

مقاله پژوهشی:

مطالعه مقایسه‌ای پوشش ترانسکریپتومی و چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی ژنوم میتوکندری در گاو هلشتاین (*Bos taurus*) در مقابل کیستانی (*Bos indicus*)

احمد تهروسی^۱، غلامرضا داشاب^{۲*}، محمدحسین بناءبازی^۳ و علی مقصودی^۴

۱. دانش آموخته کارشناس ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲. دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳. دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۴. دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی و بیوانفورماتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۲۸)

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی دلایل اختلاف بیان ژن بسیار فاحش بین دو زیر گونه گاو هلشتاین و کیستانی و اهمیت ژن‌های میتوکندری این دو نژاد شامل COX1، COX2، COX3، ND1 و ND2 می‌باشند که در فرآیندهای مهمی از جمله متابولیسم انرژی، در مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی و نیز مقاومت به بیماری نقش دارند. در این مطالعه از داده‌های RNA-Seq مربوط به ادغام ۴۰ نمونه از مرکز گاو شیری دانشگاه ویسکانسین آمریکا (*Bos taurus*) و ۴۵ گاو ماده کیستانی (*Bos indicus*) در مزرعه گوجایتپیر شهر باهاولپور واقع در ایالت پنجاب پاکستان استفاده شد. جهت بررسی سطح پوشش ترانسکریپتومی و اختلافات ژنتیکی که شامل نواحی چندشکلی، نواحی حذف و اضافه و نواحی اتصال بود از نرم افزار IGB استفاده شد. همچنین جهت تعیین مکان نواحی چندشکل و محاسبه درصد انواع جایگزینی‌های انتقالی و تقاطعی نوکلئوتیدها و هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها نرم‌افزارهای MEGA6 و DnaSPV.5 استفاده شدند. نتایج حاصل از این مطالعه، بیانگر این بود که ژن COX1 به طول ۱۵۴۲ جفت باز، بیشترین سطح پوشش ترانسکریپتومی (کاوریج) در ژنوم میتوکندری را دارا بود و کمترین سطح پوشش ترانسکریپتومی مربوط به ژن ND1 بود. در بین ژن‌های میتوکندری، ژن COX1 بیشترین میزان حذف و اضافه را نشان داد که در نژاد هلشتاین بیشتر از کیستانی بود. تعداد نواحی چندشکل در جایگاه COX1 بیشتر از سایر ژن‌ها و برابر با ۱۹ ناحیه بود. همچنین نتایج نشان داد که درصد جایگزینی تک نوکلئوتیدی انتقالی در بازها بیشتر از جایگزینی تک نوکلئوتیدی تقاطعی می‌باشد که دلیل پایداری تغییرات در طی نسل‌های متفاوت هستند. بنابراین، دلایل احتمالی تفاوت بیان ژن‌های mtDNA می‌تواند در نتیجه تفاوت در اتفاقات فرآیندهای حذف و اضافه، پوشش ترانسکریپتوم و نواحی چندشکلی باشند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پوشش ترانسکریپتومی، کیستانی، حذف و اضافه، هلشتاین.

A comparative study of transcriptome coverage and single nucleotide polymorphisms of mtDNA in Holstein (*Bos taurus*) vs. Cholistani (*Bos indicus*)

Ahmad Tamroosi¹, Gholam Reza Dashab^{2*}, Mohammad Hossein Banabazi³ and Ali Maghsoudi⁴

1. M.Sc. Graduate, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Associate Professor of Animal Breeding and Genetic, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
3. Associate Professor, Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Associate Professor of Animal Breeding and Genetic, Department of Animal Science and Bioinformatic, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
(Received: Aug. 3, 2021 - Accepted: Apr. 17, 2022)

ABSTRACT

This research aimed to investigate the reasons for the difference of gene expression between two subspecies of Holstein and Cholistani cattle and the importance of mitochondrial genes of these two breeds, the genes under study were COX1, COX2, COX3, ND1 and ND2, which are involved in essential processes such as energy metabolism, resistance to biological and non-biological stresses, as well as disease resistance. In this study, RNA-Seq data were used, including 40 samples from the University of Wisconsin Dairy Cattle Center (*Bos taurus*) and 45 Cholistani cows (*Bos indicus*) of Gujaratpir farm in Bahawalpur, Punjab, Pakistan. IGB software was used to investigate the level of transcriptome coverage and genetic differences, which included polymorphic, deletion and addition and binding regions. MEGA6 and DnaSPV.5 softwares were also used to determine the location of polymorphic areas as well as to calculate the percentage of different types of transitional and transversal replacements of nucleotides and to align sequences. The results showed that the COX1 gene, with a length of 1542 bp, had the highest level of transcriptome coverage in the mitochondrial genome and the lowest level of transcriptome coverage was related to the ND1 gene. Among mitochondrial genes, the COX1 gene showed the highest deletions and additions, which were higher in Holstein than Cholistani breeds. The number of polymorphic regions in the COX1 locus (19 areas) was higher than other genes. The results also showed that the percentage of transitional substitution is higher than transversal substitution which is the reason for the stability of changes during different generations. Therefore, possible reasons for differences in mtDNA gene expression may be due to differences in deletion and addition processes, transcriptome coverage, and polymorphic regions.

Keywords: Addition and deletion, Cholistani, Gene expression, Holstein, Transcriptome coverage.

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

مقدمه

گاو در پیشرفت فرهنگ و تمدن بشری، جایگاه ویژه‌ای داشته است. شواهد باستان‌شناسی فعلی و تجزیه و تحلیل ژنتیکی، دو رویداد اهلی شدن را نشان می‌دهند و این که چگونه نژادهای جدید گاو از گله‌های وحشی نشأت می‌گیرند. اهلی‌شدن زیرگونه بوس تائروس (تائورین) در خاور نزدیک بین سال‌های ۸۸۰۰ و ۸۳۰۰ قبل از میلاد (Helmer *et al.*, 2005) و زیرگونه بوس ایندیکوس (زبو) در حدود ۶۸۰۰ سال قبل از میلاد مسیح از دره ایندوس منشأ گرفته است (Ajmone-Marsan *et al.*, 2010). شواهد باستان‌شناسی و ژنتیکی حاکی از آن است که گاوهای مدرن ممکن است ناشی از دو رویداد اهلی شدن گاو (بوس پریمینیگوس) در جنوب غربی آسیا باشد که به ترتیب باعث به وجود آمدن گاوهای تائورین (بوس تائروس) و زبو (بوس ایندیکوس) شدند (Loftus *et al.*, 1994; Helmer *et al.*, 2005). با این حال، اهلی شدن مستقل در آفریقا (Bradley *et al.*, 1996; Hanotte and Jianlin, 2005) و شرق آسیا (Mannen *et al.*, 2004) نیز فرض شده است و داده‌های DNA باستانی امکان تداخل ژنی از گاو وحشی را افزایش می‌دهند. همزمان با وقوع تغییرات گسترده در شرایط آب و هوایی زمین، لزوم تغییر نگرش در برنامه‌های اصلاح نژادی دام‌های اهلی بیشتر احساس می‌شود. کاهش تنوع ژنتیکی، افت ناشی از همخونی و بروز بیماری‌ها از جمله نگرانی‌های صنعت دام محسوب می‌شوند. این در حالی است که، سازگاری حاصل از انتخاب طبیعی در طی سالیان متمادی موجب شده است که دام‌های بومی در مقایسه با نژادهای تجاری از مقاومت ژنتیکی و قدرت سازگاری بالاتری برخوردار باشند (Hoffmann, 2010). وجود این نوع تنوع ژنتیکی لازمه اجرای اهداف اصلاح نژادی پیش‌رو و سازگاری سریع نسبت به تغییرات محیطی خواهد بود. به همین جهت حفاظت از منابع ژنتیکی دام‌های بومی دارای اهمیت بوده و تغییر نگرش جهانی در جهت حفاظت از دام‌های بومی مناطق مختلف ضروری به نظر می‌رسد (Herrero-Medrano *et al.*, 2013). مطالعه وضعیت اکولوژیکی و تکاملی جمعیت‌ها به دلیل توزیع

جغرافیایی غیرتصادفی آنها نیازمند شناخت صحیح ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، گامی در جهت توسعه برنامه‌های حفاظتی و مدیریت منابع ژنتیکی محسوب می‌شود (Groeneveld *et al.*, 2010).

مطالعات بیوشیمیایی گسترده، در دوره ۱۹۶۰-۱۹۰۰، به توصیف مسیرهای کاتابولیک مستقر در میتوکندری، یعنی چرخه اسید سیتریک، بتا اکسیداسیون، انتقال الکترون میتوکندری و فسفوریلاسیون اکسیداتیو منجر شد. این واکنش‌ها مسئول تولید اکثر ATP سلولی (آدنوزین ۵-تری فسفات)، مولکولی است که می‌تواند منبع پرنرژی سلول محسوب شود. از این رو با توجه به عملکرد میتوکندری، به عنوان "نیروگاه سلول" شناخته می‌شود. با این حال فعالیت‌های دیگری به غیر از تولید انرژی در میتوکندری وجود دارد. این اندامک‌های درون سلولی نقش مهمی در بیوساخت آمینواسید، نوکلئوباز، لیپید و کوفاکتور دارند. قابل توجه است که در شرایط کشت مناسب، تنفس میتوکندری قابل کنترل است، زیرا سلول‌های دارای نقص تنفس با استفاده از تولید گلیکولیز ATP قادر به رشد هستند. با این حال، میتوکندری‌ها، به دلیل عملکردهای آنابولیکی برای حیات سلول‌های یوکاریوتی ضروری می‌باشند (Fontanesi, 2001).

میتوکندری، کارخانه انرژی بدن است که نقش حیاتی در سلول هوازی ایفا می‌کند. گزارش شده است که تغییر DNA میتوکندری (mtDNA) با برخی بیماری‌ها، و سازگاری آب و هوایی (اقلیمی) مرتبط است (Pickrell and Youle, 2015; Ruiz-Pesini *et al.*, 2007). میتوکندری در متابولیسم یوکاریوتی، آپوپتوز، بیماری و پیری نقش اصلی دارد (Tuppen *et al.*, 2010). DNA میتوکندری دارای یک ناحیه غیرکد شونده (D-Loop) و نواحی کدشونده، متشکل از ۳۷ ژن، شامل ۱۳ پروتئین و ۲۲ tRNA که ۲۰ اسیدآمینو را شناسایی می‌کنند و ۲ rRNA و فاقد پروتئین‌های هیستون و اینترون است. DNA میتوکندریایی در اکثر موجودات یک مولکول دو رشته‌ای و حلقوی با حدود ۱۶ هزار جفت نوکلئوتید می‌باشد و وزن مولکولی در حدود 10×10^6 دالتون

زیرا زنجیره تنفسی، تولیدکننده اصلی واحدهای اکسیژن و اکشنگر در سلولها هستند؛ لذا محتویات میتوکندریها، شامل ژنوم میتوکندری، از بیشترین تماس با پراکسیدها و آسیب ناشی از آن رنج می‌برند؛ به‌علاوه سیستم همانندسازی DNA میتوکندریایی نسبت به سیستم هسته‌ای، اثر کمتری در تصحیح غلط‌های حاصل از همانندسازی و ترمیم آسیب DNA دارد و عدم وجود هیستون‌ها و پروتئین‌های محافظت کننده از جمله عواملی هستند که باعث بروز نرخ بالای جهش در mtDNA می‌گردند (Tuppen *et al.*, 2010).

ترانسکریپتوم مطالعه کاتالوگ‌های رونوشت در یک سلول، بافت یا ارگانیسم برای یک مرحله توسعه خاصی یا شرایط فیزیولوژیکی است (Tang *et al.*, 2009). ترانسکریپتوم مجموعه کامل از رونوشت‌ها است که شامل RNA پیام‌رسان، RNAهای کدکننده پروتئین‌ها، و RNA غیرکدکننده (ncRNA) از جمله RNA ریبوزومی (rRNA)، RNA انتقال‌دهنده، (tRNA) و سایر ncRNAs می‌باشد (Okazaki *et al.*, 2002). برخلاف ژنوم نسبتاً پایدار، عوامل مختلفی از جمله مرحله رشد، شرایط فیزیولوژیکی و محیط خارجی بر تغییرات ترانسکریپتوم تأثیر می‌گذارد. اهداف ترانسکریپتوم شامل حاشیه‌نویسی، تعیین ساختار کارکردی هر ژن در ژنوم و تغییرات در سطوح بیان ژن در میان نمونه‌های مختلف ترانسکریپتوم می‌باشد (Tang *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010).

COX یک اکسیداز ترمینال Copper-bemeA است که در غشای داخلی میتوکندری تعبیه شده است. انتقال الکترون از Cytochrome c به اکسیژن مولکولی که در یک فرآیند همراه با انتقال پروتون‌ها در طول غشای داخلی اتفاق می‌افتد، منجر به ایجاد شیب پروتون می‌شود که بوسیله ATP به کار می‌رود تا ساخت ATP را هدایت کند. آنزیم COX یک مولتی آنزیم است که توسط ۱۴ زیرواحد پروتئینی با منشأ ژنتیکی دوگانه تشکیل شده است. سه زیرواحد تشکیل دهنده هسته کاتالیزوری آنزیم (COX2, COX3, COX1) توسط میتوکندری و باقی‌مانده توسط DNA هسته‌ای کدگذاری می‌شوند. ساختار زیرواحدهای هسته از اجداد میتوکندری تا COX انسان حفظ

دارد (Kujoth *et al.*, 2007; Bao *et al.*, 2008; Gray, 2012).

در بعضی از mtDNA مثلاً (نماتدها و آنلیدها) همه ژن‌ها در یک جهت رونویسی می‌شوند، در حالی که در برخی دیگر، قابلیت رونویسی در هر دو جهت را دارند (Tuppen *et al.*, 2010). توالی DNA میتوکندری (mtDNA) می‌تواند یک ابزار زنده برای استقرار محل‌های اهلی‌سازی باشد. نقطه کانونی تنوع mtDNA گاوهای کوهان‌دار در شبه‌جزیره هند با توجه به مناطق فراگیر، نشان‌دهنده اهلی شدن *Bos indicus* در هند و پس از مهاجرت به جنوب غرب آسیا، چین و جنوب شرقی آسیا است (Chen *et al.*, 2009). به طور مشابه، *Bos taurus* دارای بیشترین تنوع در جنوب غربی آسیا با چهار mtDNA مختلف Haplogroups T1، T2، T3 و T4 می‌باشند (Troy *et al.*, 2001).

به دلیل هاپلوئید بودن ژنوم میتوکندری و در نتیجه انجام نشدن فرآیند میوز، ژنوم میتوکندری قابلیت بالایی در مطالعات فیلوژنتیکی دارد. منطقه‌ای در ژنوم میتوکندری وجود دارد که کدکننده پروتئین نبوده و جهش در آن منطقه می‌تواند تجمع پیدا کند. این منطقه در ناحیه D-Loop قرار دارد، ناحیه پیشبر برای آغاز همانندسازی ژنوم میتوکندری است (Anderson *et al.*, 1981). همانند ژنوم هسته، DNA میتوکندری نیز تحت تأثیر جهش‌های مختلف قرار می‌گیرد که اغلب این جهش‌ها مضر هستند. از آنجایی که میتوکندری از مادر به فرزندان منتقل می‌شود، در نتیجه جهش‌های میتوکندریایی نیز از مادر به نسل بعد انتقال می‌یابند. مطالعات متعددی ارتباط جهش‌های مختلف میتوکندری را با بیماری‌هایی از جمله دیابت، بیماری‌های متابولیکی، سرطان و غیره نشان داده‌اند. علاوه بر این گزارش شده است که تجمع جهش‌های مختلف در میتوکندری، در طول عمر یک انسان با بروز پیری رابطه مستقیم دارد (Bandiera *et al.*, 2013; Cooper and Hausamn, 2007).

میزان بروز جهش در DNA میتوکندری ۱۰ تا ۱۷ بار بیشتر از بخش مشابه در ژنوم هسته‌ای می‌باشد،

این دو نژاد تفاوت فنوتیپی قابل توجه بین این دو نژاد است (Levin *et al.*, 2010; Marguerat and Bahler, 2010). از آنجایی که در برخی از ژن‌های میتوکندری تفاوت بیان ژن بسیار فاحش (تا ۱۰۰۰ برابر) بین دو زیرگونه هلشتاین و کلیستانی مشاهده شده و با توجه به اهمیت ژن‌های موجود در فرآیندهای مهمی از جمله متابولیسم انرژی که در مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی و نیز مقاومت به بیماری نقش دارند، انجام یک مطالعه که پوشش ترانسکریپتومی را در ژنوم میتوکندری بررسی کند، ضروری می‌باشد. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی دلایل بیان متفاوت در ژنوم میتوکندری، بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی از نظر ساختار ژنتیکی و کاوریج می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه

در این مطالعه از داده‌های با دسترسی آزاد RNA-Seq مربوط به ادغام ۴۰ نمونه از مرکز گاو شیری دانشگاه ویسکانسین آمریکا (*Bos taurus*) و ۴۵ گاو ماده کلیستانی (*Bos indicus*) در مزرعه گوجایتپیر شهر باهوالپور واقع در ایالت پنجاب پاکستان استفاده شد. این داده‌ها در مطالعه Huang *et al.* (2012) تولید شدند.

کتابخانه‌های RNA آماده شده برای هر نژاد روی یک خط دستگاه Illumina Genome Analyzer IIx با پلتفرم Hiseq2000 توالی‌یابی شدند. نتیجه توالی‌یابی تولید ۲۱,۰۷۸,۴۷۷ و ۲۰,۹۴۰,۰۶۳ خوانش کوتاه جفتی (از هر دو انتها توالی‌یابی شده) به طول ۷۵ جفت باز به ترتیب برای نژادهای هلشتاین و کلیستانی بود. داده‌های خام برای هر نژاد در تاریخ ۲۲ ژوئیه ۲۰۱۳ در بخش آرشیو خوانش‌های کوتاه (Short (sequence) Read (Arshive (SRA) بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) منتشر شده و با فرمت sra به صورت رایگان و عمومی از لینک‌های زیر قابل دریافت است؛ نژاد کلیستانی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRS454433>

و نژاد هلشتاین <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRS454432> اطلاعات تجزیه و بررسی‌های پروفایل بیان افتراقی ژن‌ها و فراخوانی ترانسکریپتوم نمونه جمعیت گاو

شده‌اند. COX1 و COX3 به شدت هیدروفوب، غشاء پروتئینی یکپارچه بدون هیچ حوزه، خارج از غشاء هستند. COX2 از یک طرف توسط غشای بیرونی بوده که شامل دو مارپیچ Transmembrane است به COX1 متصل می‌شود و از طرف دیگر COX1 به COX3 متصل می‌شود (Soto *et al.*, 2012). زیر واحدهای COX1 و COX2 شامل مراکز فعال فلزی احیاکننده آنزیم هستند. دامنه بیرونی COX2 به فضای intermembrane میتوکندری (ims) بسط می‌یابد تا به cytochrome متصل شود. یک مرکز مسی که cuA نامیده می‌شود، الکترون‌ها را از سیتوکروم c قابل حل می‌پذیرد. مرکز cuA در ناحیه لوپ در پایین دامنه فعالیت COX2 در خط اتصال COX1 و COX2 قرار دارد. از cuA، الکترون‌ها به heme در COX1 منتقل می‌شوند که الکترون‌های منتقل شده به heme منتقل می‌شوند که الکترون‌های منتقل شده به a3-cub در مرکز دو هسته‌ای، جایی که O₂ به آب کاهش می‌یابد (Soto *et al.*, 2012).

پروتئین NADH دهیدروژناز به انتقال الکترون و دهیدروژن کمک می‌کند تا ATP را از طریق پیشروی فسفریلاسیون تولید کند. بنابراین سهم عظیمی در انتقال پروتون در سراسر غشای میتوکندری داخلی دارد که در تنظیم pH سلول‌ها دخیل است (Schauer *et al.*, 2015).

در بررسی ساختار ژن‌های میتوکندری نتایج ۸۰ مکان چندشکل در ژن MT-ND1 و ۶۷ مکان در ژن MT-ND2 را نشان داد و هنگامی که جهش‌های غیر مترادف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند، تفاوت معنی‌داری در ترکیب پایه بین MT-ND1 و MT-ND2 مشاهده نشد. در جایگاه ژنی MT-ND1، ۱۲ جهش خطا کشف شد که در آن شش SNP فقط در یک‌های تیبستان وجود داشت و دو SNP فقط در گاوهای Xuanhan (شوانان) وجود داشتند (Shi *et al.*, 2018).

نژاد کلیستانی (*Bos indicus*) شباهت بسیار زیادی با نژاد سیستانی دارد و به تحمل حرارت و مقاومت در برابر کنه و بیماری مشهور است (Fries & Ruvinsky, 1999). در مقابل گاو هلشتاین جزو نژادهای غالب در صنعت گاو شیری است. علت انتخاب

نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۱ ارائه شده است. بیان کمی ژن‌های میتوکندری استفاده شده در مطالعه حاضر در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۲ ارائه شده است.

محاسبه سطح پوشش ژنومی یا کاوریججهت بررسی سطح کاوریج ژن‌های میتوکندری و تعیین اختلافات ژنتیکی در پنج ژن میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی از برنامه IGB نسخه 9.1.0 استفاده شد (Freese *et al.*, 2016)، که مراحل انجام کار و تجزیه‌ها بشرح زیر می‌باشد؛ بارگذاری فایل داده‌های کمی بیان افتراقی ژن‌ها در قالب فرمت gtf به همراه ژنوم مرجع و سپس تجزیه سطح پوشش ژنومی یا کاوریج می‌باشد. همچنین در قالب برنامه مذکور اختلافات ژنتیکی شامل نواحی چندشکل، نواحی حذف و اضافه و نواحی اتصال به تفکیک برای هر ژن میتوکندری استخراج گردید.

هلشتاین آمریکا و گاو کلیستانی پاکستان در تحقیق Banabazi *et al.* (2016, 2019) Salimpour *et al.* (2013) گزارش شده است. با توجه به این که تجزیه بیان افتراقی بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در تعدادی از ژن‌های میتوکندری تفاوت بیان معنی‌داری را در ژنوم میتوکندری نشان دادند، لذا اطلاعات ژن‌های مذکور هدف مطالعه حاضر قرار گرفت تا دلایل بیان متفاوت آنها توضیح داده شود.

استخراج ژن‌های میتوکندری با استفاده از پایگاه‌های داده ژنومی NCBI به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> و Ensembl به آدرس <https://asia.ensembl.org/index.html> توالی پنج ژن میتوکندری برای گاو هلشتاین (*Bos taurus*) و گاو کلیستانی (*Bos indicus*) استخراج و به فرمت FASTA ذخیره گردید. اطلاعات مربوط به شماره دسترسی، نام ژن، موقعیت در ژنوم میتوکندری در دو

جدول ۱. مشخصات مربوط به پنج ژن میتوکندری در گاو هلشتاین (*Bos taurus*) و کلیستانی (*Bos indicus*)

Table 1. Specifications of five mtDNA genes in Holstein (*Bos taurus*) and Choleistani (*Bos indicus*) cattle

Number	Gene_id	Gene name	Locus	Gene type	p_value	q_value
Holestein						
1	ENSBTAG00000043561	COX1	MT:5686-7299	protein coding	0.0001	0.0001
2	ENSBTAG00000043556	COX2	MT:7373-8057	protein coding	0.001	0.0001
3	ENSBTAG00000043560	COX3	MT:8128-9750	protein coding	0.01	0.00148
4	ENSBTAG00000043558	ND1	MT:3100-4056	protein coding	0.05	0.01
5	ENSBTAG00000043571	ND2	MT:4265-5307	protein coding	0.001	0.0013
Cholistani						
1	ENSBTAG00000043561	COX1	MT:5686-7299	protein coding	0.0001	0.00011
2	ENSBTAG00000043556	COX2	MT:7373-8057	protein coding	0.01	0.002
3	ENSBTAG00000043560	COX3	MT:8128-9750	protein coding	0.001	0.0012
4	ENSBTAG00000043558	ND1	MT:3100-4056	protein coding	0.01	0.001
5	ENSBTAG00000043571	ND2	MT:4265-5307	protein coding	0.001	0.0001

جدول ۲. بیان کمی ژن‌های میتوکندری در گاو هلشتاین (*Bos taurus*) و کلیستانی (*Bos indicus*)

Table 2. Quantitative expression of mitochondrial genes in Holstein (*Bos taurus*) and Choleistani (*Bos indicus*) cattle

Gene_id	Gene name	locus	length	Coverage	FPKM	FPKM conf-lo	FPKM conf-hi
Holestein							
ENSBTAG00000043561	COX1	MT:5686-7231	1545	15241.2	7808.35	7484.06	8132.63
ENSBTAG00000043556	COX2	MT:7373-8057	684	7189.95	3587.74	3546.38	3629.1
ENSBTAG00000043560	COX3	MT:8969-9750	781	11963.5	6136.29	5878.35	6394.22
ENSBTAG00000043558	ND1	MT:3100-4056	956	5000.34	2543.46	2514.69	2572.23
ENSBTAG00000043571	ND2	MT:4265-5307	1042	2559.14	1291.45	1271.77	1311.14
Cholistani							
ENSBTAG00000043561	COX1	MT:5686-7231	1545	18280.4	8605.82	8248.86	8962.77
ENSBTAG00000043556	COII	MT:7373-8057	684	8479.63	3647.51	3605.93	3689.1
ENSBTAG00000043560	COX3	MT:8969-9750	781	19580.4	9056.71	8678.48	9434.93
ENSBTAG00000043558	ND1	MT:3100-4056	956	3354.47	1774.65	1751.2	1798.1
ENSBTAG00000043571	ND2	MT:4265-5307	1042	3047.01	1382.39	1362.7	1402.09

یک ژن یا چندین ژن مجاور را نیز حذف کنند. حذف موجب می‌شود تا عملکرد پروتئین یا پروتئین‌های حاصله نیز تغییر یابند (Groeneveld *et al.*, 2010). نتایج تغییرات حذف در ساختار ژنتیکی ژنوم میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی به واسطه حذف نقطه‌ای در جدول ۳ ارائه شده است. بیشترین تعداد نواحی حذف در گاوهای هلشتاین و کلیستانی مربوط به ژن COX1 به ترتیب با ۲۶۷ و ۲۱۸ نقطه و کمترین نواحی حذف مربوط به ND2 به ترتیب با ۵۳ و ۳۷ ناحیه حذف بودند. در بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در هر جایگاه ژنی تعداد نواحی حذف در نژاد هلشتاین بیشتر از نژاد کلیستانی بود.

نتایج بررسی تغییرات ژنتیکی به واسطه اضافه شدن، نشان داد که جایگاه ژن COX1 در هر دو نژاد هلشتاین و کلیستانی بیشترین نقاط اتصال (جانک)، به ترتیب با ۱۰ و ۱۱ ناحیه را نشان دادند. بدین ترتیب که در نژاد هلشتاین، در ۱۰ ناحیه مشتمل بر ۱۰۲ جفت باز و در کلیستانی در ۱۱ ناحیه مشتمل بر ۱۱۶ جفت باز به طول ژن اضافه شده است. جایگاه‌های ژنی COX2 و ND2 هیچ ناحیه اضافه شدن را نشان ندادند و در جایگاه ژنی COX3 و ND1 با ۶ و ۲ ناحیه در هلشتاین به ترتیب موجب اضافه شدن ۴۸ و ۲۲ جفت باز به طول ژن‌های مذکور و در جایگاه ژنی COX3 در نژاد کلیستانی با ۳ ناحیه منجر به اضافه شدن ۳۳ جفت باز گردیده است.

نتایج سطح پوشش ترانسکریپتومی در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۴ و شکل ۱ ارائه شده است.

جهت محاسبه نواحی چندشکل و همچنین محاسبه درصد جایگزینی نوکلئوتیدها از برنامه MEGA نسخه ۱۰/۱/۶ استفاده شد (Tamura *et al.*, 2013). بدین منظور نواحی ORF (Open reading frame) پنج ژن میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی از برنامه IGB استخراج و ویرایش گردید و در قالب فرمت FASTA در تجزیه با MEGA6 (Librado & Rozas, 2002) مورد استفاده قرار گرفت، به منظور تعیین نواحی چندشکل توالی دو گونه با ژنوم مرجع هم‌ردیف شدند. همچنین نواحی ORF به توالی اسیدآمینینه نیز ترجمه شده و سپس برای محاسبه شاخص‌هایی مانند درصد جایگزینی تقاطعی و انتقالی و نسبت آنها مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج و بحث

دانش تنوع، تمایز و ساختار ژنتیکی جمعیت اطلاعات حیاتی برای حفاظت و مدیریت منابع ژنتیکی حیوانی را فراهم می‌نماید (Hoffmann, 2010)، بنابراین حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت گاو جهان برای تامین منابع ژنتیکی برای مواجهه با چالش‌های اقتصادی-اجتماعی در آینده از جمله امنیت غذایی، افزایش رقابت برای پرورش و تنوع بیشتر در شرایط آب و هوایی متفاوت حائز اهمیت می‌باشد (Herrero-Medrano *et al.*, 2013).

تغییرات حذف در تعدادی از بازهای DNA موجب می‌شود تا طول DNA تغییر کند. جهش‌های حذفی کوچک یک یا چند جفت باز را از ژن حذف می‌کنند، در حالی که جهش‌های حذفی بزرگتر می‌توانند کل

جدول ۳. نواحی حذف در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در ژنوم میتوکندری
Table 3. Deletion regions in Holstein and Cholistani breeds in the mitochondrial genome

Number	Gene name	Holstein		Cholistani	
		Number of region	Number of deletion	Number of region	Number of deletion
1	COX1	267	294	192	218
2	COX2	84	97	52	57
3	COX3	116	126	114	122
4	ND1	74	83	23	26
5	ND2	53	62	35	37

جدول ۴. نتایج پوشش ژنومی یا کاوریج در بین ژن‌های میتوکندری در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Table 4. Results of coverage transcriptome among mitochondrial genes in Holstein and Cholistani breeds

Number	Gene name	Start	End	Length	Strand
1	COX1	5686	7228	1542	+
2	COX3	8969	9750	781	+
3	COX2	7373	8054	681	+
4	ND2	42665	5307	1042	+
5	ND1	3100	4056	956	+

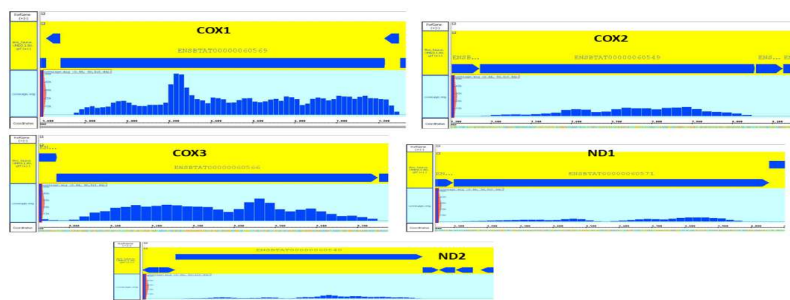
نوکلئوتید T به شماره ۶۲۴۹ قرار دارد و کمترین سطح پوشش ترانسکریپتومی متعلق به ND2 بود. در مطالعه‌ای به منظور ارزیابی پوشش و عمق ترانسکریپتومی توسط RNA-Seq در مرغ، RNA-Seq دو بار با استفاده از دو نمونه cDNA مرغ انجام شد. اولین اجرای RNA-seq تعداد کمتری خوانش و تنوع بیشتری از نظر تعداد کل خوانش‌های بین دو نمونه داشت، در حالی که در مرحله دوم تعداد زیادی خوانش و تنوع بسیار کمی بین دو نمونه وجود داشت (Wang & Chang, 2011).

تغییر در بازها در هر جفت باز را چندشکلی یا نواحی پلی مورف می‌نامند. تغییر در بازهای نوکلئوتیدی ممکن است هم‌شکل باشند یعنی یک باز از گروه پیریمیدین به باز دیگر از همین گروه تبدیل شده و همچنین باز از گروه پورین به باز دیگری از همین گروه تبدیل بشود، به این نوع تغییرات جهش‌های انتقالی یا جایگزینی انتقالی گفته می‌شود. تبدیل باز از یک گروه با بازی از گروه دیگر جهش یا جایگزینی تقاطعی گفته می‌شود و نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی به عنوان شاخصی در تکامل استفاده می‌شود.

جایگزینی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جایگاه ژن COX1

برای جایگاه ژن COX1 در مقایسه توالی‌های دو نژاد هلشتاین و کلیستانی با ژنوم مرجع به طول ۱۵۴۲ جفت باز مشتمل بر ۱۹ جهش یا ناحیه چندشکل بودند. همچنین ترجمه توالی‌های مذکور به آمینواسید تنها بیانگر دو جهش نقطه‌ای و تغییر آمینواسید در زنجیره پروتئینی بود (شکل های ۲ و ۳).

مهمترین ویژگی توالی‌یابی نسل جدید این است که هر باز از DNA چندین بار توالی‌یابی می‌شود. تعداد دفعاتی که یک موقعیت در آزمایش توالی‌یابی نسل جدید توالی‌یابی می‌شود (به عبارت دیگر تعداد خوانش‌هایی که شامل این موقعیت هستند) کاوریج (عمق توالی‌یابی) نامیده می‌شود. وجود چندین خوانش در یک موقعیت یکسان برای حذف خطاهای توالی‌یابی و مهمتر از آن برای تشخیص هتروزیگوسیتی لازم است (Freese *et al.*, 2016). بیشترین پوشش کاوریج در جایگاه ژن COX1 در نواحی نوکلئوتیدی A به شماره ۶۲۲۵ الی نوکلئوتید T به شماره ۶۲۴۹ قرار داشت. نتایج پوشش کاوریج در جایگاه ژن COX3 در بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی بیانگر بیشترین سطح پوشش کاوریج در نواحی نوکلئوتیدی A بشماره توالی ۹۴۵۰ الی نوکلئوتید T به شماره ۹۴۷۴ بود. بیشترین سطح پوشش کاوریج در جایگاه ژنی COX2 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در نواحی نوکلئوتیدی T بشماره توالی ۷۸۷۵ الی نوکلئوتید C به شماره ۷۸۹۹ قرار داشت. همچنین در جایگاه ژنی ND2 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی، بیشترین سطح پوشش کاوریج در نواحی نوکلئوتیدی T بشماره توالی ۴۹۰۰ الی نوکلئوتید A به شماره ۴۹۲۴ واقع بود و در نهایت، نتایج پوشش ترانسکریپتومی در جایگاه ژنی ND1 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی بیانگر بیشترین سطح پوشش کاوریج در نواحی نوکلئوتیدی T بشماره توالی ۳۸۰۰ تا نوکلئوتید C به شماره ۳۸۴۹ می‌باشد (شکل ۱). نتایج پوشش ترانسکریپتومی بیانگر این است که ژن COX1 دارای بالاترین سطح پوشش ترانسکریپتومی بوده که بیشترین پوشش کاوریج آن در نواحی نوکلئوتیدی A به شماره ۶۲۲۵ الی



شکل ۱. نتایج پوشش کاوریج در پنج جایگاه ژنی mtDNA در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

Figure 1. Results of coverage transcriptome at the five gene locus of mtDNA in Holstein and Cholistani breeds

#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	ATGTTTCATTA ACCGCTGACT ATTCTCAACC AGCCATAAAG ATATTGGTAC CCTTATCTA CTATTTGATG CTTGGGCCGGA.....C.....G.....
#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	TATAGTAGGA ACAGCTCTAA GCCTTCTAAT TCGCGCTGAA TTAGGCCAAC CCGGAACCTCT GCTCGGAGAC GACCAAACTCTT.....
#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	ACAACGCACT TGTAACCGCA CACGCATTTG TAATACTCTT CTTCATAGTA ATACCAATCA TAATTGGAGG ATTCGGTAACT.....T.....G.....
#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	TGACTTGTTC CCCTAATAAT TGTGCTCCC GATATAGCAT TTCCCCGAAT AAATAATATA AGCTTCTGAC TCCTCCCTCCT.....
#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	GCAACCTAGC CCATGCAAGG GCTTCAGTAG ATCTAACCAT TTCTCTTTA CACTTAGCAG GAGTTTCTCT AATTITTAGGAT.....
#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	GCCATCACT TCATTACAAC AATTATCAAC ATAAAGCCCC CCGCAATGTC ACAATACCAA ACCCTCTCTG TCGTATGATCA.....
#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	ACCTAAATAC AACCTTCTC GACCCGGCAG GAGGAGGAGA CCCTATTCTA TATCAACACT TATTCTGATT CTTTGGACACT.....T.....C.....
#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	CCCGAAGTCT ATATTTTAAT CTTACTGGG TTTGGAATAA TCTCTCATAT CGTGACCTAC TACTCAGGAA AAAAAGAACCA.....A.....
#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	ATTTACAGTA GGGGGTTTAA TGGAATTGT CTTAGCCAAC TCTTCCCTCG ATATTGTCT TCACGACACA TACTACTGTTG G.....T.....
#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	TCGCACATTI CCACTATGTT TTATCAATAG GAGCTGTATT TGCTATTATA GGGGGATTGG TTCATTGATT CCCACTATTCTT.....
#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	TCAGGTTATA CTCTCAACGA TACATGAGCC AAAATCCAAT TCGCAATTAT ATTTGTAGGC GTCAATATAA CCTTCTCTCCT.....

شکل ۲. نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی COX1 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 2. Polymorphic regions based on nucleotide sequences at the COX1 gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds.

#B_taurus_Jun_2014_:_chrM #NC_006853.1:5687-7231_Bos_taurus_mitochondrion_complete_genome #NC_005971.1:5690-7234_Bos_indicus_mitochondrion_complete_genome	MFINR ⁴ LFST SHKDIGTLVL LFDAWAGIVG TALSLLIRAE LGQPGLLGD DQIYNVAVTA HAFVIIFFIV IPTIIIGGFGNN.....G.....V.....
--	--

شکل ۳. نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های آمینواسیدی در جایگاه ژنی COX1 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 3. Polymorphic regions based on amino acid sequences at the COX1 gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds.

جدول ۵ می‌باشد. اعداد در قطر بیانگر درصد جایگزینی انتقالی و اعداد خارج قطر جایگزینی تقاطعی را نشان می‌دهند. مجموع فراوانی‌ها برابر با یک است. فراوانی نوکلئوتیدها در جایگاه COX1 برای بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین به ترتیب برابر با ۲۸/۶۶، ۲۹/۷۴، ۲۵/۲۷ و ۱۶/۳۲ بودند.

تغییرات یا جایگزینی آمینواسیدی شامل تبدیل سرین به اسپارژین، اسپارتیک اسید به گلیسین و آلانین به والین بودند. همچنین در مقایسه ژنوم دو نژاد تمام تغییرات مربوط به نژاد کلیستانی بودند. الگوی تعویض و نرخ جایگزینی بر اساس مدل Tamura & Nei (1993)، در جایگاه ژنی COX1 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی مطابق با

جدول ۵. درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن COX1 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Table 5. Percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of COX1 gene locus in Holstein and Cholistani

Nucleotide	A	T/U	C	G
A	-	0.76	0.65	15.66
T/U	0.73	-	23.76	0.42
C	0.73	27.96	-	0.42
G	27.50	0.76	0.65	-

* نسبت جایگزینی از یک ردیف به ستون می‌باشد. اعداد خارج قطر (ایتالیک) جهش تقاطعی و اعداد روی قطر (پر رنگ) جانشینی انتقالی را نشان می‌دهند.
*The replacement ratio is one row to one column. Numbers outside the diameter (*italic*) indicate the transversional substitution and numbers on the diameter (**Bold**) indicate the transition substitution.

۱۶/۷۰ و گوانین به آدنین ۳۸/۷۵ درصد بودند و مجموع جانشینی بازهای پیریمیدینی ۴۴/۴۹ درصد بود. همچنین میزان جایگزینی بازهای پورینی به پیریمیدینی ۰/۰۲ و پیریمیدینی به پورینی ۰/۰۱ درصد پیش‌بینی گردید. فراوانی جهش‌های تقاطعی در مقایسه با جهش‌های انتقالی بسیار کم بود و این نسبت برابر با ۱۶۶۵/۶۷ محاسبه شد.

جایگزینی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جایگاه ژن COX3

در جایگاه ژن COX3 در مقایسه توالی نوکلئوتیدی به طول ۷۸۱ جفت باز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی شامل ۹ ناحیه چندشکل بود و براساس توالی آمینواسیدی تنها دو ناحیه چندشکل را نشان داد (شکل‌های ۵ و ۶).

تغییرات آمینواسیدی شامل تبدیل میتونین و والین به ایزولوسین بودند. الگوی جایگزینی بازها در طول ژن COX3 با طول ۷۸۱ جفت باز در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۷ ارائه شده است. فراوانی بازها شامل آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین به ترتیب برابر با ۲۶/۵۵، ۲۹/۴۵، ۲۹/۰۷ و ۱۴/۹۴ درصد بودند.

نتایج حاصل از درصد جابجایی توالی نوکلئوتیدی ژن COX3 نشان داد که مقدار بالای جانشینی مربوط به بازهای پورینی به میزان ۶۵/۸۱ درصد بود. بدین ترتیب که تبدیل آدنین به گوانین ۲۳/۷۰ درصد و تبدیل گوانین به آدنین ۴۲/۱۱ درصد را شامل می‌شد و مجموع جانشینی بازهای پیریمیدینی ۳۴/۱۴ درصد برآورد شدند. تبدیل تیمین به سیتوزین ۱۶/۹۶ درصد و سیتوزین به تیمین ۱۷/۱۸ درصد بود. همچنین میزان جایگزینی بازهای پورینی به پیریمیدینی ۰/۰۲ و پیریمیدینی به پورینی ۰/۰۱ درصد محاسبه شد. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی ۱۶۶۵/۸۳ محاسبه شد.

نتایج حاصل از درصد جابجایی توالی نوکلئوتیدی ژن COX1 نشان داد که مقدار بالای جانشینی مربوط به بازهای پیریمیدینی به میزان ۵۱/۷۲ درصد بود. بدین صورت که در بازهای پیریمیدینی تبدیل سیتوزین به تیمین ۲۷/۹۶ درصد و تیمین به سیتوزین ۲۳/۷۶ درصد بودند و مجموع جانشینی بازهای پورینی برابر با ۴۳/۱۶ درصد محاسبه شد. بدین ترتیب که میزان تبدیل آدنین به گوانین ۱۵/۶۶ و گوانین به آدنین ۲۷/۵۰ درصد بودند. همچنین میزان جایگزینی بازهای پورینی به پیریمیدینی ۱/۴۱ و پیریمیدینی به پورینی ۱/۱۵ درصد بودند. بنابراین بیشترین تغییرات از نوع جهش‌های انتقالی هستند. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی برابر با ۱۸/۳۸ محاسبه گردید.

جایگزینی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جایگاه ژن COX2

در جایگاه ژن COX2 با طول ۶۸۱ نوکلئوتید، ۶ ناحیه چندشکل یا جهش شناسایی شد. تغییرات بر اساس توالی آمینواسیدی در جایگاه ژنی COX2 تنها مشتمل بر یک چندشکلی بود میتونین به ایزولوسین تغییر یافته است (شکل‌های ۴ و ۵).

درصد جایگزینی در توالی نوکلئوتیدی بر اساس مدل تامورا-نی در جایگاه ژن COX2 مطابق با جدول ۶ است. در جایگاه مذکور فراوانی نوکلئوتیدهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین با طول ۶۸۱ جفت باز به ترتیب برابر با ۳۴/۰۷، ۲۷/۲۶، ۲۳/۹۸ و ۱۴/۶۸ درصد برآورد شدند که بازهای آدنین و تیمین بیشترین فراوانی و باز گوانین کمترین فراوانی را دارا هستند.

نتایج حاصل از درصد جابجایی توالی نوکلئوتیدی ژن COX2 نشان داد که مقدار بالای جانشینی مربوط به بازهای پورینی به میزان ۵۵/۴۵ درصد بودند. بدین صورت که در بازهای پورینی تبدیل آدنین به گوانین

```
GCTAATAATT GTCTTCTTAA TTAGCTCATT AGTACTTTAC ATTATTTTAC TAATACTAAC GACAAAGCTG ACCCATACAA
.....
..... A.....
GACTATTAGA AGTCGATAAT CGAGTTGTAC TACCAATAGA AATAACAATC CGAATGTTAG TCTCCTCTGA AGACGTATTA
.....
..... C.....
CACTCATGAG CTGTGCCCTC TCTAGGACTA AAAACAGACG CAATCCCAGG CCGTCTAAAC CAAACAACCC TTATATCGTC
.....
..... T.....
CCGTCAGGCG TTATATTACG GTCAATGCTC AGAAATTTGC GGGTCAAACC ACAGTTTCAT GCCCATTGTC CTTGAGTTAG
.....
..... A.....
TCCCCTAAA GTACTTTGAA AAATGATCTG CGTCAATATT A
.....
..... A.....
```

شکل ۴. نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی COX2 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 4. Polymorphic regions based on nucleotide sequences at the COX2 gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds.

```
HS*AVPSLGL KTD AIPGRLN QTTLISSRPG LYYGQCSEIC GSNHSMPIV LELVPLKYFE K*SASIL
.....
..... I.....
```

شکل ۵. نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های آمینواسیدی در جایگاه ژنی COX2 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 5. Polymorphic regions based on amino acid sequences at the COX2 gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds.

جدول ۶. درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن COX2 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Table 6. Percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of COX2 gene locus in Holstein and Cholistani

*Nucleotide	A	T/U	C	G
A	-	0.01	0.01	16.70
T/U	0.01	-	20.82	0.00
C	0.01	23.67	-	0.00
G	38.75	0.01	0.01	-

*نسبت جایگزینی از یک ردیف به ستون می‌باشد. اعداد خارج قطر (ایتالیک) جهش تقاطعی و اعداد روی قطر (پر رنگ) جانشینی انتقالی را نشان می‌دهند.
*The replacement ratio is one row to one column. Numbers outside the diameter (*italic*) indicate the transversional substitution and numbers on the diameter (**Bold**) indicate the transition substitution.

```
ATGACACACC AAACATCATGC TTATCATATA GTAACCCCAA GCCCTTGACC TCTTACAGGA GCTTTGTCTG CCCTCTTAAT
.....
..... C.....
AACATCCGGC CTAACCATGT GATTTCACTT TAACCTCAATG ACCCTGCTAA TAATTGGCCT AACACAAAT AACTAACAAC
.....
..... A.....
TATGGAATAA TTCTTTTAT TATCTCCGAA GTACTATTCT TTACCGGATT TTTCTGAGCT TTCTACCACT CAAGCCTCGC
.....
..... G.....
CCCCACCCCT GAAGTAGGCG GCTGCTGACC CCCAACAGGC ATTCACCCAC TAAACCCCT AGAAGTCCCA CTGCTCAACA
.....
..... G.....
CAAGCCCTAT TTATCACCAT CACATTAGGA GTCTACTTCA CACTACTACA AGCCTCAGAA TACTATGAAG CACCTTTTAC
.....
..... A.....
TATCTCCGAC GGAGTTTACG GCTCAACTTT TTTTGTAGCC ACAGGCTTCC ACGGCCTCCA CGTCATCATT GGGTCCACCT
.....
..... T.....
..... A.....
```

شکل ۶. نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی COX3 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 6. Polymorphic regions based on nucleotide sequences at the COX3 gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds.

MTHQTHAYHI VNPSP*PLTG ALSALLITSG LTM*HFHNSM TLLIIGLTTN ILTIYQ**RD VIRESTFQGH HTPAVQKGLR

 I.....
 QALFITITLG VYFTLLQASE YYEAPFTISD GVGSTFFVA TGFHGLHVII GSTFLIVCF RQLKFHFTSN HHFGFEAAA*

 I.....

شکل ۷. نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های آمینواسیدی در جایگاه ژنی COX3 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
 Figure 7. Polymorphic regions based on amino acid sequences at the COX3 gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds.

جدول ۷. درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن COX3 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
 Table 7. Percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of COX3 gene locus in Holstein and Cholistani

*Nucleotide	A	T/U	C	G
A	-	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	23.70
T/U	<i>0.01</i>	-	16.96	<i>0.00</i>
C	<i>0.01</i>	17.18	-	<i>0.00</i>
G	42.11	<i>0.01</i>	<i>0.01</i>	-

* نسبت جایگزینی از یک ردیف به ستون می‌باشد. اعداد خارج قطر (ایتالیک) جهش تقاطعی و اعداد روی قطر (پر رنگ) جانشینی انتقالی را نشان می‌دهند.
 *The replacement ratio is one row to one column. Numbers outside the diameter (*italic*) indicate the transversional substitution and numbers on the diameter (**Bold**) indicate the transition substitution.

۴۰/۰۳ درصد بود. تبدیل تیمین به سیتوزین ۲۰/۲۰ درصد و سیتوزین به تیمین ۱۹/۸۳ درصد بود. میزان جایگزینی تقاطعی بازهای پورینی به پیریمیدینی ۱/۲۳ درصد و پیریمیدینی به پورینی ۰/۹۸ درصد محاسبه شد. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی برابر با ۲۱/۶۷ بود.

جایگزینی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جایگاه ژن ND2

مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی به طول ۱۰۴۲ جایگاه ژن ND2 محتوای ۱۲ ناحیه چندشکل و بر اساس توالی آمینواسیدی سه ناحیه چندشکل را نشان داد (شکل‌های ۱۰ و ۱۱).

جایگزینی آمینواسیدی شامل تبدیل ایزولوسین به میتونین، والین به لوسین و سرین به اسپارژین بودند. الگوی جایگزینی بازها در نواحی چندشکل در جایگاه ژنی ND2 با طول ۱۰۴۲ جفت باز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۹ ارائه شده است. نسبت بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در جایگاه مذکور به ترتیب برابر با ۲۶/۴۰، ۲۸/۳۴، ۲۶/۳۶ و ۸/۸۹ درصد بودند.

نتایج حاصل از درصد جایگزینی توالی نوکلئوتیدی ژن ND2 بیانگر مقدار بالای جانشینی مربوط به

جایگزینی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جایگاه ژن ND1

در جایگاه ژن ND1 در مقایسه توالی نوکلئوتیدی به طول ۹۵۶ جفت باز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی شامل ۲۰ ناحیه چندشکل بود و بر اساس توالی آمینواسیدی سه ناحیه چندشکل را نشان داد (شکل‌های ۸ و ۹). تغییرات آمینواسیدی شامل تبدیل میتونین به ایزولوسین، والین به لوسین و ترئونین به ایزولوسین بودند.

الگوی جایگزینی بازها در نواحی چندشکل در جایگاه ژنی ND1 با طول ۹۵۶ جفت باز در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۸ ارائه شده است. درصد بازهای آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در جایگاه مذکور به ترتیب برابر با ۳۱/۸۰، ۲۷/۴۸، ۲۸/۰۰ و ۱۲/۷۳ درصد بودند.

نتایج درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی توالی نوکلئوتیدی ژن ND1 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی (جدول ۸) بیانگر مقدار بالای جانشینی انتقالی مربوط به بازهای پورینی به میزان ۵۵/۵۶ درصد بودند. بدین صورت که در بازهای پورینی تبدیل آدنین به گوانین ۱۵/۸۸ درصد و تبدیل گوانین به آدنین ۳۹/۶۸ درصد شامل می‌شد و مجموع جایگزینی بازهای پیریمیدینی

سیتوزین ۷/۶۵ درصد و سیتوزین به تیمین ۸/۲۳ بودند. همچنین میزان جایگزینی تقاطعی بازهای پورینی به پیریمیدینی ۳/۱۸ درصد و پیریمیدینی به پورینی ۲/۶۳ درصد بود. نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی برابر با ۷/۶۰ بود.

بازهای پورینی به میزان ۷۲/۵ درصد بود. بدین صورت که در بازهای پورینی تبدیل آدنین به گوانین ۱۴/۲۳ درصد و گوانین به آدنین ۵۸/۲۷ را شامل می‌شد و مجموع جانشینی بازهای پیریمیدینی ۱۵/۸۸ درصد بود. در بازهای پیریمیدینی میزان تبدیل تیمین به

ATGTTTCATAA	TTAACATCTT	AATACTAATT	ATTCCCATCC	TATTGGCCGT	AGCATTCCCTT	ACGTTAGTGG	AACGAAAAGT
.....T.....A.....
TCTAGGCTAT	ATACAACCTC	GAAAAGGTCC	AAATGTCGTA	GGTCCATATG	GCCTACTTCA	ACCCATCGCC	GATGCAATCA
.....G.....
AACTTTTTCAT	TAAAGAACCA	CTACGACCCG	CTACATCTTC	AGCCTCAATA	TTTATCCTAG	CACCTATCAT	AGCTTTAGGC
.....C.....C.....
CTAGCCTTAA	CCATGTGAAT	TCCCTACCA	ATACCCTATC	CTCTTATCAA	CATAAACCTA	GGAGTCTTAT	TTATACTAGC
.....A.....C.....
CATATCAAGC	CTAGCCGTAT	ACTCCATTCT	CTGATCAGGC	TGAGCTTCCA	ACTCAAAATA	CGCACTAATC	GGAGCCCTAC
.....G.....
GAGCAGTAGC	ACAAACAATC	TCATACGAAG	TAACGCTAGC	AATTATCCTG	TTATCAGTGG	TCCTAATAAG	TGGGTCCTTT
.....A.....A.....AC.....
ACCCTCTCCA	CATTAATTAC	TACACAAGAA	CAAATATGGT	TAATCTCCC	AGCATGGCCT	CTAGCAATAA	TATGATTTAT
.....T.....
AATATGCAGC	AGGACCATTT	GCCCTCTTCT	TCATAGCAGA	GTACGCAAAT	ATTATCATAA	TAAATATCTT	TACAGCAATT
.....C.....
TTATTCCTAG	GAACATCCCA	CAATCCACAC	ATACCAGAAC	TCTACACAAT	CAATTTTACC	ATTAATCCCC	TACTGCTCAC
.....G.....C.....
AATATCCTTC	CTATGAATCC	GAGCATCCTA	CCCTCGATTT	CGCTATGACC	AACTAATACA	CTTACTATGA	AAAAATTTTC
.....T.....C.....
TACCTCTGAC	ACTAGCCCTG	TGCATGTGAC	ACGTATCCCT	ACCCATCCTT	ACATCAGGCA	TCCCACCACA	AACATA
.....C.....A.....

شکل ۸. نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی ND1 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 8. Polymorphic regions based on nucleotide sequences at the ND1 gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds.

LALTM*IPLP	IPYPLININL	GVLFILAISS	LAVYSIL*5G	*ASNSKYALI	GALRAVAQTI	SYEVLAIIL	LSVVLISGSF
.....L.....
.....I.....
TLSTLITTQE	QIWLILPAWP	LAII*FISTL	AETNRAPFDL	TEGESELVSG	FNVEYAAGPF	ALFFIAEYAN	IIIIINFITAI
.....
.....I.....

شکل ۹. نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های آمینواسیدی در جایگاه ژنی ND1 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 9. Polymorphic regions based on amino acid sequences at the ND1 gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds.

جدول ۸. درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن ND1 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Table 9. Percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of ND1 gene locus in Holstein and Cholistani

*Nucleotide	A	T/U	C	G
A	-	0.61	0.62	15.88
T/U	0.70	-	20.20	0.28
C	0.70	19.83	-	0.28
G	39.68	0.61	0.62	-

* نسبت جایگزینی از یک ردیف به ستون می‌باشد. اعداد خارج قطر (ایتالیک) جهش تقاطعی و اعداد روی قطر (پر رنگ) جانشینی انتقالی را نشان می‌دهند.
*The replacement ratio is one row to one column. Numbers outside the diameter (italic) indicate the transversional substitution and numbers on the diameter (Bold) indicate the transition substitution.

```

ATAAACCCAA TTATCTTTAT TATTATTCTA CTAACCATTA TACTAGGAAC TATTATTGTC ATAATCAGTT CTCACTGACT
.....
.....G.....
AAGCATCAAC TAAATATTTT TTGACTCAAT CAACAGCCTC AATACTACTA ATAATAGCCG TCATCATTAA CGTAATATTC
.....
.....C.....
TCAGGCCAAT GAACCGTAAT AAAACTATTT AGCCCAATAG CCTCAATACT TATAACGATA GCCCTAGCTA TAAAACTAGG
.....
.....A.....
AAAAACTAGC ACCTATATCT GTACTTTTACC AAATCTTCCC ATCAATTAAC CTAAACTTAA TTCTAACCCCT ATCAGTTTTTA
.....
.....G.T.....
TCAATCCTAA TTGGAGGCTG AGGGGGACTA AACCAAAAC AACTCCGAAA AATCATAGCC TACTCATCAA TCGCTCATAT
.....
.....A.....
AGGCTGAATA ACAGCAGTAC TACCATATAA CCCCACCATA ACATTGCTAA ACTTAATTAT CTATATCATT ATAACCTCCA
.....
.....A.....
CCATATTTAC CATATTTATA GCCAATTCCA CCACCACTAC CCTGTCATTA TCACACACAT GAAATAAAAC ACCCATTATA
.....
.....T.....
ACCGTCCTAA TTCTTGCCAC TCTCCTATCC ATAGGAGGAC TCCTCCCTCT ATCTGGGTTT ATACCAAAT GAATAATCAT
.....
.....A.....
AAAAAAATAA CTTTCTTACC AACAATAGTC GTATTATCTA CCATAATACT ACCACTCACG CCAATACTAT CAGTGTAGA
.....
.....A.....

```

شکل ۱۰. نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژنی ND2 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 10. Polymorphic regions based on nucleotide sequences at the ND2 gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds.

```

INPIIFIIIL LTIILGTIIV IISSH*LLV* IGFEINILAI IPIIIKNHNP RATEASTKYF LTQSTASILL IIAVIINVIF
.....
.....M.....L..
SGQ*TVIKLF SPIASILITI ALAIKLGIAF FHF*VPEVTQ GIPLSSGLIL LT*QKLAPIS VLYQIFPSIN LNLILTSLV
.....
.....N.....

```

شکل ۱۱. نواحی چندشکل بر اساس توالی‌های آمینواسیدی در جایگاه ژنی ND2 در مقایسه دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Figure 11. Polymorphic regions based on amino acid sequences at the ND2 gene locus in comparison between Holstein and Cholistani breeds.

جدول ۹. درصد جایگزینی انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن ND2 در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی
Table 9. Percentage of transitional and transversional substitution in the nucleotide sequence of ND2 gene locus in Holstein and Cholistani breeds

*Nucleotide	A	T/U	C	G
A	-	<i>1.65</i>	<i>1.53</i>	14.23
T/U	<i>2.11</i>	-	7.65	<i>0.52</i>
C	<i>2.11</i>	8.23	-	<i>0.52</i>
G	58.27	<i>1.65</i>	<i>1.53</i>	-

* نسبت جایگزینی از یک ردیف به ستون می‌باشد. اعداد خارج قطر (ایتالیک) جهش تقاطعی و اعداد روی قطر (پر رنگ) جانشینی انتقالی را نشان می‌دهند.
*The replacement ratio is one row to one column. Numbers outside the diameter (*italic*) indicate the transversional substitution and numbers on the diameter (**Bold**) indicate the transition substitution.

به متمایز کردن جمعیت‌ها از یکدیگر داشته و بالعکس، جریان ژنی جمعیت‌ها را به یکدیگر شبیه‌تر می‌نماید. نتایج بیانگر این بود که ژن COX1 به طول ۱۵۴۲ جفت باز، بیشترین سطح پوشش ترانسکریپتومی در ژنوم میتوکندری را در بین دو نژاد هلشتاین و

نتیجه‌گیری کلی

از دیدگاه متخصصین ژنتیک جمعیت، تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها همزمان با یک تعادل و توازن بین رانش و جریان ژنی شروع شده و هر جمعیت متحمل نرخ جهش و رانش ژنتیکی خود خواهد شد که تمایل

تأثیر قرار داده است. همچنین تفاوت‌های قابل توجهی در نسبت جایگزینی انتقالی و تقاطعی در جایگاه‌های مورد مطالعه مشاهده شد که بیشتر تغییرات مربوط به جانشینی انتقالی بودند و درصد جانشینی تقاطعی خیلی کم بود و این مسئله بیانگر پایداری تغییرات در ژنوم هست. بنابراین از نظر ساختاری دلایل احتمالی تفاوت بیان ژن‌های میتوکندری در دو نژاد هلستاین و کلیستانی می‌تواند حذف و اضافه، میزان چندشکلی و سطح پوشش ترانسکریپتوم باشد.

کلیستانی دارا است و کمترین سطح پوشش ترانسکریپتومی مربوط به ژن ND2 بود. در بین ژن‌های میتوکندری، ژن COX1 با بیشترین تعداد SNP به تعداد ۱۹ ناحیه و زنجیره پروتئینی آن با ۲ ناحیه چندشکلی بیشترین میزان چندشکلی را در بین ژن‌های مورد مطالعه نشان داد که این امر نشان‌دهنده این می‌باشد که شرایط محیطی تا چه حدی بر میزان تغییرات و اختلافات ژنوم گونه‌های مدنظر مؤثر بوده و به طور کل مسیر بیوشیمیایی ژنوم را تا چه حد تحت

REFERENCES

1. Ajmone-Marsan, P., Lenstra, J. A., Fernando Garcia, J. & Consortium, G. (2010). On the origin of cattle: how aurochs became domestic and colonized the world. *Evolutionary Anthropology Issues News and Reviews*, 19, 148-57.
2. Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., De Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R. & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-465.
3. Banabazi, M. H., Ghaderi-Zefrehei, M., Imumorin, I. & Peters, S. (2013). Whole Transcriptome Value Index (WTVI): A methodology for integrating functional sequences from RNA-Seq data into animal selection. *21st International Conference on Plant and Animal Genome*, 12-16 pp, San Diego, United States.
4. Bandiera, S., Matégot, R., Girard, M., Demongeot, J. & Henrion-Caude, A. (2013). MitomiRs delineating the intracellular localization of microRNAs at mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 64, 12-19.
5. Bao, H., Zhao, C., Zhang, L., Li, J. & Wu, C. (2008). Single-nucleotide polymorphisms of mitochondrially coded subunit genes of cytochrome c oxidase in five chicken breeds: *DNA Sequence*, 19(5), 461-464.
6. Bradley, D. G., MacHugh, D. E., Cunningham, P. & Loftus, R. T. (1996). Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 5131-5135.
7. Chen, Y. F., Kao, C. H., Chen, Y. T., Wang, C. H., Wu, C. Y., Tsai, C. Y., Liu, F. C., Yang, C. W., Wei, Y. H., Hsu, M. T., Tsai, S. F. & Tsai, T. F. (2009). Cisd2 deficiency drives premature aging and causes mitochondria-mediated defects in mice. *Genes & Development*, 23(10), 1183-1194.
8. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach*. 4th edition Washington, D.C., Sunderland, Mass., ASM Press.
9. Costa, V., Angelini, C., De Feis, I. & Ciccodicola, A. (2010). Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-16.
10. Fontanesi, F. (2001). Mitochondria: structure and role in respiration. *eLS*, 1-13.
11. Freese, N. H., Norris, D. C. and Loraine, A. E. (2016). Integrated Genome Browser: Visual analytics platform for genomics. *Bioinformatics*, 32 (14), 2089-2095.
12. Fries, R. & Ruvinsky, A. (1999). *The Genetics of Cattle*. New York: CABI Publishing.
13. Gray, M. W. (2012). Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a011403.
14. Groeneveld, L. F., Lenstra, J. A., Eding, H., Toro, M. A., Scherf, B., Pilling, D., Negrini, R., Finlay, E. K., Jianlin, H., Groeneveld, E., Weigend, S. & Consortium, G. (2010). Genetic diversity in farm animals—a review. *Animal Genetics*, 41, 6-31.
15. Hanotte, O. & Jianlin, H. (2005). *Genetic Characterization of Livestock Populations and Its Use in Conservation Decision-Making*. Villa Gualino, Turin, Italy. 5-7 March, 131-136.
16. Helmer, D., Gourichon, L., Monchot, H., Peters, J. & San'a Segui, M. (2005). Identifying early domestic cattle from pre-pottery neolithic sites on the middle euphrates using sexual dimorphism. *In The First Steps of Animal Domestication: New Archaeozoological Approaches* (eds J.-D. Vigne, D. Helmer & J. Peters), pp. 86-95. Oxford, UK: Oxbow Books.
17. Herrero-Medrano, J. M., Megens, H. J., Groenen, M. A., Ramis, G., Bosse, M., Pérez-Enciso, M. & Crooijmans, R. P. (2013). Conservation genomic analysis of domestic and wild pig populations from the Iberian Peninsula. *BMC Genetics*, 14(1), 106.

18. Hoffmann, I. (2010). Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, 41, 32-46.
19. Huang, W., Nadeem, A., Zhang, B., Babar, M., Soller, M. & Khatib, H. (2012). Characterization and comparison of the leukocyte transcriptomes of three cattle breeds. *PLoS One*, 7(1), e30244.
20. Kujoth, G. C., Bradshaw, P. C., Haroon, S. & Prolla, T. A. (2007). The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PLoS Genetics*, 3(2), e24.
21. Levin, J., Adiconis, X., Yassour, M., Thompson, D., Guttman, M., Berger, M. & Regev, A. (2010). Development and evaluation of RNA-Seq methods. *Genome Biology*, 11(Suppl 1), 1-1.
22. Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
23. Loftus, R. T., MacHugh, D. E., Bradley, D. G., Sharp, P. M. & Cunningham, P. (1994). Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 2757-2761.
24. Mannen, H., Kohno, M., Nagata, Y., Tsuji, S., Bradley, D. G., Yeo, J. S., Nyamsamba, D., Zagdsuren, Y., Yokohama, M., Nomura, K. & Amano, T. (2004). Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in north eastern Asian cattle. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 32, 539-544.
25. Marguerat, S. & Bähler, A. (2010). RNA-Seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(4), 569-579.
26. Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S. & Yamanaka, I. (2002). FANTOM consortium RIKEN genome exploration research group phase I & II team analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*, 420(6915), 563-573.
27. Pickrell, A. M. & Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, 85, 257-273.
28. Ruiz-Pesini, E., Lott, M. T., Procaccio, V., Poole, J. C., Brandon, M. C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P. & Wallace, D. C. (2007). An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research*, 35, 823-828.
29. Salimpour, M. (2016). *Differential Gene Expression Analysis Between the Holstein and Cholistani (a Pakistani Breed) Population Using RNA Sequencing (RNA-Seq)*. M. Sc. Thesis, University of Tehran, IRAN. (in Persian)
30. Salimpour, M., Miraei-Ashtiani, S. R. & Banabazi, M. H. (2019). Differential gene expression of two bovine *Bos Taurus* (Holstein) and *Bos Indicus* (Cholistani) sub-species using RNA-Seq data. *Iranian Journal of Animal Science*, 50(1), 47-55. (In Persian)
31. Schauer, M., Kotteck, T., Schönherr, M., Bhattacharya, A., Ibrahim, S. M., Hirose, M., Rüdiger Köhling, R., Fuellen, G., Schmitz, U. & Kunz, M. (2015). A mutation in the NADH-dehydrogenase subunit 2 suppresses fibroblast aging. *Oncotarget*, 6(11), 8552.
32. Shi, Y., Hu, Y., Wang, J., Elzo, M. A., Yang, X. & Lai, S. (2018). Genetic diversities of MT-ND1 and MT-ND2 genes are associated with high-altitude adaptation in yak. *Mitochondrial DNA Part A*, 29(3), 485-494.
33. Soto, I. C., Fontanesi, F., Liu, J. & Barrientos, A. (2012). Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(6), 883-897.
34. Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
35. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
36. Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B. B., Siddiqui, A., Lao, K. & Surani, M. A. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature Methods*, 6(5), 377.
37. Troy, C. S., MacHugh, D. E., Bailey, J. F., Magee, D. A., Loftus, R. T., Cunningham, P., Chamberlain, A. T., Sykes, B. C. & Bradley, D. G. (2001). Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature*, 410, 1088-1091.
38. Tuppen, H. A., Blakely, E. L., Turnbull, D. M. & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797, 113-128.
39. Wang, K. C. & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular Cell*, 43(6), 904-914.