

## تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه HVR-I از ژنوم میتوکندری در گوسفند نژاد افشاری

### Genetic and Phylogenetic Analyses of HVR-I Region of mtDNA in Afshari Sheep Breed

ژانا پیرخضرانیان<sup>۱</sup>، مجتبی طهمورث پور<sup>۲\*</sup>، آرزو محمدهاشمی<sup>۳</sup>، نصرالله پیرانی<sup>۴</sup> و مرجان ازغندی<sup>۵</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۴/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۲

#### چکیده

خلوص ژنتیکی نژادهای گوسفند به علت تلاقی‌های کنترل نشده دستخوش تغییر شده است، استفاده از نشانگرهای ژنتیکی توالی‌یابی ژنوم میتوکندری، یکی از راه‌های بررسی این تغییرات است. هدف از این تحقیق بررسی میزان تنوع ناحیه HVR-I از ژنوم میتوکندری گوسفند نژاد افشاری می‌باشد. برای این منظور از تعداد ۲۰ رأس گوسفندان افشاری غیرخویشاوند نمونه خون جمع‌آوری و پس از استخراج DNA از آنها، ناحیه موردنظر توسط پرایمرهای اختصاصی با تکنیک PCR، تکثیر و قطعات موردنظر توالی‌یابی شدند. با تجزیه داده‌های حاصل، تعداد ۵ هاپلوتیپ در این جمعیت شناسایی شد. مقایسه توالی HVR-I گوسفند افشاری با توالی ناحیه مشابه از ژنوم گوسفندان سایر نژادها، مشخص کرد این نژاد متعلق به گروه هاپلوتیپی A می‌باشد، همچنین مقایسه توالی مذکور گوسفند افشاری با منطقه مشابه در گروه هاپلوتیپی A از ژنوم گوسفندان سایر نژادها، نشان داد که گوسفند افشاری دارای کمترین فاصله ژنتیکی با نژاد بلوچی و مغانی ایران می‌باشد. همچنین تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنی رسم شده برای گروه هاپلوئیدی A نشان داد که احتمالاً قوچ و میش اوربال به‌عنوان منشاء نژاد افشاری و دو نژاد دیگر گوسفند محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ناحیه HVR-I – D-Loop، گوسفند افشاری، هاپلوتیپ

- 
۱. دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
  ۲. استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
  ۳. دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
  ۴. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
  ۵. دانشجوی کارشناسی‌ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
- \*: نویسنده مسوول  
Email: m\_tahmoorespur@yahoo.com

## مقدمه

گوسفند افشاری نژادی گوشتی با رنگ بدن قهوه‌ای روشن تا تیره و به‌ندرت سفید، می‌باشد که در وسعتی قریب به ۲۰۰۰۰ کیلومترمربع در بین استان زنجان و قسمتی از استان‌های آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی و کردستان پراکنده است. به‌دلیل وجود تلاقی‌های کنترل نشده در گله‌های گوسفند خلوص ژنتیکی نژادها در حال از بین رفتن است به همین علت ضرورت استفاده از علم ژنتیک برای شناسایی دام‌های پرتولید بیش از پیش احساس می‌شود. شفق (۱۳۸۶). در بین نشانگرهای ژنتیکی توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تشخیص گونه‌ها و تعیین رابطه فیلوژنی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم می‌باشد. هایندلیدر و همکاران (Hiendleder et al., 2002).

میتوکندری اندامکی دو غشایی است که به‌صورت رشته‌ای یا دانه‌ای در سیتوپلاسم سلول‌های یوکاریوتیک وجود دارد. میتوکندری کانون اصلی تنفس سلولی بوده و براساس تئوری همزیستی، انگل‌های اجباری درون سلولی هستند. در هر سلول هزار الی ۱۰ هزار میتوکندری و در درون هر یک از آنها ۵ تا ۱۰ ژنوم وجود دارد. این ژنوم‌ها و در گونه‌های جانوری ۳۷ ژن را کد می‌کند، که شامل ۱۳ ژن کدکننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کدکننده tRNA و دو ژن کدکننده rRNA می‌باشد. محمدی پسته‌بیک و همکاران (Mohammadi Pestehbig et al., 2001).

ساختار حلقوی DNA میتوکندری (mtDNA) در ترسیم گونه‌ها و ترسیم روابط فیلوژنتیکی دارای مزایایی از جمله، تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول، کوچک بودن اندازه آن نسبت به DNA هسته‌ای، وراثت‌پذیری مادری، هاپلوئید بودن و در نتیجه انجام نشدن فرایند میوز، عدم وجود نوترکیبی در آن‌ها، سرعت بالای تکامل و وجود نواحی حفاظت نشده مانند D-Loop است که آن را برای انجام مطالعات تکاملی گونه‌های نزدیک به هم مناسب نموده است قوتی (2009)؛ زدر و همکاران؛ آزور و همکاران؛ کیم و لی؛ تلتنچا و همکاران؛ شین و همکاران (Zeder et al., 2006; Azor et al., 2004; Kim and Lee, 2002; Teletchea et al., 2005; Xin et al., 2007).

منطقه‌ای به نام D-Loop در ژنوم میتوکندری وجود دارد که ژن رمزکننده پروتئین ندارد و جهش‌ها می‌توانند در آنجا تجمع پیدا کنند. این بخش خود به دو ناحیه متغیر کاملاً مشخص (HVRI) I و (HVRII) II و ناحیه نسبتاً حفاظت شده در بین این دو ناحیه تقسیم می‌شود. این نواحی دارای بالاترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی در افراد مختلف هستند و جهش‌های

ایجاد شده در آن‌ها بدون تغییر به نسل‌های بعد منتقل می‌شود. به‌خاطر این ویژگی‌ها و همچنین تکامل سریع، مطالعه توالی این نواحی در بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط میان گونه‌ها بسیار ارزشمند است. از ناحیه کنترل (D-Loop) ژنوم میتوکندری به‌منظور مطالعه زمان شروع اهلی‌سازی و مطالعات دیرین‌شناسی استفاده می‌شود.

اولین مطالعه بر روی ژنوم میتوکندری گوسفند توسط وود و فلو (Phu and Wood, 1996) صورت گرفت که در این مطالعه دو دسته هاپلوتایپی مختلف A و B برای گوسفند شناسایی شدند. در سال ۱۹۹۸ هایندلیدر و همکاران در ضمن انجام مطالعات هاپلوتایپی دسته C را نیز شناسایی نمودند در این مطالعه شروع اهلی‌سازی گوسفند در حدود ۹۰۰۰ سال پیش تخمین زده شد تاپیو و همکاران (Tapio et al., 2006). یک گروه هاپلوتایپی دیگر (هاپلوتایپ D) را گزارش کرد و همچنین اعلام کرد که تنوع نوکلئوتیدی در گروه هاپلوتایپی A ۰/۰۹٪، در گروه هاپلوتایپی B ۰/۰۱٪ و در گروه هاپلوتایپی C ۰/۰۰۴٪ می‌باشد. بیشترین فراوانی مربوط به هاپلوتایپ B با ۷۱٪ و کمترین فراوانی مربوط به گروه D می‌باشد که تنها در یک مورد در شمال پاکستان یافت شده است. (تاپیو و همکاران، 2006). با توجه به تنوع زیاد گونه‌ها و زیرگونه‌ها، اهمیت نگهداری خلوص نژادهای بومی و اطلاعات ناقص در مورد منشا اهلی شدن گوسفندان ایرانی هدف انجام این پژوهش، بررسی میزان تنوع موجود در گوسفندان نژاد افشاری و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ناحیه HVR-I، D-Loop، میتوکندریایی بود.

## مواد و روش‌ها

## نمونه‌گیری و شرایط نگهداری نمونه و استخراج DNA:

برای انجام این تحقیق تعداد ۲۰ نمونه بیولوژیکی (خون) از یک جمعیت از گوسفندان نژاد افشاری موجود در ایستگاه اصلاح نژاد مزرعه دانشگاه زنجان جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون تا زمان استخراج در لوله‌های حاوی EDTA و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. بعد از استخراج DNA با کیت DIAAtom DNA Prep محصول Iso Gene کشور روسیه، جهت سنجش کمیت و کیفیت از ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش طیف‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND-2000 شرکت THERMO آمریکا استفاده شد.

اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت مواد به شرح زیر بود:

حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای آن شامل ۵۰ نانوگرم DNA، پنج پیکومول از مخلوط آغازگر، یک واحد آنزیم *Taq* پلیمرز، دو میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  ۵۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر پی سی آر ۱۰X و ۱۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. همچنین به منظور تأیید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش PCR، الکتروفورز محصولات این واکنش روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تهیه شده با بافر TBE IX، و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید در ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۲۰ دقیقه انجام پذیرفت و برای تعیین حدود اندازه آن از DNA Ladder 100bp استفاده شد.

طراحی آغازگر:

طراحی آغازگر جهت تکثیر اختصاصی توالی ناحیه HVR-I، D-Loop از mtDNA با استفاده از نرم افزار Primer Premier5 / لایتا (Lalitha, 2000) صورت گرفت. توالی آغازگرهای طراحی شده در تحقیق اخیر به صورت زیر بود:

5'-GAAGTGTGGGGGTACGATTT-3'

5'-TGTATTGAGGACGGGGTTA-3'

واکنش زنجیره ای پلیمرز:

واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ۴۳۲ جفت بازی توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T.personal و در ۳۵ سیکل با برنامه حرارتی موجود در جدول ۱ انجام گرفت.

جدول ۱: برنامه واکنش زنجیره ای پلیمرز

Table 1: Polymerase chain reaction steps

مرحله Steps	واسرشت اولیه Initial denaturation	واسرشت Denaturation	اتصال Annealing	تکثیر Extension	تکثیر نهایی Final extension
دما (درجه سانتی گراد) Temperature (°C)	95	95	55	72	72
زمان (ثانیه) Time (sec)	300	30	30	30	300

MEGA5 با ۱۰۰۰ تکرار و ماتریس فواصل ژنتیکی نیز به کمک رویه Create pairwise comparison نرم افزار CLC رسم گردید.

### نتایج و بحث

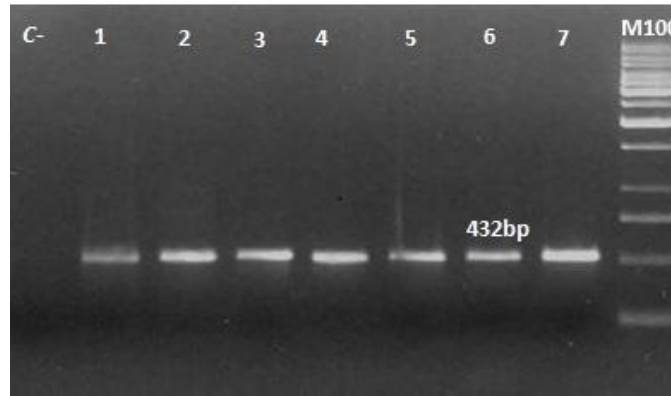
استخراج DNA از تمام نمونه ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار است. بعد از بهینه سازی PCR الکتروفورز آن ها روی ژل ۱ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای ناحیه HVR-1، D-Loop میتوکندری به طول ۴۳۲ جفت باز به خوبی تکثیر شده است (شکل ۱).

تعیین توالی قطعه ۴۳۲ جفت بازی ناحیه HVR-I برای هر ۲۰ نمونه انجام گرفت، اما نتایج حاصل از یکی از نمونه ها به علت کیفیت بسیار پایین کنار گذاشته شد و در آنالیز مورد استفاده قرار نگرفت. با تجزیه و تحلیل توالی ها وجود ۵ هاپلوتایپ در جمعیت مورد مطالعه ثابت شد (جدول ۲). محتوای توالی مورد توافق به دست آمده از هاپلوتایپ ها شامل، ۲۶/۴٪ آدنین، ۲۳/۶٪ سیتوزین، ۱۶/۴٪ گوانین و ۳۳/۶٪ تیمین بود.

توالی یابی ناحیه HVR-I، D-Loop و رسم درخت فیلوژنتیکی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محصولات PCR پس از برش از ژل خالص سازی شد و به همراه ۵۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال شدند. این نمونه ها به روش اتوماتیک و با استفاده از دستگاه AB1 3130 توالی یابی گردیدند.

به منظور تجزیه و تحلیل توالی ها ابتدا کیفیت نتایج تعیین توالی ژن مورد نظر توسط برنامه 2.1(Technelysium, 2007) chromas Lite انجام شد. سپس از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی ها استفاده شد. از نرم افزار CLC Main Workbench 5.5 کنودسن و همکاران (Knudsen, 2007) نیز جهت بررسی همولوژی خود توالی ها با هم و با توالی های موجود در بانک ژن استفاده شد.

تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپی توسط نرم افزار Arlequin 3.5 /کسکوئیر و همکاران (Excoffier et al., 2005) به دست آمد. همچنین به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نمونه های مورد مطالعه با دیگر گونه ها، درخت فیلوژنی با استفاده از رویه Neighbor-Joining، نرم افزار (Tamura, 2011)



شکل ۱: الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به طول ۴۳۲ جفت‌باز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون‌های ۱ تا ۷ نمونه‌های ناحیه HVR-I گوسفندان نژاد افشاری. ستون C- کنترل منفی

Fig. 1: Electrophoresis of a 432 bp fragment on 1.5 % agarose gel, lane 1-7 HVR-I region in Afshari sheep breed and lane C is control negative

جدول ۲: موقعیت جهش‌ها و فراوانی‌های به‌دست آمده برای هاپلوتایپ‌های نژاد افشاری

Table 2: Mutations position and frequency of Afshari sheep breed haplotypes

هاپلوتایپ haplotypes	فراوانی از 19 Frequency of 19	موقعیت position		
		13	29	36
1	1	G	C	T
2	5	-	T	A
3	4	G	T	A
4	5	-	C	A
5	4	G	C	A

قرار گرفت. نی (Nei, 1997). در جدول ۳ تنوع نوکلئوتیدی در مطالعات انجام شده توسط سایر پژوهشگران دیگر آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌کنید تنوع نوکلئوتیدی گوسفندان نژاد افشاری کمتر از گزارش‌های مربوط به گوسفندان نژاد مغانی، بلوچی، بانور هند و همچنین *Ovis orientalis* تاجیکستان، قزاقستان و ترکیه می‌باشد. علت پایین بودن تنوع نوکلئوتیدی در گوسفندان نژاد افشاری احتمالاً دو دلیل داشته باشد یکی کوچکی اندازه نمونه به‌نحوی که ممکن است نمونه مطالعه شده بیانگر سطح تنوع واقعی در جمعیت اصلی گوسفندان نژاد افشاری نباشد و دوماً به‌نظر می‌رسد از آنجایی که اندازه مؤثر جمعیت این گوسفند در کشور کم می‌باشد، ایستگاه‌های تحقیقاتی به‌منظور حفظ این گونه از انقراض، مجبور به تلاقی گوسفندان خویشاوند با هم هستند که این خود می‌تواند باعث کاهش چشمگیر تنوع ژنتیکی شود لازم به ذکر است که نمونه‌های به‌دست آمده جهت انجام این مطالعه همگی از یک مرکز تحقیقاتی می‌باشد که خود می‌تواند دلیلی برای کم بودن تنوع نوکلئوتیدی باشد. با وجود این میزان تنوع نوکلئوتیدی محاسبه شده برای گوسفندان نژاد افشاری نسبت

هاپلوتایپ‌های به‌دست آمده دارای سه جایگاه چندشکل بودند. در دو جایگاه (موقعیت‌های ۲۹ و ۳۶) جهش جانیشینی که حاصل تبدیل نوکلئوتید پورینی به پیریمیدینی است اتفاق افتاده بود و در جایگاه دیگر (موقعیت ۱۳) اضافه شدن نوکلئوتید رخ داده بود. لازم به ذکر است که تمام تغییرات در ۳۶ نوکلئوتید اول رخ داده است. در مطالعه محمد هاشمی (۱۳۸۸) روی گوسفندان نژاد مغانی پنج هاپلوتایپ و ۹ جایگاه چندشکل گزارش شده است. که تعداد جایگاه‌های چندشکل و تعداد هاپلوتایپ‌ها در مطالعه مذکور بیشتر از این مطالعه بود همچنین همه جایگاه‌های چند شکل به‌دست آمده در این تحقیق در مطالعه محمد هاشمی (۱۳۸۸) نیز گزارش شده است.

از آنجایی که تعداد جایگاه‌های چند شکل وابسته به تعداد نمونه هستند، لذا از پارامتر دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ ) یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید نیز استفاده گردید که تحت تأثیر طول DNA و اندازه نمونه نیست. پروری و همکاران (parvari et al., 1988). تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت حاضر به‌دست آمد که در محدوده متوسط تنوع نوکلئوتیدی در یوکاریوت‌ها که بین ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۱۹ می‌باشد

درصد) قرار می‌گیرند که این گزارش نیز می‌تواند قرار گرفتن گوسفند افشاری در گروه هاپلوتایپ A را توجیه کند.

شکل ۲ قادر به تعیین موفقیت کلی گوسفند نژاد افشاری در بین سایر نژادها می‌باشد ولی به‌منظور بررسی و تعیین موقعیت دقیق این نژاد در درون گروه هاپلوتایپ A نیاز به ترسیم یک درخت فیلوژنی برای گونه‌های مربوط به گروه هاپلوتایپ A بود (شکل ۳).

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود گوسفند نژاد افشاری در بین گونه‌های مربوط به هاپلوتایپ A که همه آنها مربوط به گوسفندان آسیا می‌باشد بیشترین قرابت را با گوسفندان بلوچی و مغانی ایران دارد از طرفی نزدیکی این نژاد با گوسفند اورپال ایرانی و نحوه‌ی قرارگیری اورپال ایرانی در درخت نشان می‌دهد که احتمالاً کوچ و میش اورپال به‌عنوان منشاء نژاد افشاری مطرح هستند. البته اثبات کامل این موضوع نیاز به داده‌های بیشتر و همچنین رسم درخت فیلوژنتیکی ریشه‌دار با استفاده از شجره این دو گونه می‌باشد. اما این امر برای نژادهای مورد بررسی می‌تواند صادق باشد. از آنجایی که فواصل ژنتیکی بین حیوانات مختلف به‌صورت دوه‌دو است، اعداد حاصله نماینگر 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 (ماتریکس فواصل ژنتیکی) هم می‌توان برای دوری و نزدیکی ژنتیکی حیوانات مختلف استفاده کرد (جدول ۴).

به گوسفندان هندی نژاد دسانی و گارول مورد مطالعه توسط پاردشی (Pardeshi, 2007) بیشتر می‌باشد.

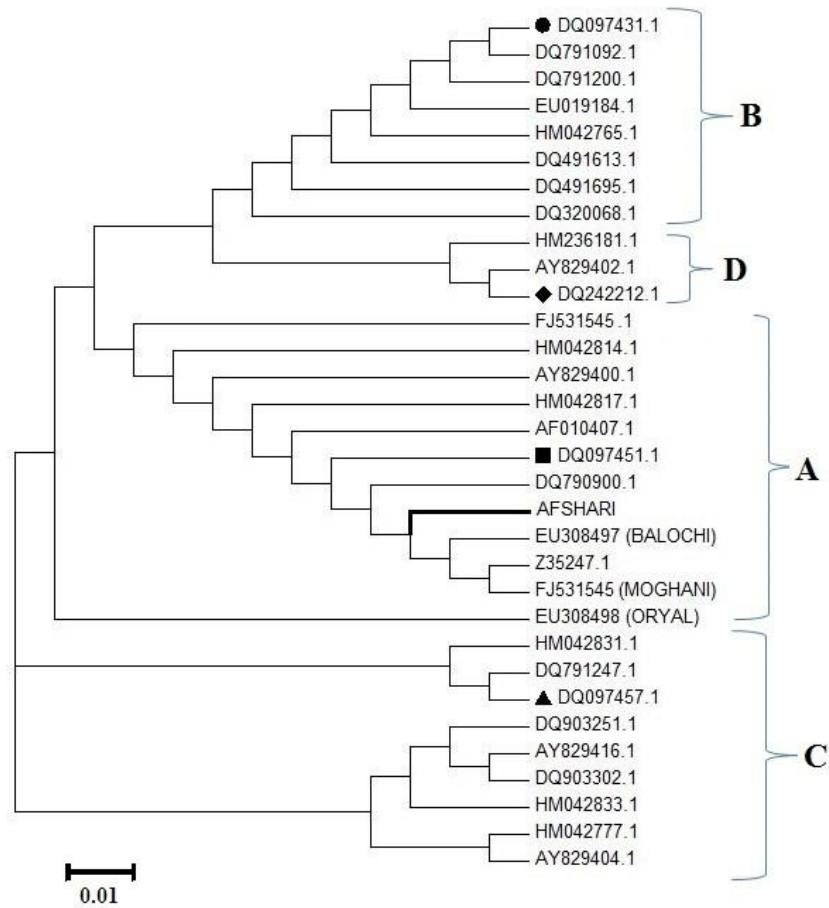
در گوسفندان اهلی تا کنون چهار گروه هاپلوتایپی A, B, C و D تشخیص داده شده است. با مقایسه توالی D-Loop نژاد افشاری با توالی‌های مربوط به این چهار گروه هاپلوتایپی (DQ097457=C, DQ242212=D, DQ097431=B ) (DQ097451=A) به‌عنوان توالی‌های مرجع و همچنین ۲۷ توالی دیگر مربوط به ژنوم میتوکندری نژادهای مختلف گوسفند از سراسر جهان می‌توان موقعیت این نژاد در بین نژادهای دیگر را تعیین نمود و در نهایت برخی تغییرات در خصوصیات مورفولوژیکی نژادها را توجیه نمود. شکل ۲ تعیین گروه هاپلوتایپی با استفاده از نمودار فیلوژنی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود گروه‌های هاپلوتایپی چهارگانه فوق به‌صورت کاملاً تفکیک شده در خوشه‌های مختلف قرار گرفته‌اند، با توجه به نتایج فوق گوسفند نژاد افشاری جزء گروه هاپلوتایپی A طبقه‌بندی می‌شود. قرار داشتن گوسفند نژاد مغانی و گوسفند نژاد بلوچی که بیشتر توسط شفق (۱۳۸۶) و محمد هاشمی (۱۳۸۸) وجود آن در گروه هاپلوتایپی A اثبات شده بود گواه دیگری در تعلق گوسفند نژاد افشاری به این گروه است.

تاپیو و همکاران (2006) در بررسی تنوع ژنوم میتوکندری گوسفندان اروپایی، کاسکازین و آسیا گزارش کردند که بیشتر گوسفندان آسیایی در هاپلوتایپ‌های A (۲۲ درصد) و B (۷۱)

جدول ۳: تنوع نوکلئوتیدی چند نژاد مختلف آسیایی و مقایسه آن با گوسفند نژاد افشاری

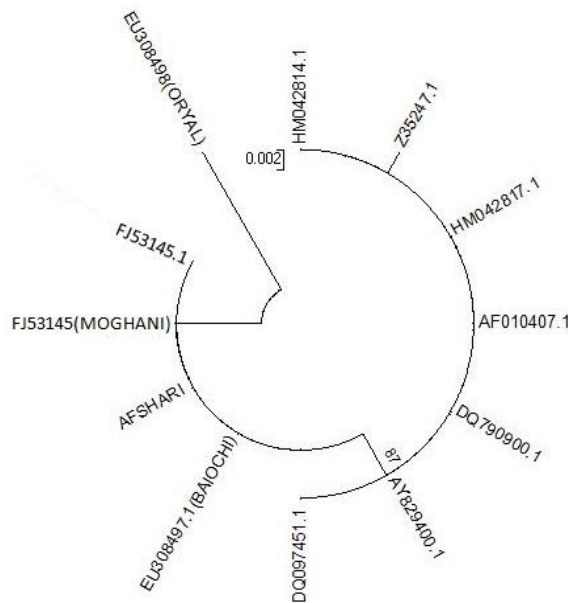
Table 3: Nucleotide diversity of Asian multi-breed and comparison with Afshari sheep

نام محقق Researcher	تنوع نوکلئوتیدی Nucleotide diversity	تعداد نمونه Sampels	گونه Species
مطالعه حاضر Present study	0.00268	19	گوسفند نژاد افشاری Afshari sheep breed
محمد هاشمی، ۱۳۸۸ Mohammadhashemi, 1388	0.0072	10	گوسفند نژاد مغانی moghani sheep breed
شفق، ۱۳۸۶ Shafagh, 1386	0.0100	14	گوسفند نژاد بلوچی baluchi sheep breed
پاردشی، 2007 Pardeshi, 2007	0.00355	21	گوسفند نژاد بانور هند banoor sheep breed
..	0.00167	18	گوسفند نژاد دسانی هند desani sheep breed
..	0.00221	18	گوسفند نژاد گارول هند garol sheep breed
نقاش، 2006 Naghash, 2006	0.0026	25	Ovis orientalis (Pakistan)
..	0.0823	23	Ovis orientalis (Tajikistan)
..	0.0018	4	Ovis orientalis (Uzbekistan)
..	0/0722	20	Ovis orientalis(Kazakhstan)
..	0/0029	7	Ovis orientalis (Turkey)



شکل ۲: درخت فیلوژنی ناحیه HVR-I ترسیم شده با نرم افزار MEGA5 و به روش NG (دایره= گروه هاپلوتایپی B، لوزی= گروه هاپلوتایپی D، مربع= گروه هاپلوتایپی A و مثلث= گروه هاپلوتایپی C)

Fig. 2: Phylogenetic tree using MEGA5 Software and NG method (Circle= B Haplogroup, Rhombic = D Haplogroup, Square = A Haplogroup and Triangle = C Haplogroup)



شکل ۳: درخت فیلوژنی مربوط به گونه‌های گروه هاپلوتایپی A، ناحیه HVR-I ترسیم شده با نرم افزار MEGA5 و روش NG

Fig. 3: Phylogenetic tree using MEGA5 Software and NG method

گرفته‌اند دارای کمترین فاصله ژنتیکی با گوسفند نژاد بلوچی می‌باشد همچنین این دو گونه هیچ‌گونه اختلافی در سطح

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود گوسفند نژاد افشاری در بین گونه‌هایی که در گروه هاپلوتایپی A قرار

زمینه را برای استفاده بهتر از آنها در برنامه‌های اطلا‌حی باز می‌کند. همچنین با توجه به نتایج حاصل شده از این تحقیق می‌توان گفت که استفاده از داده‌های حاصل از توالی ناحیه HVR-I, D-Loop جایگاه نژادهای مختلف گوسفند را نه تنها در بین انواع گونه‌های مختلف حیوانات بلکه در بین نژادهای مختلف گوسفند نیز به‌خوبی نشان می‌دهد. با توجه به این‌که داده‌های جمع‌آوری شده برای این مطالعه مربوط به یک ایستگاه تحقیقاتی می‌باشد که شاید به‌خوبی نتواند نماینده تنوع ژنتیکی ناحیه موردنظر در تمام گله‌های گوسفند نژاد افشاری ایران باشد بدین‌منظور جهت تأیید نتایج حاصل از این تحقیق مطالعه بر روی نمونه‌های بیشتر و نمونه‌گیری از گله‌های مختلف پیشنهاد می‌گردد.

نوکلئوتید با هم ندارند ولی با گوسفند نژاد مغانی دارای دو نوکلئوتید اختلاف می‌باشد. همچنین گوسفند نژاد اوربال ایرانی دارای اختلاف نوکلئوتیدی نسبتاً کمی با گوسفندان افشاری (نه نوکلئوتید)، بلوچی (نه نوکلئوتید) و مغانی (۱۰ نوکلئوتید) دارد که این به نوعی تأییدکننده نتایج حاصل از درخت فیلوژنی برای گونه‌های هاپلوتا‌پ A می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر تعیین توالی نقاطی از DNA میتوکندری برای برخی نژادهای گوسفند در ایران به‌منظور کسب اطلاعات و شناخت دقیق‌تر از نژادهای بومی انجام شده است، اگرچه انجام تحقیقات در مقیاس وسیع و با تعداد نمونه بالا در حال حاضر مقدور نمی‌باشد اما انجام تحقیقات در مقیاس کوچک،

جدول ۴: فواصل ژنتیکی و اختلاف نوکلئوتیدی بین گونه‌های مربوط به گروه هاپلوتا‌پیی A. اعداد مربوط به ردیف، فواصل ژنتیکی و اعداد ستون، اختلاف نوکلئوتیدی بین گونه‌ها را نشان می‌دهند

Table 4: Genetic distance and percent identity between different species Scores in row related to genetic distance and in column related to nucleotide differences

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
HM042814.1	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03
AY829400.1	2	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03
HM042817.1	3	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03
Z35247.1	4	1	1	1	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03
AF010407	5	0	0	0	0	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03
DQ097451.1	6	0	0	0	1	0	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03
DQ790900.1	7	0	0	0	1	0	0	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03
EU308497(BALochi)	8	4	4	4	5	4	4	4	0.00	0.00	0.01	0.02
AFSHARI*	9	4	4	4	5	4	4	4	0	0.00	0.01	0.02
FJ531545(MOGHANI)	10	2	2	2	3	2	2	2	2		0.00	0.02
FJ532545.1	11	4	4	4	5	4	4	4	4	4	2	0.03
EU308498(ORIAL)	12	13	13	13	14	13	13	13	9	9	10	13

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۶-۱۷ متن انگلیسی مراجعه شود.