Iranian Journal of Animal Science
Vol 50, No 1, Spring 2019 (35-46)
DOI: 10.22059/ijas.2019.272018.653672

علوم دامی ایران
دورۀ ۵۰، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۸ (ص ۴۶-۳۵)

تجزیه فیلوژنتیک و هاپلوگروهی بزهای بومی ایران بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری

مریم شریعت[۱]، غلامرضا داشاب[۲*] و مهدی وفای واله[۲]
۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۲۳)

چکیده

بزهای بومی ایران به‌عنوان یکی از ذخایر ژنتیکی ارزشمند محسوب می‌شوند و حفظ تنوع ژنتیکی آنها حائز اهمیت است. ژنوم میتوکندری در یک اکوتیپ و مقایسه آن با سایر اکوتیپ‌ها می‌تواند شاخص مناسبی از میزان تنوع موجود در آن جمعیت را ارائه دهد. هدف از پژوهش اخیر بررسی ساختار ژنتیکی و ترسیم روابط فیلوژنتیکی ناحیه HVR1 میتوکندری چهار توده جمعیتی بزهای بومی ایران شامل سیستانی، پاکستانی، عدنی و سیاه لری (هر کدام ۴ رأس) و مقایسه آنها با توالی نوکلئوتیدی جایگاه مذکور در دیگر اکوتیپ‌های بز می‌باشد. استخراج DNA کل به روش فنل- کلروفرم انجام شد و واکنش تکثیر با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام گرفت. محصولات تکثیرشده پس از خالص‌سازی به روش سانگر تعیین توالی شدند. توالی‌های مذکور به همراه توالی مشابه از ژنوم میتوکندری مربوط به سایر اکوتیپ‌های بز بدست آمده از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) جهت تجزیه ژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. با بررسی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در توده‌های مختلف بز در مطالعه حاضر ۱۲۳ جایگاه چندشکلی و ۱۶ هاپلوتیپ شناسایی شد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۱۵ درصد از تنوع بین جمعیت‌ها و ۸۵ درصد در درون جمعیت‌ها است. کلیه توده‌های بز ایران استفاده شده در مطالعه حاضر در گروه هاپلوتیپی A که معمولاً در همه قاره‌ها یافت می‌شود گروه‌بندی شدند. مقادیر آماره‌های D و Fs تست تاجیما (به‌ترتیب ۲/۱۴- و ۹/۵۵-) در مطالعه اخیر منفی بود که ممکن است به دلیل کوچک بودن اندازه نمونه مورد استفاده در این مطالعه باشد. نتایج این مطالعه نشان داد توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 میتوکندری ابزار مناسبی برای مطالعات ژنتیکی و گروه‌بندی توده‌های جمعیتی بز در ایران و دنیا است.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، روابط فیلوژنتیکی، ناحیه دی لوپ، هاپلوگروهی.

Phylogenetic and Haplogroup analysis of native goats of Iran based on nucleotide sequence of HVR1 region of mitochondrial genome

Maryam Shariat[1], Gholam Reza Dashab[2*] and Mehdi Vafaye Valleh[2]
1, 2, 3. Former M.Sc. Student, Associate Professor of Animal Breeding and Genetic, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
(Received: Dec. 22, 2018 - Accepted: May 13, 2019)

ABSTRACT

Iranian indigenous goats are considered as one of the most valuable genetic reserves and it is important to keep their genetic diversity. The mitochondrial genome in an ecotype and comparing it with other ecotypes can provide an appropriate mesures of the diversity of the population. The purpose of this study was to investigate the genetic structure and phylogenetic relationships analysis of mitochondria HVR1 in four populations of indigenous goats in Iran including of Sistani, Pakestani, adani and Black Lori goats (Each of them has 4 heads) and compare to the other species of goats in the world. Total DNA extraction was performed using phenol-chloroform method and proliferation reaction was performed using a pair of special primers. Proliferation products were sequenced after purification by Sanger method. All of these sequences with17 sequences of the mitochondrial genome of other non Iranian goat ecotypes obtained from the National Center of Biotechnology Information (NCBI) were used for genetic analysis and phylogenetic tree mapping. Studying of HVR1 region of the mitochondrial genome in different goat populations, 123 polymorphic sites and 16 haplotypes were identified. The analysis of molecular variance showed that 15% of variation belongs to between populations and 85% within populations. All Iranian goat populations used in the present study were grouped in the Haplogroup group A, which were commonly found in world ecotypes. The values of the D and Fs statistics of the Tajima test were negative (-2.14 and -9.55 respectively) in the recent study, which may be due to the small size of the sample size. The results of this study showed that HVR1 region of the mitochondrial genome is a suitable tool for genetic studies and Haplogrouping of Iran and Non Iranian goat populations.

Keywords: D-Loop region, Genetic diversity, Phylogenetic relationships, Haplogroup.

* Corresponding author E-mail: dashab@uoz.ac.ir

مقدمه

نخستین نشانه‌های اهلی‌سازی بز در ایران یافت شده که مربوط به حدود ده هزار سال پیش از میلاد است (Zeder & Lapham, 2010). بز به‌دلیل اندازه متوسط بدن و توانایی سازگاری با محیط‌های گوناگون برای نقل و انتقال‌های بین قاره‌ها بسیار مناسب بوده است. جریان ژنی بالا در جمعیت‌های مختلف بز در 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).

استفاده از ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی در علوم دامی به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی و حفاظت ذخایر ژنتیکی دام و طیور کاربردهای زیادی پیدا کرده است (Mousavizadeh *et al*., 2009). ژنوم میتوکندری (mtDNA) نشانگر بسیار مناسبی برای تشخیص بین گونه‌ای گروه‌هایی است که ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سال از هم جدا بوده‌اند. همچنین، سرعت بالای تکامل mtDNA در مقایسه با DNA هسته‌ای، باعث شده کاربرد فراوانی در مطالعات تکاملی داشته باشد. سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در برخی از نواحی ژنی mtDNA مهره‌داران عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته‌ای است (Naderi *et al*., 2007).

ناحیه‌ای به نام ناحیه کنترلی (D-loop) در ژنوم میتوکندری وجود دارد که ژن کد کننده هیچ نوع پروتئینی را ندارد، بنابراین جهش‌ها می‌توانند در آن تجمع پیدا کنند. این بخش خود به دو ناحیه متغیر HVR1 و HVR2 و یک ناحیه ناحیه نسبتاً حفاظت شده در بین این دو ناحیه تقسیم می‌شود. این نواحی دارای بالاترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی در افراد مختلف بوده و جهش‌های به وجود آمده بدون تغییر به نسل‌های بعدی منتقل می‌شوند (Jazin *et al*., 1998). به علت وجود این ویژگی‌ها و همچنین تکامل سریع، مطالعه توالی این ناحیه از ژنوم میتوکندری در بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط میان گونه‌ها و نژادها بسیار ارزشمند است.

بسیاری از تحقیقات انجام شده در زمینهٔ خاستگاه احشام (به‌ویژه بز) بر روی ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری تمرکز داشته‌اند (Zeder & Lapham, 2010). مطالعه تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی منطقه HVR1 ناحیه D-Loop ژنوم میتوکندری در بزهای البانی نشان داد که ۹۸/۷ درصد از تنوع ژنتیکی در این ناحیه در درون جمعیت‌ها و تنها ۱/۳ درصد از تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها است و تجزیه هاپلوگروهی اکوتیپ‌های کشور آلبانی را در گروه A دسته‌بندی نمود (Doro *et al*., 2014). نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی ناحیه ژنوم میتوکندری تعدادی از اکوتیپ‌های بومی ایران شامل بزهای بومی آباده، خلخال و قزوین نشان داد که بیشترین تغییرات ژنتیکی مربوط به درون جمعیت‌ها بوده و تنها ۳/۰۸ درصد تغییرات را در بین جمعیت‌ها گزارش نمودند (Muezzini *et al*., 2015). در مطالعه‌ای ساختار ژنتیکی بزهای خلخالی بر اساس توالی ژنوم میتوکندری، ۷۷ درصد تنوع را در درون جمعیت‌ها و ۲۳ درصد تنوع را در بین جمعیت‌ها گزارش شده است (Karimi *et al*., 2017).

در تجزیه فیلوژنتیکی و هاپلوگروهی ۱۳ اکوتیپ از بزهای بومی پاکستان و یک توده بز وحشی در ناحیه D-Loop و سیتوکروم-b چهار هاپلوگروه A، B، C و D گزارش شده است (Soltana *et al*., 2003). همچنین، در تجزیه فیلوژنتیک ۳۱ اکوتیپ کشور چین، چهار هاپلوگروه A تا D را در ژنوم میتوکندری گزارش شد که هاپلوگروه‌های A و B در بزهای این کشور غالب بوده و هاپلوگروه‌های C و D فقط در ۷ اکوتیپ یافت شد (Kimura, 1980). مطالعه ۱۳ اکوتیپ بز چینی در ناحیه D-loop میتوکندری بیانگر چهار هاپلوتیپ A، B، C و D در ژنوم میتوکندری بود که فراوانی هاپلوتیپ B در حد متوسط و هاپلوتیپ‌های C و D فراوانی بسیار پایین داشتند (Liu *et al*., 2007).

تعیین توالی DNA میتوکندریایی می‌تواند برای تشریح تنوع ژنتیکی و روند تکامل در دام‌های اهلی و از جمله اکوتیپ‌های بز و همچنین جهت مطالعه‌ی تکاملی موجوداتی که گونه‌های مشابهی دارند به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار گیرد. بسیاری از این مطالعات در ناحیه D-Loop میتوکندری انجام می‌گیرد، چرا که این ناحیه میزان تنوع بالاتری را

نسبت به سایر بخش های ژنوم میتوکندری نشان می‌دهد (Lie *et al.*, 2015). همچنین مطالعه و شناسایی توالی ژنوم میتوکندری می‌تواند در تهیه شناسنامه ژنتیکی و حفظ خلوص نژادهای بومی مورد استفاده قرار گیرد. لذا هدف از مطالعه حاضر مطالعه ساختار ژنتیکی، فیلوژنتیکی و هاپلوگروهی توده‌های جمعیتی بزهای بومی ایران است.

مواد روش‌ها

در این پژوهش از تعداد ۱۶ رأس بز از اکوتیپ‌های پاکستانی (۴ رأس)، سیستانی (۴ رأس)، عدنی (۴رأس) و لری سیاه (۴رأس) به ترتیب در استان‌های سیستان و بلوچستان، هرمزگان و لرستان به طور تصادفی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. خونگیری از ورید گردنی به مقدار ۳ میلی‌لیتر در لوله‌های تحت خلاء و حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA یک درصد) انجام گرفت و نمونه‌های خون بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA کل از خون کامل به روش فنل-کلروفرم انجام شد.

تکثیر قطعه‌ای از ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری به طول ۹۷۶ جفت باز از یک جفت پرایمر اختصاصی استفاده شد. بدین منظور توالی ناحیه مذکور در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی NC005044 شناسایی گردید و با نرم افزار Primer-3 یک جفت پرایمر مناسب جهت تکثیر قطعه ۹۷۶ ناحیه HVR1 طراحی گردید و با ارسال به شرکت پیشگام توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen Co.) سنتز شدند (جدول ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم نهایی ۴۵ میکرولیتر شامل ۶ میکرولیتر DNA نمونه، ۱۳/۵میکرولیتر آب مقطر، ۱/۵میکرولیتر مخلوط پرایمرهای رفت و برگشت و ۲۴ میکرولیتر بافر واکنش تکثیر (Master mix) در طی ۳۵ چرخه و در دستگاه ترموسیکلر (Eppendorf) انجام شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر در سه مرحله شامل: مرحله اول در طی یک چرخه واسرشته سازی اولیه دو رشته DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه، مرحله دوم در طی ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰/۳ به مدت ۵۰ ثانیه و بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه انجام شد.

شکل ۱. تصویر چهار اکوتیپ. A: بز پاکستانی، B: بز سیستانی، C: بز لری سیاه و D: بز عدنی

Figure 1. Picture four ecotypes. A: Pakistani goat, B: Sistani goat, C: Black Lori goat, D: Adani goat.

جدول ۱. توالی آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه ۹۷۶ جفت باز از منطقه HVR1 ژنوم میتوکندری

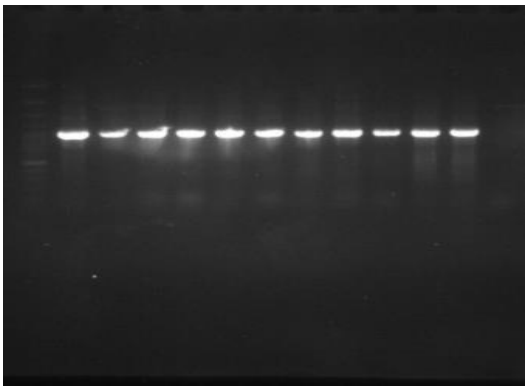
Table 1. The sequence of special primers for purification of 978bp segment of HVR1 region of mitochondrial genome

Primers	Neucleotide sequence	Segment size (bp)	Anneling temperature (°C)
Forward	5’-ACTCCACAAGCCTACAGA-3′	976	60.3
Reverse	5’-GGAAAGGTGGAGCGGATG-3′		

در نهایت مرحله سوم در طی یک چرخه شامل بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. در نهایت محصولات واکنش تکثیر بر روی ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند. قطعه ۹۷۶ جفت بازی تکثیر شده بر اساس آغازگرهای رفت و برگشت با ارسال به شرکت پیشگام به روش سانگر توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی شدند. بازنگری و بررسی کیفیت توالی‌های مورد بررسی و تشخیص همپوشانی‌ها (هتروپلاسمی و هموپلاسمی) و نمایش خودکار نقاط دارای ابهام برای ویرایش و حذف داده‌های با کیفیت پایین با استفاده از نرم‌افزار Chromas version 2.4.1 انجام گرفت (Lopez & Bonasora, 2017). سپس از ابزار BLAST در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی‌ها استفاده شد. تست تاجیما، به منظور شناسایی هرگونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف، برآورد شدند (Tamura *et al.*, 2004). شاخص‌های تنوع مولکولی از قبیل جهش‌ها، تعداد هاپلوتیپ‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، مکان‌های چندشکلی، چندشکلی اضافه و حذف، نواحی حفاظت شده، تعداد جایگاه‌هایی که در آن جایگزینی مشابه اتفاق افتاده و بررسی تنوع با استفاده از نرم‌افزار Dnasp (Rozas *et al.*, 2003) انجام گرفت. تجزیه واریانس مولکولی بین و درون جمعیت‌ها (AMOVA) از نرم‌افزار GENALEX6.41 استفاده شد (Excoffier, 1993). تجزیه شبکه‌ای هاپلوگروه‌ها با نرم‌افزار NETWORK4.163 انجام گرفت. برای تعیین هاپلوگروه جمعیت بزهای مورد مطالعه، هاپلوگروه‌هایی که قبلاً در جمعیت‌های مختلف بز شناسایی شده بودند از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)، استخراج شده و با روش پیوند همجواری روابط فیلوژنتیکی با نمونه‌های توالی‌یابی شده ترسیم گردید (Mazdarani *et al.*, 2014; Naderi, 2007) (http: //www. fluxus-engineering. com). در نهایت ترسیم درخت فیلوژنتیکی به‌روش اتصال- همسایگی (NJ) با روش آماری Bootstrap و ۱۰۰۰۰ تکرار از نرم‌افزار MEGA6 و در نظر گرفتن توالی بزهای وحشی به‌عنوان outgroup (شماره دسترسی AJ317833) انجام شد (Tamura *et al.*, 2004) استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه‌ها با روش فنل- کلروفرم با موفقیت انجام گرفت و کیفیت مناسب را برخوردار بودند. نتایج الکتروفورز محصولات تکثیر شامل قطعه ۹۷۶ جفت بازی از منطقه HVR1، ناحیه D-LOOP ژنوم میتوکندری نشان می‌دهد قطعه مذکور به خوبی تکثیرشده و فاقد باندهای غیراختصاصی هستند (شکل۲). تعیین توالی قطعه ۹۷۶ جفت بازی ناحیه HVR1 برای ۱۶ نمونه انجام شد. تجزیه‌وتحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی بیانگر ۱۶ هاپلوتیپ مختلف در جمعیت‌های مورد مطالعه بود. میانگین درصد فراوانی نوکلئوتیدهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در اکوتیپ‌های مختلف بز بومی ایران به‌ترتیب برابر با ۲۹/۶، ۲۹، ۲۵/۳ و ۱۶/۱ درصد بودند. نتایج نشان داد که در توالی ژنوم میتوکندری اکوتیپ‌های مختلف بز ایران باز آدنین بیشترین فراوانی و باز گوانین کمترین فراوانی را داشت (جدول ۲). در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از بزهای نژاد مرخز فراوانی نوکلئوتیدهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین به‌ترتیب ۲۹/۶، ۲۹/۱، ۲۵ و ۱۶/۲ گزارش گردید (Alipanah *et al*., 2015).



شکل ۲. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد (ستون اول لدر ۱۰۰ جفت‌بازی و سایر ستون‌ها بیانگر نمونه‌های مختلف هستند.

Figure 2. The electrophoresis of PCR products of HVR1 region on the 1% agarose gel (the first column is Ladder M100 and others are related to different sample)

جدول ۲. درصد فراوانی نوکلئوتیدهای مختلف منطقه HVR1 ژنوم میتوکندری در چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران

Table 2. Percentage of different nucleotides of HVR1 region of mitochondrial genome in four indigenous ecotypes of Iranian goats

Indigenous native of Iran	Sample	The frequency of neocleotides (%)			
		A	T	C	G
Sistani	4	29.5	28.98	25	16.7
Black lori	4	29.5	29.1	25.4	16
Adani	4	30.2	28.7	25.2	15.8
Pakistani	4	29.8	28.9	25.3	16
Mean	-	29.75	28.92	25.23	16.13

نتایج حاصل از هم‌ترازی توالی‌های نوکلئوتیدی بین چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران بیانگر جهش‌های متفاوت در ژنوم میتوکندری بود (جدول ۳). یازده جهش نقطه‌ای در ژنوم میتوکندری در بین نمونه‌های مختلف شناسایی گردید که به جز یک مورد، مابقی جهش‌ها در انتهای ناحیه HVR1 قرار داشتند و جهش‌ها اکثراً از نوع جایگزینی C و T بودند. نسبت جهش انتقالی نسبت به تقاطعی در ژنوم میتوکندری بیشتر بود (جدول ۴). در توجیه این نسبت می‌توان گفت درصورتی‌که در ردیف توالی DNA دو نوکلئوتید C و G پشت سر هم واقع گردند، احتمال متیله‌شدن نوکلئوتید C وجود داشته و به‌دنبال آن، این نوکلئوتید متیله می‌شود و به نوکلئوتید T تبدیل می‌گردد که به آن نقاط داغ جهش می‌گویند. همچنین، رشته مکمل نیز به همین نسبت می‌تواند در زمان همانندسازی باعث تبدیل نوکلئوتید G به A شود. نسبت جهش انتقالی به تقاطعی در مطالعه حاضر ۱/۹ محاسبه شد که خیلی بیشتر از گزارش‌های مربوط به ژنوم هسته‌ای است (Moradpour & Ghasemian, 2011).

با تجزیه‌وتحلیل توالی‌های ژن HVR1، وجود ۱۶ هاپلوتیپ در جمعیت چهار اکوتیپ بز مورد مطالعه شناسایی شد که محتوای توالی مورد توافق برای تبدیل بازهای آدنین به گوانین و گوانین به آدنین به ترتیب ۱۱/۱۴ و ۲۰/۴ درصد بودند. مجموع سیتوزین و گوانین۴۱/۴ درصد و مجموع آدنین و تیمین ۵۸/۶ درصد محاسبه شد. بالا بودن نرخ جایگزینی آدنین و تیمین باعث متمایز بودن نرخ تغییر تنوع ژنتیکی این ژن شده و می‌تواند یکی از دلایل بالا بودن نرخ جهش در جایگاه مذکور باشد. جانشینی نوع اول، جانشینی بازهای پورینی با یکدیگر و جانشینی بازهای پیریمیدینی با یکدیگر است. جانشینی نوع دوم شامل جانشینی بازهای پورینی به پیریمیدینی و برعکس است. نتایج حاصل حاکی از این است که جانشینی نوع اول بیشتر بوده است (جدول ۴).

جدول ۳. تعداد و موقعیت چندشکلی نوکلئوتیدهای مختلف (جهش داغ) منطقه HVR1 ژنوم میتوکندری چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران نسبت به ژنوم رفرنس

Table 3. The number and position of different single neucleotide polymorphisms (hot mutant) in HVR1 region of mitochoderial genome of four indegineus goat of Iran related to reference genome

Sample	Position of hot SNP										
	29	887	931	951	961	962	970	973	974	975	976
Reference genome	A	A	C	C	G	C	T	C	C	C	C
Sistani 1	G	T	T	T	C	C	T	A	A	A	T
Lori 1	A	A	T	T	C	C	T	A	C	A	C
Adani 1	A	T	T	A	C	G	C	A	A	A	A
Pakistani 1	A	T	T	C	G	C	C	T	T	T	T
Adani 2	A	T	T	T	C	C	T	A	A	A	A
Lori 3	A	T	T	C	T	G	C	T	T	C	A
Pakistani4	C	T	T	T	C	C	C	A	T	A	T
Adani4	A	A	T	T	C	C	C	T	C	A	C
Lori4	A	C	A	T	C	A	A	T	T	C	C
Sistani4	C	T	A	T	C	G	T	A	C	A	C
Sistani 2	A	T	T	C	G	A	C	T	T	C	A
Adani3	A	A	T	T	G	C	T	C	C	C	C
Sistani 3	A	A	T	T	G	C	T	C	C	C	C
Pakistani 2	A	A	T	T	G	C	T	C	C	C	C
Pakistani 3	A	A	T	T	G	C	T	C	C	C	C
Lori 2	A	A	T	T	G	C	T	C	C	C	C

جدول ۴. درصد فراوانی جایگزینی انتقالی و تقاطعی منطقه HVR1 ژنوم میتوکندری چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران

Table 4. The frequency percent of transitional and transvertional substitution in HVR1 region of motochonderial genome of four indegineus goats of Iran

Substitution	A	T	C	G
A	-	4.99	4.33	**11.14**
T	5.12	-	**15.72**	2.78
C	5.12	**18.16**	-	2.78
G	**20.54**	4.99	4.33	-

Each entry is the probability of substitution (*r*) from one base (row) to another base (column). Substitution pattern and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in **bold** and those of transversionsal substitutions are shown in *italics*. Relative values of instantaneous *r* should be considered when evaluating them. For simplicity, sum of *r* values is made equal to 100 (Tamura *et al.*, 2004).

میزان تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتیپی بر حسب جفت باز در جمعیت بزهای بومی ایران به ترتیب ۰/۰۲۹و ۱ تخمین زده شد. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از سطح تنوع بسیار بالا و عدم وجود مناطق حفاظت‌شده در ناحیه HVR1 در چهار اکوتیپ مورد بررسی است (جدول ۵). میانگین اختلاف نوکلئوتیدها بین اکوتیپ‌ها ۲۶/۸۶ جفت باز محاسبه شد. همچنین، در بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران با توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه مذکور در سایر اکوتیپ‌های بز به‌دست‌آمده از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)، ۲۰۰ جهش نقطه‌ای شناسایی شد که توزیع آن‌ها در طول ژنوم میتوکندری متفاوت بود. نسبت جهش‌های انتقالی به تقاطعی روند انتخاب مثبت در این ناحیه ژنی از ژنوم میتوکندری را نشان داد (جدول ۵). در پژوهشی که به منظور بررسی ساختار ژنتیکی ۱۰۰ نمونه بز خلخالی صورت گرفت، تعداد جهش کل ۶۲، تعداد هاپلوتیپ ۳۷، تنوع هاپلوتیپی ۰/۸۳۴و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۸ گزارش شدند (Karimi *et al.*, 2017).

شاخص‌های تجزیه نواحی حفاظت‌شده ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران (عدنی، لری سیاه، پاکستانی، سیستانی) در جدول ۶ آورده شده است. کمترین حد آستانه حفاظت، طول حفاظت و حفاظت توالی مربوط به اکوتیپ سیستانی (به‌ترتیب برابر با ۰/۹۸، ۴۰ و ۰/۸۹) و بیشترین آنها مربوط به اکوتیپ پاکستانی (به‌ترتیب ۱، ۵۸ و ۰/۹۵) بود.

فاصله ژنتیکی به‌صورت یک معیار آماری استاندارد است که با یک عدد بیان می‌گردد و تابعی از فراوانی نوکلئوتیدها است و جهت میزان واگرایی ژنتیکی جمعیت‌ها استفاده می‌شود. اگر هیچ تفاوتی وجود نداشته باشد، فاصله صفر خواهد بود و درصورتی‌که جمعیت‌ها در هیچ جایگاهی آلل مشترک نداشته باشند، فاصله میان آن‌ها حداکثر مقدار خود و برابر با یک خواهد بود. اعداد حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی نمایان‌گر میزان جانشینی نوکلئوتیدها، بین توالی‌های مورد بررسی هستند. فاصله ژنتیکی بین دو گونه، مرتبط با همبستگی فیلوژنتیکی بین آن گونه‌ها خواهد بود. در نتیجه از این شاخص می‌توان برای مشخص کردن دوری یا نزدیکی گونه‌ها از هم استفاده نمود (Huson & Steel, 2004). نتایج فاصله ژنتیکی در چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران در جدول ۷ آورده شده است. ازآنجایی‌که فواصل ژنتیکی بین حیوانات مختلف به‌صورت دو به دو است، اعداد حاصله، نمایانگر جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی‌های مورد بررسی هستند. فواصل ژنتیکی بین چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران برای توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری بیانگر کمترین فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ سیستانی با عدنی و بیشترین فاصله ژنتیکی سیاه لری با سیستانی بود.

جدول ۵. شاخص‌های تنوع ژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در درون و بین جمعیتی چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران و سایر اکوتیپ‌های بز دنیا

Table 5. The genetic variation indices of neucleotide sequences of HVR1 region of mitochondrial genome within and between four ecotypes of indegineus goat of Iran and others breed goat of the world

Population	S	H	H_d	Pi	Eta	k
Sistani	104	4	1	0.006	127	61.5
Adani	50	4	1	0.030	54	28.50
Black lori	56	4	1	0.03	59	30.00
Pakistani	46	4	1	0.03	58	28.83
Between four indigenous goat ecotypes of Iran	123	16	1	0.029	138	26.86
Between four ecotypes of Iran and other of goat breeb in the world	178	33	0.944	0.024	200	22.21

S: The number of polymorphic sites، H: The number of haplotypes، H_d: Haplotype diversity، Pi: Neucleotide diversity، Eta: Total number of mutations، K: Nucleotide divergence between population or speices (Nucleotide divergence).

جدول ۶. شاخص‌های تجزیه مناطق حفاظت‌شده ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران (درون جمعیتی)

Table 6. The analysis indices of conserved region of HVR1 region of mitochondrial genome of four indegineus goate ecotypes of Iran (within population)

Population	C	MWL	CT
Sistani	0.89	40	0.98
Adani	0.95	54	1
Black Lori	0.94	45	1
Pakistani	0.95	58	1

C: Conserved rate، MWL: Minimum length of conserved، CT: Conserved tolerance limit

جدول ۷. ماتریس برآورد فاصله ژنتیکی (بالای قطر) و اختلاف نوکلئوتیدی (پایین قطر) ناحیهHVR1 ژنوم میتوکندری بین جمعیتی چهار اکوتیپ بزهای بومی ایران

Table 7. The matrix of genetic diversity estimate (above digonal) and neucleotides difference (under diagonal) of HVR1 region of mitochondrial genome between four indegineus goat ecotypes of Iran

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Zabol _1		0.013	0.016	0.016	0.014	0.016	0.015	0.013	0.017	0.014	0.015	0.013	0.013	0.014	0.014	0.013
Lori _1	0.028		0.006	0.004	0.005	0.008	0.006	0.004	0.009	0.005	0.006	0.004	0.004	0.005	0.005	0.004
Adani_1	0.034	0.012		0.007	0.006	0.005	0.008	0.004	0.009	0.005	0.005	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006
Pakistan_1	0.330	0.014	0.013		0.007	0.006	0.003	0.005	0.009	0.006	0.005	0.005	0.005	0.004	0.005	0.005
Adani _2	0.031	0.009	0.011	0.013		0.007	0.005	0.004	0.009	0.005	0.006	0.005	0.004	0.005	0.005	0.005
Lori_2	0.035	0.015	0.008	0.010	0.013		0.007	0.005	0.008	0.006	0.005	0.004	0.005	0.006	0.006	0.006
Pakistan_4	0.031	0.011	0.013	0.005	0.010	0.014		0.004	0.009	0.005	0.006	0.005	0.005	0.004	0.004	0.005
Adani_4	0.029	0.006	0.008	0.009	0.008	0.009	0.007		0.006	0.003	0.004	0.005	0.002	0.003	0.003	0.003
Lori_4	0.037	0.018	0.019	0.017	0.018	0.016	0.018	0.012		0.007	0.007	0.002	0.006	0.008	0.007	0.006
Zabol_4	0.030	0.008	0.010	0.012	0.009	0.011	0.009	0.005	0.013		0.005	0.007	0.003	0.004	0.004	0.004
Zabol _2	0.033	0.011	0.011	0.010	0.011	0.009	0.012	0.006	0.013	0.010		0.004	0.005	0.005	0.005	0.004
Adani _3	0.028	0.007	0.011	0.009	0.008	0.010	0.009	0.003	0.013	0.006	0.008		0.001	0.001	0.001	0.001
Zabol_ 3	0.029	0.007	0.011	0.010	0.008	0.010	0.009	0.004	0.013	0.006	0.009	0.00		0.002	0.002	0.001
Pakistan_2	0.030	0.008	0.012	0.008	0.010	0.011	0.007	0.005	0.015	0.008	0.010	0.001	0.002		0.001	0.002
Pakistan_3	0.030	0.008	0.012	0.009	0.010	0.011	0.008	0.005	0.014	0.007	0.010	0.001	0.002	0.002		0.002
Lori _3	0.029	0.008	0.012	0.010	0.009	0.011	0.010	0.004	0.012	0.007	0.008	0.001	0.001	0.002	0.002	

تست‌های Neutrality شامل Tajima's D و Fu's Fs به منظور شناسایی هرگونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها در جمعیت‌های بز محاسبه شد (جدول ۹). جمعیت‌هایی که دچار گسترش و یا افزایش معنی‌دار در اندازه مؤثر جمعیت شده باشند و یا انتخاب جهت‌دار بر روی آنها عمل شده باشد، مقادیر D و Fs منفی و معنی‌دار تولید می‌کنند، درحالی‌که مقادیر مثبت و معنی‌دار D و Fs نشان‌دهنده اثرات مربوط به رانش ژنتیکی، تنگناهای ژنتیکی و یا اثر متعادل‌کننده در طول تاریخ تکاملی جمعیت است. نتایج این مطالعه نشان داد که مقادیر D و Fs منفی است که ممکن است به‌دلیل کوچک‌بودن اندازه نمونه مورد استفاده در این مطالعه باشد. نتایج هر دو تست Neutrality در مطالعه حاضر منفی بودند که می‌تواند نتیجه اثر گسترش، مهاجرت و اختلاط اکوتیپ‌های مختلف جمعیت بز در ایران و یا اثر انتخاب جهت‌دار بر روی این ژن در طول تکامل باشد. به‌طورکلی مطالعات نشان داده‌اند که تست Fu's Fs برای جمعیت‌های با اندازه کوچک و تست Tajima's D برای جمعیت‌های با اندازه بزرگ‌تر کارآمدتر هستند (Tajima, 1989).

جدول ۹. نتایج تست تاجیما جهت بررسی فرضیه انحراف از صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر ناحیه HVR1 در اکوتیپ‌های مختلف بز ایران (Neutrality Tajima Test)

Table 9. The results of Tajima test for study of null hypothesis of neutral evolution and recognition of neutral selection effects on the HVR1 region in different goat ecotypes of Iran

Region	Tajima's D	Fu's Fs
HVR1	-2.14	-9.55

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) به عنوان یک روش تجزیه آماری در محاسبه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌ها و میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها محسوب می‌شود (Pariset *et al.*, 2011). معمولاً در بررسی‌های جمعیتی مقدار F_{st} شاخص مهمی در جهت تعیین تمایز و تفکیک ژنتیکی بین

جمعیت‌ها محسوب می‌شود و بیانگر آن است که هر چه میزان جریان ژنی بیشتر باشد، اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌ها کمتر است. مقادیر از صفر تا ۰/۰۵ تمایز ژنتیکی پایین، مقادیر بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط، مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالا و مقادیر بیش از ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالا را نشان می‌دهد (Zawdzki *et al.*, 2008). نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۸۵ درصد از تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها بوده و تنها ۱۵ درصد تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها و اکوتیپ‌های مختلف بود (جدول ۱۰). محدود بودن تعداد نمونه‌ها، جریان ژنی بالا در نتیجه مهاجرت و آمیزش‌های خویشاوندی می‌توانند دلایل احتمالی کاهش تنوع بین جمعیت‌ها باشند. تجزیه واریانس مولکولی توالی نوکلئوتیدی ژنوم میتوکندری در اکوتیپ‌های بز بومی چین گزارش شد که ۸۶/۲۳ درصد تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها و ۱۳/۷۷ درصد بین جمعیت‌ها است (Zhao *et al.*, 2011).

جهت ترسیم درخت فیلوژنی اکوتیپ‌های بومی ایران با سایر گونه‌های بز دنیا در مرحله اول توالی‌های ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری در سایر گونه‌های بز دنیا با ابزار BLAST از پایگاه داده‌های ژنی (NCBI) استخراج شدند. طی این فرایند تعداد ۱۷ توالی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری از اکوتیپ‌های مختلف بز در دنیا بدست آمدند که اطلاعات مربوط به جایگاه ژن مذکور در این۱۷ اکوتیپ بز در جدول ۱۱ آورده شده است. در مرحله دوم توالی‌های بدست آمده با روش Clustalw نرم‌افزار MEGA6 هم‌ردیف شدند و در ترسیم درخت فیلوژنی استفاده شدند (شکل۵). نتایج تجزیه فیلوژنی نشان داد که بزهای ایرانی به یکدیگر نزدیکی بیشتری دارند که این امر نشان‌دهنده منشأ مشترک این اکوتیپ‌ها با توجه به منطقه جغرافیایی محل زندگی آن‌ها می‌باشد.

تعیین گروه‌های هاپلوتیپی یکی از مراحل مهم جهت تعیین موقعیت جغرافیایی اکوتیپ‌های مورد مطالعه با سایر اکوتیپ‌ها می‌باشد. به‌طور مرسوم مطالعه تکامل ژنتیکی گونه‌های مختلف دام‌ها بر اساس مطالعه قطعه کوچکی از ناحیه کنترل موسوم به ناحیه D-LOOP انجام شده است. نتایج تجزیه هاپلوگروه اکوتیپ‌های بومی ایران و سایر هاپلوگروه‌های شناسایی‌شده از اکوتیپ‌های مختلف دنیا در شکل‌های ۴ و ۵ آورده شده است.

جدول ۱۰. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری اکوتیپ‌های بز بومی ایران

Table 10. Analysis of molecular variance (AMOVA) of neucleotide sequences in HVR1 region of mitochondeial genome of indegineus goat ecotypes of Iran

Source of variation	df	Sum of square	Mean of square	Varation (%)	F
Between population	3	1.188	0.042	15	0.17^{ns}
Within population	12	2.750	0.229	85	
Total	15	3.938	0.281	100	

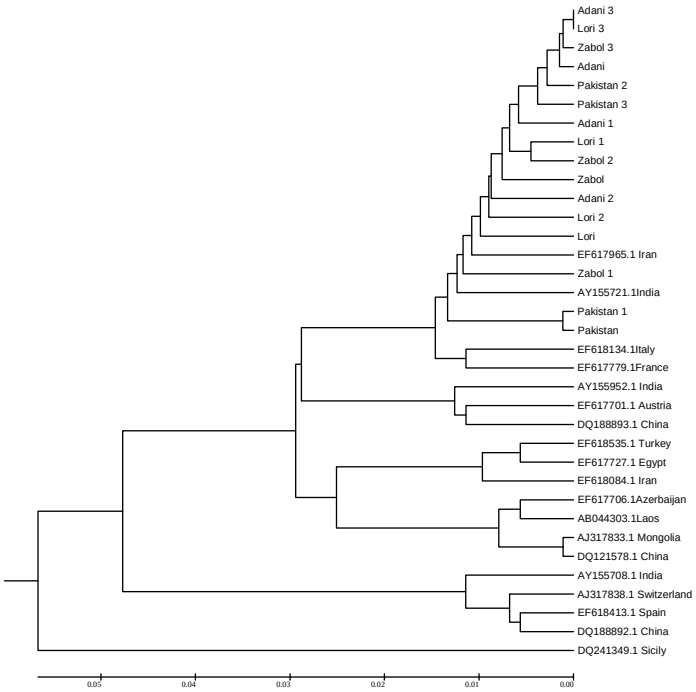
ns: Non-significantly difference (P>0.05)

ns: وجود اختلاف غیرمعنی‌دار (P>۰/۰۵).

جدول ۱۱. نژاد، کشور و شماره دسترسی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 برخی از نژادهای بز دنیا استفاده شده در مطالعه حاضر

Table 11. The breed, counrty and accession number of neucleotide sequence of HVR1 region some of world goat breeds in which were used in current study

Breed	Country	Accession number
Indian goats	India	AY155721
Indian goats	India	AY155952
Ganj Dareh	Iran	EF617965
Biondadell Adamello	Italy	EF618134
French Alpine	France	EF617779
Pinzgau	Austria	EF617701
Matou	China	DQ188893
Matou	China	DQ121578
Gurcu	Turkey	EF618535
Baladi	Egypt	EF617727
Ganj Dareh	Iran	EF618084
Azeri	Azerbaijan	EF617706
Laos native	Laos	AB044303
Asia	Mongolia.	AJ317833
Switzerland native breeds	Switzerland	AJ317838
Spain native breeds	Spain	EF618413
Girgentana	Sicily	DQ241349

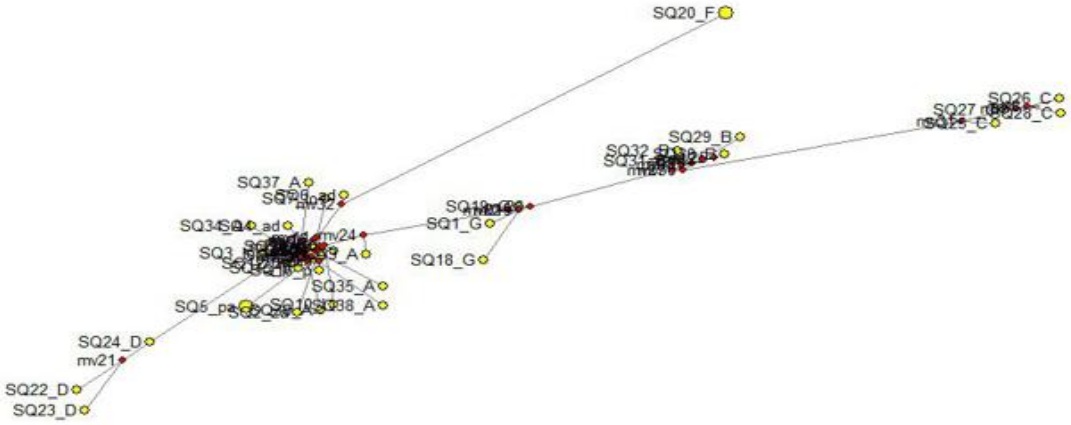


شکل ۳. درخت فیلوژنی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری اکوتیپ‌های مختلف بز ایران و تعدادی از نژادهای بز در دنیا

Figure 3. Phylogenetic tree of neucleotide sequences of HVR1 region of mitochondrial genome of different goat ecotypes of Iran and some breeds in the world

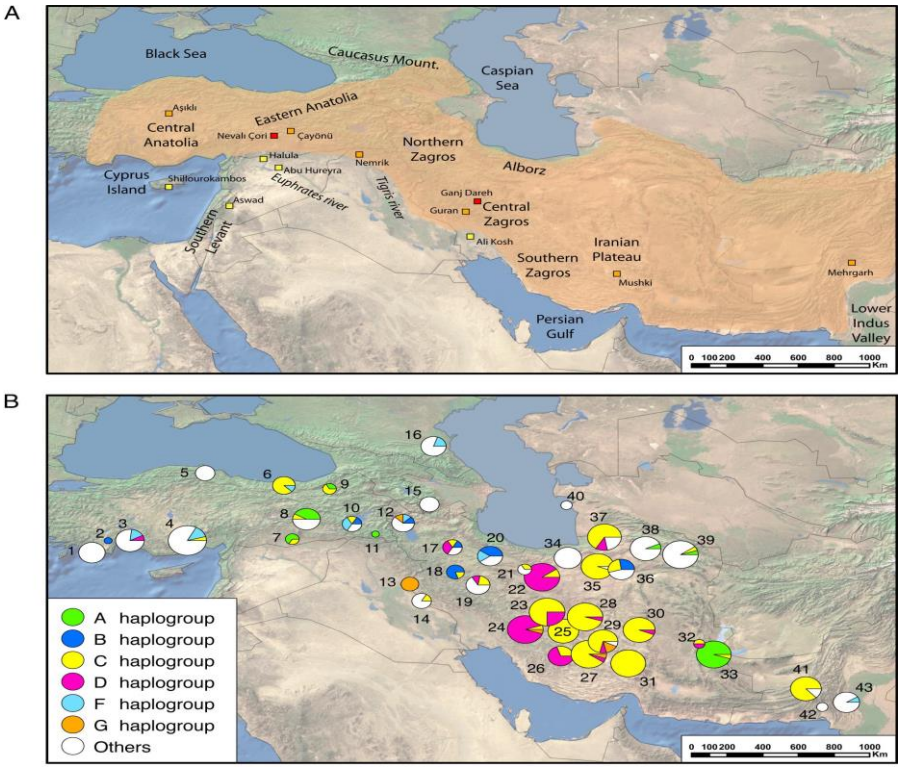
در شکل‌های مذکور هاپلوتیپ‌های با فراوانی بیشتر با دایره بزرگ‌تر و هاپلوتیپ‌های با فراوانی پایین‌تر دایره کوچک‌تر را به خود اختصاص داده‌اند. تمامی ۱۶ نمونه در هاپلوگروه A قرار گرفتند. این هاپلوگروه بزرگ‌ترین هاپلوگروه در انواع اکوتیپ‌های مختلف جهان می‌باشد. در بز اولین مطالعه‌ای که با تجریه هاپلوگروه انجام شد وجود چند خط مادری کاملاً متمایز را مشخص کرد که ساختار ژئوگرافی آنها کمتر از سایر اکوتیپ‌ها بود. طی این بررسی مشخص شد که خط مادری اکوتیپ‌های 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 بوده‌اند (Luikart *et al.*, 2001). در ادامه با مطالعه بزهای بومی پاکستان، هاپلوگروه دیگری بنام D نیز معرفی شد (Sultana *et al.*, 2003). در مطالعه‌ای ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری برخی اکوتیپ‌های بومی کشور ایران مورد بررسی قرار گرفت، که هر شش نوع هاپلوگروه با تنوع هاپلوتیپی به نام‌های A، B، C، D، F و G را گزارش نمودند که پنج مورد از این هاپلوگروه‌ها توسط محققان قبلی گزارش شده بود (Luikart *et al.*, 2001; Sultana *et al.*, 2003; Naderi *et al.*, 2007). دو هاپلوتیپی که توسط Joshi *et al.* (2004) معرفی شده بود نیز به‌دلیل این‌که حدواسط بین دو هاپلوگروه A و E بودند وارد هاپلوگروه A شدند. بنابراین، هاپلوگروه E نمی‌توانست بررسی شود (Joshi *et al.*, 2004). در مطالعه‌ای به منظور توصیف تنوع ژنتیکی سه جمعیت بز بومی آباده، خلخالی و قزوین بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه D-loop میتوکندری، تمام اکوتیپ‌ها در هاپلوگروه A گزارش شدند (Muezzini *et al.*, 2015). در مطالعه توالی HVR1 ناحیه D-LOOP برای ۱۴۵ نمونه حیوان از ۱۹ نژاد بومی چین و ۴ بز وحشی، نتایج نشان داد که دو انفجار جمعیتی در تاریخچه تکامل تبار B اتفاق افتاده است (Wu *et al.*, 2009). در تحقیق دیگری با مطالعه ۵۱ نمونه از جمعیت بز جاموناپاری هندوستان تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی این نژاد مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه

بیشتر این جمعیت یک انفجار جمعیتی در تاریخچه آنها را نشان داد (Doro *et al.*, 2014). در تجزیه توالی کامل ژنوم میتوکندریایی به‌منظور تعیین هاپلوگروهی و گسترش جهانی آن با استفاده از ۹۸ رأس بز از نژاد ساردینی ایتالیا، ۹۱۶ چندشکلی را در ۱۱ جایگاه ژنی گزارش نمودند. ۱۱۱ مورد از این چندشکلی‌ها مربوط به هاپلوگروه B و C بوده و ۲۱ مورد مربوط به هاپلوگروه A بودند. یافته‌های این تحقیق گسترش جهانی هاپلوگروه A و تنوع بیشتر این هاپلوگروه را تأیید کرد (Rout *et al.*, 2012).



شکل ۴. شبکه پیوسته حاصل از ۳۳ نمونه مربوط به توالی نوکلئوتیدی ناحیهHVR1 ژنوم میتوکندری (اندازه دایره‌ها متناسب با فراوانی آنها است) (شماره‌ها شامل شماره دسترسی و هاپلوگروه گزارش شده در مطالعات قبلی هستند).

Figure 4. Continuous network from 38 samples of the nucleotide sequence of the HVR1 region of the mitochondrial genome (the size of the circles is proportional to their abundance) (The numbers include accession numbers and haplogroups reported in previous studies).



شکل ۵. پراکندگی هاپلوگروه‌های مختلف بز در برخی مناطق دنیا بر روی نقشه

Figure 5. Distribution of various haplogroups of goats in some areas of the world on a map

نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر تعیین توالی نقاطی از ژنوم میتوکندری برای تعداد کمی از نژادهای بز ایرانی به منظور کسب اطلاعات و شناخت دقیق‌تر از نژادهای بومی انجام شده است. یکی از مهم‌ترین اهداف این تحقیق تعیین یک توالی شاخص برای هر کدام از اکوتیپ‌ها بوده است. در واقع با تعیین توالی توافقی برای هر اکوتیپ و ثبت این توالی‌ها در بانک جهانی ژن برای اولین بار نام اکوتیپ‌های بزهای مورد مطالعه در بانک جهانی ژن آورده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که همه اکوتیپ‌های مورد پژوهش دارای جهش و تفاوت‌های نوکلوتیدی در ناحیه HVR1 هستند. نتایج فیلوژنی نشان داد که اکوتیپ عدنی و لری سیاه با هم گروه شدند که این امر می‌تواند به‌دلیل نزدیکی جغرافیایی مکان زیستی و جریان ژنی در بین آنها باشد. تجزیه هاپلوگروهی موجب گروه‌بندی تمام اکوتیپ‌ها در دسته هاپلوتیپ A شد و در نهایت تجزیه واریانس مولکولی توالی ناحیه HVR1 بیانگر تنوع زیاد در درون جمعیت‌ها (۸۵ درصد) و در بین جمعیت‌ها به میزان کمتری (۱۵ درصد) بود. البته با توجه به تعداد کم نمونه‌ها در آزمایش اخیر جهت کسب اطلاعات دقیق‌تر از میزان تنوع و گروه‌بندی ژنتیکی در بین اکوتیپ‌های بز ایران نیاز به تعداد نمونه بیشتر و حجم توالی وسیع تر از ژنوم میتوکندری در مطالعات آینده است.

REFERENCES

1. Alipanah, M., Seydabadi, H. R., Gharan, F. & Rodbari, Z. (2015). Genetic and phylogenetic analysis D-Loop region of mithchondrial genome in Khorasan native turkey. *Aniam Science Journal (Pajouhesh and Sazandeqi)*, 107, 119-126. (in Farsi)
2. Doro, M. G., Piras, D., Leoni, G. G., 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.
3. Excoffier, L. (1993). *Analysis of molecular variance (AMOVA) version 1.55*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
4. Huson, D. H. & Steel, M. (2004). Distances that perfectly mislead. *Systematic Biology*, 53, 327-332.
5. Jazin, E., Soodyall, H., Jalonen, P., Lindholm, E., Stoneking, M., Gyllensten, U. (1998). Mitochondrial mutationrate revisited: hot spots and polymorphism. *Nature Genetics*, 18, 109-110.
6. Joshi, M. B., Rout, P. K., Mandal, A. K., Tyler-Smith, C., Singh, L. & Thangaraj, K. (2004). Phylogeography and origin of Indian domestic goats. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), 454-462.
7. Karimi, V., Hedayat Evrigh, N., Seyed Sharifi, R. & Nikbin, S. (2017). Invetigation of genetic structure of Khalkhali goat using mitochondrial genome. *Novin Genetic Journal*, 12(2), 217-227. (in Farsi)
8. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
9. Lie, D. E., Cean, A., Cziszter, L. T., Gavojdian, D., Ivan, A. & Kusza, S. (2015). Microsatellite and mitochondrial DNA study of native eastern European cattle populations: the case of the Romanian Grey. *PLoS One*, 10, 1-18.
10. Liu, A. H., Yin, H., Guan, G. Q., Schnittger, L., Liu, Z. J., Ma, M. L. & Ahmed, J. S. (2007). At least two genetically distinct large Babesia species infective to sheep and goats in China. *Veterinary Parasitology*, 147(3), 246-251.
11. Liu, Y. P., Cao, S. X., Chen, S. Y., Yao, Y. G. & Liu, T. Z. (2009). Genetic diversity of Chinese domestic goat based on the mitochondrial DNA sequence variation. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126(1), 80-89.
12. Lopez, A. & Bonasora, M. G. (2017). Phylogeography, genetic diversity and population structure in a Patagonian endemic plant. *AoB Plants*, 16(4), 275.
13. Luikart, G., Gielly, L., Excoffier, L., Vigne, J. D., Bouvet, J. & Taberlet, P. (2001). Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences*, 98, 5927-5932.
14. Mazdarani, F. H., Akbari, M. T., Fard, R. M. N., Hessari, M. & Pour, K. C. (2014). Molecular identification of Capra hircus in East Chia Sabz, an Iranian pre-pottery Neolithic site, Central Zagros, based on mtDNA. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(3), 945-950.
15. Moradpour, Z. & Ghasemian, A. (2011). Bioinformatics in simple language. Biological House Publishing, pp. 446-454. (in Farsi)
16. Mousavizadeh, A., Mohammadabadi, M. R., Torabi, A., Nassiry, M. R., Ghiasi, Esmailizadeh, A. K. (2009). Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology*, 7, 51-53. (in Farsi)

17. Muezzini, F., Afraz, S., Vahid, F. & Toligiyani, A. (2015). Study of mitochondrial DNA diversity in native goat populations of Khalkhal and Qazvini. *The 9th National Conference of the Islamic Republic of Iran*, p. 66-89. (in Farsi)
18. Naderi, S., Rezaei, H. R., Taberlet, P., Zundel, S., Rafat, S. A., Naghash, H. R., Elbarody, M. A. A., Ertugrul, O. & Pompanon, F. (2007). Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. *Plos One*, 2(10), 1-12. (in Farsi)
19. Pariset, L., Mariotti, M., Gargani, M., Joost, S., Negrini, R., Perez, T. & Valentini, A. (2011). Genetic diversity of sheep breeds from Albania, Greece, and Italy assessed by mitochondrial DNA and nuclear polymorphisms (SNPs). *The Scientific World Journal*, 11, 1641-1659.
20. 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.
21. Rozas, J., Sachez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.
22. Sultana, S., Mannen, H. & Tsuji, S. (2003). Mitochondrial DNA diversity of Pakistani goats. *Animal Genetics*, 34(6), 417-421.
23. Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
24. Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11030-11035.
25. Wu, Y. P., Guan, W. J., Zhao, Q. J., He, X. H., Pu, Y. B., Huo, J. H. & Ma, Y. H. (2009). A fine map for maternal lineage analysis by mitochondrial hypervariable region in 12 Chinese goat breeds. *Animal Science Journal*, 80, 372-380.
26. Zawadzki, C. H., Pavanelli, C. S. & Langeani, F. (2008). Neoplecostomus (Teleostei: Loricariidae) from the upper Rio Paraná basin, Brazil, with description of three new species. *Zootaxa*, 1757, 31-48.
27. Zeder, M. A. & Lapham, H. A. (2010). Assessing the reliability of criteria used to identify postcranial bones in sheep, Ovis, and goats, Capra. *Journal of Archaeological Science*, 37 (11), 2887-2905.
28. Zhao, Y., Zhang, J., Zhao, E., Zhang, X., Liu, X. & Zhang, N. (2011). Mitochondrial DNA diversity and origins of domestic goats in Southwest China (excluding Tibet). *Small Ruminant Research*, 95 (1), 40-47.