



## تولیدات دامی

دوره ۲۰ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۷

صفحه‌های ۲۴۱-۲۲۵

### مطالعه روابط تکاملی و فیلوژنتیکی ژن گلوکاتایون پراکسیداز-۱ در جمعیت‌های مرغ

#### خزک و راس ۳۰۸

رخساره نجم‌الدینی<sup>۱</sup>، غلامرضا داشاب<sup>۲\*</sup>، مهدی وفای‌واله<sup>۳</sup>، نصراله مرادی کر<sup>۴</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۴. دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۲/۱۹

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۰۸

#### چکیده

استرس گرمایی یکی از مهمترین عوامل استرس‌زای محیطی است که تولید طیور در دنیا به‌خصوص در مناطق گرم همانند استان سیستان و بلوچستان در ایران را با چالش همراه کرده است. استرس گرمایی موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در بدن پرندگان می‌شود. گلوکاتایون پراکسیداز نقش مهمی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان سلولی در استرس گرمایی ایفا می‌کند. هدف از انجام این پژوهش، تجزیه تکاملی و فیلوژنتیک توالی نوکلئوتیدی GPX-1 در دو جمعیت راس ۳۰۸ و خزک بود. نمونه‌های خون از ۱۰ پرنده از دو جمعیت خزک و راس ۳۰۸ به‌طور تصادفی جمع‌آوری شد (پنج قطعه از خزک و پنج قطعه راس ۳۰۸). DNA از خون کامل استخراج شد. تکثیر PCR قطعه ۸۰۰ جفت بازی از GPX-1 با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی انجام گرفت. سپس محصول تکثیر برای توالی‌یابی DNA ارسال شد. هم‌ردیفی توالی قطعات GPX-1 در مجموع نه هاپلوטיפ و ۱۳ ناحیه متغیر را نمایان ساخت. از ۱۳ ناحیه چندشکل، پنج ناحیه جهش‌های نقطه‌ای بودند. ترسیم درخت فیلوژنتیک تشابه ژنتیکی بالایی را در بین دو جمعیت مورد مطالعه نشان داد، اما تفرق در درون جمعیت‌ها نشان می‌دهد که امکان بهبود، تغییرات ژنتیکی و افزایش مقاومت به استرس‌های محیطی در نتیجه انتخاب وجود دارد. نتایج فاصله ژنتیکی و نواحی چندشکل GPX-1 در گونه‌های مختلف درخت فیلوژنتیک را تأیید نمودند. مطالعه فرآیندهای انتخاب مثبت نشان داد که انتخاب و تکامل نقش مهمی در فهم نقش زیستی این ژن دارند.

**کلیدواژه‌ها:** تکامل، جهش، فیلوژنتیک، گلوکاتایون پراکسیداز، همولوگ.

## مقدمه

استرس گرمایی از جمله مشکلاتی می‌باشد که سبب افت عملکرد طیور به‌ویژه در نواحی با آب و هوای گرم می‌شود. رادیکال‌های آزاد به دلیل میل ترکیبی بالا برای واکنش با مولکول‌های زیستی مهم از جمله اسیدهای نوکلئیک، اسیدهای چرب و پروتئین‌ها، باعث آسیب به غشاها، آنزیم‌ها، گیرنده‌ها و سایر ساختارهای سلولی در بافت‌های مختلف بدن مرغ می‌شوند. در شرایط تنش گرمایی، تولید رادیکال‌های آزاد در بدن مرغ افزایش می‌یابد. بدن مرغ با دو نوع سازوکار آنزیمی و غیرآنزیمی، رادیکال‌های آزاد را خنثی و از بروز تبعات منفی آنها جلوگیری می‌کند [۳۰]. از بین آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، گلوتاتیون‌پراکسیداز دارای اهمیت خاصی است، این آنزیم عضوی از خانواده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که باعث تسریع در کاهش  $H_2O_2$  و یا هیدروپراکسیدهای آلی می‌شود [۲۸، ۳۰ و ۳۵]. تاکنون پنج ایزوآنزیم: GPX-1، GPX-2، GPX-3، GPX-4 و PX-5 از گلوتاتیون پراکسیداز شناخته شده است [۱۱ و ۱۲]. از بین ایزومرهای مذکور، GPX-1 یکی از فراوان‌ترین گلوتاتیون‌پراکسیدازها می‌باشد که در همه سلول‌ها به‌طور گسترده وجود دارد [۱۱].

از نظر موقعیت مکانی، آنزیم GPX-1 در سیتوزول و میتوکندری حضور دارد و یک پروتئین هموترامر است که از چهار زیرواحد تشکیل شده و هر زیرواحد آن حاوی یک اتم سلنیوم با وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون است [۵]. این آنزیم اولین بار توسط Mills (۱۹۵۷) به‌عنوان یک آنزیم گلوبول قرمز کشف شد که محافظت هموگلوبین را در برابر اکسیداسیون برعهده دارد [۱۱]. بیان GPX-2 به‌طور عمده در لوله گوارش است، این آنزیم اپی‌تلیوم روده را از تنش‌های اکسیداتیوی محافظت می‌کند [۶ و ۳۹]. GPX-3 از نظر موقعیت مکانی بیشتر در

پلاسمای کلیه یافت می‌شود [۱۱]. GPX-4 از دیگر آنزیم‌های این خانواده است که سوسترای اصلی آن، هیدروپراکسید لیپیدی غشاها می‌باشد [۹ و ۱۰] و تقریباً در تمام سلول‌های پستانداران، اما در سطح بسیار پائین بیان می‌شود [۲]. ایزوآنزیم دیگر، GPX-5 است. این پروتئین به‌صورت هموترامر است و فاقد سلنیوم در جایگاه فعال می‌باشد [۳۸].

تنش اکسیداتیو در اثر عدم توازن میان تولید رادیکال‌های آزاد در داخل بدن و مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی حاصل می‌شود. در موجودات زنده پراکسیداسیون لیپیدهای موجود در دیواره سلول‌های زنده از جمله مهمترین اهداف رادیکال‌های آزاد می‌باشد. در این شرایط دیواره سلولی و عملکرد آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد. همچنین، بعضی از محصولات ناشی از اکسیداسیون به‌عنوان نمونه مالوندی‌آلدهید می‌تواند با مولکول‌های زیستی واکنش نشان داده و اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک از خود نشان دهد [۲۵].

ژن GPX-1 منجر به تولید آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز-۱ می‌شود که یک سلنوپروتئین محلول است و باعث می‌شود تا پراکسیدهایی مانند  $H_2O_2$  و ROOH به آب و الکل تبدیل شوند [۷، ۱۵ و ۱۶]. جایگاه‌های چندشکل متعددی در نواحی ایترون، اگزونی و مناطق UTR این ژن گزارش شده است که می‌توانند عملکرد GPX-1 را تحت تأثیر قرار دهند [۲۰]. یکی از نواحی چندشکل مهم در جایگاه ژنی GPX-1 در موقعیت rs1050450 قرار دارد. این SNP در اگزون دوم ژن GPX-1 است که اسیدآمینوهای پرولین یا لوسین را رمزگذاری می‌کند [۸ و ۲۱]. مطالعات نشان داده است که واریانت لوسین ۱۰ درصد کمتر از شکل طبیعی آنزیم فعالیت دارد [۱۹ و ۲۶]. همچنین، مطالعات نشان داده است که واریانت لوسین خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی را

## تولیدات دامی

با مرغ پلیموت سفید ایجاد شده، یکی از مهمترین تلاش های محققین اصلاح نژاد در تولید یک سویه به خصوص گوشتی بوده که در دهه ۱۹۳۰ معرفی گردید [۱۷]. جوجه گوشتی راس ۳۰۸، دارای رشد سریع و ضریب تبدیل غذایی پایین برای تولید گوشت می باشد [۴] و فقط به دلیل استفاده اقتصادی و منبع گوشت در ایران پرورش می یابد. مرغ مادر گوشتی سویه تجاری راس ۳۰۸ در حال حاضر یکی از پرتقاضاترین نژادهای مرغ مادر گوشتی در دنیا و ایران می باشد به طوری که حدود ۷۰-۷۵ درصد مرغ های راس گوشتی ایران را این سویه تشکیل می دهد [۲۹].

حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت های بومی در نقاط مختلف ایران، به دلیل اندازه کم جمعیت آنان، برای انجام برنامه های اصلاح نژادی و افزایش تولید ضروری است. با توجه به نقش مهم آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در حفاظت سلول در برابر اکسیداسیون و تحمل شرایط گرمایی، تاکنون تحقیقاتی در مورد روند تکاملی و فیلوژنتیک توالی های ژن این آنزیم در طیور انجام نشده است. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی روابط تکاملی و فیلوژنتیکی ژن گلوکاتایون پراکسیداز-۱ در سویه راس ۳۰۸ و مرغ بومی سیستان تحت نام خزک بود.

### مواد و روش ها

در تحقیق حاضر از ۱۰ قطعه پرنده شامل پنج قطعه از مرغان خزک ایستگاه تحقیقاتی دام های خاص دانشگاه زابل و پنج قطعه جوجه گوشتی تجاری سویه راس ۳۰۸ موجود در مجتمع پرورشی مرغ گوشتی هامون واقع در شهرستان بیرجند استفاده شد (شکل ۱). دو میلی لیتر خون از ورید بال گرفته شد و در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA (۰/۵ درصد) جمع آوری گردید و نمونه ها روی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج در دمای

افزایش می دهد [۳۴]. پرولین اسید آمینه ای است که منجر به ایجاد خمیدگی در ساختار پروتئین می شود. بنابراین، جابجایی پرولین با لوسین با تغییر کنفورماسیون ساختاری جایگاه فعال آنزیم و فعالیت آن منجر به عدم تعادل فعالیت اکسیدانسی-آنتی اکسیدانسی می شود [۱۸].

در مطالعه فیلوژنتیک توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن GPX در گونه های مختلف گزارش گردید که مسیر تکاملی ژن GPX-1 متفاوت و مستقل از هم است، لذا امکان تعیین منشأ اجدادی این ژن سخت است [۲۷]. اما آنچه نمایان است ترسیم درخت فیلوژنتیک سه گروه اصلی را نشان داد که گروه یک به عنوان بزرگترین گروه تمام گونه های جانوری را در برمی گیرد و خود به هفت زیرگروه کوچکتر از جمله پستانداران، پرندگان و ماهی ها طبقه بندی می شوند. گروه دوم شامل پروکاریوت ها اعم از باکتری ها و قارچ ها بودند و در نهایت گروه سوم گونه های گیاهی را شامل می شود [۲۷].

مرغ خزک، بومی منطقه سیستان است که به علت کوتاه بودن پاهای آن به این نام خوانده می شود. این مرغ دارای جثه کوچک با پاهای کوتاه و رنگ پرهای حنایی تا قهوه ای تیره و با لکه های سیاه می باشد و مقاومت بالایی در برابر شرایط نامناسب محیطی دارد. سن بلوغ این نژاد شش تا هفت ماهگی است و اولین تخم های تولیدی آن فاقد توانایی جوجه درآوری هستند. تخم گذاری این مرغ محدود به اسفند تا اواخر خرداد است که این میزان بین ۷۰ تا ۸۰ عدد تخم مرغ است. تخم مرغ این نژاد به رنگ سفید و حدود ۳۵ تا ۵۰ گرم وزن دارد. میزان باروری خوب تخم مرغ از خصوصیات خوب این نژاد محسوب می شود. وزن زنده مرغ خزک بالغ در سن ۶ ماهگی بین ۱/۵ تا ۲/۵ کیلوگرم متغیر است. پراکندگی این نژاد در شمال استان سیستان و بلوچستان می باشد [۱].

سویه تجاری راس ۳۰۸ که از تلاقی خروس کورنیش

### تولیدات دامی

دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت با بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه به منظور جمع‌آوری پرایمرهای آزاد در واکنش در طی یک سیکل ادامه پیدا کرد. جهت اطمینان از کمیت و کیفیت قطعه ژن GPX-1 بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. محصول تکثیر پس از تخلیص از روی ژل جهت تعیین توالی به روش سانگر به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال شد.

واکنش تکثیر شامل ۱۲ میکرولیتر بافر واکنش Master mix، یک میکرولیتر DNA نمونه، ۱/۵ میکرولیتر مخلوط پرایمرهای رفت و برگشت و ۱۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسییکر (Peqlab gradient pcr) مدل گرادینت و ساخت کشور انگلیس) انجام گرفت. چرخه دمایی واکنش تکثیر شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، سپس ۳۵ سیکل با واسرشته‌سازی ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در

۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. استخراج DNA کامل به روش نمکی - درجنت از خون کامل مرغ‌های خزک و راس ۳۰۸ انجام شد.

جهت تکثیر اختصاصی قطعه‌ای از ژن GPX-1 به طول ۸۰۰ جفت باز از یک جفت پرایمر اختصاصی استفاده گردید که با نرم‌افزار Primer Premier (نسخه ۶/۲۳) طراحی شده و جهت سنتز به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد (جدول ۱).

واکنش تکثیر شامل ۱۲ میکرولیتر بافر واکنش Master mix، یک میکرولیتر DNA نمونه، ۱/۵ میکرولیتر مخلوط پرایمرهای رفت و برگشت و ۱۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسییکر (Peqlab gradient pcr) مدل گرادینت و ساخت کشور انگلیس) انجام گرفت. چرخه دمایی واکنش تکثیر شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، سپس ۳۵ سیکل با واسرشته‌سازی ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در



شکل ۱. A) مرغ بومی خزک در سن حدود ۶ ماهگی، B) جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ در سن ۴۵ روزگی

جدول ۱. ویژگی پرایمرهای مورد استفاده جهت سنتز قطعه ۸۰۰ جفت بازی از جایگاه ژنی GPX-1

نام پرایمر	توالی پرایمر	GC%	Tm [oc]	طول قطعه
رفت	3'GGTGGTGTCTTCGTGAACGG 5'	۶۰	۶۰/۸	۸۰۰
برگشت	3'CTTCCTCGGCGGCTTTGT 5'	۶۱/۱	۶۰/۹	۸۰۰

## تولیدات دامی

روند انتخاب طبیعی برای ژن GPX-1 بررسی گردید. مقادیر  $d_N$  و  $d_S$  به ترتیب با استفاده از رابطه‌های ۲ و ۳ محاسبه شدند:

$$d_N = -3/4 \ln(1 - 4/3 P_N) \quad (2)$$

$$d_S = -3/4 \ln(1 - 4/3 P_S) \quad (3)$$

که در این رابطه‌ها،  $P_N$ ، نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی نامشابه و  $P_S$ ، نیز نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی مشابه می‌باشند. بنابراین، با استفاده از مقدار عددی این نسبت ( $d_N/d_S$ ) روند انتخاب برای ژن GPX-1 محاسبه شد. معنی دار بودن مقدار عددی  $d_N/d_S$  با آزمون فیشر در سطح احتمال پنج درصد با نرم‌افزار انالین HIV\_SNAP (نسخه ۱/۱/۲) [۲۲] محاسبه شد.

### نتایج و بحث

تکثیر قطعه ۸۰۰ جفت بازی از ژن GPX-1 به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی صورت گرفت (شکل ۲).



شکل ۲. الکتروفورز قطعه به طول ۸۰۰ جفت باز از جایگاه ژن GPX-1 بر روی ژل آگارز ۱ درصد

کانتینگ برهم‌گذاری توالی‌های رفت و برگشت تمام نمونه‌ها برای قطعه ۸۰۰ جفت بازی جایگاه ژنی GPX-1 دو جمعیت خزک و راس ۳۰۸ جهت ترمیم خطاهای احتمالی و اشکالات توالی‌یابی انجام شد (شکل ۳).

شاخص‌های تنوع مولکولی از قبیل تعداد جهش‌ها، تعداد هاپلوتیپ‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، مکان‌های چندشکل، چندشکلی حذف و اضافه، شاخص توزیع گاما به منظور برآورد نرخ یا ضریب ناهمگونی بین مکان‌های مورد بررسی، تعداد جایگاه‌هایی که در آنها جایگزینی مشابه اتفاق افتاده و همچنین تنوع آنها از نرم‌افزار DnaSP (نسخه ۵) [۲۴] استفاده شد. تنوع هاپلوتیپی براساس روش حداکثر درستیابی ML و فاصله ژنتیکی براساس مدل تامورا-نئی (MCL) [۳۷] انجام گرفت.

ترسیم درخت فیلوژنتیکی، روابط تکاملی بین توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن GPX-1 به منظور تعیین تاریخ تکاملی گونه‌های استخراج شده (جدول ۲) با استفاده از نرم‌افزار MEGA (نسخه ۶) [۳۶] با ۱۰۰۰۰ تکرار با روش آماری Bootstrap مورد بررسی قرار گرفت. پس از ویرایش توالی‌ها و حذف نواحی غیرکدکننده، درخت فیلوژنی با استفاده از روش اتصال-همسایگی (NJ) انجام شد. در این روش، درخت فیلوژنی براساس مدل MCL [۳۷] از ماتریس (Q) استفاده می‌نماید.

$$Q(i, j) = (r - 2)d(i, j) - \sum d(i, k) - \sum d(j, k) \quad (1)$$

که در این رابطه،  $d(i, j)$  فاصله بین شاخه  $i$  و  $j$ ؛  $k$  شاخه  $k$  درخت؛  $r$  تعداد کل شاخه‌ها و  $Q(i, j)$  مقدار عددی شاخه‌های  $i$  و  $j$  است. همچنین، از روش حداکثر درست‌نمایی برای به دست آوردن میزان جانشینی به جایگزینی نوکلئوتیدها در بازهای پورینی و پیریمیدینی استفاده شد. بررسی تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند ( $d_N$ ) نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصله نداشته‌اند ( $d_S$ )، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد. بنابراین، با استفاده از مقدار عددی این نسبت ( $d_N/d_S$ )

RS2-R- GATGGGGGGTGTGTTTTTGGAAACGGGGCTCCGCTGCCCAACGCCATCCGCTGCGGATC  
 RS2-F+ CATCCGCTGCGGATC

Consensus  
 GATGGGGGGTGTGTTTTTGGAAACGGGGCTCCGCTGCCCAACGCCATCCGCTGCGGATC

RS2-R- GTGAGCTGGCCAGCTCGGCATTCCGCGTGGACATCAGCCGCCAGTGGGGTCTCG  
 RS2-F+ GTGAGCTGGCCAGCTCGGCATTCCGCGTGGACATCAGCCGCCAGTGGGGTCTCG

consensus  
 GTGAGCTGGCCAGCTCGGCATTCCGCGTGGACATCAGCCGCCAGTGGGGTCTCG

RS2-R- CACGGCTGCGTCAGCAAGATCCTGGCCCGCTACAACGAGACCGGCTCCATCCTGCCCGGA  
 RS2-F+ CACGGCTGCGTCAGCAAGATCCTGGCCCGCTACAACGAGACCGGCTCCATCCTGCCCGGA

consensus  
 CACGGCTGCGTCAGCAAGATCCTGGCCCGCTACAACGAGACCGGCTCCATCCTGCCCGGA

RS2-R- GCCATCGGAGGCAAGACCGCGGGTCAACACCCCAACGTGGTCAAGCACATCCGGAC  
 RS2-F+ GCCATCGGAGGCAAGACCGCGGGTCAACACCCCAACGTGGTCAAGCACATCCGGAC

Consensus  
 GCCATCGGAGGCAAGACCGCGGGTCAACACCCCAACGTGGTCAAGCACATCCGGAC

RS2-R- TACAAGCAGGGAGACCCGGCATCTTCGCTGGGAGATCCGCGACCGGCTGCTGGCCGAC  
 RS2-F+ TACAAGCAGGGAGACCCGGCATCTTCGCTGGGAGATCCGCGACCGGCTGCTGGCCGAC

consensus  
 TACAAGCAGGGAGACCCGGCATCTTCGCTGGGAGATCCGCGACCGGCTGCTGGCCGAC

RS2-R- GCGCTGCGGACAAGTACAACGTGCGGTGCGTCACTCCATCAGCAGGATCCTGCCGAAC  
 RS2-F+ GCGCTGCGGACAAGTACAACGTGCGGTGCGTCACTCCATCAGCAGGATCCTGCCGAAC

Consensus  
 GCGCTGCGGACAAGTACAACGTGCGGTGCGTCACTCCATCAGCAGGATCCTGCCGAAC

RS2-R- AAAATCGGCAGCCTCTCGCAGCCCGGGCCCTTACGACGGCGGCAAGCAGCCCCCCCCG  
 RS2-F+ AAAATCGGCAGCCTCTCGCAGCCCGGGCCCTTACGACGGCGGCAAGCAGCCCCCCCCG

Consensus  
 AAAATCGGCAGCCTCTCGCAGCCCGGGCCCTTACGACGGCGGCAAGCAGCCCCCCCCG

RS2-R- CAGCCCGCCTGCCCTACAACCCCTTACCAGTACCCGTACCCGGCCCATGGCCCCG  
 RS2-F+ CAGCCCGCCTGCCCTACAACCCCTTACCAGTACCCGTACCCGGCCCATGGCCCCG

Consensus  
 CAGCCCGCCTGCCCTACAACCCCTTACCAGTACCCGTACCCGGCCCATGGCCCCG

RS2-R- CCGGCAGCCAAGATGAGCGCTATCCCGGGCCGTCGCCCGGGCCACGTCGGGCTGCC  
 RS2-F+ CCGGCAGCCAAGATGAGCGCTATCCCGGGCCGTCGCCCGGGCCACGTCGGGCTGCC

Consensus  
 CCGGCAGCCAAGATGAGCGCTATCCCGGGCCGTCGCCCGGGCCACGTCGGGCTGCC

RS2-R- CGCTCCTGCCCTCGGCTCACTCTGTCACCAACATCCTGGGCATCCGCACCTTCGTGGAG  
 RS2-F+ CGCTCCTGCCCTCGGCTCACTCTGTCACCAACATCCTGGGCATCCGCACCTTCGTGGAG

Consensus  
 CGCTCCTGCCCTCGGCTCACTCTGTCACCAACATCCTGGGCATCCGCACCTTCGTGGAG

RS2-R- CAGACGGGTGGGTACCGAAAGTCACTGGGACAGCGCTTCTGCCCTCGGGGTTTTCCGTC  
 RS2-F+ CAGACGGGTGGGTACCGAAAGTCACTGGGACAGCGCTTCTGCCCTCGGGGTTTTCCGTC

Consensus  
 CAGACGGGTGGGTACCGAAAGTCACTGGGACAGCGCTTCTGCCCTCGGGGTTTTCCGTC

RS2-R- GGGAAAAGCCCGACGGCTGAGAGTTGATCCTGACTGCTCCGGGCTCTGCTCCTGCCAG  
 RS2-F+ GGGAAAAGCCCGACGGCTGAGAGTTGATCCTGACTGCTCCGGGCTCTGCTCCTGCCAG

Consensus  
 GGGAAAAGCCCGACGGCTGAGAGTTGATCCTGACTGCTCCGGGCTCTGCTCCTGCCAG

RS2-R- GGGCTTTGGGTGGCACCGAGGGCTCTGCTTACCCCCCAAAATGGAAGACTGGCCCGGG  
 RS2-F+ GGGCTTTGGGTGGCACCGAGGGCTCTGCTTACCCCCCAAAATGGAAGACTGGCCCGGG

Consensus  
 GGGCTTTGGGTGGCACCGAGGGCTCTGCTTACCCCCCAAAATGGAAGACTGGCCCGGG

RS2-F+ TGAACAGGACTGCCTTCCCTTCCGCCAGGCCGACAAGGCCAAAAGAGAGAGAA  
 TGAACAGGACTGCCTTCCCTTCCGCCAGGCCGACAAGGCCAAAAGAGAGAGAA

Consensus  
 TGAACAGGACTGCCTTCCCTTCCGCCAGGCCGACAAGGCCAAAAGAGAGAGAA

شکل ۳. کانتینگ برهم‌گذاری قطعات توالی‌یابی رفت و برگشت جایگاه ژنی GPX-1 یکی از نمونه‌های مربوط به سویه راس ۳۰۸

به‌منظور تعیین همولوژی و مقایسه میزان تفرق توالی‌های به‌دست‌آمده از دو سویه مرغان راس ۳۰۸ و خزک با توالی‌هایی که تاکنون از ژن GPX-1 در بانک ژنی NCBI ثبت شده است، ۴۰ توالی از گونه‌ها و نژادهای مختلف حیوانات استخراج شد. اطلاعات مربوط به توالی‌های جایگاه ژنی GPX-1 در گونه‌های مورد بررسی در جدول ۲ آورده شده است.

یکی از راه‌های شناسایی جهش‌های مؤثر و غیرمؤثر در محصول پروتئین تولیدی، مطالعه تغییرات در قاب‌های خواندنی<sup>۱</sup> است. یک قاب خواندنی (ORF) که می‌تواند یک پروتئین را رمزگردانی کند، با یک رمز کدکننده متیونین شروع و با یک رمز پایان، خاتمه می‌یابد (شکل ۴). این قاب‌های خواندنی، قاب‌های خواندنی باز نامیده می‌شوند [۳].

1. Open reading frame

```

atg ggg ggg tgt gtt ttt gga acg ggc gtc cgc tgc cca acg cca
M G G C V F G T G V R C P T P
tcc gcc tgc gga tgc tgg agc tgg ccc agc tgc gca ttc gcc cgt
S A C G S W S W P S S A F A R
gcg aca tca gcc gcc agc tgc ggg tet cgc acg gct gcg tca gca
A T S A A S C G S R T A A S A
aga tcc tgg ccc gct aca acg aga ccg gct cca tcc tgc cgg gag
R S W P A T T R P A P S C P E
cca tgc gag gca gca agc cgc ggg tca cca ccc cca acg tgg tca
P S E A A S R G S P P T W S
agc aca tcc gcg act aca agc agg gag acc ceg gca tet teg cct
S T S A T T S R E T P A S S P
ggg aga tcc gcg acc ggc tgc tgg cgg acg gcg tet gcg aca agt
G R S A T G C W P T A S A T S
aca acg tgc cgt cgg tca gct cca tca gca gga tcc tgc gga aca
T T C R R S A P S A G S C G T
aaa tgc gca gcc tct cgc agc cgg gcg gcc ctt acg acg gcg gca
K S A A S R S P A A L T T A A
agc agc ccc ccc cgc agc cgg ccc tgc cct aca acc ccc ttt acc
S S P P R S P P C P T T P F T
agt acc cgt acc cgg gcc cca tgg ccc cgc cgg cag cca aga tga
S T R T P A P W P R R Q P R
    
```

شکل ۴. شناسایی نواحی ORF جایگاه ژنی GPX-1 در دو توده مرغان خزک و راس ۳۰۸

پیریمیدینی گزارش کرده اند، مطابقت دارد [۳۳، ۳۹ و ۴۲]. علت این تغییرات را می توان به متیله شدن سیتوزین (جزایر CpG) نسبت داد که میزان رونویسی را کاهش می دهد. درصد جهش انتقالی (Ts) یا جانشینی نوع اول نسبت به جهش تقاطعی (Tv) یا جانشینی نوع دوم بیشتر بود؛ زیرا جهش به نوکلئوتید مشابه نسبت به نوکلئوتید نامشابه پایدارتر است و این جهش ها می توانند برگشت پذیر هم باشند. نسبت جهش انتقالی به تقاطعی نیز در این برآورد، ۱/۵۸ به دست آمد که نشان می دهد گونه های مورد بررسی برای ژن GPX-1 روند تکاملی داشته اند.

در تجزیه و تحلیل توالی های نوکلئوتیدی در دو توده خزک و راس ۳۰۸ با سایر گونه ها، باز سیتوزین، بیشترین فراوانی و باز تیمین کمترین فراوانی را داشت (جدول ۴). مجموع سیتوزین و گوانین نیز در حدود ۶۰/۵ درصد بود که این میزان بالای C و G به علت داشتن سه پیوند هیدروژنی، یکی از عوامل اصلی در ثابت ماندن این ناحیه می باشد.

با تجزیه و تحلیل توالی های ژن GPX-1، وجود نه هاپلوتایپ در جمعیت توده خزک و راس ۳۰۸ مشاهده شد که محتوای توالی مورد توافق به دست آمده از هاپلوتایپ ها شامل ۱۶/۸۸ درصد آدنین، ۱۵/۵۲ درصد تیمین، ۳۸/۸۸ درصد سیتوزین و ۲۸/۷۲ درصد گوانین بود. همان طور که مشاهده می شود، مجموع سیتوزین و گوانین بیشتر از ۶۰ درصد (۶۷/۶ درصد) می باشد که همین میزان بالای C و G به علت داشتن سه پیوند هیدروژنی، یکی از عوامل اصلی محافظت این ناحیه از ژن GPX-1 در مقابل عوامل جهش زا است و مقادیر بالای جایگزینی مربوط به بازهای پیریمیدینی بود، به طوری که این مقدار برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۴۱/۳۶ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین برابر ۱۶/۵۱ درصد برآورد شد. این مقادیر برای بازهای پورینی کمتر و به ترتیب برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین برابر ۳/۷۹ درصد و ۲/۲۳ درصد بودند (جدول ۳). مقادیر جایگزینی حاصل در این بررسی با مقادیر ذکر شده از سوی سایر محققین که بیشترین میزان جانشینی را جانشینی بازهای

## تولیدات دایمی

نجم‌الدینی و همکاران

جدول ۲. گونه، اسم علمی، اندازه ژن و شماره دسترسی توالی‌های ژن GPX-1 استفاده شده در تجزیه فیلوژنی و روند تکاملی

ردیف	گونه	شماره دسترسی	اندازه ژن (جفت باز)
۱	انسان (Human)	NC_000003	۱۱۸۳
۲	موش نروژ (Norway Rat)	NC_005107	۱۰۹۹
۳	موش خانگی (House Mouse)	NC_000075	۱۲۶۳
۴	موش خرمايي کوهی آلپ (Alpine Marmot Rat)	NW_015351229	۱۱۳۳
۵	موش کور (Upper galilee mountains blind mole Rat)	NW_008355774	۱۱۲۴
۶	گاو (Cattle)	AC_000179	۱۱۶۹
۷	گاو میش اهلی شده آسیایی (Water Buffalo)	NW_005784513	۱۱۶۲
۸	خوک (Pig)	NC_010455	۱۰۶۹
۹	خوک گینه (Domestic Guinea Pig)	NT_176411	۱۰۸۴
۱۰	خرگوش (Rabbite)	NC_013677	۱۰۰۸
۱۱	جوجه (Chicken)	NC_006099	۹۴۲
۱۲	بوقلمون (Turkey)	NC_015024	۱۰۹۱
۱۳	مارموست سفید (White – Tuted – ear Marmoset)	NC_013910	۱۸۴۲
۱۴	سگ (Dog)	NC_006602	۱۰۸۹
۱۵	قورباغه چنگال‌دار گرمسیری (Tropical Clawed Frog)	NC_030680	۵۰۷۴
۱۶	ماهی زبرا فیش (Zebra Finch)	NC_011476	۱۰۰۲
۱۷	خفاش برانت (Brandt's Bat)	NW_005357736	۶۲۹
۱۸	هامستر چینی (Ghinese Hamster)	NW_003613788	۱۰۹۵
۱۹	شپانزه (Chimpanzee)	NC_006490	۸۹۲
۲۰	میمون زرد (Rhesus Monkey)	NC_027894	۱۱۳۶
۲۱	میمون سیاه (Black snub – nosed Monkey)	NW_016804422	۱۵۰۲
۲۲	میمون طلایی (Golden snub – nosed Monke)	NW_010788472	۱۱۲۴
۲۳	میمون سبز (Green Monkey)	NC_023663	۱۶۴۲
۲۴	میمون خوک دم (Pig – tailed Macaque)	NW_012018354	۱۱۴۳
۲۵	میمون شب (Ma's night Monkey)	NW_012184106	۱۱۴۰
۲۶	یوزپلنگ (Cheetah)	NW_015131163	۱۱۲۲
۲۷	سار اروپایی (Common Starling)	NW_014650485	۹۷۹
۲۸	موش کانگرو (Ord's Kangaroo Rat)	NW_012267323	۱۰۹۵
۲۹	شتر عرب (Arabian Camel)	NW_011590974	۱۱۲۰
۳۰	شتر دوکوهانه (Bactrian Camel)	NW_011517149	۱۰۱۷
۳۱	عقاب گر (Bald Eagle)	NW_010972438	۹۲۳
۳۲	اسب (Horse)	NW_007673843	۱۱۹۴
۳۳	اسب شوالسکی (Przewalski's Horse)	NW_007673843	۱۱۹۴
۳۴	دلفین رودخانه یانگ تسه (Yangtze River Dolphin)	NW_006770548	۱۰۷۳
۳۵	تمساح امریکایی (American Alligator)	NW_014552422	۳۷۳۷
۳۶	بز (Goat)	NC_030829	۱۱۷۱
۳۷	گره ماهی (Channel Cat Fish)	NC_012589	۱۰۸۰
۳۸	گره خانگی (Domestic Cat)	NC_018724	۱۱۲۷
۳۹	بلدرچین ژاپنی (Japanese Quail)	NC_029527	۹۹۴
۴۰	چرخ ریسک بزرگ (Great Tit)	NC_029281	۹۷۲

تولیدات دایمی

دوره ۲۰ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۷



جدول ۵. ماتریس برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی ژن

GPX-1 دو توده خزک و راس ۳۰۸ با سایر گونه‌ها

From\To	A	T/U	C	G
A	-	۳/۷۰	۶/۴۹	۱۲/۸۰
T/U	۳/۸۰	-	۲۵/۱۵	۵/۰۰
C	۳/۸۰	۱۴/۳۴	-	۵/۰۰
G	۹/۷۳	۳/۷۰	۶/۴۹	-

میزان جانشینی نوع اول و جانشینی نوع دوم در جمعیت توده خزک و راس با سایر حیوانات براساس روش آماری ML برآورد شد. در این جدول اعدادی که به صورت پررنگ نشان داده شده‌اند نرخ جانشینی نوع اول را بیان می‌کند و سایر اعداد (مورب) نشان‌دهنده نرخ جانشینی نوع دوم هستند. الگوهای جانشینی و نرخ‌ها براساس مدل تامورا-نی برآورد شده است [۳۷].

نتایج تنوع تکاملی و فاصله ژنتیکی در دو توده خزک و راس ۳۰۸ در جدول ۶ آورده شده است. از آنجایی که فواصل ژنتیکی بین حیوانات مختلف به صورت دو به دو است، اعداد حاصله، نمایانگر جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی‌های مورد بررسی می‌باشند. فاصله ژنتیکی بین دو حیوان با همبستگی فیلوژنتیکی بین حیوانات مرتبط خواهد بود. در نتیجه از این شاخص هم می‌توان برای دوری و نزدیکی ژنتیکی حیوانات مختلف استفاده کرد. همان‌طور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود، در برآورد فواصل ژنتیکی دو توده خزک و راس ۳۰۸ برای ژن GPX-1 مشخص شد که تنوع پایینی در بین دو جمعیت مشاهده می‌گردد، اما تنوع درون جمعیت‌ها بیشتر است. همچنین، در برآورد میانگین فاصله ژنتیکی بین گروهی، فاصله ژنتیکی بین دو گروه خزک و راس ۳۰۸ در حدود ۰/۰۰۶ جفت باز محاسبه شد و میانگین فاصله ژنتیکی داخل گروهی توده خزک و راس ۳۰۸ نیز در حدود ۰/۰۰۶ با خطای استاندارد ۰/۰۰۲ بود که خود نشان‌دهنده قرابت و شباهت زیاد بین دو توده خزک و راس ۳۰۸ در جایگاه مذکور است. همچنین، نتایج حاصل از جدول فواصل ژنتیکی و میزان اختلاف نوکلئوتیدی صحت ترسیم درخت فیلوژنتیک را تأیید می‌کند.

جدول ۳. ماتریس برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی

جایگاه ژنی GPX-1 در دو توده مرغان خزک و راس ۳۰۸

From\To	A	T/U	C	G
A	-	۲/۸۰	۷/۰۲	۳/۷۹
T/U	۳/۰۵	-	۴۱/۳۶	۵/۱۸
C	۳/۰۵	۱۶/۵۱	-	۵/۱۸
G	۲/۲۳	۲/۸۰	۷/۰۲	-

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصدهای جهش انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به صورت ضخیم و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به صورت ایتالیک نشان داده شده‌اند. الگوی جایگزینی تحت مدل تامورا-نی و با استفاده از روش آماری ML برآورد شده است [۴۰].

جدول ۴. درصد فراوانی نوکلئوتیدهای مختلف در جایگاه

ژنی GPX-1 در جمعیت خزک، راس ۳۰۸ و کل

گونه‌های حیوانی

نوکلوئوتید	تعداد نمونه	A	T/U	C	G
توده خزک (درصد)	۵	۱۷/۸	۱۵/۴	۳۷/۹	۲۸/۹
راس ۳۰۸ (درصد)	۴	۱۷/۷	۱۴/۸	۳۸/۴	۲۹/۱
خزک+ راس ۳۰۸ (درصد)	۹	۱۶/۸۸	۱۵/۵۲	۳۸/۸۸	۲۸/۷۲
کل جمعیت (درصد)	۴۹	۲۰/۰۱	۱۹/۴۹	۳۴/۱۹	۲۶/۳۱

در برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی دو توده خزک و راس ۳۰۸ با سایر گونه‌ها نیز مقادیر بالای جایگزینی مربوط به بازهای پیریمیدینی بود، به طوری که این مقدار برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۲۵/۱۵ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین برابر ۱۴/۳۴ درصد مشاهده شد. این مقادیر برای بازهای پورینی کمتر و به ترتیب برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین برابر ۱۲/۸۰ درصد و ۹/۷۳ درصد بودند (جدول ۵). نسبت جهش انتقالی به تقاطعی در این برآورد، ۱/۵۸ محاسبه شد که نشان می‌دهد گونه‌های مورد بررسی نیز برای ژن GPX-1 روند تکاملی داشته‌اند.

جدول ۶. ماتریس برآورد فاصله ژنتیکی (پایین قطر) و اختلاف نوکلئوتیدی (بالای قطر) بین توالی‌های نوکلئوتیدی ژن GPX-1 در

توده خزک و راس ۳۰۸

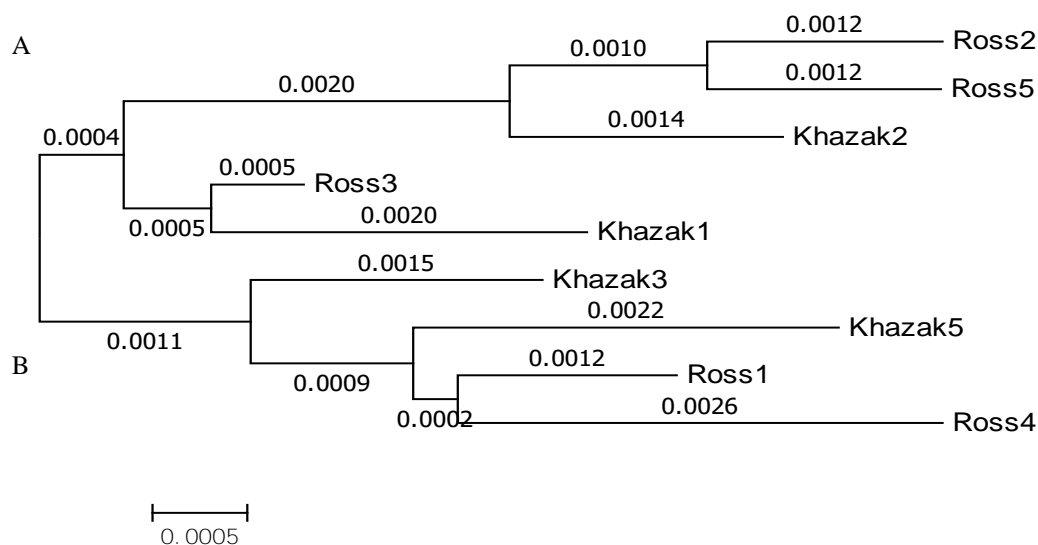
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
Ross1		۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲
Ross2	۰/۰۰۹		۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳
Ross3	۰/۰۰۵	۰/۰۰۴		۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳
Ross4	۰/۰۰۴	۰/۰۱۰	۰/۰۰۶		۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲
Ross5	۰/۰۰۹	۰/۰۰۲	۰/۰۰۴	۰/۰۱۰		۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳
Khazak1	۰/۰۰۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۲	۰/۰۰۹	۰/۰۰۶		۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳
Khazak2	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹	۰/۰۰۴	۰/۰۰۷		۰/۰۰۳	۰/۰۰۳
Khazak3	۰/۰۰۴	۰/۰۰۷	۰/۰۰۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶		۰/۰۰۲
Khazak5	۰/۰۰۴	۰/۰۱۰	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰/۰۱۰	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	

در برآورد واگرایی تکاملی بین توالی‌های نوکلئوتیدی ژن GPX-1 توده خزک و راس ۳۰۸، تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی به‌ازای هر موقعیت از بین توالی نشان داده شده است. برآورد خطای استاندارد بالاتر از قطر نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل ۹ توالی نوکلئوتیدی با استفاده از حداکثر مدل حداکثر درستی [۳۷] و برآورد واریانس، با استفاده از روش بوت استرپ با تکرار ۱۰۰۰۰ انجام شد. موقعیت کدون شامل ۱ + ۲ + ۳ + غیر رمزگذار بود و تمام موقعیت‌های حاوی شکاف‌ها و داده‌های گم شده، حذف شدند. در مجموع ۸۱۷ موقعیت در مجموعه داده‌های نهایی وجود دارد. هر عدد در ردیف نشان‌دهنده اختلاف نوکلئوتیدی و اعداد موجود در ستون بیانگر میزان فاصله ژنتیکی است.

می‌دهد که در بسیاری از موارد، هموپلازی (وقتی که در چند جاندار، یک ویژگی حالت آپومورف خود را به‌صورت جداگانه چند بار نشان دهد) باعث به‌وجود آمدن صفات مشابه، بدون جد مشترک شده است که عوامل محیطی عامل اصلی به‌وجود آمدن آن‌ها هستند [۳۲ و ۴۱].

در این پژوهش، برای رسم درخت فیلوژنتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی دو توده مرغان خزک و راس ۳۰۸ و سایر گونه‌های حیوانی از روش اتصال مجاور (NJ) با بوت‌استرپ ۱۰۰۰۰ و مدل تامورا- نئی استفاده شد (شکل‌های ۵ و ۶). همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد، بررسی درخت فیلوژنتیکی نشان داد که تمام نمونه‌ها در دو گروه A و B قرار دارند. هر چند فواصل بین آنها خیلی کم است، اما تفکیک بین دو جمعیت اتفاق نیفتاد و نتایج نشان داد هرچند جمعیت راس ۳۰۸ یک هیبرید تجاری گوشتی است، اما تعادل در این جایگاه رخ داده تا در مواقع آسیب‌های محیطی عمدتاً ناشی از استرس گرمایی بتواند مقابله کند.

درخت فیلوژنتیکی بیان روابط تکاملی میان‌گروهی با استفاده از خصوصیات همولوگ است. بر اساس نظریه Fitch همولوژی رابطه دو خصوصیت به ارث رسیده و معمولاً همگرا است و این خصوصیت در جد آن‌ها وجود داشته است. صفت می‌تواند، توالی DNA، توالی پروتئین، صفات ظاهری یا ویژگی‌های رفتاری باشد. قبل از استفاده از خصوصیات ژنومی، مرسوم است که اطلاعات مورفولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد تا قرابت بین گونه‌ها را بررسی کنند. پس از تأیید روابط مورفولوژیکی، اطلاعات مولکولی و توالی‌ها برای رسم درختچه مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به اینکه ژنوم جانداران حجم گسترده‌ای از اطلاعات را در خود دارد و بررسی تمام این توالی‌ها بسیار دشوار است، لذا بایستی یک یا چند توالی را از بین توالی‌های ژنوم انتخاب کرد و میان دو یا چند جاندار مورد بررسی قرار داد. بهتر است که در انتخاب توالی بسیار دقت شود. توالی انتخابی باید میان موجودات انتخاب‌شده همولوگ باشد. این عمل به ما نشان



شکل ۵. درخت فیلوژنتیک ژن GPX-1 براساس روش NJ در دو توده مرغان خزک و راس (۰/۰۰۰۵ نرخ جایگزینی نوکلئوتیدها در هر جایگاه).

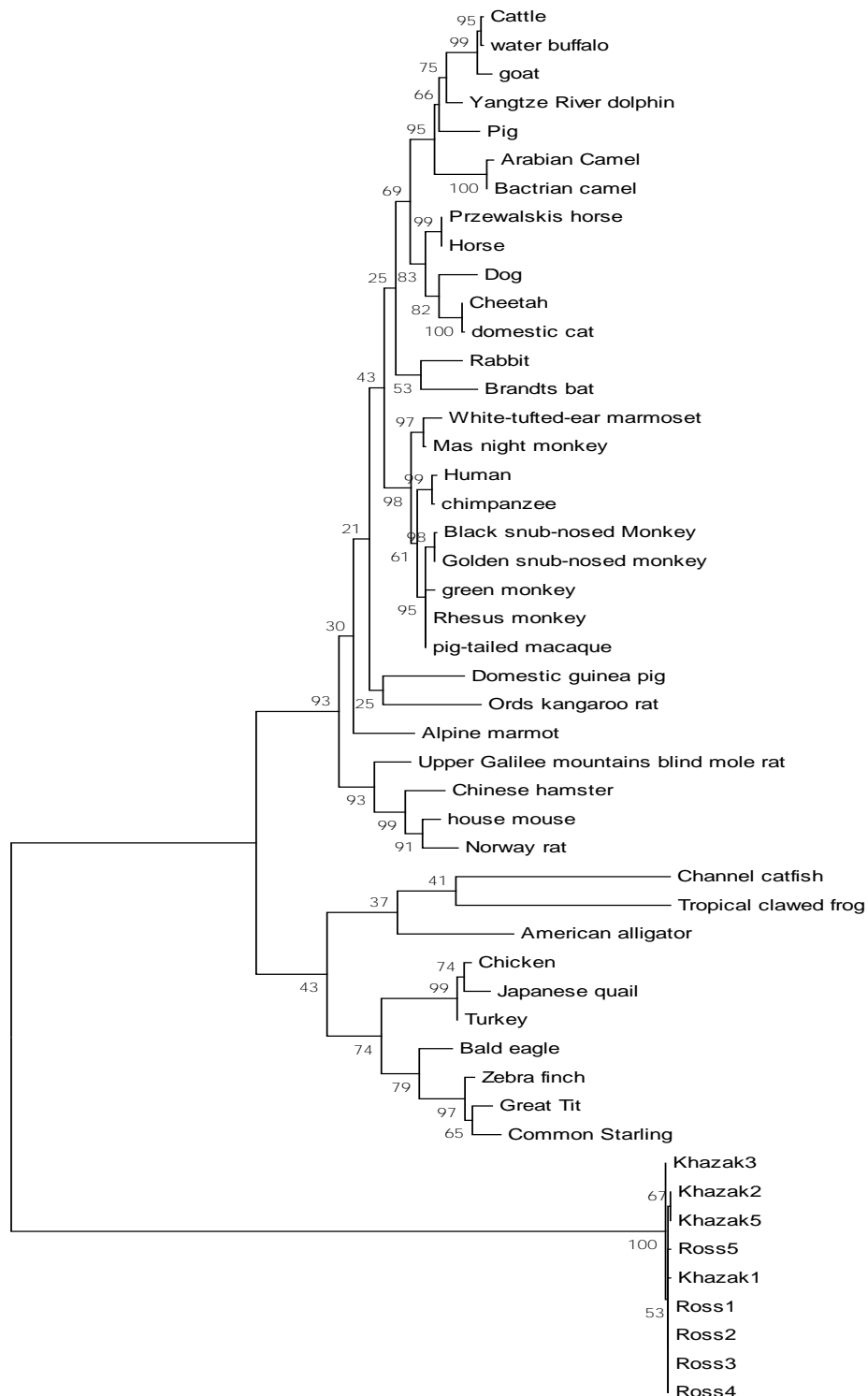
طبقه‌بندی شدند [۲۳]. تجزیه تکاملی توالی نوکلئوتیدی ژن GPX-1 گونه‌های مختلف جانوری را در چهار گروه شامل پستانداران، پرندگان، ماهیان و مخمرها طبقه‌بندی نمود که شباهت زیاد در بین گونه‌های پستانداران را گزارش نمودند. هرچند جهش‌های معدودی نیز یافت شد [۴۰].

نتایج حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند ( $d_N$ ) نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصله نداشته‌اند ( $d_S$ ), یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد [۳۱]. اگر این نسبت بیشتر از یک باشد انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد انتخاب خنثی را در طی تکامل این ژن‌ها نشان می‌دهد [۳۳]. مقدار عددی این نسبت ( $d_N/d_S$ ) برای ژن GPX-1 در دو توده مرغان خزک و راس ۳۰۸ برابر ۱/۶۰ بود (جدول ۷) که روند انتخاب مثبت در طی تکامل برای این ژن را نشان می‌دهد.

در مطالعه روابط تکاملی و فیلوژنتیک در مهره‌داران توالی اسیدهای آمینه جایگاه ژن GPX بیانگر وجود چهار گروه اصلی با سطوح بالای بوت استرایپینگ (بالای ۸۶ درصد) بودند. اولین گروه شامل پستانداران، پرندگان و ماهی‌ها هستند، که توسط جایگاه ژنی GPX-1 رمزگذاری می‌شوند و سایر گروه‌ها مربوط به سایر گروه‌های فامیلی جایگاه ژنی GPX شامل GPX-2, GPX-3, GPX-4, GPX-5 و GPX-6 می‌باشند. نتایج این مطالعات پیشنهاد نمود که مضاعف شدن در جایگاه GPX-1 قبل از تفرق پرندگان و پستانداران رخ داده است [۲۷].

تجزیه فیلوژنتیک توالی ژن GPX-1 هرچند شباهت بالایی را در بین مهره‌داران نشان داد، اما تفاوت‌های جزئی با هم داشتند که موجب گردید تا زیرگروه‌های کوچک‌تر شامل انسان و میمون، موش، خرگوش و در نهایت گاو و خوک ایجاد گردد [۱۴]. همچنین، در مطالعه دیگر تجزیه فیلوژنتیک در مهره‌داران در ناحیه ژنی GPX-1 چهار زیرگروه شامل انسان، خوک و گاو، موش و ماهیان

## نجم‌الدینی و همکاران



0/1

شکل ۶. درخت فیلوژنتیک توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی GPX-1 بر اساس روش NJ در گونه‌های مورد بررسی (۰/۱ نرخ جایگزینی نوکلئوتیدی در هر جایگاه).

## تولیات دایمی

دوره ۲۰ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۷

جدول ۷. تعیین روند انتخاب طبیعی در ژن GPX-1 در دو

توده مرغان خزک و راس ۳۰۸

پارامتر	مقدار عددی	انحراف استاندارد
$d_N$	۰/۰۰۷۴	۰/۰۰۲۴
$d_S$	۰/۰۰۵۳	۰/۰۰۱۹
$d_N/d_S^*$	۱/۴۰	۰/۰۰۲۱

\* مقدار عددی ( $d_N/d_S$ ) نشان‌دهنده روند انتخاب طبیعی.

مقدار عددی این نسبت ( $d_N/d_S$ ) برای ژن GPX-1 در دو توده مرغان خزک و راس ۳۰۸ با گونه‌های دیگر برابر دو محاسبه شد (جدول ۸) که روند انتخاب مثبت در طی تکامل برای این ژن را نشان می‌دهد. این نوع انتخاب سبب به‌وجود آمدن واریته‌های جدید، پروتئین‌های جدید و عملکرد جدید برای این پروتئین‌ها می‌شود. این نوع انتخاب علاوه بر به‌وجود آمدن واریته‌های جدید از طرفی سبب تثبیت عملکرد آن‌ها در طی روند تکامل و پیشرفت در جهت خالص‌سازی عملکرد آن‌ها شده است که ناشی از تبدیل نواحی غیرکدکننده ژنی (ایسترون‌ها) به نواحی کدکننده ژنی (اگزون‌ها) است.

جدول ۸. تعیین روند انتخاب طبیعی در ژن GPX-1 در دو

توده مرغان خزک و راس ۳۰۸ با سایر گونه‌ها

پارامتر	مقدار عددی	انحراف استاندارد
$d_N$	۰/۰۰۶	۰/۰۰۲
$d_S$	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱
$d_N/d_S^*$	۲	۰/۰۰۱

\* مقدار عددی ( $d_N/d_S$ ) نشان‌دهنده روند انتخاب طبیعی.

نتایج مطالعه جایگاه ژنی GPX-1 در دو توده مرغان خزک و راس ۳۰۸ بیانگر پنج جهش تک نوکلئوتیدی بود که سه جایگاه (۱۶۷، ۹۹ و ۴۱) جهش انتقالی رخ داده است یعنی نوکلئوتیدهای پورینی به پورینی تبدیل شده‌اند و دو جایگاه (۸۱۵ و ۷۲۱) جهش تقاطعی که حاصل

تبدیل پورین به پیریمیدین است رخ داده است. در جایگاه ژن GPX-1 تاکنون بیش از ۳۸ ناحیه چندشکل گزارش گردیده است که بیشتر این نواحی چندشکل در دو انتهای ژن قرار دارند که یکی از متداول‌ترین آنها تبدیل باز تیمین به سیتوزین است که منجر به تغییر اسیدآمین پورلین با لوسین می‌شود [۱۳].

به دلیل این که تعداد جایگاه‌های چندشکل به تعداد نمونه وابسته می‌باشند، لذا از پارامتر تنوع نوکلئوتیدی یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید استفاده شد که به طول DNA و اندازه نمونه بستگی ندارد و عبارت از متوسط تفاوت نوکلئوتیدی بین دو توالی در هر جایگاه می‌باشد [۳۰]. تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت مرغان خزک و راس ۳۰۸، ۰/۰۰۹ تخمین زده شد. از آنجایی که مقدار تنوع نوکلئوتیدی حاضر در محدوده‌ی (۰/۰۱۹ - ۰/۰۰۲) است که برای موجودات یوکاریوت ذکر شده است [۳۰]، حاکی از سطح تنوع بسیار پایین در نواحی ژن GPX-1 در دو توده مرغان خزک و راس ۳۰۸ است، علت آن نیز حفاظت شدید نواحی زیادی از ژن مذکور می‌باشد. مناطق حفاظت‌شده DNA در توالی‌های نوکلئوتیدی ژن GPX-1 در دو توده مرغان خزک و راس ۳۰۸، شامل ناحیه یک (۴۵۶-۱۶۸) و ناحیه دو (۷۲۰-۴۵۸) بودند که حد آستانه حفاظت این نواحی برابر با یک و حداقل طول حفاظت آنها ۱۴۷ باز بود.

بنابراین، نتایج مطالعه حاضر بیانگر میزان تنوع پایین در بین دو توده مرغان خزک و راس ۳۰۸ در مقایسه با درون جمعیت‌ها در جایگاه ژن GPX-1 بود. البته جهش‌های معدودی در نواحی اگزونی شناسایی گردید که با تغییر رمز یا کدون همراه بود. بنابراین، انتخاب در طی سالیان متمادی و تکامل گونه‌ها موجب شده است که جایگاه مذکور در مقابل تغییرات ژنتیکی محافظت شود تا در مواجهه با آسیب‌ها و استرس‌های گرمایی بتوانند مقابله

- it? *Molecular & Cellular Oncology*. 2(3): e995047.
10. Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kolle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M and Bornkamm GW (2005) The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Molecular Cell Biology*. 25: 7637-7644.
  11. Conrad M, Schneider M, Seiler A and Bornkamm GW (2007) Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Journal of Biological Chemistry*. 388: 1019-1025.
  12. Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG and Solomon W (2011) Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics*. 161: 1307-1320.
  13. Foster CB, Aswath K, Chanock SJ, McKay HF and Peters U (2006) Polymorphism analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at the glutathione peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. *BMC Genetics*. 7(1): 56-57.
  14. Fukuhara R and Kageyama T (2003) Tissue distribution, molecular cloning, and gene expression of Cytosolic Glutathione Peroxidase in Japanese Monkey. *Zoological Science*. 20: 861-868.
  15. Gugliandolo A, Gangemi C, Calabro C, Vecchio M, Di Mauro D and Renis M (2016) Assessment of Glutathione Peroxidase-1 polymorphisms, oxidative stress and DNA damage in sensitivity-related illnesses. *Life Science*. 145: 27-33.
  16. Hao S, Hu J, Song S, Huang D, Xu H, Qian G, Gan F and Huang K (2016) Selenium alleviates aflatoxin B1-induced immune toxicity through improving Glutathione Peroxidase 1 and selenoprotein S expression in primary porcine splenocytes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 64: 1385-1393.
  17. Havenstein GB, Ferket PR and Qureshi MA (2003) Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*. 82: 1509-1518.
  18. Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, Wang L, Oyama C, Sato K, Nishiyama H, Ogawa O and Kato T (2004) Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *Journal of Urology*. 172: 728-732.
- نمایند، اما تنوع بیشتر در درون هر یک از گونه‌ها می‌تواند راهبردی جهت اجرای برنامه‌های بهبود تولیدات بر پایه انتخاب ژنومی باشد.
- منابع**
1. اصغری مقدم م (۱۳۹۳) بررسی خصوصیات چند نژاد دامی سیستان نسبت به سایر نژادهای دامی ایران. اولین کنفرانس بین‌المللی یافته‌های نوین در علوم کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست، ایران، تهران.
  2. Ahmadi Mazjin M, Salehi Z, and Bahadori M (2015) The study of GPx-1 Pro198Leu polymorphism in idiopathic male infertility. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences*. 22 (1): 76-82.
  3. Aris-Brosou S, and Yang Z (2012) Effects of models of rate evolution on estimation of divergence dates with special reference to the metazoan 18S ribosomal RNA phylogeny. *Systematic Biology*. 51: 703-714.
  4. Bjedov S, Ljubojević DB, Milošević N, Stanačev V, Đukić-Stojčić M and Milić D (2011) Production performance of meat type hybrids. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 27(4): 1689-1696.
  5. Brigelius-Flohe R and Kipp A (2009) Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790: 1555-1568.
  6. Brigelius-Flohe R and Maiorino M (2013) Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830: 3289-303.
  7. Cao XL, Zhao MF, Li DG, Xing Y, Zhang YC, Chen J, He XY, Cui R, Meng JX, Xiao X, Mu J, Jiang YY and Wu RM (2016) Establishment of macrophage model of iron overload in vitro and the injury induced by oxidative stress on macrophage with iron overload. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 96: 129-133.
  8. Cardoso BR, Busse AL, Hare DJ, Cominetti C, Horst MA, McColl G, Magaldi RM, Jacob-Filho W and Cozzolino SM (2016) Pro198Leu polymorphism affects the selenium status and GPx activity in response to Brazil nut intake. *Food and Function*. 7: 825-833.
  9. Conrad M and Friedmann Angeli JP (2015) Glutathione peroxidase 4 (Gpx4) and ferroptosis: what's so special about

19. Jablonska E, Gromadzinska J, Peplonska B, Fendler W, Reszka E and Krol MB (2015) Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity relationship in breast cancer depends on functional polymorphism of GPX1. *BMC Cancer*. 15: 657-662.
20. Kalkan G, Seckin HY, Benli I, Akbaş A, Bas Y and Karakus N (2015) Relationship between manganese superoxide dismutase (MnSODAla-9Val) and glutathione peroxidase (GPx1 Pro 197 Leu) gene polymorphisms and alopecia areata. *International Journal of Clinical Experimental Medicine*. 8: 33-40.
21. Kidir V, Uz E, Yigit A, Altuntas A, Yigit B, Inal S, Uz E, Sezer MT and Yilmaz HR (2016) Manganese superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase gene polymorphisms and clinical outcomes in acute kidney injury. *Renal Failure*. 38: 372-377.
22. Korber B (2000) HIV Signature and Sequence Variation Analysis. *Computational Analysis of HIV Molecular Sequences*, Chapter 4, pages 55-72. Allen G. Rodrigo and Gerald H. Learn, eds. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
23. Li GZ, Liang XF, Yao W, Liao WQ and Zhu WF (2008) Molecular characterization of glutathione peroxidase gene from the liver of silver carp, bighead carp and grass carp. *BMP Reports*. 41(3): 204-209.
24. Librado PR and Rozas J (2009) DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
25. Mandal S, Yadav S, Yadav S and Nema RK (2009) Antioxidants: a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 1: 102-104.
26. Mao J, Vanderlelie J, Perkins AV, Redman CW, Ahmadi KR and Rayman MP (2016) Genetic polymorphisms that affect selenium status and response to selenium supplementation in United Kingdom pregnant women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 103: 100-106.
27. Margis R, Dunand C, Teixeira FK and Margis-Pinheiro M (2008) Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *FEBS Journal*. 275: 3959-3970.
28. Najafi M, Ghasemi H, Roustazadeh A and Farajollahi M (2014) Lack of association between glutathione peroxidase1 (GPx1) activity, Pro198Leu polymorphism and stenosis of coronary arteries: A population-based prediction. *Meta Gene*. 2: 722-729.
29. Namakparvar R, Shariatmadari F and Hossieni SH (2014) Strain and sex effects on ascites development in commercial broiler chickens. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 15(2): 116-121.
30. Nei M and Kumar S (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford; New York: Oxford University Press.
31. Ngandu NK, Scheffler K, Moore P, Woodman Z, Martin D and Seoighe C (2008) Extensive purifying selection acting on synonymous sites in HIV-1 Group M sequences. *Virology Journal*. 5: 1.
32. Petersen G and Seberg O (2003) Phylogenetic analyses of the diploid species of *Hordeum* (Poaceae) and a revised classification of the genus. *Systematic Botany*. 28: 293-306.
33. Phuphuakrat A and Auewarakul P (2003) Heterogeneity of HIV-1 Rev response element. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 19: 569-574.
34. Sabet EE, Salehi Z, Khodayari S, Zarafshan SS and Zahiri Z (2014) Polymorphisms of glutathione peroxidase 1 (GPX1 Pro198Leu) and catalase (CATC-262T) in women with spontaneous abortion. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 60: 304-307.
35. Sattin G, Bakiu R, Tolomeo AM, Carraro A, Coppola D, Ferro D, Patarnello T and Santovito G (2015) Characterization and expression of a new cytoplasmic glutathione peroxidase 1 gene in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Hydrobiologia*. 761: 363.
36. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725-2729.
37. Tamura T, McMicken HW, Smith CV and Hansen TN (1997) Gene structure for mouse glutathione reductase, including a putative mitochondrial targeting signal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 237: 419-422.
38. Vernet P, Rigaudiere N, Ghyselinck N, Dufaure JP, Drevet JR (1996) In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochemistry and Cell Biology*. 74(1): 125-131.

39. Winkler K, Böcher M, Flohé L, Kollmus H, Brigelius-Flohé R (1999) mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *European Journal of Biochemistry*. 259(1-2): 149-57.
40. Yamashita Y, Yabu T, Touhata K and Yamashita M (2012) Purification and characterization of glutathione peroxidase lin the red muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fish Science*. 78: 407-413.
41. Zhang C, Fan X, Yu HQ, Zhang HQ, Wang XL and Zhou YH (2009) Phylogenetic analysis of questionable tetraploid species in *Roegneria* and *Pseudoroegneria* (Poaceae: Triticeae) inferred from a gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Systematics and Ecology*. 37: 412-420.
42. Zhang JX, Wang ZM, Zhang JJ, Zhu LL, Gao XF and Chen SL (2014) Association of glutathione peroxidase-1 (GPx1) rs1050450 Pro198Leu and Pro197Leu polymorphisms with cardiovascular risk: a meta-analysis of observational studies. *Journal of Geriatric Cardiology*. 11(2): 141-50.





## Animal Production

(College of Abouraihan – University of Tehran)

Vol. 20 ■ No. 2 ■ Summer 2018

### Evolutionary and phylogenetic study of Glutathione peroxidase gene in Khazak and Ross 308 populations

Rokhsareh Najmadini<sup>1</sup>, Gholam Reza Dashab<sup>2\*</sup>, Mehdi Vafae Valleh<sup>3</sup>, Nasroallah Moradi Kor<sup>4</sup>

1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
4. Ph.D. Student, Research Center of Physiology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Science, Semnan, Iran.

Received: February 27, 2018

Accepted: May 9, 2018

#### Abstract

Heat stress is one of the most important environmental stressors challenging poultry production worldwide, especially in warm regions such as Sistan and Baluchestan province of Iran. Heat stress increases the production of free radicals in the chicken's body. Glutathione peroxidase plays important roles as cellular antioxidants in heat stress. The aim of this study was to conduct an analysis of the evolutionary and phylogenetic of GPX-1 in Ross 308 and Khazak populations. Blood samples were collected from 10 birds selected randomly from two stocks of Khazak and Ross 308 population (5 Ross 308 and 5 Khazak birds). DNA was extracted from whole blood. PCR amplification of 800 bp of GPX-1 was performed using one pair of special primers. Then, PCR product sent for DNA sequencing. Sequence alignment of the GPX-1 fragment revealed a total of 9 haplotypes and 13 variable sites. Out of 13 polymorphic sites, 5 were singletons. Dendrogram of phylogenetic showing genetic similarity between the two populations, but probably diversity within populations indicate the possibility to improve genetic changes and increase the resistance to environmental stresses using selection. The results of genetic distance and polymorphic site of GPX-1 in different species approved phylogenetic tree findings. Study of positive- selection process showed that selection and evolution are playing major roles in understanding the biological function of this gene.

**Keywords:** Evolution, glutathione peroxidase, hemologous, mutation, phylogenetic.