DOI:10.22092/VJ.2021.352317.1786
شماره ۱۳۴ بهار ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه HVR I D-loop میتوکندری سه نژاد گوسفند بومی ایران (تالشی، شال و ماکویی)

• **محمود نظری (نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان،ملاثانی، ایران
• **غزال محمدی اهوازی**
گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۸-۰۴ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹-۱۰-۱۴
Email: m.nazari@Asnrukh.ac.ir

چکیده

خلوص ژنتیکی نژادهای گوسفند با توجه به تلاقی‌های کنترل نشده رو به کاهش است به همین علت حفظ تنوع زیستی در نژادهای بومی به عنوان یک سرمایه ملی ضرورت دارد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه HVR I D-loop ژنوم میتوکندری، بین سه نژاد گوسفند تالشی، شال و ماکویی بود. جهت انجام آنالیزها از توالی‌های ناحیه D-loop میتوکندری سه نژاد تالشی، شال و ماکویی ذخیره شده در بانک اطلاعاتی NCBI استفاده شد. تنوع نوکلئوتیدی برای نژاد تالشی، شال و ماکویی به ترتیب ۰/۰۴۱۶۰، ۰/۰۴۵۵۲ و ۰/۰۴۴۲۲ و تنوع هاپلوتایپی در هر سه نژاد ۱/۰۰ برآورد شد. همچنین نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) حاکی از آن بود که تنوع درون جمعیت‌ها ۱۰۰ درصد و تنوع بین جمعیت‌ها صفر درصد بود. این نتایج بیانگر وجود تنوع بسیار بالا در این نژادها می‌باشد. محاسبه D تاجیمای منفی برای نژاد تالشی بیان‌کننده این موضوع است که جمعیت نژاد تالشی بعد از گذراندن یک تنگنای ژنتیکی در حال گسترش است و انتخاب جهت‌دار در حال انجام است. در حالی که محاسبه D تاجیمای مثبت برای دو نژاد شال و ماکویی نشان می‌دهد که این دو جمعیت در حال گزینش متعادل‌کننده هستند. با رسم درخت فیلوژنتیک به روش NJ مشخص گردید هر سه نژاد گوسفند در گروه هاپلوتایپی D قرار دارند. از قرارگیری این نژادها در گروه نژادهای قفقاز و ترکیه می‌توان نتیجه گرفت که این سه نژاد از نژادهای قدیمی و باستانی هستند و باید جهت حفظ این سرمایه‌های ملی تلاش بیشتری کرد.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، HVR I، درخت فیلوژنتیک، ژنوم میتوکندری، گوسفند

● Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 31-39

Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial D-loop HVR I region in three breeds of native sheep Iran (Taleshi, Shal and Makui)

By: Nazari, M., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran. and Mohamadi Ahvazi, Gh., Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran.

Received: 2020-10-25 **Accepted: 2021-01-03**

Email: m.nazari@Asnrukh.ac.ir

The genetic purity of sheep breeds is declining due to uncontrolled crossbreeding, so it is essential to preserve biodiversity in native breeds as a national asset. Therefore, the purpose of this study was to investigate the genetic and phylogenetic diversity of the mitochondrial HVR I region between the three Taleshi, Makui and Shal breeds. For this purpose, HVR I sequences of these three breeds were downloaded from NCBI database. Nucleotide diversity for Taleshi, Shawl and Makui breeds calculated 0.0416, 0.04552 and 0.04422, respectively, and haplotype diversity in all three breeds was estimated to be 1.00. In addition, the results of molecular analysis of variance (AMOVA) showed that the diversity within populations was about %100 and in fact the total diversity was included and the diversity between populations was %0. These results indicated high genetic variation in three sheep breeds. Negative Tajima's D for Taleshi breed indicated that the this population is expanding after going through a recent bottleneck and selection sweep is in progress, while positive Tajima's D for shawl and Makui breeds demonstrated that these two populations are balancing selection. The NJ phylogenetic test results indicated that all three breeds of sheep were classified into haplotype D. From the classification of these breeds with the Caucasian and Turkish breeds in one branch, it can be concluded that these three breeds are the ancient breeds of sheep and more efforts should be made to preserve these national assets.

Key words: Genetic diversity, HVR I, phylogenetic tree, mitochondrial genome, sheep

مقدمه

گوسفندان با هدف بهره‌برداری از صفات تولیدی آن‌ها در اکثر نقاط دنیا پرورش داده می‌شوند و به دلیل دارا بودن نقش مهم در جامعه بشری، در پی مهاجرت‌های انسانی در جهان گسترش پیدا کرده‌اند (۲). شواهد حاکی از آن است که اهلی شدن گوسفند به ۱۱۰۰۰ سال قبل باز می‌گردد و گوسفند، بز و گاو از ناحیه آناتولی مرکزی تا شمال کوه‌های زاگرس، اهلی شده‌اند (۲۷). درصد خلوص ژنتیکی نژادهای گوسفند با توجه به تلاقی‌های کنترل نشده رو به کاهش است به همین علت حفظ تنوع زیستی در نژادهای بومی گوسفند به عنوان یک سرمایه ملی، ضروری به نظر می‌رسد. ایران با داشتن وسعت زیاد و همچنین تنوع نژادی نسبتا خوب دارای سابقه فراوان در زمینه پرورش گوسفند بوده است.

مناطق زاگرس شمالی به دلیل اهمیتی که در اهلی کردن گوسفند دارند مورد توجه محققین در سطح بین‌المللی قرار گرفته است. در تحقیقی نشان داده شد که مناطق زاگرس شمالی تا جنوب آناتولیا، مرکز اصلی اهلی شدن گوسفند است و گوسفندان از این مناطق به سایر بخش‌های جهان مهاجرت کرده‌اند (۱۱). از نژادهای بومی که از گذشته‌های دور در این مناطق زندگی می‌کردند گوسفند نژاد ماکویی، شال و تالشی است. گوسفند ماکویی نژادی گوشتی، پشمی با رنگ بدن سفید یکدست است اما لکه‌های سیاه رنگ در اطراف چشم، پوزه و روی زانو مشاهده می‌شود. زیستگاه و پراکنش گوسفند ماکویی، آذربایجان غربی و تا حدودی آذربایجان شرقی است و از بهترین نژادهای گوشتی و پشمی ایران محسوب می‌شود (۲۳) (شکل ۱ - الف). نژاد شال در مناطق دشت قزوین، تاکستان، بوئین زهرا تا کرج نگهداری می‌شود. رنگ آن شکری مایل به خاکستری با سر و دست سیاه است و روی پیشانی لکه سفید رنگی است که گاهی تا پشت سر گوسفند ادامه دارد. گوسفند نژاد شال از جمله نژادهای دنبه‌دار می‌باشد که هدف اصلی پرورش آن، تولید گوشت می‌باشد (۲۳) (شکل ۱- ب). از دیگر نژادهای گوسفند بومی، نژاد تالشی می‌باشد. رنگ آن از سفید تا نخودی با لکه‌های قهوه‌ای روشن تا تیره می‌باشد. در رابطه با گوسفند نژاد تالشی تصور بر این است که این نژاد از جفت‌گیری گوسفند زل با نژاد مغانی بوجود آمده است. زیستگاه اصلی نژاد تالشی، شهرستان تالش در استان گیلان می‌باشد و از تالش تا آستارا و ارتفاعات حیران پراکنده هستند (شکل ۱ – پ).

وجود تنوع ژنتیکی به عنوان مؤلفه‌ی اصلی تکامل، که احتمال بقای

طولانی مدت جمعیت‌ها را ممکن می‌سازد، ضروری می‌باشد. تنوع ژنتیکی به وسیله‌ی چندشکلی پروتئین، نشانگرهای ریزماهواره و تنوع میتوکندریایی در گونه‌های مختلف اهلی و وحشی مورد بررسی قرار گرفته است (۶). یکی از کاربردی‌ترین شیوه‌های تعیین روابط تکاملی بین جمعیت‌ها، DNA میتوکندریایی می‌باشد. DNA میتوکندریایی (mtDNA) از ابزارهای مهم در شناسایی ژنتیک تکاملی و جمعیت حیوانات اهلی بشمار می‌رود. میتوکندری دارای مزایای زیادی از جمله نرخ جهش بالا (۳، ۱۸)، وراثت مادری و داشتن ناحیه بسیار متغیر D-loop یا Displacement-Loop می‌باشد. میتوکندری در سیتوپلاسم تمامی سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد و قادر به تولید انرژی برای سلول می‌باشد. ژنوم میتوکندری ۳۷ ژن را در گونه‌های جانوری کد می‌کند (۲۴). Displacement-Loop یا D-loop یکی از بخش‌های مهم و ناحیه بسیار متغیر در ژنوم میتوکندری است که هیچ پروتئینی را کد نمی‌کند و با فرکانس بسیار بالا حدود ۱۰ برابر دی‌ان‌آ هسته تمایل به جهش دارد. به دلیل عدم وجود ژن رمزکننده پروتئین در این ناحیه، جهش می‌تواند در آن تجمع یابد (۱۰). در نتیجه، DNA میتوکندریایی ابزاری مهم برای استنتاج فیلوژنتیک و آنالیزهای تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف می‌باشد (۵).

پژوهش‌های زیادی در رابطه با DNA میتوکندریایی گوسفندان ایرانی صورت گرفته است که از جمله می‌توان به تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه HVR-I از ژنوم میتوکندری در گوسفند نژاد مغانی ایران (۱۲)، گوسفند زندی (۱۶) ، قزل، مهربان، قشقایی، بهمئی، قره‌گل و کرمانی (۱۹) عربی، لری و لری‌بختیاری (۱۳) اشاره کرد. اما تحقیقی که به تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه HVR-I سه نژاد مهم شال، ماکویی و تالشی بپردازد گزارش نشده است. لذا با توجه به ضرورت حفظ و نگهداری خلوص نژادهای بومی در ارتباط با موضوع تنوع بالای گونه‌ها و زیرگونه‌ها و همچنین با توجه به مناسب بودن DNA میتوکندریایی در مطالعه و بررسی روابط تکاملی گونه‌های مختلف، بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی، بررسی میزان تنوع موجود و همچنین ترسیم روابط فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه HVR-I از D-loop ژنوم میتوکندری در سه جمعیت از نژاد گوسفندان بومی (تالشی، شال و ماکویی) ایران و بررسی ارتباط آن‌ها با دیگر توالی‌های ثبت شده از گوسفندان خارجی موجود در بانک جهانی ژن NCBI، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام پژوهش حاضر تعداد ۱۲، ۷ و ۱۰ توالی به ترتیب از گوسفندان نژاد تالشی، شال و ماکویی موجود در پایگاه NCBI با هدف تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه HVR-I از D-loop ژنوم میتوکندریایی، استخراج گردید. شکل ۲ پراکندگی و توزیع جغرافیائی این سه نژاد را نشان می‌دهد. کد دسترسی توالی‌های مذکور در جدول ۱ عنوان شده است. پس از استخراج توالی‌های موردنظر از بانک ژن، ابتدا از ابزار BLAST و رویه BLASTN در بانک ژن جهت تعیین شباهت و همولوژی توالی‌های استخراج شده با توالی‌های ثبت شده موجود در NCBI استفاده شد. سپس از رویه Clastal W برنامه MEGA6 جهت همردیفی و مقایسه توالی‌ها استفاده گردید.

تست تاجیما، به منظور شناسایی هرگونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف برآورد و مورد استفاده قر ار گرفت (۲۰).

شاخص‌های تنوع مولکولی از قبیل جهش‌ها، تعداد هاپلوتیپ‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، جایگاه‌های چندشکل، حذف و اضافه، شاخص‌های نواحی حفاظت شده، تعداد جایگاه‌هایی که در آن جایگزینی مشابه اتفاق افتاده و بررسی تنوع با استفاده از نرم‌افزار Dnasp 6.1 انجام گرفت (۱۷). تجزیه واریانس مولکولی بین و درون جمعیت‌ها (AMOVA) از نرم‌افزار Gen Alex۶,۳ استفاده شد (۱۵). در نهایت به منظور رسم درخت فیلوژنی و بررسی رابطه فیلوژنتیکی توالی‌های مورد مطالعه با سایر نژادهای موجود در جهان و تعیین گروه هاپلوتایپی به روش اتصال همسایگی (Neighbor-joining) ، از نرم‌افزار MEGA6 با روش آماری بوت استرپ (۱۰۰۰ تکرار) استفاده گردید (۲۱).

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی سه نژاد گوسفند تالشی، شال و

الف – گوسفند ماکویی　　ب – گوسفند شال　　پ– گوسفند تالشی

شکل۱- فنوتیپ نژادهای بومی گوسفند ایرانی مورد بررسی در این مطالعه. الف) ماکویی، ب) شال، پ) تالشی.

ماکویی به طول ۷۱۰ جفت باز به ترتیب بیانگر ۱۲، ۷ و ۱۰ هاپلوتیپ متفاوت در جمعیت‌های مورد بررسی بود. وجود تعداد هاپلوتیپ‌های بالا در مقایسه با تعداد کل نمونه‌ها احتمالا به دلیل وجود تنوع بالا بین نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. از آنجایی که ناحیه D-loop یک ناحیه بسیار متغیر می‌باشد این تغییرات حاکی از تنوع بالا در توالی‌های مورد بررسی می‌باشد. میانگین درصد فراوانی نوکلئوتیدی آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین در سه جمعیت مختلف از گوسفندان بومی ایران شامل تالشی، شال و ماکویی به ترتیب برابر با ۳۶/۲، ۲۸/۱، ۲۲/۰ و ۱۳/۷ درصد محاسبه شد. با بررسی توالی ژنوم میتوکندری سه نژاد گوسفند تالشی، شال و ماکویی در برآورد میانگین درصد فراوانی نوکلئوتیدی مشخص شد که بیشترین باز آلی به کار رفته در قطعه مورد بررسی آدنین با میانگین ۳۶/۲ و کمترین باز آلی، گوانین با میانگین ۱۳/۷ درصد بوده است (جدول ۲). همچنین جهش‌ها اکثرا از نوع جایگزینی انتقال یعنی جابه‌جایی دو باز پورینی G A→ بودند. نسبت جهش انتقالی به جهش متقاطع در ژنوم میتوکندری بیشتر است. این نسبت نزدیک به ۲۰ بوده که خیلی بیشتر از ژنوم هسته است. این جهش‌ها هم در ناحیه کدکننده و هم در ناحیه کنترل گزارش شده‌اند. در این مطالعه جهش جایگزینی انتقالی بیشتری نسبت به جهش متقاطع در ناحیه مورد سنتز دیده شد. این نتایج با نتایج تحقیقات سجادی‌زجانی و همکاران مطابقت داشت (۱۹).

همچنین نتایج حاصل از بررسی توالی‌های این سه نژاد نشان داد که کمترین تعداد جهش‌های به وقوع پیوسته، در نژاد شال و بیشترین تعداد جهش‌ها در نژاد ماکویی مشاهده گردید که نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های نوکلئوتیدی و جهش در ناحیه مورد بررسی بوده است که با نتایج تحقیق سجادی‌زرجانی و همکاران (۱۹) مطابقت دارد. این محققین ناحیه HVRI از ژنوم میتوکندری را در شش نژاد گوسفند ایرانی (قزل، مهربان، لک‌قشقایی، بهمئی، قره‌گل و کرمانی) را مورد بررسی قرار دادند نتایج آنها نشان داد که بیشترین جهش‌ها در نژاد مهربان و کمترین تعداد در نژادهای کرمانی و قره‌گل به وقوع پیوسته است. همچنین ناحیه HVRI از D-loop میتوکندریایی گوسفند نژاد مغانی مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تعداد ۵ هاپلوتیپ مشاهده گردید. همچنین هیچ جهشی از نوع حذف و اضافه گزارش نگردید (۱۲).

همچنین در بین جمعیت‌های مورد بررسی گوسفند نژاد تالشی دارای بیشترین جایگاه حذف و اضافه و گوسفندان نژاد ماکویی و شال دارای کمترین تعداد، با ۷ جایگاه حذف و اضافه بودند.

میزان تنوع نوکلئوتیدی برای نژاد تالشی، شال و ماکویی به ترتیب ۰/۰۴۱۶۰،، ۰/۰۴۵۵۲ و ۰/۰۴۴۲۲ و تنوع هاپلوتایپی در هر سه نژاد ۱/۰۰ برآورد شد. که این نتایج بیانگر وجود تنوع بسیار بالا و عدم وجود مناطق حفاظت شده در ناحیه HVR-I در جمعیت‌های مورد مطالعه بود (جدول ۳).

تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) یک روش آماری برای مطالعه ساختار جمعیت‌ها و محاسبه میزان تنوع و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها است. با تجزیه و تحلیل توالی‌های سه نژاد مورد مطالعه، نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس مولکولی حاکی از آن بود که تنوع درون جمعیت‌ها حدود ۱۰۰ ٪ و در واقع کل تنوع را شامل شد و تنوع بین جمعیت‌ها صفر درصد بود که با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد (۱۳ و ۱۹). بر اساس نتایج بدست آمده احتمالا از دلایل کاهش تنوع بین جمعیت‌های مورد مطالعه جریان ژنی بالا، آمیزش‌های خویشاوندی و محدود بودن تعداد نمونه‌ها بین جمعیت‌های موردنظر باشد (جدول ۴). مطابق با نتایج این تحقیق، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی سه نژاد گوسفند ایرانی (عربی، لری و لری‌بختیاری) نشان داد که ۹۶ درصد تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها و ۴ درصد بین جمعیت‌ها بود (۱۳). تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی شش نژاد گوسفند ایرانی نشان داد که ۹۳ درصد تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها و ۷ درصد بین

شکل ۲- توزیع جغرافیایی سه نژاد گوسفند تالشی، شال و ماکویی روی نقشه ایران.

جمعیت‌ها بود (۱۹).
معمولا برای بررسی تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف از شاخص تثبیت (FST) استفاده می‌شود. این شاخص معیار مهمی جهت مشخص کردن تفکیک و تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها بشمار می‌رود. ارزش FST نشان‌دهنده سطح تمایز ژنتیکی در بین جمعیت است. طبق این معیار اگر دو جمعیت دارای فراوانی آللی یکسان باشند، تفاوت ژنتیکی بین آن‌ها وجود نداشته و FST برابر صفر است. حال اگر دو جمعیت دارای آلل‌های کاملا متفاوت در هر لوکوس باشند، مقدار FST برابر با یک است. اگر مقادیر FST بین ۰/۰۵ - ۰ باشد، معمولا آن را به عنوان تفاوت ژنتیکی اندک، مقادیر ۰/۲۵ – ۰/۰۵ به عنوان تفاوت ژنتیکی متوسط و مقادیر بیشتر از ۰/۲۵ را تحت عنوان تفاوت ژنتیکی بارز قلمداد می‌کنند (۴). به نظر Wright مقادیر FST زیر ۰/۰۵ در حقیقت نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی ناچیزی نیست (۲۵). مقادیر پایین تمایز ژنتیکی لزوما نشان‌دهنده اثر جریان ژنی نیست بلکه می‌تواند وجود جد مشترک و یا اندازه بزرگ جمعیت را نشان دهد. تحقیقات حاکی از آن است که FST به مهاجرت و پلی‌موفیسم حساسیت پایینی دارد (۱).
آماره FST، ضریب تمایز ژنتیکی (GST)، تعداد متوسط جایگزینی نوکلئوتید در هر جایگاه (DXY) و تعداد جایگزینی خالص نوکلئوتید در هر جایگاه (D_a) بین سه جمعیت گوسفند نژاد تالشی، شال و ماکویی محاسبه شد (جدول ۵). مقادیر FST کوچکتر از ۰/۲۵ و برای تمامی نژادها منفی محاسبه گردید که نشان می‌دهد تمایز قابل توجهی در بین جمعیت‌های مورد مطالعه رخ نداده است. ضریب تمایز GST می‌تواند میزان جریان ژن و رانش ژنتیکی را تا حدی نشان دهد، مقادیر GST محاسبه شده از ۰/۰۰۰۳۸ تا ۰/۰۰۳۹۰ متغیر بود. مقدار G_ST بین گوسفندان نژاد تالشی و شال، بیشترین (۰/۰۰۳۹۰) و کمترین مقدار بین نژادهای ماکویی و تاشی (۰/۰۰۰۳۸) بدست آمد (جدول ۵).
چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی در میان جمعیت‌ها می‌تواند با واگرایی نوکلئوتیدی (DXY) و متوسط تعداد جایگزینی‌های نوکلئوتیدی خالص در هرجایگاه (D_a) نشان داده شود. میزان واگرایی (جایگزینی نوکلئوتیدی به ازای جایگاه) بین سه جمعیت گوسفند بومی ایران بر اساس آزمون واگرایی (DXY) تخمین زده شد. نتایج حاصل از برآورد DXY نشان می‌دهد که تعداد تقریبا مشابه و تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی کمی در هر جایگاه، بین سه جمعیت گوسفند بومی ایران رخ داده است (جدول ۵).
D تاجیما یک تست آماری ژنتیک جمعیت است که به عنوان تفاوت بین دو متغیر تنوع ژنتیکی برای تشخیص هر نوع انحراف از فرضیه تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها محاسبه می‌شود (۲۰). D تاجیما در جمعیت‌های گوسفندان بومی ایران محاسبه گردید.
نتایج بررسی D تاجیما برای سه نژاد گوسفند بومی ایران (تالشی، شال و ماکویی) نشان داد که گوسفندان نژاد شال و ماکویی دارای مقادیر مثبت D و گوسفند نژاد تالشی دارای مقادیر منفی D بودند (جدول ۶). D تاجیما مثبت برای نژاد شال و ماکویی می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که فراوانی آلل‌های کمیاب در این دو نژاد کم است و جمعیت این دو نژاد رو به کاهش است و موازنه رانش ژنتیکی و گزینش متعادل بخش

جدول ۱- کدهای دسترسی توالی‌های مربوط به سه نژاد گوسفند تالشی، شال و ماکویی که از NCBI گرفته شده است.

نژاد دام	تعداد توالی	طول توالی	شماره دسترسی در بانک ژن
گوسفند تالشی	۱۲	۷۱۰	KR۶۹۷۹۹۸,۱ تا KR۶۹۸۰۰۹,۱
گوسفند شال	۷	۷۱۰	KR۶۹۷۹۸۹,۱ تا KR۶۹۷۹۹۵,۱
گوسفند ماکویی	۱۰	۷۱۰	KR۶۹۷۹۷۹,۱ تا KR۶۹۷۹۸۸,۱

جدول ۲-درصد فراوانی نوکلئوتیدهای مختلف ناحیه HVR-I ژنوم میتوکندری در سه نژاد گوسفند بومی ایران.

گوسفندان بومی ایران	نمونه	درصد فراوانی نوکلئوتیدی			
		A	T	C	G
تالشی	۱۲	۳۶/۱	۲۸/۲	۲۱/۹	۱۳/۸
شال	۷	۳۶/۲	۲۸/۰	۲۲/۰	۱۳/۷
ماکویی	۱۰	۳۶/۳	۲۸/۰	۲۲/۱	۱۳/۶
میانگین	-	۳۶/۲	۲۸/۱	۲۲/۰	۱۳/۷

(balancing selection) در حال انجام است. اما D تاجیما منفی برای نژاد تالشی می‌تواند بیان‌کننده این موضوع باشد که فراوانی آلل‌های نادر زیاد است و جمعیت نژاد تالشی بعد از گذراندن یک تنگنای ژنتیکی در حال گسترش است و چند شکلی‌های با فراوانی کم، نسبت به انتظار افزایش یافته است و انتخاب جهت‌دار (selection sweep) در این جمعیت در حال انجام است.

فاصله‌ی ژنتیکی

بدینوسیله از دکتر کسایی فاصله ژنتیکی به عنوان ابزار ساده‌ای در جهت مقایسه‌ی بین جمعیت‌ها به کار می‌رود. برای بررسی فاصله‌ی ژنتیکی، منبع اطلاعاتی ممکن است گروه خونی، جایگاه کدکننده پروتئین و یا فراوانی آللی باشد. در این میان نشانگرهایی که دارای چندشکلی بالایی هستند، جهت بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی دارای ارزش بیشتری می‌باشند (۱۴). دقت برآورد فواصل ژنتیکی تابعی از تعداد جایگاه‌های بررسی شده، هتروزایگوسیتی در هر جایگاه و تعداد نمونه از هر جمعیت است. همچنین افزایش تعداد نمونه و جایگاه‌ها باعث افزایش دقت برآورد فاصله‌ی ژنتیکی می‌شود (۱۴). علاوه بر این اعداد بدست آمده از ماتریس فواصل ژنتیکی بیانگر میزان جانشینی نوکلئوتیدها در بین توالی‌های مورد مطالعه هستند. اگر جمعیت‌های مورد بررسی هیچ آلل مشترک در هیچ جایگاهی نداشته باشند عدد برابر یک و فاصله میان آن‌ها دارای حداکثر مقدار خود است. عدم وجود تفاوت، به معنای فاصله صفر خواهد بود (۹). نتایج بدست آمده از فواصل ژنتیکی بین سه جمعیت گوسفند مورد مطالعه در ارتباط با ناحیه HVR-I از D-loop ژنوم میتوکندری نشان داد که نژاد ماکویی با نژاد شال دارای بیشترین فاصله ژنتیکی با مقدار عددی ۰/۰۴۶ می‌باشد. همچنین نتایج حاکی از آن بود که نژاد تالشی با دو نژاد ماکویی و شال دارای فاصله ژنتیکی یکسان (۰/۰۴۵) می‌باشد (جدول ۷).

فیلوژنتیک علمی است که با در نظر داشتن شباهت‌ها و تفاوت‌های بین گونه‌ها و نژادها، به توضیح روابط تکاملی موجودات می‌پردازد (۷). تاکسونومی و یا علم طبقه‌بندی، انواع موجودات زنده را به گروه‌های

جدول ۳- شاخص‌های تنوع ژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ناحیه HVR-I ژنوم میتوکندری در سه نژاد گوسفند بومی ایران.

نژاد	تعداد جایگاه‌های دارای چندشکلی	تعداد هاپلوتیپ‌ها	تنوع هاپلوتیپی	تنوع نوکلئوتیدی	مجموع جهش ها	میانگین تفاوت نوکلئوتیدی
تالشی	۷۴	۱۲	۱/۰۰۰	۰/۰۴۱۶۰	۷۴	۲۷/۴۵۵
شال	۷۰	۷	۱/۰۰۰	۰/۰۴۵۵۲	۷۰	۳۲/۰۰۰
ماکویی	۷۷	۱۰	۱/۰۰۰	۰/۰۴۴۲۲	۷۷	۳۱/۰۸۹
میانگین			۱	۰/۱۳۱۳۴		

جدول۴- تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی در سه نژاد گوسفند مورد مطالعه.

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مولفه‌های واریانس	درصد تغییرات
بین جمعیت‌ها	۲	۱۵/۰۸۸	۷/۵۴۴	۰	۰٪
درون جمعیت‌ها	۲۶	۳۳۱/۲۵۷	۱۲/۷۴۱	۱۲/۷۴۱	۱۰۰٪
کل	۲۸	۳۴۶/۳۴۵	-	۱۲/۷۴۱	۱۰۰٪

جدول ۵- نتایج حاصل از تمایز ژنتیکی.

D_a	D_{XY}	F_{ST}	G_{ST}	جمعیت۲	جمعیت۱
-۰/۰۰۲۲۶	۰/۰۴۱۹۲	-۰/۰۵۳۸۳	۰/۰۰۳۹۰	شال	تالشی
-۰/۰۰۱۳۷	۰/۰۴۲۱۲	-۰/۰۳۲۵۶	۰/۰۰۰۳۸	ماکویی	تالشی
-۰/۰۰۲۸۷	۰/۰۴۳۲۰	-۰/۰۶۶۳۵	۰/۰۰۱۸۹	ماکویی	شال

بسیار زیادی تقسیم می‌نماید به نحوی که اعضاء هر یک از این گروه‌ها ویژگی‌های یکسان یا مشابهی دارند بدین ترتیب امکان طبقه‌بندی گونه‌ها فراهم می‌شود. در مطالعات تکامل، طبقه‌بندی شامل، تشکیل فیلوژنی نیز می‌گردند. به دلیل نشان دادن مسیرهای تکاملی، از درختان فیلوژنتیک برای درک روابط تکاملی می‌توان استفاده کرد. در واقع شاخه‌ها، فاصله‌ی تکاملی بین یک نژاد با نژاد دیگر را اندازه‌گیری می‌نماید. معمولا برای نشان دادن میزان انشقاق گروه‌ها، طول شاخه‌هایی که آن‌ها را به هم متصل می‌کنند مورد قیاس قرار می‌گیرد (۲۵). آنالیزهای فیلوژنتیک بر مبنای رسم درخت فیلوژنی ابزاری برای جدا کردن جمعیت‌های خاص و مشخص کردن گونه‌های نیازمند به حفاظت است (۲۸).

نتایج درخت فیلوژنتیک نشان داد که گوسفندان ایرانی از یک شاخه اصلی منشا گرفته‌اند و نزدیکی بیشتری نسبت به هم دارند که با وجود منطقه جغرافیایی و منشأ مشترک این نژادها نتایج این درخت فیلوژنی منطقی به نظر می‌رسد (شکل ۳). دو نژاد گوسفند تالشی و ماکویی در یک زیرشاخه و نژاد شال در زیرشاخه‌ای نزدیک به این دو نژاد قرار گرفت. قرار گرفتن دو نژاد تالشی و ماکویی در یک زیرشاخه نشان دهنده‌ی وجود بیشترین تشابه در بین این نژادها است. از آنجایی که دو نژاد از نظر منطقه جغرافیایی، فاصله نسبتا نزدیکی بهم دارند، طبق نتایج بدست آمده قرار گرفتن آنها در یک زیرشاخه منطقی به نظر می‌رسد (شکل ۳).

با توجه به پژوهش‌های مختلفی که بر روی ژنوم میتوکندری گوسفندان اهلی انجام شده است، ۵ گروه هاپلوتایپی مختلف بر اساس مناطق جغرافیایی مشخص شده است (A, B, C, D و E) (۸، ۲۲). هاپلوتایپ‌های A و B، شناخته‌ترین هاپلوتایپ‌ها هستند و اکثر نژادهای گوسفند اهلی جز این دسته هاپلوگروه‌ها قرار می‌گیرند و برای اولین بار توسط وود و فوآ در سال ۱۹۹۶ ثبت و توسط هایندلدر و همکاران (۸) طبقه‌بندی شدند. همچنین، هاپلوگروه C، به مناطق هلال حاصل‌خیز، آسیا، قفقاز و

جدول ۶- نتایج حاصل از تست D تاجیما در سه نژاد گوسفند بومی ایران.

جمعیت	تست Tajima's D
تالشی	-۰/۴۷۶۰۱
شال	۱/۰۵۶۸۱
ماکویی	۰/۸۳۰۱۴

جدول ۷- فاصله ژنتیکی بین سه جمعیت گوسفند بومی ایران.

	ماکویی	شال	تالشی
تالشی			
شال			۰/۰۴۵
ماکویی		۰/۰۴۶	۰/۰۴۵

شبه جزیره لیبی مرتبط می‌شود و کمترین پراکنش را بین هاپلوگروه‌های مختلف دارا می‌باشد. علاوه‌براین، هاپلوتیپ D و E از نادرترین هاپلوتایپ‌ها و به گوسفندان مناطق قفقاز و ترکیه مربوط می‌باشند (۲۲).

همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود هر سه نژاد تالشی، شال و ماکویی در گروه هاپلوتایپی D قرار گرفتند. این موضوع نشان می‌دهد این نژادها جز نژادهای کمیاب، باستانی و قدیمی هستند. زیستگاه هاپلوتیپ D منطقه قفقاز و ترکیه بوده است. به دلیل زیستگاه اصلی این نژادها در مناطق شمال و شمال‌غرب ایران (تالشی: از گیلان تا گردنه حیران، ماکویی: آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی) و همسایگی این مناطق با کشور ترکیه می‌تواند دلیلی بر صحت این ادعا و قرارگیری این نژادها در گروه هاپلوتایپی D باشد. بیشتر نژادهای مناطق مختلف ایران جز گروه A و B هستند و همانطور که قبلا بیان شد گروه D جز نژادهای قدیمی و باستانی است. مطالعه‌ای توسط محمدی‌اهوازی و همکاران (۱۳۹۸) با هدف آنالیز ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه HVRI ژنوم میتوکندری در سه نژاد گوسفند ایرانی (عربی، لری و لری‌بختیاری) صورت گرفت، با بررسی‌های صورت گرفته به این نتیجه رسیدند که گوسفندان نژاد عربی و لری متعلق به گروه هاپلوتایپی B و نژاد لری‌بختیاری متعلق به گروه هاپلوتایپی A می‌باشند (۱۳). پیرخضرانیان و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی بخشی از ناحیه کنترلی ژنوم میتوکندری نژاد زندی، بیان نمودند که این نژاد متعلق به گروه هاپلوتایپی A می‌باشد و کمترین فاصله ژنتیکی را با نژادهای گوسفند ایرانی بلوچی، مغانی و افشاری دارد. (۱۶). همچنین در تحقیقی نژاد مغانی در گروه A طبقه بندی شد (۱۲).

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از ژنوم میتوکندری و تعیین توالی بخشی از HVR-I (D-loop)، می‌تواند برای شناخت دقیق‌تر نژادهای گوسفند بومی به کار رود. هدف از انجام این پژوهش، تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی و ترسیم روابط فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه HVR-I از D-loop ژنوم میتوکندری در سه جمعیت از نژاد گوسفندان بومی (تالشی، شال و ماکویی) ایران و بررسی ارتباط آن‌ها با دیگر نژادهای موجود در جهان بود. نتایج حاکی از وجود تنوع بالا درون، و تنوع پایین بین جمعیت‌های مورد مطالعه بود. از دلایل کاهش تنوع بین جمعیت‌های مورد مطالعه می‌تواند جریان ژنی بالا، آمیزش‌های خویشاوندی و محدود بودن تعداد نمونه‌ها بین جمعیت‌های موردنظر باشد. علاوه براین رسم درخت فیلوژنی نشان داد که گوسفندان ایرانی از یک شاخه اصلی منشا گرفته‌اند و نزدیکی بیشتری نسبت به هم دارند که با وجود منطقه جغرافیایی و منشأ مشترک این نژادها، نتایج این درخت فیلوژنی منطقی به نظر می‌رسد.

همچنین هر سه نژاد تالشی، شال و ماکویی در گروه هاپلوتایپی D قرار گرفتند که نزدیکی زیستگاه اصلی این نژادها و همسایگی این مناطق با کشور ترکیه می‌تواند، دلیلی بر صحت این ادعا و قرارگیری این نژادها در گروه هاپلوتایپی D باشد. فاصله ژنتیکی گوسفندان را می‌توان با مشخص کردن تغییرات mtDNA در طول زمان، تعیین کرد و همچنین در آینده از اطلاعات آن در ژنتیک مولکولی استفاده کرد. از قرارگیری این نژادها در گروه نژادهای قفقاز و ترکیه می‌توان نتیجه گرفت که این سه نژاد از نژادهای قدیمی و باستانی هستند و مسئولین مرتبط باید جهت حفظ این

سرمایه‌های ملی تلاش و برنامه ریزی کنند.

پاورقی‌ها

1- Analysis of molecular variance (AMOVA).

2-fixation index.

3-The genetic differentiation coefficient.

4-average number of nucleotide substitutions persite between populations.

5-net nucleotide substitutions persite between populations.

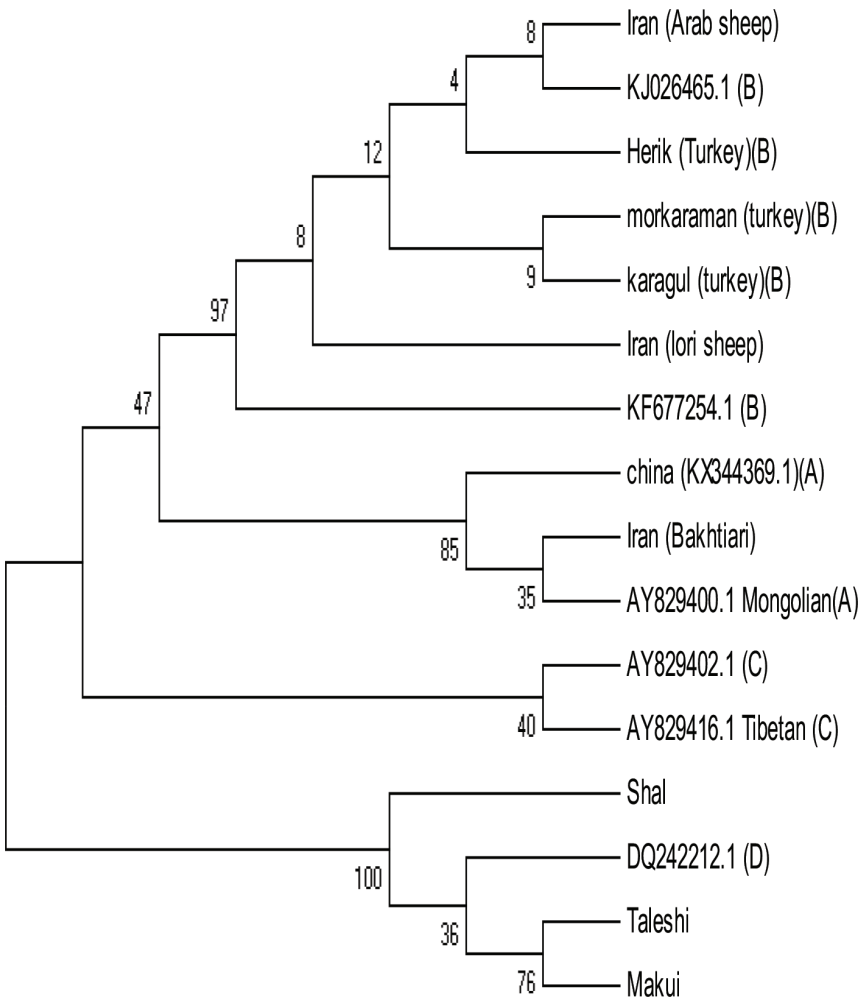
منابع مورد استفاده

1. Balloux, F. and Lugon, M. N. 2002. The estimate of population diffrention with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 11, 155-165.

2. Chessa, B., Pereira, F., Arnaud, F., Amorim, A., Goyache, F., Mainland, I., Kao, R. R., Pemberton, J. M., Beraldi, D., Stear, M. J., Alberti, A., Pittau, M., Iannuzzi, L., Banabazi, M. H., Kazwala, R. R., Zhang, Y. P., Arranz, J. J., Ali, B. A., Wang, Z., Uzun, M., Dione, M. M., Olsaker, I., Holm, L. E., Saarma, U., Ahmad, S., Marzanov, N., Eythorsdottir, E., Holland, M. J., Ajmone-Marsan, P., Bruford, M. W., Kantanen, J., Spencer, T. E. and Palmarini, M. 2009. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. *Science*. 324:532–536.

3. Colombo, F., Marchisio, E., Pizzini, A. and Cantoni, C. 2004. Identification of the goose species (Anser ancer) in Italian mortara salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. *Journal of Meat Science*. 61: 261-294.

4. Freeland, J. 2010. Molecular ecology. Translation: Mansoura



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک رسم شده بر اساس توالی ژنوم میتوکندری در سه نژاد گوسفند ایرانی (تالشی، شال و ماکویی) به روش NJ با استفاده از نرم‌افزار MEGA۶.

Malekian. Mashhad University Jihad Publications, Mashhad. Pp.108-104. (In Farsi).

5. Galtier, N., Nabholz, B., Glemin, S. and Hurst G. D. D. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity. Molecular Ecology. 18: 4541-4550.

6. Harley, E. H., Baumgarten, I., Cunningham, J. and O'Ryan, C. 2005. Genetic variation and population structure inremnant populations of black rhinoceros, Diceros bicornis in Africa. *Molecular Ecology*. vol. 14, no. 10, pp. 2981–2990.

7. Hedrik, P.W. 1999. Genetics of population. Second edition. Jones and Bartlett publshers. Sudbury. MA.USA.

8. Hiendleder, S., Mainz, K., Plante, Y. and Lewalski, H. 1998. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. *Journal of Heredity*. 89: 113–120.

9. Huson, D. H. and Steel, M. 2004. Distances that perfectly mislead. *Systematic Biology*. 53: 327-332.

10. Jazin, E., Soodyall, H., Jalonen, P., Lindholm, E., Stoneking, M. and Gyllensten, U. 1998. Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism. *Nature Genetics*. 18: 109-110.

11. Lv, F. H., Peng, W. F., Yang, J., Zhao, Y. X., Li, W. R., Liu, M. J., Ma, Y. H., Zhao, Q. J., Yang, G. L., Wang, F., Li, J. Q., Liu, Y. G., Shen, Z. Q., Zhao, Sh. G., Hehua, E., Gorkhali, N. A., Vahidi, F., Muladno, M., Naqvi, A. N., Tabell, J., Touru, T. L., Bruford, M. W., Kantanen, J., Han, J. L. and Li, M. H. 2016. Mitogenomic Meta-Analysis Identifies Two Phases of Migration in the History of Eastern Eurasian Sheep. *Molecular. Biology. Evolution*. 32(10):2515–2533.

12. Mohammad hashemi, A., Pirani, N., Nassiri, M.R., Abbassi Daloii, T. and Baghban Kohnegroz, B. 2012. Studying the Partially Sequenced mtDNA Hypervariable Region 1 (HVR1) of Iranian Moghani Sheep. *Annals Biological Research*. 3: 2906-2910.

13. Mohammadi Ahwazi, G., Nazari, M., Mohammadabadi, M. R. and Heidari, R. 2019. Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial HVR1 region in three breeds of Iranian sheep. Modern Genetics Journal. 14: 209-217. (In Farsi).

14. Murray, B. W. 1996. The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite alleles frequency data. *Canada department biology*. 40: 112-114.

15. Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. Gen AlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology. Notes. 6: 288–295.

16. Pirkhzaranian, Z., Razmakbir, M. And Nazifi, N. 2017. Genetic and phylogenetic analysis of part of the mitochondrial genome control region in Zandi sheep. *Journal of Agricultural Biotechnology*. Vol. 9: No. 3. (In Farsi).

17. Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. and Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology Evolution*. 34 (12): 3299-3302.

18. Selionova, M. I., A.-M. M. Aibazov, T. V. Mamontova, I. A. Stolpovsky, S. V. Beketov, S. N. Petrov, V. R. Kharzinova, A. V. Dotsev and N. A. Zinovieva. 2021. Characteristics of the Allele Pool and the Genetic Differentiation of Goats of Different Breeds and their Wild Relatives by Str-Markers. *Archives of Razi Institute*. 76: 1351-1362.

19. Sajjadi Zarjani, Z., Bahraini Behzadi, M. R. And Fardaei, M. 2016. Genetic and phylogenetic analysis of HVR1 region of mitochondrial genome in six Iranian sheep breeds. *Journal of Ruminant Research*. Vol. 4. No. 3. (In Farsi).

20. Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123 (3): 585–95.

21. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution*. 30: 2725-2729.

22. Tapio, M., Marzanov, N., Ozerov, M., Cinkulov, M., Gonzarenko, G., Kiselyova, T., Murawski, M., Viinalass, H. and Kantanen, J. 2006. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Molecular Biology and Evolution*. 23: 1776–1783.

23. Valizadeh, R. 2010. Sheep and goat breeding. Ferdowsi University of Mashhad Publications, Mashhad. pp. 59, 61 and 62. (In Farsi).

24. Wallce, D. C. 1992. Mitochondrial genetics aparadigm for aging and degenertive diseases. *Science.* 256: 628-632.

25. Weir, B. S. 1996. Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. Sinauer associations, INC.

26. Wrigth, S. 1978. Evolution and the Genetics of Population. Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago.

27. Zeder, M. A. 2008. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105: 11597– 11604.

28. Zhang, D. X. and Hewitt, G. M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of papulations: practice, problems and prospets. *Molecular Ecology*. 12: 563-584.