی بزهای امروزی ۹۹ درصد شباهت داشت که نشان‌دهنده محافظت بالای این توالی در بزهای دوره نوسنگی بود. هر پنج توالی مربوط به دوره نوسنگی همگی مربوط به هاپلوگروه A بود که نشان می‌دهد انفجار اولیه تبار غالب در هزاره ۹ قبل از میلاد اتفاق افتاده است. علاوه بر این دو نمونه بررسی شده از جایگاه باستانی قبرستان دشت قزوین نیز مربوط به هاپلوگروه A بود (Fernandez et al. 2005).

بز به دلیل اندازه متوسط بدن و توانایی سازگاری با محیط‌های گوناگون برای نقل و انتقال‌های بین قاره‌ای بسیار مناسب بوده است و جریان ژنی بالا (مهاجرت) در جمعیت‌های مختلف بز در اثر روش‌هایی مثل چوپانی فصلی، مهاجرت‌های سالانه در فواصل دور و همین‌طور تسهیل و گسترش بازرگانی منجر به الگوی درهم در مخزن ژنی بزهای مناطق مختلف شده است (Liu et al. 2009).

اکثر توالی‌هایی که به یک دودمان اصلی تعلق دارند تحت عنوان هاپلوگروه A نامیده می‌شوند (۹۱ درصد افراد سراسر جهان و ۱۰۰ درصد نمونه‌های مکانی). انتقال توالی‌های متعلق به این دودمان در مکان‌های دورتر نظیر آسیای شرقی، آفریقای جنوبی و

### منابع

Abbaszadeh E, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh A, Alinaghizadeh R (2011) The Polymorphism of Exon 2 of GOLA-DRB3 Gene in Nadushan Goat Using PCR-RFLP. Iranian Journal of Animal Science Research 3: 274-279. (In Farsi).  
Alinaghizadeh H, Mohammad Abadi MR, Zakizadeh S (2010) Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. Journal of Agricultural Biotechnology 2: 69-80. (In Farsi).  
Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2008) Analysis of the genetic structure of Iranian indigenous Raeni cashmere goat populations using microsatellite markers. Biotechnology 2: 1-4.  
Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeni

cashmere goat using ISSR markers. Modern Genetics Journal 5: 49-56. (In Farsi).  
Askari N, Mohammadabadi MR, Baghizadeh A (2011) ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian Journal of Biotechnology 9: 222-229.  
Askari N, Mohammadabadi MR, Beygi Nassiry MT, Baghizadeh A, Fayazi J (2009) Study of Genetic Diversity of Raeni Cashmere Goat Based on Microsatellite Markers. Journal of Agricultural Science 18: 155-161. (In Farsi).  
Bruford MW, Bradley DG, Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature Reviews Genetic, 4: 900-910.  
Chen, SY, Su YH, Wu SF, Sha T, Zhang YP (2005). Mitochondrial diversity and phylogeographic structure of

- Chinese domestic goats. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 804-814.
- Doro MG, Piras D, Leoni GG, Casu G, Vaccargiu S, Parracciani D, Novelletto A (2014). Phylogeny and patterns of diversity of goat mtDNA haplogroup A revealed by resequencing complete mitogenomes. *PLoS one*, 9: e95969.
- FAO: FAO-STAT (2007) Food and Agricultural Organisation, Statistical Databases.
- Fernandez H, Taberlet P, Mashkour M, Vigne JD, Luikart G (2002). Assessing the origin and diffusion of domestic goats using ancient DNA. Paper presented at The first steps of animal domestication: new archaeozoological approaches. Proceedings of the 9th Conference of the International Council of Archaeozoology, Durham, August 2002.
- Gorkhali N (2014). Mitochondrial DNA diversity in Nepalese goats. 10<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 14: 0.945-940.
- Hadizadeh M, Mohammadbadi MR, Niazi A, Esmailzadeh A, Mahdizadeh Gazooei Y (2014a) Search for polymorphism in growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene in prolific beetal and tali goats (*Capra hircus*). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 4: 186-191.
- Hadizadeh M, Niazi A, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh A, Mehdizadeh Gazooei Y (2014b) Bioinformatics Analysis Of The Bmp15 Exon 2 In Tali And Beetal Goats. *Modern Genetics Journal* 9:117-120. (In Farsi).
- Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh A, Mehdizadeh Gazooei Y, Molaei S (2013) Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetal goats. *Modern Genetic Journal*. 8: 283-288. (In Farsi).
- Han L, Yu HX, Cai DW, Shi HL, Zhu H, Zhou H (2010). Mitochondrial DNA analysis provides new insights into the origin of the Chinese domestic goat. *Small Ruminant Research*, 90: 41-46.
- Hassani MN, Asadi Fozi M, Esmailzadeh AK, Mohammadabadi MR (2010). A genetic analysis of growth traits in raieni cashmere goat using multivariate animal model. *Iranian Journal of Animal Science* 41:323-329. (In Farsi).
- Hoffmann I (2010). Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. *Animal genetics*, 41: 32-46.
- Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmansh A, Asadzadeh N (2008). Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (*Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics* 44: 495-497.
- Joshi MB, Rout PK, Mandal AK, Tyler-Smith C, Singh L, Thangaraj K (2004). Phylogeography and origin of Indian domestic goats. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 454-462.
- Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16: 111-120.
- Kul BC, Ertugrul O (2011) mtDNA diversity and phylogeography of some Turkish native goat breeds. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 58: 129-134.
- Liu RY, Yang GS, Lei CZ (2006). The genetic diversity of mtDNA D-loop and the origin of Chinese goats. *Acta Genetica Sinica*. 33: 420-428.
- 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.
- Luikart G, Gjelty L, Excoffier L, Vigne JD, Bouvet J, Taberlet P (2001) Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 5927-5932.
- Mazdarani F, Akbari M, Fard R, Hessari M, Pour K (2014). Molecular identification of *capra hircus* in east Chia sabz, an Iranian pre-pottery neolithic site, central zagros, based on mtdna. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24: 945-950.
- Moghadaszadeh M, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh 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.
- Mohammadabadi MR (2012). Relationships of IGFBP-3 gene polymorphism with cashmere traits in raini cashmere goat. *Modern Genetics Journal* 7:115-120 (In Farsi).
- Mohammadabadi MR, Askari N, Baghizadeh A, Esmailzadeh A (2009) A directed search around caprine candidate loci provided evidence for microsatellites linkage to growth and cashmere yield in Rayini goats. *Small Ruminant Research*. 81:146-51.
- Mohammadabadi MR, Dastafkan K (2012). Polymorphism of the Second Exon of MHC-DRB Gene in Jabal-Barez Red Goat. *Animal production Research* 2:10-17 (In Farsi).
- Mohammadabadi MR, Shahabi A, Noshari AR, Askari N, Dayani O, Khezri A, Sataei Mokhtari M, Soflaei M, Ayatollahi A (2011). Study of genetic variation within red jabal barez goat population using microsatellite markers. *Iranian Journal of Animal Science* 42:125-131 (In Farsi).
- Mousavizadeh A, Mohammad Abadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H, Esmailzadeh AK (2009). Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Tali goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology*, 7: 51-53.
- Naderi S, Rezaei HR, Taberlet P, Zundel S, Rafat SA, Naghash HR, Consortium E (2007) Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. *PLoS one*, 2: e1012.
- Odahara S, Chung H, Choi S, Yu S, Sasazaki S, Mannen H, Lee J (2006) Mitochondrial DNA diversity of Korean native goats. *Asian Australian Journal of Animal Science*. 19: 482-485.
- Pereira F, Pereira L, Van Asch B, Bradley D, Amorim A (2005) The mtDNA catalogue of all Portuguese autochthonous goat (*Capra hircus*) breeds: high diversity

- of female lineages at the western fringe of European distribution. *Molecular Ecology*, 14: 2313-2318.
- Pereira F, Queirós S, Gusmão L, Nijman IJ, Cuppen E, Lenstra JA, Consortium E (2009) Tracing the history of goat pastoralism: new clues from mitochondrial and Y chromosome DNA in North Africa. *Molecular Biology and Evolution*, 26: 2765-2773.
- Piras D, Doro MG, Casu G, Melis PM, Vaccargiu S, Piras I, Lai G (2012) Haplotype affinities resolve a major component of goat (*Capra hircus*) MtDNA D-loop diversity and reveal specific features of the Sardinian stock. *PloS one*, 7: e30785.
- Rout P, Thangraj K, Mandal A, Roy R (2012) Genetic variation and population structure in Jamunapari goats using microsatellites, mitochondrial DNA, and milk protein genes. *The Scientific World Journal*, 2012:1-7.
- Ruo-Yu L, Gong-She Y, Chu-Zhao L (2006) The genetic diversity of mtDNA D-loop and the origin of Chinese goats. *Acta Genetica Sinica*, 33: 420-428.
- Sardina M, Ballester M, Marmi J, Finocchiaro R, Van Kaam J, Portolano B, Folch J (2006) Phylogenetic analysis of Sicilian goats reveals a new mtDNA lineage. *Animal genetics*, 37: 376-378.
- Shamsalddini S, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK (2016) Polymorphism of the prolactin gene and its effect on fiber traits in goat. *Russian Journal of Genetics*. 52: 405-408.
- 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.
- Sultana S, Mannen H, Tsuji S (2003) Mitochondrial DNA diversity of Pakistani goats. *Animal genetics*, 34: 417-421.
- 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, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Journal of Agricultural Biotechnology* 6: 35-50 (In Farsi).
- Vacca GM, Daga C, Pazzola M, Carcangiu V, Dettori ML, Cozzi M (2010) D-loop sequence mitochondrial DNA variability of Sarda goat and other goat breeds and populations reared in the Mediterranean area. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 127: 352-360.
- Wang J, Chen Y, Wang X, Yang Z (2008) The genetic diversity of seven indigenous Chinese goat breeds. *Small Ruminant Research*, 74: 231-237.
- WU YP, GUAN WJ, ZHAO QJ, HE XH, PU YB, HUO JH, MA YH (2009) A fine map for maternal lineage analysis by mitochondrial hypervariable region in 12 Chinese goat breeds. *Animal Science Journal*, 80: 372-380.
- 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.