



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)

Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of Animal Science Research Institute of Iran.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors received no specific funding for this project.

Acknowledgment: The authors thank the Deputy Director of Animal Production Affairs of West Azerbaijan Province and the Animal Production Affairs Department of Mahabad City for their utmost cooperation in providing blood samples.

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 خدامرادی^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 D-Loop مربوط به DNA میتوکندریایی (mtDNA) مورد مطالعه قرار گرفت. برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره از یک PCR چندگانه استفاده شد. آغازگرهای انتخابی نشان‌دار شده و با استفاده از دستگاه Genetic Analyser تعیین ژنوتیپ افراد انجام گرفت. در مجموع، ۸۴ آلل در جمعیت مورد مطالعه شناسایی شد، لذا متوسط تعداد آلل به ازای هر نشانگر برابر با ۸/۴ بود. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و هتروزیگوسیتی 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 و وجود تنوع قابل 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 به‌دست 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، DNA میتوکندریایی

* نویسنده مسئول: a.javanrouh@gmail.com

مقدمه

هدف از پرورش گوسفند در ایران بیشتر تولید گوشت بوده و سایر فرآورده‌ها 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، ماکویی، 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 دهندگان 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

ذخایر ژنتیکی کمک کرده و اطلاعات خوبی را برای شروع برنامه‌های اصلاح نژادی در اختیار متخصصین قرار دهد (FAO, 2007). با پیشرفت فن‌آوری‌های 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 فیلوژنتیکی 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). ریزماهورها شامل واحدهای ساده تکرارشونده هستند که در سراسر ژنوم یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند که به دلیل هم‌بارز بودن، سیستم چندآللی و تفسیر آسان آلل‌ها به عنوان یکی از مناسب‌ترین نشانگرها 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 آبی 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 سویه حاصل فرآیندهای جهش، رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری مجزایی است که طی قرون متمادی 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 ژنها است که مخزن ژنی آن نژاد را می‌سازند (Barker, 2001). هدف از این تحقیق، مطالعه ساختار ژنتیکی گوسفند شین بش با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره روی ژنوم هسته‌ای و نشانگرهای چندشکل تک نوکلئوتیدی یا SNP موجود

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 فلورسنتی FAM (6-carboxy-fluorescein) و HEX (Hexachlorofluorescein) نشان‌دار شدند. از مجموع ۱۰ آغازگر، تعداد پنج آغازگر با رنگ فلورسنتی FAM و پنج آغازگر با رنگ فلورسنتی HEX نشان‌دار شدند. آغازگرهای برگشت (Reverse) به صورت معمولی و بدون رنگ فلورسنتی 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 به‌طور همزمان انجام شد. چرخه حرارتی بهینه برای تکثیر نشانگرها 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 نمونه های 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 انعقاد 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 سلسیوس 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 اسپکتوفتومتری و ژل آگارز و اطمینان از کیفیت مطلوب نمونه‌ها، دو نوع غلظت DNA برای انجام واکنش PCR برای نشانگر ریزماهواره و یک ناحیه کنترلی (Control Region) در بخش D-Loop 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 ریزماهوره، توالی آغازگرها، محدوده آلی 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)	GCTGAACAATGTGATATGTTTCAGG	101-124	3	FAM
OarCP34 (R)	GGGACAATACTGTCTTAGATGCTGC			
OarCP20 (F)	GGCATTTCATGGCTTTAGCAGG	71-89	2	FAM
OarCP20 (R)	GTTTGATCCCCTGGAGGAGGAAACGG			
MAF70 (F)	CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC	124-166	4	M
MAF70 (R)	GCAGGACTCTACGGGGCCTTTGC			
MAF214 (F)	AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG	182-264	16	FAM
MAF214 (R)	GGGTGATCTTAGGGAGGTTTTGGAGG			
BM6526 (F)	CATGCCAAACAATATCCAGC	161-175	26	FAM
BM6526 (R)	TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC			
MCM42 (F)	CATCTTTCAAAGAAGTCCGAAAGTG	73-103	9	HEX
MCM42 (R)	CTTGGAATCCTTCCTAACTTTTCGG			
ILSTS11 (F)	GCTTGCTACATGGAAAGTGC	180-296	9	HEX
ILSTS11 (R)	CTAAAATGCAGAGCCCTACC			
OarJMP58 (F)	GAAGTCATTGAGGGGTCGCTAACC	145-169	26	HEX
OarJMP58 (R)	CTTCATGTTACAGGACTTTCTCTG			
OarHH35 (F)	AATTGCATTAGTATCTTTAATCTGGC	119-139	4	HEX
OarHH35 (R)	ATGAAAATATAAAGAGAATGAACACACGG			
BM757 (F)	TGGAAACAATGTAAACCTGGG	176-200	9	HEX
BM757 (R)	TTGAGCCACCAAGGAACC			

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

پس از انجام Multiplex PCR با استفاده از آغازگرهای ریزماهوره، جهت تعیین ژنوتیپ و خوانش آلل‌ها از دستگاه Genetic Analyser 3130 ساخت شرکت Applied 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 μ M (each primer)
Primer mix (R)	0.25 μ M (each primer)
dNTPs	200 μ M
Taq polymerase enzyme	1 unit/reaction
DNA template	10 ng/reaction
dd H ₂ O	Variable
Final volume	15 μ L

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 پلیمرز 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، ذخیره شد. همچنین جهت اطمینان از خوانش 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 ژنوتیپ هر یک از جایگاه‌های ریزماهوره انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نشانگرهای ریزماهوره: برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نشانگرهای ریزماهوره، فراسنجه‌های جمعیتی شامل آزمون تعادل هاردی-واینبرگ، تعداد آلل در هر جایگاه، تعداد آلل موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص شانون و آماره F با استفاده از نرم افزارهای POPGEN نسخه 3.1 و GENALEX نسخه 6.5 محاسبه شد (Yeh *et al.*, 1999; Peakall *et al.*, 2012).

انجام PCR و تعیین توالی ناحیه کنترلی mtDNA به منظور مطالعه ژنوم میتوکندریایی 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 ۱۶۵۳۷ و ۱۶۰۰۷ بازی ژنوم میتوکندریایی 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 هم‌ردیفی و یکنواخت نمودن طول همه توالی‌ها، تعیین هاپلوگروه‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA ver. 7.0 انجام گرفت. از پنج روش ترسیم فیلوژنی شامل Maximum Likelihood, Parsimony Maximum (MP) Neighbour-joining (NJ)، (ML)، Minimum Evolution (ME) 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 به‌دست آمده با توالی‌های اخذ شده از بانک ژن 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، آلودگی‌های شدید نمکی، پروتئینی و RNA مشاهده نشد (شکل ۴). کمیت DNA نیز با کمک دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ 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 MEGA ver. 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) و DnaSP ver. 6.12 (Rozas *et al.*, 2017) استفاده شد. برای تجزیه داده‌ها با نرم افزار MEGA ver. 7.0 ابتدا همه توالی‌های مربوط به این جمعیت در یک فایل ادغام و هم‌ردیف کردن توالی‌های به‌دست 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 هاپلوتیپ‌ها، تنوع هاپلوتیپی، تنوع نوکلئوتیدی و سایت‌های چندشکل از نرم افزار DnaSP ver. 6.12 استفاده شد.

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

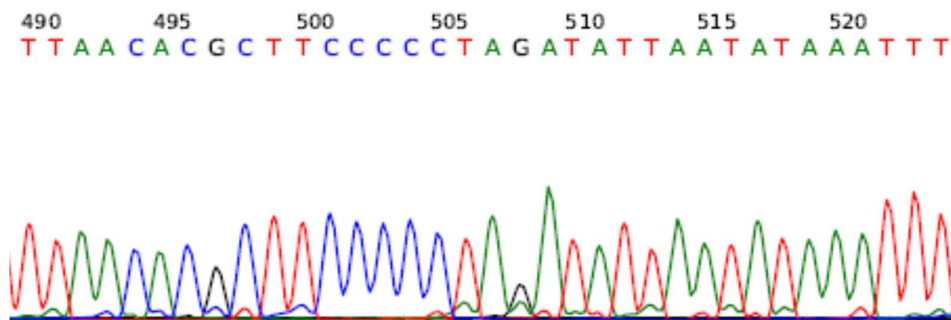


Fig. 3. Sequencing of the terminal position of the control region (CR) of mtDNA in Shin Bash sheep
 شکل ۳- تعیین توالی بخش انتهایی ناحیه کنترلی mtDNA در گوسفند شین بش



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٪. شماره‌های ۱ تا ۷، نمونه‌های DNA و M نشانگر اندازه است

و OarCP49 با ۱۹ آلل بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. تعداد و فراوانی آلل‌ها در جایگاه‌های ریزماهواره مورد مطالعه در مطالعات مختلف متفاوت است و علت اصلی این امر، اختلاف در نژادها، مناطق جغرافیایی مورد مطالعه و روش‌های استفاده شده در تعیین ژنوتیپ 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-

کلیه نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه پس از بهینه‌سازی واکنش‌های PCR تکثیر شدند. تمامی ۱۰ نشانگر مورد استفاده در این تحقیق، تکثیر شده و تنوع نشان دادند. تعداد کل آلل‌های 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 MAF70 و OarJMP58 (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 تعداد آلل به ازای هر جایگاه مربوط به جایگاه‌های MAF70

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

داری از تعادل هاردی-واینبرگ داشتند. عدم تعادل می‌تواند به دلایل افزایش هموزیگوت‌ها در برابر هتروزیگوت‌ها و یا برعکس، میزان جهش بالا، ایجاد آلل‌های جدید و وجود آلل‌های پوچ ایجاد شود (Hedrick, 2000). آماره‌های مربوط به ساختار ژنتیکی جمعیت شین بش در جدول ۶ نشان داده شده است. این آماره‌ها 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_o	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

مورد انتظار به ترتیب به جایگاه‌های MAF70 (۰/۸۳۸) و BM6526 (۰/۴۰۲) بود و در مورد هتروزیگوسیتی مشاهده شده نیز بیشترین و کمترین مقدار، به ترتیب در جایگاه‌های MAF70 (۰/۹۸۴) و BM6526 (۰/۴۸۳) مشاهده شد. مقادیر OarCP34 و BM6526 (۰/۴۸۳) مشاهده شد. مقادیر عددی بسیار بالا نشان‌دهنده چندشکلی فراوان در جایگاه‌های مزبور است و چنین مقادیری از نشانگر ریزماهواره مورد انتظار است. مقایسه سطوح هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار نشان می‌دهد که در بیشتر موارد، هتروزیگوسیتی مشاهده شده بیشتر از مورد انتظار است و این باعث منفی شدن شاخص تثبیت رایت (F_{IS}) شده است و همچنان که مشاهده می‌شود این شاخص منفی نشان می‌دهد که هتروزیگوسیتی در این جمعیت در حال افزایش است. چون حد نهایی هتروزیگوسیتی برابر با یک است، و مقدار آن در نشانگرهایی همچون ریزماهواره‌ها در بیشتر موارد بالاتر از ۰/۸ است، از این‌رو مقادیر هتروزیگوسیتی 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

یکی از معیارهای سنجش تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها، مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار است. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت شین بش 0.724 ± 0.042 است که تنوع ژنتیکی بالایی را در جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در واریته‌های مختلف گوسفند برزلی 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 که بالاتر از گوسفند شین بش است (Angelo *et al.*, 2009). میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده نیز در جمعیت شین بش برابر با 0.805 ± 0.042 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 هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نژادهای گوسفند مصری گزارش شد (0.54 ± 0.22) تا 0.61 ± 0.22). مقادیر هتروزیگوسیتی 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 هتروزیگوسیتی

نمی‌کند. در این موارد، استفاده از شاخص اطلاعات شانون برای مقایسه تنوع موجود در ترکیب جمعیت-شانن (I) در مناسب‌تر است. میانگین شاخص اطلاعات شانن (I) در جمعیت گوسفند شین بش برابر با 1.14 ± 0.16 بود. مقدار 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 $1/56$ برآورد شده بود که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالاتر در گوسفند شین بش است (Sharma *et al.*, 2020). مقدار F_{IS} بیانگر میانگین شاخص تثبیت رایب برای هر نشانگر در هر جمعیت مورد مطالعه است. این مقادیر میانگین برای جمعیت گوسفند شین بش برابر با -0.108 است. شاخص F_{IS} در هر جمعیت نشان‌دهنده کاهش و افزایش فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت مورد نظر بوده و انعکاس‌دهنده سیستم آمیزشی (آمیزش تصادفی و غیرتصادفی) در آن است. دامنه تغییرات F_{IS} بین -1 تا 1 است. اگر در جامعه تعادل هاردی-واینبرگ وجود داشته باشد، فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار با هم برابر بوده و در نتیجه، مقدار F_{IS} برابر با صفر و یا نزدیک به صفر خواهد بود. منفی بودن این شاخص نشان‌دهنده برتری هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به مورد انتظار و مثبت بودن آن به معنای کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده در برابر هتروزیگوسیتی مورد انتظار است. مقدار این شاخص در جمعیت مورد مطالعه منفی است و این نتیجه نشان‌دهنده زیاده‌تر بودن فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار در درون این جمعیت و در نتیجه غیرهمگون بودن و وجود تنوع قابل قبولی در داخل جمعیت مورد مطالعه است. میانگین مقدار F_{IS} در شش نژاد گوسفند بومی ایران برابر با 0.167 برآورد شده است که نشان‌دهنده کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده در برابر مورد انتظار و بالا بودن میزان همخوانی در این جمعیت‌ها است (Molaei *et al.*, 2010). همچنین باید توجه نمود که مقدار بالای F_{IS} نشان می‌دهد که جریان ژنی در بین جمعیت‌ها اتفاق افتاده است. لذا به نظر می‌رسد گوسفند شین بش 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 به‌دست آمده از جمعیت گوسفند شین بش، چون در بعضی از قطعات تعیین توالی شده، بخش‌های ابتدایی و انتهایی توالی‌ها به‌طور ناقص تعیین توالی شده بودند، به منظور یکسان نمودن همه قطعات تعیین توالی شده، بخش‌های ابتدایی و انتهایی این قطعات حذف شدند. به این ترتیب، همه قطعات با طول 507 جفت باز جهت تجزیه مورد استفاده قرار گرفتند. بررسی توالی ناحیه کنترلی نشان داد که در جمعیت شین بش، $4/59$ درصد جایگاه‌ها چندشکل هستند و تعداد 23 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 به‌دست آمده، تعداد 17 هاپلوتیپ با تنوع هاپلوتیپی برابر با $0.938/0.39 \pm 0.0$ شناسایی شد. تنوع هاپلوتیپی در گوسفندان عبری اسپانیا بین 0.85 تا 1 گزارش شده است که تا حد زیادی با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Pedrosa *et al.*, 2007). همچنین تنوع هاپلوتیپی با استفاده از ژنوم میتوکندریایی در گوسفندان بومی ترکیه $0.950/0.11 \pm 0.0$ برآورد شد که اندکی بالاتر از تنوع هاپلوتیپی برآورد شده در جمعیت شین بش بود (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 بش برابر با $0.131/0.13 \pm 0.0$ به ازای هر جایگاه به‌دست آمد. متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت در این توالی‌ها برابر با $6/59$ بود. از طرفی، مقدار تتا (θ) به ازای هر توالی برابر با $6/16$ و مقدار تتا به ازای هر جایگاه برابر با 0.12 به‌دست آمد. مقدار تتا (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 با 0.14 برآورد شد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (Oner *et al.*, 2013). هم‌جواری کشور ترکیه و تبادلات ژنتیکی صورت گرفته در بین دو کشور ایران و ترکیه در گذشته تا حدودی می‌تواند توجیه‌کننده نتایج مشابه به‌دست آمده باشد. نتایج حاصل روی 17 نژاد از گوسفندان چینی، میزان تنوع نوکلئوتیدی را به‌طور متوسط و برابر با 0.116 نشان

قدیمی قزاقستان، هند، چین و اسپانیا شناسایی شده است، به طوری 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.*, 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.*, 2015; Schroeder *et al.*, 2017).

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 هتروزیگوسیته مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیته مورد انتظار بوده و در نتیجه بیانگر غیرهمخون بودن و 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 کنترل mtDNA نیز وجود تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی بالاتر را در جمعیت گوسفند شین بش نشان داد. از طرفی، نتایج تعیین گروه-های 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 کردستان 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

داد که نشان‌دهنده 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 ۰/۱۹ برآورد شد که اندکی بالاتر از مقدار برآورد شده در گوسفند شین بش است (Liu *et al.*, 2016). 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 روش-های 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 مروری، 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، به طوری 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 هشت نژاد بومی گوسفند در ترکیه با استفاده از قطعه ۵۳۱ جفت بازی ناحیه کنترلی ژنوم میتوکندری (همان توالی mtDNA در تحقیق حاضر)، فراوانی گروه‌های هاپلوتیپی A، B و C به ترتیب ۵۰/۴، ۳۰/۷ و ۱۸/۹ درصد تعیین شد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Oner *et al.*, 2013). در تحقیقی که با استفاده از تعیین توالی کل ژنوم میتوکندری روی دو نژاد کردستان عراق انجام شد، گروه-های هاپلوتیپی A، B و C به ترتیب با فراوانی‌های ۴۵/۲، ۲۹ و ۲۵/۸ 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،

تشکر و قدردانی

از معاونت امور تولیدات دامی استان آذربایجان غربی و نیز اداره امور تولیدات دامی شهرستان مهاباد که نهایت همکاری را برای تهیه نمونه‌های خون داشتند، تشکر و قدردانی می‌شود.

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.

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., Málková 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., Asfour 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 Kurdistan 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. GenAlEx 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., Rensegné 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.