

**RESEARCH PAPER****OPEN ACCESS**

Study of the genetic structure of the Shin Bash sheep population by molecular markers

A. Javanrouh^{1*}, S. Khodamoradi²

1. Assistant Professor, Animal Science Research Institute of Iran, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Assistant professor, Animal Science Department, Mahabad Branch, Islamic Azad University, Mahabad, Iran

(Received: 12-12-2021 – Accepted: 30-04-2022)

Introduction: West Azerbaijan province is the second most populous sheep province in Iran. In this province, different breeds of sheep such as Makui, Herki, Ghezel, Afshar, and Shin Bash are bred. Shin Bash sheep are bred in the south of West Azerbaijan province, especially in the cities of Mahabad and Piranshahr, and its population is about 200,000. Nowadays, the management of genetic resources and the study of the risk of genetic diversity of populations has become very important. The need to preserve the genetic resources of native livestock and use these genetic resources in the future determines the genetic structure of populations, and the study of the genetic diversity within each population can help manage genetic resources and provide good information for breeding programs. With the development of molecular techniques and the use of molecular markers as a tool to assess genetic diversity, useful information has been provided at various levels such as population structure, gene flow rate, phylogenetic relationships, and genealogy tests. Identification of livestock using various molecular techniques is highly accurate and the results of studies can be used in breeding and management programs. The purpose of this study was to study the genetic structure of Shin Bash sheep using microsatellite markers on the nuclear genome and SNP markers on mitochondrial DNA (mtDNA) and to introduce a lesser-known population.

Materials and methods: To study the genetic structure of the Shin Bash sheep population, 75 blood samples were collected from their geographic regions. Genomic DNA was extracted by using a modified Salting-Out method. Ten microsatellite markers and a control region (CR) of D-Loop belonging to mitochondrial DNA (mtDNA) were studied. Microsatellite loci were amplified in a multiplex PCR. Selected primers were labeled and genotyping was conducted using the Genetic Analyzer system. To analyze the data obtained from microsatellite markers, population parameters include: the Hardy-Weinberg equilibrium test, number of alleles per site, number of effective alleles, observed and expected heterozygosity, Shannon index, and F-statistic were calculated using POPGENE software version 3.1 and GENALEX version 6.5. In this research, Chromas ver. 2.33 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) was used to sort the sequencing data. Thus, the nucleotide sequence of each individual in this software was called and saved after sorting in the FASTA format. Also, to ensure the correct reading of the nucleotides, all sequences were examined using Blast online software at the NCBI site, indicating that this sequence is related to sheep mtDNA. To analyze the data obtained from sequencing in the control region of sheep mtDNA, MEGA version 7.0 and DnaSP version 6.12 were used.

Results and discussion: A Total of 84 alleles were identified; thus, the mean number of alleles per locus was 8.4. A total of 10 microsatellite loci were studied, seven were at Hardy-Weinberg equilibrium and three had significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. Hardy-Weinberg disequilibrium can be caused by an increase in homozygotes vs. heterozygotes or, conversely, a high mutation rate, the formation of new alleles, and the presence of null alleles. The mean expected heterozygosity and observed heterozygosity in this population were 0.724 ± 0.042 and 0.80 ± 0.058 , respectively. The F_{IS} value for this population was -0.108 which showed

* Corresponding author: a.javanrouh@gmail.com



low inbreeding and considerable diversity in the studied population. The results of the control region (CR) of mtDNA showed that haplotype diversity and percentage of the polymorphic site were 0.938 ± 0.039 and 4.59, respectively. A total of 24 sequenced individuals of the control region (CR) of mtDNA and 17 haplotypes were identified in the studied population. The amount of nucleotide diversity in the Shin Bash population was 0.0131 ± 0.0013 per site. The results of this study showed that 50% of the Shin Bash population has haplogroup A, 29.2% haplogroup B, and 20.8% haplogroup C.

Conclusions: The results of this study, using microsatellite markers, showed that the population of Shin Bash sheep has significant genetic diversity. The negative F_{IS} index indicates the observed heterozygosity superiority over the expected heterozygosity and thus indicates non-inbreeding and the existence of acceptable diversity within the Shin Bash sheep population. The results of mtDNA control region sequencing also showed the presence of haplotypic diversity and higher nucleotide diversity in the Shin Bash sheep population. On the other hand, the results of determining haplotype groups showed that this population has all three types of haplotype groups A, B, and C.

Keywords: Genetic characterizations, Shin Bash sheep, Microsatellite marker, Mitochondrial DNA (mtDNA)

How to cite this article:

Javanrouh A. and Khodamoradi S. 2022. Investigation of the genetic structure of Shin Bash sheep populations by molecular markers. Animal Production Research, 11(3): 27-40. doi: 10.22124/AR.2022.21249.1671



مقاله پژوهشی

مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت گوسفند شین بش با استفاده از نشانگرهای مولکولی

علی جوانروح^{۱*}, صلاح الدین خدامرادي^۲

۱- استادیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- استادیار، گروه علوم دامی، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰)

چکیده

در این تحقیق جهت مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت گوسفند شین بش، تعداد ۷۵ نمونه خون از محل پراکنش این حیوانات جمع‌آوری شد. استخراج DNA با روش بهینه یافته Salting-Out انجام گرفت. تعداد ۱۰ جایگاه ریزماهواره و یک ناحیه کنترلی PCR مربوط به DNA میتوکندریائی (mtDNA) مورد مطالعه قرار گرفت. برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره از یک D-Loop چندگانه استفاده شد. آغازگرهای انتخابی نشان دار شده و با استفاده از دستگاه Genetic Analyser تعیین ژنتیپ افراد انجام گرفت. در مجموع، ۸۴ آل در جمعیت مورد مطالعه شناسایی شد، لذا متوسط تعداد آلل به ازای هر نشانگر برابر با $8/4$ بود. میانگین هتروزیگوستی موردنظر و هتروزیگوستی مشاهده شده در این جمعیت به ترتیب برابر با 0.724 ± 0.042 و 0.80 ± 0.058 بود. مقدار F_{IS} در این جمعیت برابر با -0.108 بود که نشان‌دهنده غیرهمخون بودن وجود تنوع قبل توجه در این جمعیت است. نتایج حاصل از ناحیه کنترلی mtDNA نشان داد که میزان تنوع هاپلوتیپی و درصد جایگاه‌های چندشکل در این جمعیت به ترتیب 0.938 ± 0.039 و $4/59$ است. از مجموع ۲۴ نمونه تعیین توالی شده در ناحیه کنترلی mtDNA، تعداد ۱۷ هاپلوتیپ در جمعیت مورد مطالعه مشخص شد. میزان تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت شین بش، 0.131 ± 0.013 به ازای هر جایگاه به دست آمد. نتایج این تحقیق نشان داد که ۵۰ درصد از افراد جمعیت شین بش دارای هاپلوگروه A، ۲۹/۲ درصد افراد دارای هاپلوگروه B و ۲۰/۸ درصد افراد دارای هاپلوگروه C هستند.

واژه‌های کلیدی: خصوصیات ژنتیکی، گوسفند شین بش، نشانگر ریزماهواره، mtDNA میتوکندریائی

* نویسنده مسئول: a.javanrouh@gmail.com

doi: 10.22124/AR.2022.21249.1671

مقدمه

ذخایر ژنتیکی کمک کرده و اطلاعات خوبی را برای شروع برنامه‌های اصلاح نژادی در اختیار متخصصین قرار دهد (FAO, 2007). با پیشرفت فن آوری‌های مولکولی و با استفاده از نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزاری در جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی، اطلاعات مفیدی در سطوح مختلف مانند ساختار جمعیت‌ها، میزان جریان ژن‌ها، ارتباطات فیلوجنتیکی و آزمون انساب فراهم شده است. شناسایی دام‌ها با بهره‌گیری از فناوری‌های مختلف مولکولی، از دقت بالایی برخوردار بوده و از نتایج مطالعات انجام شده می‌توان در برنامه‌های اصلاح نژادی و مدیریتی بهره‌گیری نمود (Beuzen *et al.*, 2000). ریزماهواره‌ها شامل واحدهای ساده تکرارشونده هستند که در سراسر ژنوم یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند که به دلیل همبارز بودن، سیستم چندآلی و تفسیر آسان آلل‌ها به عنوان یکی از مناسب‌ترین نشانگرهای در مطالعات جمعیتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Al-Atiyat *et al.*, 2018). DNA میتوکندریایی (mtDNA) در سیتوپلاسم سلول قرار دارد و تنها از راه مادر به فرزندان منتقل می‌شود. با توجه به وقوع جهش بالا در DNA میتوکندریایی و عدم وجود نوترکیبی در آن، از نشانگرهای موجود در آن می‌توان در پیگیری خطوط مادری و یافتن منشاء نژادها به خوبی استفاده نمود (Ladoukakis and Zouros, 2017). تنوع ژنتیکی، هم تنوع درون نژادی و هم تنوع بین نژادی را شامل می‌شود. متخصصین اصلاح نژاد از تنوع ژنتیکی برای رسیدن به حیوانات اهلی منطبق بر احتیاجاتشان، بهره‌گیری می‌نمایند. فقدان تنوع، قدرت انتخاب موجود برای رفع نیازهای غیرقابل پیش‌بینی آتی را محدود می‌سازد. تنوع درون نژادی پیوسته با ورود تنوع جدید ناشی از جهش مواجه است، ولی تنوع ژنتیکی بین نژادی را نمی‌توان به راحتی بازسازی نمود. هر نژاد یا سوبه حاصل فرآیندهای جهش، رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری مجزایی است که طی قرون متتمادی حاصل شده است (Groeneveld *et al.*, 2010). فشار انتخاب طی زمان تحت تأثیر آب و هوا، انگل‌ها و بیماری‌های بومی، تغذیه و معیارهای وضع شده از سوی انسان تغییر می‌کند. بنابراین می‌توان بیان کرد هر نژاد مجموعه منحصر به فردی از ژنهای است که مخزن ژنی آن نژاد را می‌سازند (Barker, 2001).

هدف از این تحقیق، مطالعه ساختار ژنتیکی گوسفند شین بش با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره روی ژنوم هسته‌ای و نشانگرهای چندشکل تک نوکلئوتیدی یا SNP موجود

هدف از پرورش گوسفند در ایران بیشتر تولید گوشت بوده و سایر فرآوردهای در درجه دوم اهمیت قرار دارند. بر اساس آمار معاونت امور تولیدات دامی کشور در سال ۱۳۹۸، جمعیت گوسفندان ایران بیش از ۴۴ میلیون راس است که استان آذربایجان غربی با دارا بودن بیش از ۷/۸ درصد، بعد از استان خراسان رضوی در رتبه دوم پرورش گوسفند در ایران قرار دارد. در این استان، نژادهای گوسفند قزل، ماکوبی، هرکی، افشاری و شین بش پرورش داده می‌شود و از این نظر نیز یکی از استان‌های دارای تنوع نژادی گوسفند در کشور است. در بین این نژادها، گوسفند شین بش تا حدود زیادی ناشناخته بوده و اطلاعات محدودی در خصوص این نژاد بومی وجود دارد. این نژاد در جنوب استان آذربایجان غربی، به ویژه در شهرهای مهاباد و پیرانشهر پرورش داده می‌شود. این گوسفند به وسیله ایل منگور (غربی و شرقی) نگهداری می‌شود. جمعیت گوسفند شین بش حدود ۲۰۰ هزار راس تخمین زده می‌شود. به نظر می‌رسد گوسفند شین بش با داشتن جثه بزرگ از لحاظ تولید شیر و گوشت برای پرورش دهنده‌گان محلی اهمیت اقتصادی زیادی دارد، ولی به دلیل ناشناخته بودن عملکرد تولیدی و همچنین آمیخته شدن با سایر نژادهای منطقه، جمعیت آن در حال کاهش است. شین بش در زبان کردی به معنی آبی پیشانی سفید است، یعنی رنگ این نژاد، آبی تیره بوده و دارای پیشانی سفید است. چون این منطقه کوهستانی، با زمستان‌های بسیار سرد است، این نژاد به هوای سرد مقاوم بوده و دارای دست و پاهای مناسب برای راهپیمایی در مناطق کوهستانی است (Javanrouh, 2013). باید توجه نمود که مدیریت ذخایر ژنتیکی دام‌های اهلی و حفظ نژادهای بومی جزء وظایف حاکمیتی هر کشور بوده و سازمان‌های جهانی و بین‌المللی از جمله سازمان خوار و بار جهانی (FAO) با همکاری کشورهای مختلف، برنامه‌هایی را در خصوص حفاظت از ذخایر ژنتیکی بومی هر کشور دنبال می‌کند. امروزه مدیریت منابع ژنتیکی و مطالعه میزان در معرض خطر بودن تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها اهمیت زیادی پیدا کرده است. با توجه به ضرورت حفظ ذخایر ژنتیکی دام‌های بومی و استفاده از این منابع ژنتیکی در آینده، تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و بررسی میزان تنوع ژنتیکی در داخل هر جمعیت می‌تواند به مدیریت

و برای mtDNA از غلظت ۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر تهیه شد.

جایگاه‌های ریزماهواره: به منظور مطالعه ساختار ژنتیکی گوسفند شین بش با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، از ۱۰ جایگاه ریزماهواره که دارای بالاترین میزان چندشکلی بودند، استفاده شد (FAO, 2011). آغازگرهای رفت و برگشت برای جایگاه‌های مورد نظر ساخت شرکت Generay Biotech بودند که مشخصات آنها در جدول ۱ ارائه شده است. آغازگرهای رفت (Forward) در انتهای '۵ با دو رنگ فلورستنی FAM (6-carboxy-fluorescein) و HEX (Hexachlorofluorescein) نشان دار شدند. از مجموع ۱۰ آغازگر، تعداد پنج آغازگر با رنگ فلورستنی FAM و پنج آغازگر با رنگ فلورستنی HEX نشان دار شدند. آغازگرهای برگشت (Reverse) به صورت معمولی و بدون رنگ فلورستنی تهیه شدند.

انجام واکنش PCR برای انجام Multiplex PCR با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره، مناسب‌ترین دمای اتصال آغازگرها با استفاده از شیب حرارتی دستگاه ترموسایکلر مشخص شد. سپس با مخلوط کردن هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت و انجام PCR با استفاده از شرایط بهینه شده در جدول ۲، عمل تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره به طور همزمان انجام شد. چرخه حرارتی بهینه برای تکثیر نشانگرهای ریزماهواره در جدول ۳ ارائه شده است. مرحله ۲ تا ۴ به تعداد ۳۰ چرخه حرارتی در برنامه PCR تکرار و عمل تکثیر انجام گرفت.

روی DNA میتوکندریایی و معرفی یک جمعیت کمتر شناخته شده بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های خون: در این تحقیق با همکاری معاونت امور تولیدات دامی استان آذربایجان غربی و جهاد کشاورزی شهرستان مهاباد از تعداد پنج گله گوسفند شین بش در منطقه پراکنش این جمعیت، نمونه‌گیری انجام شد (شکل ۱). در مجموع، نمونه خون از ۷۵ راس دام از این جمعیت تهیه شد (شکل ۲). نمونه‌های خون از سیاه‌رگ و داج و با استفاده از لوله خلاء دار پنج میلی‌لیتری حاوی ماده ضد اعقاد EDTA تهیه شد. سپس نمونه‌ها در شرایط سرد به آزمایشگاه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور منتقل شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۲۰ درجه سیلیسیوس قرار گرفت.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه‌سازی شده انجام شد. پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با دو روش اسپکتروفوتومتری و ژل آگارز DNA و اطمینان از کیفیت مطلوب نمونه‌ها، دو نوع غلظت برای انجام واکنش PCR برای نشانگر ریزماهواره و یک D-Loop ناحیه کنترلی (Control Region) در بخش (Control Region) در بخش مربوط به mtDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای نشانگرهای ریزماهواره، غلظت ۱۰ نانوگرم در هر میکرولیتر



Fig. 1. Geographical distribution and blood sampling sites of Shin Bash sheep in Mahabad city

شکل ۱ - پراکنش جغرافیایی و مناطق تهیه نمونه‌های خون گوسفند شین بش در شهرستان مهاباد



Fig. 2. Shin Bash sheep in Mangoor area of Mahabad city

شکل ۲- گوسفند شین بش در منطقه منگور شهرستان مهاباد

جدول ۱- جایگاه‌های ریزماهواره، توالی آغازگرها، محدوده آللی و نوع رنگ فلورسنتی مورد استفاده برای نشان‌دار کردن آغازگرها

Table 1. Microsatellite loci, primer sequence, allelic range, and type of fluorescent dye used to label primers

Microsatellite loci	(3'-5') Primer sequence	Allelic range (bp)	Chromosome number	Fluorescent dye
OarCP34 (F)	GCTGAACAATGTGATATGTTCAAGG	101–124	3	FAM
OarCP34 (R)	GGGACAATACTGTCTTAGATGCTGC			
OarCP20 (F)	GGCATTTCATGGCTTAGCAGG	71–89	2	FAM
OarCP20 (R)	GTTTGATCCCTGGAGGAGGAAACGG			
MAF70 (F)	CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC	124–166	4	M
MAF70 (R)	GCAGGACTCTACGGGCCTTGC			
MAF214 (F)	AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG	182–264	16	FAM
MAF214 (R)	GGGTGATCTTAGGGAGGTTTGGAGG			
BM6526 (F)	CATGCCAACAAATATCCAGC	161–175	26	FAM
BM6526 (R)	TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC			
MCM42 (F)	CATCTTCAAAAAGAACCTCGAAAGTG	73–103	9	HEX
MCM42 (R)	CTTCCAATCCTCCTAACCTTCGG			
ILSTS11 (F)	GCTTGCTACATGGAAAGTGC	180–296	9	HEX
ILSTS11 (R)	CTAAAATGCAGAGCCCTACC			
OarJMP58 (F)	GAAGTCATTGAGGGTCGCTAAC	145–169	26	HEX
OarJMP58 (R)	CTTCATGTTCACAGGACTTTCTCG			
OarHH35 (F)	AATTGCATTCAAGTATCTTAACATCTGGC	119–139	4	HEX
OarHH35 (R)	ATGAAAATATAAAGAGAATGAACCACACGG			
BM757 (F)	TGGAAACAAATGTAAACCTGGG	176–200	9	HEX
BM757 (R)	TTGAGGCCACCAAGGAACC			

سیستم مؤین الکتروفورز جهت خوانش آلل‌ها استفاده می‌شود. به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای مؤین الکتروفورز، ۱/۵ میکرولیتر از محصول PCR با مقدار ۱۱ میکرولیتر از فرمامید رقیق شده و مقدار ۰/۳ میکرولیتر DNA استاندارد

پس از انجام Multiplex PCR با استفاده از آغازگرها ریزماهواره، جهت تعیین ژنتیک و خوانش آلل‌ها از دستگاه Applied Genetic Analyser 3130 شرکت Biosystem (ABI) آمریکا استفاده شد. در این دستگاه از

جدول ۲- بهینه‌سازی شرایط Multiplex PCR

Table 2. Optimization of Multiplex PCR conditions

Reaction components	Final concentration
Buffer PCR	1X
MgCl ₂	2 mM
Primer mix (F) (labeled)	0.25 μM (each primer)
Primer mix (R)	0.25 μM (each primer)
dNTPs	200 μM
Taq polymerase enzyme	1 unit/reaction
DNA template	10 ng/reaction
dd H ₂ O	Variable
Final volume	15 μL

جدول ۳- چرخه‌های حرارتی Multiplex PCR

Table 3. Multiplex PCR thermal cycles

Row	PCR steps	Temperature (°C)	Time
1	Initial denaturation	95	10 minutes
2	Denaturation	95	45 seconds
3	Annealing	58	1 minute
4	Extension	72	1 minute
5	Final extension	72	10 minutes

CR(R): 5'- AGTATTGAGGACGGGGTAA-3'
 پس از بهینه‌سازی شرایط PCR، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم ۱۵ میکرولیتر برای ۲۵ نمونه انجام شد (جدول ۴). برنامه چرخه حرارتی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf صورت گرفت (جدول ۵). مرحله ۲ تا ۴ به تعداد ۳۵ چرخه حرارتی در برنامه PCR تکرار و عمل تکثیر انجام گرفت. پس از تکثیر ناحیه کنترلی mtDNA، به منظور تعیین توالی محصول PCR به همراه یکی از آغازگرها به شرکت BIO NEER کره جنوبی ارسال شد و تعیین توالی با کیفیت مطلوبی انجام شد (شکل ۳). در این تحقیق از نرم افزار Chromas ver. 2.33 (http://www.technelysium.com.au/chromas.html) جهت مرتب کردن داده‌های تعیین توالی استفاده شد. به این ترتیب، توالی نوکلئوتیدی مربوط به هر فرد در این نرم افزار فراخوانده شد و پس از مرتب کردن در فرمت FASTA صحیح نوکلئوتیدها، تمام توالی‌ها با کمک نرم افزار برخط Blast در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد این توالی مربوط به mtDNA گوسفند است (Boratyn et al., 2012).

با نام تجاری GeneScan-500 LIZ با همدیگر مخلوط و در پلیت دستگاه بارگذاری و عمل ران شدن نمونه‌ها برای تعیین ژنتیپ هر یک از جایگاه‌های ریزماهواره انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نشانگرهای ریزماهواره برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نشانگرهای ریزماهواره، فراسنجه‌های جمعیتی شامل آزمون تعادل هاردی-واینبرگ، تعداد آل در هر جایگاه، تعداد آل موثر، هتروزیگوستی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص شانون و آماره F با استفاده از نرم افزارهای POPGENE نسخه 3.1 (Yeh et al., 1999) و GENALEX نسخه 6.5 محاسبه شد (Peakall et al., 2012).

اجام PCR و تعیین توالی ناحیه کنترلی mtDNA به منظور مطالعه ژنوم میتوکندریالی جهت بررسی ساختار ژنتیکی گوسفند شین بش، از یک ناحیه کنترلی در بخش D-Loop مربوط به mtDNA گوسفند جهت تکثیر و تعیین توالی استفاده شد. این قطعه تکثیری در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۶۰۰۷ و ۱۶۵۳۷ بازی ژنوم میتوکندریالی قرار داشته و طول قطعه تکثیری، ۵۳۱ جفت بازی بود. برای تکثیر این قطعه، از آغازگرهای رفت و برگشت با توالی زیر استفاده شد:

CR (F): 5'- ACTGCTTGACCGTACATAGTAC-3'

جدول ۴- بهینه‌سازی شرایط PCR برای ناحیه کنترلی DNA میتوکندریایی

Table 4. Optimization of PCR conditions for control region (CR) of mtDNA

Reaction components	Final concentration
Buffer PCR	1X
MgCl ₂	2 mM
Primer mix (F) (labeled)	0.25 μM (each primer)
Primer mix (R)	0.25 μM (each primer)
dNTPs	200 μM
Taq DNA polymerase	1 unit/reaction
DNA template	50 ng/reaction
dd H ₂ O	Variable

جدول ۵- چرخه‌های حرارتی PCR برای ناحیه کنترلی mtDNA

Table 5. PCR thermal cycles for Control Region (CR) of mtDNA

Row	PCR steps	Temperatures (°C)	Time
1	Initial denaturation	94	5 minutes
2	Denaturation	94	50 seconds
3	Annealing	51	1 minute
4	Extension	72	1 minute
5	Final extension	72	5 minutes

کنترلی mtDNA در جمعیت مورد مطالعه (۲۴ توالی) اضافه شد.

پس از هم‌دیفی و یکنواخت نمودن طول همه توالی‌ها، تعیین هاپلوگروه‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA ver. 7.0. Maximum گرفت. از پنج روش ترسیم فیلوزنی شامل Maximum Likelihood (ML)، Parsimony (MP) و Neighbour-Joining (NJ). Minimum Evolution (ME) و UPGMA برای تعیین هاپلوگروه‌ها در جمعیت مورد مطالعه استفاده شد. در نهایت به منظور مشخص کردن هاپلوگروه‌ها، با استفاده از نرم افزار BioEdit ver. 7.0.9.0 (Hall, 1999)، یک توالی کلی از این جمعیت تهیه شد و سپس این توالی به دست آمده با توالی‌های اخذ شده از بانک NCBI که مربوط به توالی هاپلوگروه‌های مختلف گوسفند است، مقایسه و هاپلوگروه‌ها مشخص شدند.

نتایج و بحث

کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز سنجیده شد. کیفیت DNA مطلوب بود و مشکلاتی مانند شکستگی DNA، آلدگی‌های شدید نمکی، پروتئینی و RNA مشاهده نشد (شکل ۴). کمیت DNA نیز با کمک دستگاه اسپکتروفتومتری نانودرایپ مدل ND-1000 ساخت شرکت Thermo سنجیده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تعیین توالی در ناحیه کنترلی mtDNA به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تعیین توالی در ناحیه کنترلی mtDNA گوسفند از دو نرم افزار 7.0 (Rozas *et al.*, 2017) MEGA ver. 6.12 (Kumar *et al.*, 2016) DnaSP ver. 6.12 (DnaSP ver. 6.12) استفاده شد. برای تجزیه داده‌ها با نرم افزار MEGA ver. 7.0 ابتدا همه توالی‌های مربوط به این جمعیت در یک فایل ادغام و هم‌ردهی کردن توالی‌های به دست آمده در این نرم افزار انجام شد. پس از آن با توجه به گزینه‌های موجود در نرم افزار، فراسنجه‌های جمعیتی از جمله تنوع ژنتیکی درون جمعیتی محاسبه شد. از طرفی، به منظور محاسبه تعداد هاپلووتیپ‌ها، تنوع هاپلووتیپی، تنوع نوکلئوتیدی و سایت‌های چندشکل از نرم افزار DnaSP ver. 6.12 استفاده شد.

به منظور تعیین گروه‌های هاپلووتیپی در جمعیت مورد مطالعه، تعداد ۳۸ توالی mtDNA مربوط به سه گروه هاپلووتیپی عمدۀ شناسایی شده در گوسفندان جهان، از سایت NCBI در قالب فرمت FASTA اخذ شد. این توالی‌ها شامل ۱۴ توالی مربوط به گروه هاپلووتیپی A، ۱۲ توالی B و ۱۱ توالی مربوط به گروه هاپلووتیپی C بودند. شماره دسترسی این توالی‌ها شامل DQ097468 تا DQ097431 در سایت NCBI قابل مشاهده است. این ۳۸ توالی به توالی‌های به دست آمده از ناحیه

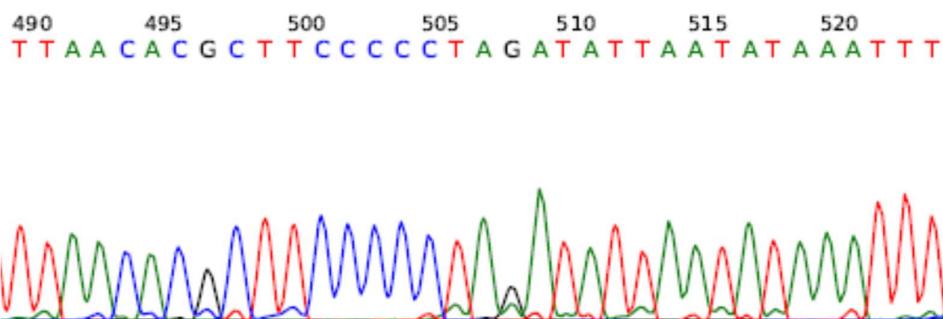


Fig. 3. Sequencing of the terminal position of the control region (CR) of mtDNA in Shin Bash sheep

شکل ۳- تعیین توالی بخش انتهایی ناحیه کنترلی mtDNA در گوسفند شین بش



Fig. 4. Determination of DNA quality by electrophoresis on 1% agarose gel. Numbers 1 to 7 are DNA samples, and M is molecular size marker

شکل ۴- تعیین کیفیت DNA استخراج شده به روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪. شماره های ۱ تا ۷، نمونه های DNA و نشانگر اندازه است

مطابقت دارد. تعداد و فراوانی آلل ها در جایگاه های ریزماهواره مورد مطالعه در مطالعات مختلف متفاوت است و علت اصلی این امر، اختلاف در نژادها، مناطق جغرافیایی مورد مطالعه و روش های استفاده شده در تعیین ژنتیک افراد است.

برای بررسی تعادل هاردی-واینبرگ از آزمون مربع کای استفاده شد. از مجموع ۱۰ جایگاه ریزماهواره مورد مطالعه، هفت نشانگر در تعادل بودند و سه نشانگر نیز انحراف معنی داری از تعادل هاردی- واینبرگ داشتند. عدم تعادل می تواند به دلایل افزایش هموزیگوت ها در برابر هتروزیگوت ها

کلیه نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه پس از بهینه سازی واکنش های PCR تکثیر شدند. تمامی ۱۰ نشانگر مورد استفاده در این تحقیق، تکثیر شده و تنوع نشان دادند. تعداد کل آلل های مشاهده شده برابر با ۸۴ آلل و متوسط تعداد آلل به ازای هر نشانگر برابر با ۸/۴ بود. بیشترین تعداد آلل مربوط به نشانگرهای OarJMP58 و MAF70 (۱۱ آلل) و کمترین تعداد آلل مربوط به نشانگرهای BM757 و BM6526 (پنج آلل) بود. در تحقیقی که روی گوسفندان بومی رومانی انجام گرفت (Dudu *et al.*, 2020)، بیشترین MAF70 تعداد آلل به ازای هر جایگاه مربوط به جایگاه های OarCP49 با ۱۹ آلل بود که با نتایج تحقیق حاضر

آللهای مشاهده شده (N_a)، تعداد آلل‌های موثر (N_e)، هتروزیگوستی مشاهده شده (H_0)، هتروزیگوستی مورد انتظار (H_e)، شاخص رایت (F) و شاخص اطلاعات شانون (I) بودند.

و یا بر عکس، میزان جهش بالا، ایجاد آلل‌های جدید و وجود آلل‌های پوج ایجاد شود (Hedrick, 2000). آمارهای مربوط به ساختار ژنتیکی جمعیت شین بش در جدول ۶ نشان داده شده است. این آمارهای شامل تعداد

جدول ۶- پارامترهای جمعیتی ۱۰ نشانگر ریزماهواره در جمعیت گوسفند شین بش

Table 6. Population parameters for 10 microsatellite markers in Shin Bash sheep population

Microsatellite loci	N_a	N_e	H_0	H_e	F_{IS}	I
OARCP34	9	4.91	0.984	0.796	-0.235	1.86
OARCP20	7	4.04	0.869	0.752	-0.155	1.59
MAF70	11	6.17	0.984	0.838	-0.174	2.01
MAF214	10	6.33	0.949	0.842	-0.127	1.97
BM6526	5	1.67	0.483	0.402	-0.202	0.77
MCM42	10	3.95	0.836	0.747	-0.119	1.67
ILSTS11	10	5.12	0.724	0.805	0.100	1.85
OARJMP58	11	2.66	0.770	0.624	-0.234	1.49
OARHH35	6	3.17	0.500	0.685	0.270	1.41
BM757	5	3.97	0.900	0.748	-0.203	1.49
Mean	8.4	4.20	0.800	0.724	-0.108	1.61
Standard error	0.76	0.47	0.058	0.042	0.052	0.114

هتروزیگوستی مشاهده شده نیز بیشترین و کمترین مقدار، به ترتیب در جایگاه‌های (۰/۹۸۴) MAF70 و (۰/۹۸۴) OarCP34 و (۰/۴۸۳) BM6526 مشاهده شد. مقادیر عددی بسیار بالا نشان دهنده چندشکلی فراوان در جایگاه‌های مزبور است و چنین مقادیری از نشانگر ریزماهواره مورد انتظار است. مقایسه سطوح هتروزیگوستی مشاهده شده و مورد انتظار نشان می‌دهد که در بیشتر موارد، هتروزیگوستی مشاهده شده بیشتر از مورد انتظار است و این باعث منفی شدن شاخص ثبتیت رایت (F_{IS}) شده است و همچنان که مشاهده می‌شود این شاخص منفی نشان می‌دهد که هتروزیگوستی در این جمعیت در حال افزایش است. چون حد نهایی هتروزیگوستی برابر با یک است، و مقدار آن در نشانگرهایی همچون ریزماهواره‌ها در بیشتر موارد بالاتر از ۰/۸ است، از این‌رو مقادیر هتروزیگوستی در نشانگرهای بسیار چندشکل مانند ریزماهواره‌ها نسبت به افزایش تنوع، زیاد حساس نیست. بنابراین مقایسه مقادیر به عنوان معیار تنوع درون جمعیتی برای نشانگرهای بسیار چندشکل همچون ریزماهواره‌ها، مقایسات دقیقی را بیان نمی‌کند. در این موارد، استفاده از شاخص اطلاعات شانون برای مقایسه تنوع موجود در ترکیب جمعیت-نشانگر مناسب‌تر است. میانگین شاخص اطلاعات شانون (I) در جمعیت گوسفند شین بش برابر با ۱/۶۱±۰/۱۱۴ بود. مقدار

یکی از معیارهای سنجش تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت-ها، مقادیر هتروزیگوستی مورد انتظار است. میانگین هتروزیگوستی مورد انتظار در جمعیت شین بش $۰/۷۲۴\pm۰/۰۴۲$ است که تنوع ژنتیکی بالایی را در جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد. میانگین هتروزیگوستی مورد انتظار در واریته‌های مختلف گوسفند بزرگی Morado Nova برابر با ۰/۵۹۶ بود که پایین‌تر از گوسفند شین بش در ایران است (Ferreira *et al.*, 2014). هر چند H_e گزارش شده در یک نژاد بومی گوسفند در ایتالیا برابر با ۰/۷۶۷ بود (Angelo *et al.*, 2009). میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده نیز در جمعیت شین بش برابر با ۰/۰۵۸ است که قابل توجه است. در تحقیقی که روی گوسفندان مصر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام شد (El Nahas *et al.*, 2008)، مقادیر پائین‌تری برای میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده در نژادهای گوسفند مصری گزارش شد $۰/۵۴\pm۰/۲۲$ تا $۰/۶۱\pm۰/۰۲۲$. مقادیر هتروزیگوستی مشاهده شده و مورد انتظار در سطح هر جایگاه نیز محاسبه شد که سطح تغییرپذیری هر جایگاه در هر جمعیت مورد بررسی را نشان می‌دهد. در این میان، بیشترین و کمترین هتروزیگوستی مورد انتظار به ترتیب مربوط به جایگاه‌های (۰/۸۳۸) BM6526 و (۰/۴۰۲) MAF70 بود و در مورد

همه قطعات تعیین توالی شده، بخش‌های ابتدایی و انتهایی این قطعات حذف شدند. به این ترتیب، همه قطعات با طول ۵۰۷ جفت باز جهت تجزیه مورد استفاده قرار گرفتند. بررسی توالی ناحیه کنترلی نشان داد که در جمعیت شین ۴/۵۹ درصد جایگاه‌ها چندشکل هستند و تعداد ۲۳ جایگاه چندشکل در این جمعیت شناسایی شدند. نتایج تجزیه هاپلوتیپ در جمعیت مورد مطالعه در ناحیه کنترلی mtDNA نشان داد که با در نظر گرفتن همه توالی‌های بدست آمده، تعداد ۱۷ هاپلوتیپ با تنوع هاپلوتیپی برابر با ۰/۹۳۸ \pm ۰/۰۳۹ گوسفندان عربی اسپانیا بین ۰/۸۵ تا ۱ گزارش شده است که تا حد زیادی با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد استفاده از ژنوم میتوکندریایی در گوسفندان بومی ترکیه (Pedrosa *et al.*, 2007) همچنین تنوع هاپلوتیپی با انتظار آن بود که اندکی بالاتر از تنوع Oner *et al.*, 2013 نتایج تجزیه تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت مورد مطالعه در ناحیه کنترلی mtDNA نشان داد که با در نظر گرفتن همه توالی‌های حاصله از این جمعیت، میزان تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت شین بسیار برابر با ۰/۰۱۳ \pm ۰/۰۱۳ به ازای هر جایگاه بدست آمد. متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت در این توالی‌ها برابر با ۶/۵۹ بود. از طرفی، مقدار تنا (θ) به ازای هر توالی برابر با ۶/۱۶ و مقدار تنا به ازای هر جایگاه برابر با ۰/۰۱۲ به دست آمد. مقدار تنا (θ)، میانگین تعداد متفاوت جفتی در بین توالی‌های mtDNA است که بر حسب میزان جهش‌های متفاوت در بین افراد محاسبه می‌شود. میانگین تنوع نوکلئوتیدی گزارش شده در هشت نژاد از گوسفندان ترکیه برابر ۰/۰۱۴ Oner *et al.*, 2013 برآورد شد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. همچنین تعداد متغیرهای نوکلئوتیدی در این افراد می‌شود. میزان جهش‌های متفاوت در بین توالی‌ها در این افراد می‌تواند توجه کننده نتایج مشابه به دست آمده باشد. نتایج حاصل روی ۱۷ نژاد از گوسفندان چینی، میزان تنوع نوکلئوتیدی را به طور متوسط و برابر با ۰/۰۱۶ نشان داد که نشان دهنده تنوع نوکلئوتیدی بالاتر در گوسفندان ایران است (Chen *et al.*, 2006). میانگین تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از توالی D-Loop ژنوم میتوکندری در گوسفندان تبتی برابر با ۰/۰۱۹ برآورد شد که اندکی بالاتر از مقدار برآورد شده در گوسفند شین بسیار است (Liu *et al.*, 2016).

برآورد شده شاخص I در این جمعیت، بالاتر از میانگین شاخص I در گوسفندان بومی هند بود. مقدار شاخص I در این نژادها برابر با ۱/۵۶ برآورد شده بود که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالاتر در گوسفند شین بسیار است (Sharma *et al.*, 2020). مقدار Fis بینگر میانگین شاخص ثابتی رایت برای هر نشانگر در هر جمعیت مورد مطالعه است. این مقدادر میانگین برای جمعیت گوسفند شین بسیار با ۰/۱۰۸ است. شاخص Fis در هر جمعیت نشان دهنده کاهش و یا افزایش فراوانی هتروزیگوسمیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسمیتی مورد انتظار در جمعیت موردنظر بوده و انعکاس دهنده سیستم آمیزشی (آمیزش تصادفی و غیرصادفی) در آن است. دامنه تغییرات Fis بین ۱-۱ است. اگر در جامعه تعادل هارדי-واینبرگ وجود داشته باشد، فراوانی هتروزیگوسمیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسمیتی موردنظر بوده و موردنظر با هم برابر بوده و در نتیجه، مقدار Fis برابر با صفر و یا نزدیک به صفر خواهد بود. منفی بودن این شاخص نشان دهنده برتری هتروزیگوسمیتی مشاهده شده نسبت به موردنظر و مثبت بودن آن به معنای کاهش هتروزیگوسمیتی مشاهده شده در برابر هتروزیگوسمیتی موردنظر است. مقدار این شاخص در جمعیت مورد مطالعه منفی است و این نتیجه نشان دهنده زیادتر بودن فراوانی هتروزیگوسمیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسمیتی موردنظر در درون این جمعیت و در نتیجه غیرهمخون بودن و وجود تنوع قابل قبولی در داخل جمعیت مورد مطالعه است. میانگین مقدار Fis در شش نژاد گوسفند بومی ایران برابر با ۰/۱۶۷ برآورد شده است که نشان دهنده کاهش هتروزیگوسمیتی مشاهده شده در برابر موردنظر و بالا بودن میزان همخونی در این جمعیت‌ها است (Molaei *et al.*, 2010). همچنین باید توجه نمود که مقدار بالای Fis نشان می‌دهد که جریان ژنی در بین جمعیت‌ها اتفاق افتاده است. لذا به نظر می‌رسد گوسفند شین بسیار که در مناطق کوهستانی و تا حدی صعب‌العبور شهرستان مهاباد پرورش داده می‌شود، از گزند آمیخته‌گری و اختلاط نژادی دور مانده و خلوص ژنتیکی بالاتری دارد.

به منظور بررسی نتایج تعیین توالی ناحیه کنترلی mtDNA (CR)، پس از هم‌ردیف کردن همه توالی‌های به دست آمده از جمعیت گوسفند شین بسیار، چون در بعضی از قطعات تعیین توالی شده، بخش‌های ابتدایی و انتهایی توالی‌ها به طور ناقص تعیین توالی شده بودند، به منظور یکسان نمودن

2021). به نظر می‌رسد که گونه گوسفند پس از اهلی شدن در منطقه خاورمیانه و آناتولی و ایجاد خطوط مادری مختلف، از راه چند مسیر مختلف دریای کاسپین و نیز جاده ابریشم در مناطق مختلف جهان از جمله کشورهای اوراسیا به صورت نژادهای امروزی توسعه یافته است (Lv *et al.*, 2017; Schroeder *et al.*, 2015).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره نشان داد که جمعیت گوسفند شین بش که یکی از نژادهای بومی ایران است، از تنوع ژنتیکی قابل توجهی برخوردار است. منفی بودن شاخص FIS نشان‌دهنده برتری هتروزیگوستی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوستی مورد انتظار بوده و در نتیجه بیانگر غیرهمخون بودن وجود تنوع قابل قبول در داخل جمعیت گوسفند شین بش است. وجود تنوع ژنتیکی در یک نژاد یا جمعیت دامی، زمینه را برای شروع برنامه اصلاح نژادی هموار می‌کند. به عبارتی جمعیت‌های با تنوع ژنتیکی بالاتر به انجام انتخاب بهتر پاسخ می‌دهند و می‌توان در صفات اقتصادی مورد نظر، بهبود ژنتیکی ایجاد نمود. نتایج تعیین توالی ناحیه کنترلی mtDNA نیز وجود تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی بالاتر را در جمعیت گوسفند شین بش نشان داد. از طرفی، نتایج تعیین گروه‌های هاپلوتیپی نشان داد که این جمعیت مورد مطالعه در ایران دارای هر سه نوع گروه هاپلوتیپی A، B و C است. بنابراین نتایج این تحقیق و مطالعات انجام شده در کشورهای هم‌جوار از جمله ترکیه و کردهستان عراق وجود حداقل سه فرآیند مختلف اهلی شدن گوسفند را در مناطق خاورمیانه و آناتولی نشان می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد، کشور ایران بخصوص نواحی غربی و شمال غربی که یکی از مراکز اهلی شدن گونه گوسفند محسوب می‌شود، در توسعه نژادهای گوسفند امروزی نقش مهمی داشته است. با توجه به پراکنش محدود گوسفند شین بش، احتمال افزایش همخونی و کاهش تنوع ژنتیکی در این جمعیت در آینده وجود دارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود، یک برنامه حفاظتی و توسعه‌ای با مشارکت پرورش‌دهندگان به منظور مدیریت تنوع ژنتیکی در این جمعیت تدوین و اجرایی شود. همچنین تعیین اهداف اصلاحی و اجرای برنامه اصلاح نژادی سبب افزایش بازده اقتصادی در این جمعیت شده و به حفاظت و بهره‌برداری از این نژاد بومی کمک می‌کند.

نتایج تجزیه تنوع درون جمعیتی با استفاده از نرم افزار MEGA ver. 7.0 در جمعیت مورد مطالعه در ناحیه کنترلی mtDNA نشان داد که با در نظر گرفتن همه توالی‌های حاصله از این جمعیت، میزان تنوع درون جمعیتی برابر ۰/۱۱۸۱ است. نتایج تعیین گروه‌های هاپلوتیپی با روش‌های اشاره شده نشان داد که ۵۰ درصد از افراد جمعیت شین بش دارای گروه هاپلوتیپی A، ۲۹/۲ درصد افراد دارای گروه هاپلوتیپی B و ۲۰/۸ درصد افراد دارای گروه هاپلوتیپی C هستند. در یک مطالعه موری، فرآیند توسعه گوسفند پس از اهلی شدن با استفاده از ژنوم میتوکندریایی و کروموزوم Y تشریح شد و نشان داده شد که یکی از مناطق اهلی شدن گوسفند، منطقه خاورمیانه است که کشور ایران را هم شامل می‌شود (Machova *et al.*, 2022). شواهدی از وجود سه خط مادری در گونه گوسفند در منطقه خاورمیانه گزارش شده است که نشان‌دهنده وقوع چند فرآیند مختلف اهلی شدن در گوسفند است، به‌طوری که وجود هر سه گروه هاپلوتیپی A، B و C در همه نژادهای گوسفند مورد مطالعه ترکیه با استفاده از تجزیه توالی‌های D-Loop و سیتوکروم b ژنوم میتوکندری به اثبات رسید (Pedrosa *et al.*, 2005). در مطالعه جدیدتر انجام شده در ۵۳۱ هشت نژاد بومی گوسفند در ترکیه با استفاده از قطعه ۵۰/۷، ۳۰/۷، ۵۰/۴ و ۱۸/۹ درصد تعیین شد که جفت بازی ناحیه کنترلی ژنوم میتوکندری (همان توالی mtDNA در تحقیق حاضر)، فراوانی گروه‌های هاپلوتیپی A و C به ترتیب ۲۹/۸ و ۲۵/۸ درصد شناسایی شدند که تا حد زیادی با نتایج با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Oner *et al.*, 2013). در تحقیقی که با استفاده از تعیین توالی کل ژنوم میتوکندری روی دو نژاد کردهستان عراق انجام شد، گروه‌های هاپلوتیپی A، B و C به ترتیب با فراوانی‌های ۴۵/۲، ۲۵/۸ و ۱۰/۰ درصد شناسایی شدند که تا حد زیادی با نتایج حاضر مطابقت داشت (Mustafa *et al.*, 2018). وجود چهار گروه هاپلوتیپی A، B، C و E در ۱۰ نژاد از گوسفندان بومی ایران با استفاده از توالی ناحیه کنترلی mtDNA مشخص شده است (Rafia and Tarang, 2016). همچنین وجود هر سه گروه هاپلوتیپی در گوسفندان امروزی قزاقستان، قدیمی قزاقستان، هند، چین و اسپانیا شناسایی شده است، به‌طوری که فراوانی گروه هاپلوتیپی A و B به ترتیب در نژادهای گوسفند آسیایی و اروپایی بالاتر است (Pedrosa *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Mukhametzharova *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2020; Tarlykov *et al.*,

همکاری را برای تهیه نمونه‌های خون داشتند، تشکر و
قدردانی می‌شود.

تشکر و قدردانی
از معاونت امور تولیدات دامی استان آذربایجان غربی و نیز
اداره امور تولیدات دامی شهرستان مهاباد که نهایت

فهرست منابع

- Al-Atiyat R. M., Aljumaah R. S., Alshaikh M. A. and Abudabos A. M. 2018. Microsatellite-based genetic structure and diversity of local Arabian sheep breeds. *Frontiers in Genetics*, 9: 408.
- Angelo F. D., Albenzio M., Sevi A., Ciampolini R., Cecchi F., Ciani E. and Muscio A. 2009. Genetic variability of the Gentile di Puglia sheep breed based on microsatellite polymorphism. *Journal of Animal Science*, 87(4): 1205-1209.
- Barker J. S. F. 2001. Conservation and management of genetic diversity: a domestic animal perspective. *Canadian Journal of Forest Research*, 31: 588-595.
- Beuzen N. D., Stear M. J. and Chang K. C. 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*, 60(1): 42-52.
- Boratyn G. M., Schäffer A. A., Agarwala R., Altschul S. F., Lipman D. J. and Madden T. L. 2012. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biology Direct*, 17(7): 12.
- Chen S. Y., Duan Z. Y., Sha T., Xiangyu J., Wu S. F. and Zhang Y. P. 2006. Origin, genetic diversity, and population structure of Chinese domestic sheep. *Gene*, 376: 216-223.
- Dudu A., Popa G. O., Ghiță E., Pelmuș R., Lazăr C., Costache M. and Georgescu S. E. 2020. Assessment of genetic diversity in main local sheep breeds from Romania using microsatellite markers. *Archives Animal Breeding*, 63(1): 53-59.
- El Nahas S., Hassan A., Abou Mossallam A., Mahfouz E., Bibars M., Oraby H. and Hondt H. A. 2008. Analysis of genetic variation in different sheep breeds using microsatellites. *African Journal of Biotechnology*, 7(8): 1060-1068.
- FAO. 2007. The State of the world's animal genetic resources for Food and Agriculture- in brief. Edited by Pilling D. and Rischkowsky B. Rome, Italy.
- FAO. 2011. Guideline on molecular genetic characterization of animal genetic resources. Food and Agriculture Organization. Rome, Italy.
- Ferreira J. S., Paiva S. R., Silva E. C., McManus C. M., Caetano A. R., Façanha D. A. and de Sousa M. A. 2014. Genetic diversity and population structure of different varieties of Morada Nova hair sheep from Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 13(2): 2480-2490.
- Groeneveld L. F., Lenstra J. A., Eding H., Toro M. A., Scherf B., Pilling D., Negrini R., Finlay E. K., Jianlin H., Groeneveld E. and Weigend S. 2010. Genetic diversity in farm animals-a review. *Animal Genetics*, 41(1): 6-31.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hedrick P. W. 2000. Genetics of populations. 2nd Edition, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.
- Javanrouh A. 2013. Determination of genetic relationships of Shin Bash sheep population with Ghezel, Harki, Shal and Zandi breeds using mtDNA and microsatellite markers. The final report of the research project, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. (In Persian).
- Kumar S., Stecher G. and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Ladoukakis E. D. and Zouros E. 2017. Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: rules and exceptions. *Journal of Biological Research-Thessalonike*, 24: 2.
- Liu J., Ding X., Zeng Y., Yue Y., Guo X., Guo T., Chu M., Wang F., Han J., Feng R., Sun X., Niu C., Yang B., Guo J. and Yuan C. 2016. Genetic diversity and phylogenetic evolution of Tibetan sheep based on mtDNA D-Loop sequences. *PloS One*, 11(7): e0159308.
- 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 S. G., Hehua E., Gorkhali N., Vahidi F., Muladno M., Naqvi A. N., Tabell J., Iso-Touru T., Bruford M. W., Kantanen J., Han J. L. and Li M. H. 2015. Mitogenomic meta-analysis identifies two phases of migration in the history of eastern Eurasian sheep. *Molecular Biology and Evolution*, 32: 2515-2533.
- Machová K., Máliková A. and Vostrý L. 2022. Sheep post-domestication expansion in the context of mitochondrial and Y chromosome haplogroups and haplotypes. *Genes*, 13(4): 613.

- Molaei V., Asfouri R., Eskandari Nasab M. P., Ghanbari P. and Nikmard M. 2010. Microsatellite diversity in six Iranian sheep breeds. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 2(2): 178-183. (In Persian).
- Mukhametzharova I., Islamov Y., Shauyenov S., Ibrayev D., Atavliyeva S. and Tarlykov P. 2018. Genetic characterization of Kazakh native sheep breeds using mitochondrial DNA. *Online Journal of Biological Sciences*, 18(3): 341-348.
- Mustafa S. I., Schwarzacher T. and Heslop-Harrison J. S. 2018. Complete mitogenomes from Kurdish sheep: abundant centromeric nuclear copies representing diverse ancestors. *Mitochondrial DNA Part A*, 29(8): 1180-1193.
- Oner Y., Calvo J. H. and Elmaci C. 2013. Investigation of the genetic diversity among native Turkish sheep breeds using mtDNA polymorphisms. *Tropical Animal Health and Production*, 45(4): 947-951.
- Peakall R. and Smouse P. E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Pedrosa S., Arranz J. J., Brito N., Renseigné N., Primitivo F. S. and Bayon Y. 2007. Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep. *Genetics Selection Evolution*, 39(1): 91-103.
- Pedrosa S., Uzun M., Arranz J. J., Gutiérrez-Gil B., San Primitivo F. and Bayón Y. 2005. Evidence of three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1577): 2211-2217.
- Rafia P. and Tarang A. 2016. Sequence variations of mitochondrial DNA displacement-loop in Iranian indigenous sheep breeds. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 6(2): 363-368.
- 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 data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12): 3299-3302.
- Schroeder O., Benecke N., Frölich K., Peng Z., Kaniuth K., Sverchkov L., Reinhold S., Belinskiy A. and Ludwig A. 2017. Endogenous retroviral insertions indicate a secondary introduction of domestic sheep lineages to the Caucasus and Central Asia between the bronze and iron age. *Genes*, 8(6): 165.
- Sharma R., Ahlawat S., Sharma H., Sharma P., Panchal P., Arora R. and Tantia M. S. 2020. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses unveil the genetic structure of native sheep breeds from three major agro-ecological regions of India. *Scientific Reports*, 10(1): 20422.
- 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.
- Tarlykov P., Atavliyeva S., Auganova D., Akhmetollayev I., Loshakova T., Varfolomeev V. and Ramankulov Y. 2021. Mitochondrial DNA analysis of ancient sheep from Kazakhstan: evidence for early sheep introduction. *Heliyon*, 7(9): e08011.
- Yeh F. C., Yang R. and Boyle T. 1999. POPGENE. Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.