



## تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی بخشی از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری در گوسفند زندی

زانا پیرخضرانیان<sup>۱\*</sup>، محمد رزم کبیر<sup>۲</sup>، نرگس نظیفی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.  
<sup>۲</sup> استادیار گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۲

### چکیده

حفظ دام‌های بومی، به عنوان ذخایر ژنتیکی و سرمایه‌های ملی برای برنامه‌های اصلاح نژادی و بازده تولید ضروری می‌باشد. استفاده از نشانگرهای ژنتیکی توالی یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تشخیص گونه‌ها و تعیین رابطه فیلوژنی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان تنوع ناحیه HVR-I ژنوم میتوکندری گوسفند نژاد زندی بود. بدین منظور نمونه‌های خون از تعداد ۲۵ رأس گوسفند غیر خویشاوند نژاد زندی در ایستگاه خجیر تهران جمع‌آوری شد؛ و پس از استخراج DNA و تکثیر قطعه ۴۳۲ نوکلئوتیدی ناحیه HVR-I ژنوم میتوکندری با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، نمونه‌ها توالی یابی شدند. نتایج آنالیز توالی‌ها حاکی از وجود چهار هاپلوتایپ و چهار جایگاه چند شکل در ژن مذکور بود. بررسی همولوژی توالی مورد توافق انواع نژادهای گوسفند نشان داد که تثبیت چند شکلی موجود در موقعیت شماره ۱۳ نمونه‌های بررسی شده به عنوان جامعه‌ای کوچک از گوسفندان زندی ایران ممکن است فقط خاص گوسفند نژاد زندی باشد. بررسی تنوع نوکلئوتیدی نشان داد که گوسفند نژاد زندی دارای تنوع نوکلئوتیدی کمتری نسبت به گوسفندان مغانی و بلوچی می‌باشد. نتایج ترسیم درخت فیلوژنی نشان داد که گوسفند نژاد زندی متعلق به گروه هاپلوتایپی A می‌باشد و کمترین فاصله ژنتیکی را با نژادهای گوسفند ایرانی بلوچی، مغانی و افشاری دارد، با این وجود فاصله ژنتیکی قابل تاملی را با توالی مرجع گروه هاپلوتایپی A دارا می‌باشد.

**واژه های کلیدی:** درخت فیلوژنی، ناحیه HVR-I، تنوع نوکلئوتیدی، گوسفند زندی.

استفاده از ژنتیک ملکولی و بیوتکنولوژی در علوم دامی به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی، تعیین ژنوتایپ کاندیدهای انتخاب در برنامه های اصلاح نژادی، حفاظت ذخایز ژنتیکی دام و طیور و اخیرا پیش بینی ژنومیک فواید و کاربردهای زیاد و موثری پیدا کرده است. ( Mousavizadeh *et al.*, 2009). همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد به طور مهبجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع می کند ( Javanmard *et al.*, 2008). مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی لازم و ضروری است (Mohammadi *et al.*, 2009). بالغ بر ۲۷ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق و اقلیم های مختلف آب و هوایی ایران سازگار شده اند ( Zamani *et al.*, 2015; Khodabakhshzadeh *et al.*, 2016b). در حال حاضر، تولید گوشت مهمترین دلیل پرورش گوسفند در ایران است و تولیدات دیگر مانند پشم، شیر و پوست در درجات بعدی اهمیت قرار دارند ( Mohammadabadi and Sattayimokhtari, 2013). به طور کلی در بیشتر کشورهای جهان هدف از اصلاح نژاد گوسفند سودآوری از طریق بهبود یک یا چند صفت اقتصادی در جامعه است. این بهبود می تواند از طریق انتخاب گوسفندان برتر به عنوان والدین نسل آینده بر اساس شایستگی ژنتیکی آنها برای صفات مورد نظر صورت گیرد ( Khodabakhshzadeh *et al.*, 2015a; )

همگام با افزایش پیشرفت های ژنتیکی، حفظ تنوع ژنتیکی یک جمعیت برای اطمینان از پاسخ به انتخاب بلند مدت، یک ضرورت و وظیفه مهم برنامه های اصلاح نژادی است. برنامه های اصلاح نژادی بیشتر در جهت بهبود وضعیت تولیدی حیوانات اهلی عمل می کنند که توفیق این برنامه ها به مقدار تنوع ژنتیکی موجود در گله ها بستگی دارد (Khodabakhshzadeh *et al.*, 2015a). گوسفند زندی یکی از نژادهای بومی ایران است. این نژاد همانند گوسفند قره گل یکی از سه نژاد تولید کننده پوست های زینتی در دنیا می باشد. ولی با توجه به کاهش تقاضا برای پوست هدف عمده پرورش این نژاد در حال حاضر تولید گوشت و بره است. استان تهران یکی از مراکز مهم پرورش گوسفند زندی است. پراکنش این نژاد از این استان به مناطق مجاور گسترش یافته است. امروزه گله های اصیل زندی در قسمت هایی از شهرستان های ساوه، شهرری، ورامین، پیشوا، شمیرانات و دماوند یافت می شوند. جمعیت این نژاد در حدود ۲ میلیون راس برآورد می شود. از جمله خصوصیات این گوسفندان می توان به توانایی تولید شیر مناسب، مقاوم بودن در برابر تغییرات آب و هوایی، خصوصیات خوب تولید مثلی، عدم وجود سخت زایی و مشکلات زایمان اشاره کرد. مجموعه مزایای شمرده شده باعث شده که این گوسفند در سیستم کوچرو موفق ترین دام باشد. ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد

را یکی از کاربردی ترین روش‌ها برای تشخیص گونه‌ها و تعیین رابطه فیلوژنی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم تشخیص دادند. از جمله مزایای DNA میتوکندری (mtDNA) در ترسیم روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌ها، تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول، کوچک بودن اندازه آن نسبت به DNA هسته‌ای، وراثت پذیری 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 می‌باشد (Zeder *et al.*, 2006). در اولین مطالعات روی ژنوم میتوکندری گوسفند که توسط پژوهشگران انجام شد دو دسته هاپلوتایپی مختلف A و B برای گوسفند گزارش شد (Wood and Phu., 1996). سپس محققان در ضمن انجام مطالعات بیشتر در راستای بررسی-های فیلوژنتیکی، هاپلوتایپ دسته C را نیز شناسایی نمودند (Hiendleder *et al.*, 2002) و در نهایت در سال ۲۰۰۶ پژوهشگران موفق به گزارش یک گروه هاپلوتایپی دیگری شدند که هاپلوتایپ D نام گذاری شد و اعلام کردند که تنوع نوکلئوتیدی در گروه هاپلوتیپی A: ۰/۹٪، در گروه هاپلوتیپی B: ۰/۷٪ و در گروه هاپلوتیپی C: ۰/۴٪ 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 (Tapio *et al.*, 2006).

گوسفند زندی از سال ۱۳۷۰ با خرید ۲۲۰ رأس دام مولد ماده و ۱۰ رأس مولد نر در منطقه میانبند خجیر از توابع شهرستان شمیرانات استان تهران شروع به کار کرد و فعالیت های ثبت مشخصات و رکوردبرداری گوسفند زندی در این ایستگاه انجام می شود.

استفاده از تعداد محدودی قوچ در ایستگاه و در مواردی تلاقی‌های کنترل نشده در گله‌ها می تواند سبب کاهش تنوع ژنتیکی حیوانات شود. بر این اساس استفاده از تکنولوژی و دانش ژنتیک مولکولی برای کمک به برنامه های انتخاب و آمیزش حیوانات، بیش از پیش ضرورت پیدا می-کند (Shafaqmotlagh *et al.*, 2007) ژن‌ها عمدتاً در کروموزوم‌های هسته سلول و مقدار کمی نیز در میتوکندری‌ها قرار دارند. در سال ۱۹۶۳ وجود DNA میتوکندریایی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی به اثبات رسید (Nass *et al.*, 1963). بیان ژن‌های میتوکندری در مهره-داران برای تولید انرژی، سوخت و ساز بدن، تعادل و مرگ سلولی ضروری است (DiMauro *et al.*, 2004). در هر سلول هزار الی ۱۰ هزار میتوکندری و در درون هریک از آنها ۵ تا ۱۰ ژنوم وجود دارد. این ژن‌ها در گونه‌های جانوری ۳۷ ژن را کد می کنند، که شامل ۱۳ ژن کد کننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کد کننده tRNA و دو ژن کد کننده rRNA می‌باشد. در پژوهشی Mohammadipestebik *et al.* (2011) استفاده از نشانگرهای ژنتیکی توالی یابی ژنوم میتوکندری

### مواد و روش‌ها

به منظور انجام این تحقیق تعداد ۲۵ نمونه بیولوژیکی (خون) به صورت تصادفی و با اطمینان از عدم وجود رابطه خویشاوندی بین نمونه‌ها (از طریق بررسی رکوردهای ثبت شده‌ی آمیزشی توسط متخصصان ایستگاه پرورش)، از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند زندی (ایستگاه خجیر) استان تهران جمع آوری شد. نمونه‌های خون تا زمان استخراج در لوله‌های حاوی EDTA در دمای ۲۰- درجه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی دانشگاه فردوسی مشهد نگهداری شد. استخراج DNA با استفاده از کیت DNA Atom Prep محصول Iso Gene کشور روسیه صورت گرفت. برای آگاهی از میزان خلوص و کیفیت DNA از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و برای تعیین کمیت آن از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND-200 شرکت THERMO امریکا استفاده شد. جهت تکثیر اختصاصی ناحیه HVR1 یک جفت پرایمر با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 (Lalitha 2000) طراحی شد (جدول ۱).

ناحیه‌ای به نام ناحیه کنترل (D-Loop) در ژنوم میتوکندری وجود دارد که ژن کد کننده هیچ نوع پروتئینی را ندارد بنابراین جهش‌ها می‌توانند در آنجا تجمع پیدا کنند. این بخش خود به دو ناحیه متغیر کاملاً مشخص<sup>۱</sup> (HVRI) و<sup>۲</sup> (HVRII) و یک ناحیه نسبتاً حفاظت شده در بین این دو ناحیه تقسیم می‌شود. این نواحی دارای بالاترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی در افراد مختلف بوده و جهش‌های ایجاد شده در آنها بدون تغییر به نسل‌های بعد منتقل می‌شوند (Jazinet *et al.*, 1998). به علت وجود این ویژگی‌ها و همچنین تکامل سریع، مطالعه توالی این نواحی از ژنوم میتوکندری، در بررسی تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط میان گونه‌ها بسیار ارزشمند است. شناسایی توالی D-Loop میتوکندری به عنوان مشخصه ژنتیکی ثابت محسوب می‌شود و می‌تواند به تهیه شناسنامه ژنتیکی و نگهداری خلوص نژادهای بومی کمک فراوانی نماید. همچنین امکان مطالعات فیلوژنیکی، بررسی اشتقاق گونه‌ها و محاسبه فاصله نسلی با استفاده از این توالی وجود دارد (Pirani *et al.*, 2009; Mohammadhashemi *et al.*, 2010). هدف انجام این پژوهش، بررسی میزان تنوع موجود در گوسفندان نژاد زندی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ناحیه HVR-I، D-Loop میتوکندریایی بود.

<sup>۱</sup>Hypervariable Region-one

<sup>۲</sup>Hypervariable Region-two

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعه تکثیر شده.

Table 1- Sequences of primers and length of PCR product.

طول قطعه تکثیر شده Product Length	توالی پرایمر Primer sequence	نام پرایمر Primer
	5'-GAACTGTGGGGGTACGATTT-3'	Forward
432	5'-TGTATTGAGGACGGGGTTA-3'	Reverse

دقیقه در ۳۵ سیکل تکثیر شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با 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.

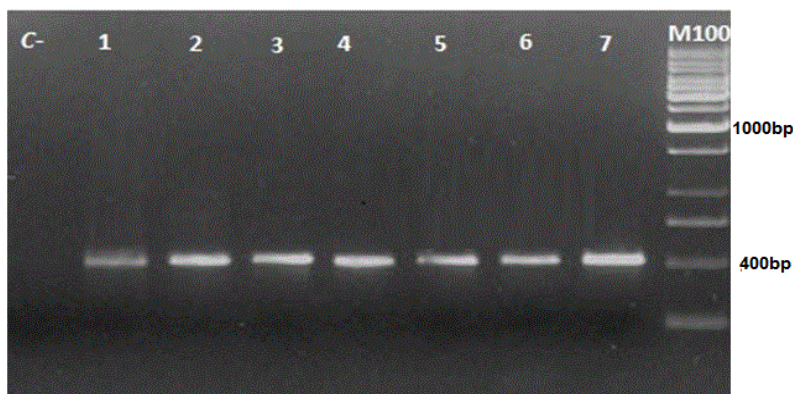
مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محصولات PCR پس از برش از ژل، خالص سازی شد و به همراه ۵۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال گردیدند. نمونه‌ها به روش اتوماتیک و با استفاده از دستگاه ABI 3130 توالی یابی گردیدند. لازم به ذکر است که برای بالا بردن دقت توالی یابی، هر نمونه با هر دو پرایمر مستقیم و معکوس توالی یابی شد. آنالیز قطعات توالی یابی شده با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی (Knudsen,2007)CLC Main workebench chromas Lite 2.01(TechneIysium, 5.5 و MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011),2007)

در مرحله بعد، با استفاده از رویه BLAST موجود در پایگاه بانک جهانی ژن (NCBI)، میزان همپوشانی آن‌ها با توالی‌های موجود، مقایسه گردید تا از اختصاصی بودن پرایمرهای رفت و برگشت اطمینان حاصل شود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ۴۳۲ جفت بازی ناحیه HVR-I، از mtDNA توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal براساس روش استاندارد و در ۳۵ چرخه انجام گرفت. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل 100mM Tris-HCL(PH 8.8)، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۰/۲mM dNtp، ۱/۵ mM از MgCl<sub>2</sub>، ۵ pmol از آغازگر اختصاصی ژن و ۱۰۰ نانوگرم از DNA هدف با استفاده از برنامه حرارتی واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه برای ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه، یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰

### نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار است. با توجه به مکان قرارگیری آغازگرها، انتظار مشاهده باندهای ۴۳۲ جفت‌باز در اثر تکثیر واکنش PCR می‌رفت. پس از انجام PCR، الکتروفورز محصول واکنش نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعه اختصاصی بخش HVR-1، از ناحیه کنترلی (D-Loop) میتوکندری به درستی تکثیر شده است. وجود کنترل منفی عاری از هر نوع باند DNA تکثیر شده‌ای و قطعات اختصاصی، نشان از دقت و صحت انجام واکنش داشت. همچنین وجود تنها یک باند در واکنش مشخص کرد که جایگاه نشست دیگری برای آغازگرهای طراحی شده در سایر نواحی ژنوم وجود ندارد (شکل ۱).

Bio Edit (Hall TA, 1999) برای ۲۵ نمونه انجام گرفت. ابتدا توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Chromas Lite 2.01 ویرایش شدند، بعد از تبدیل کردن توالی‌ها از فرمت ab1 به FASTA، از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI و نرم‌افزار CLC Main workebench 5.5 جهت تعیین همولوژی توالی به دست آمده با توالی‌های ثبت شده از همین ژن در NCBI و همچنین خود توالی‌ها با هم استفاده شد. تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپی توسط نرم افزار Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005) به دست آمد. همچنین جهت رسم درخت فیلوژنتیکی با ۱۰۰۰ تکرار، از رویه Neighbor-Joining نرم افزار MEGA5 و تعیین فاصله ژنتیکی از رویه Create Pairwise Comparison نرم‌افزار CLC Main workebench 5.5 استفاده شد.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به طول ۴۳۲ جفت‌باز ناحیه HVR-I روی ژل آگارز ۱ درصد با اندازه نشانگر M100.

**Figure 1- Electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) products by 432bp length of HVR-I area in 1% agaros gel.M: size marker.**

و ۳۳/۴٪ تیمیدین بود که همانطور که مشاهده می‌شود نسبت فراوانی A+T به C+G در این توالی، به ترتیب به نسبت ۶۰ به ۴۰ می‌باشد. وزن مولکولی این ناحیه از D-loop ۱۳۸/۰۵ کیلو دالتون می‌باشد. همچنین وزن مولکولی این ناحیه از ژنوم میتوکندری گوسفند بلوچی ایران نیز همین مقدار گزارش شده است ولی وزن مولکولی گوسفند مغانی ایران کمتر و ۱۳۵/۵۲ کیلو دالتون گزارش شده است (Mohamadhashemi et al., 2009; Shafaqmotlagh et al., 2007). توالی نهایی به دست آمده برای اولین بار برای گوسفند نژاد زندی ایران به طول ۴۳۱ جفت باز، با استفاده از نرم افزار Sequin در بانک جهانی ژن (NCBI) با کد دسترسی KJ705406 ثبت شد. با تعیین موقعیت جهش‌های نوکلئوتیدی مشخص شد که هاپلوتایپ‌های به دست آمده دارای ۴ جایگاه چندشکل می‌باشند. این جایگاه‌های چند شکل در موقعیت‌های شماره ۱۳، ۲۹، ۳۶ و ۴۱۴ توالی‌ها وجود داشتند (شکل ۲). همانطور که در شکل دیده می‌شود چندشکلی حاصل در موقعیت شماره ۱۳ از نوع اضافه شدن<sup>۱</sup> نوکلئوتید، در موقعیت شماره ۲۹ از نوع جانشینی<sup>۲</sup> یا تغییرات درون بازهای پورینی و پیریمیدنی، در موقعیت

بعد از تعیین توالی قطعه ۴۳۲ جفت بازی ناحیه HVR-I برای همه نمونه‌ها، مشاهده شد که دو تا از نمونه‌های توالی یابی شده فاقد کیفیت مناسب می‌باشند بنابراین، در ادامه آزمایشات آنالیز داده‌ها مورد استفاده قرار نگرفتند و بقیه مراحل آنالیز با ۲۳ توالی باقی مانده انجام شد. با تجزیه و تحلیل توالی‌ها وجود ۴ هاپلوتایپ در جمعیت مورد مطالعه ثابت شد. بیشترین و کمترین فراوانی متعلق به هاپلوتایپ‌های شماره یک و چهار ترتیب با فراوانی ۳۵ و ۱۳ درصد بود، همچنین هاپلوتایپ‌های شماره ۲ و ۳ نیز به ترتیب ۲۲ و ۳۰ درصد فراوانی را به خود اختصاص داده بودند (شکل ۲). در مطالعات قبلی پژوهشگران ایرانی روی ۲۰ راس گوسفند نژاد مغانی، وجود پنج هاپلوتایپ گزارش شده است (Mohamadhashemi et al., 2009). تعیین توالی‌های مورد توافق یکی از روش‌های معمول جهت ثبت و شناسایی نژادهای مختلف می‌باشد (Valizade et al., 2012). در نتیجه با زیرمجموعه توالی‌های مورد مطالعه یک توالی مورد توافق به عنوان توالی شاخص در نژادهای مورد مطالعه، تعیین گردید. از آنجایی که توالی مورد توافق بر حسب IUPAC برای NCBI تعریف نشده است، در نتیجه از توالی مورد توافق براساس معیار اکثریت استفاده شد. محتوای توالی مورد توافق به دست آمده از هاپلوتایپ‌ها شامل ۲۶٪/۱۶ آدنین، ۲۳٪/۴ سیتوزین، ۱۶٪/۶ گوانوزین

<sup>۱</sup> Insertion

<sup>۲</sup> Transition

چندشکلی در توالی مورد توافق این نژاد دیده نمی‌شود.

با توجه به این موضوع که تعداد جایگاه‌های چند شکل وابسته به تعداد نمونه هستند و با افزایش یا کاهش میزان نمونه‌ها تغییر می‌کنند، در نتیجه از پارامتر دیگری تحت عنوان تنوع نوکلئوتیدی ( $\pi$ ) یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید نیز استفاده گردید، که تحت تاثیر طول DNA و اندازه نمونه نیست (Parvari *et al.*, 1988). تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت حاضر ۰/۰۰۳۵۷ به دست آمد که در محدوده متوسط تنوع نوکلئوتیدی در یوکاریوت‌ها که بین ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۱۹ می‌باشد قرار گرفت. دامنه شاخص نئی (Nei., 1987) نوکلئوتیدی برای گوسفند نژاد بلوچی، مغانی، افشاری، شال و سنگسری ایران، توسط سایر پژوهشگران به ترتیب ۰/۰۰۷، ۰/۰۰۲۶۸، ۰/۰۰۹۲، ۰/۰۰۸۳ گزارش شده است (Shafaq motlagh *et al.*, 2007; Mohamadhashemiet *al.*, 2009; Pirkhezranian *et al.*, 2015). میانگین تنوع نوکلئوتیدی گزارش شده برای گوسفندان بومی هند، پاکستان، تاجیکستان، ازبکستان، ترکیه و قزاقستان به ترتیب برابر با ۰/۰۰۲۴، ۰/۰۰۲۶/۰۰۸۲۳، ۰/۰۰۱۸، ۰/۰۰۲۹ و ۰/۰۷۲۲ می‌باشد (Naghash *et al.*, 2007; Pardeshi *et al.*, 2007).

شماره ۳۶ از نوع جایگزینی<sup>۳</sup> یا تبدیل به هر نوکلئوتید دیگر و چند شکلی حاصل در موقعیت ۴۱۴ نیز، هم ناشی از جانشینی و هم حذف<sup>۴</sup> نوکلئوتید می‌باشد. در مطالعه محمدهاشمی و همکاران (۲۰۰۹) روی گوسفند نژاد مغانی ۹ جایگاه چند شکل گزارش شد که جهش‌های گزارش شده در این مطالعه در موقعیت‌های ۲۹ و ۴۱۴ را نیز شامل می‌شود (Mohamadhashemi *et al.*, 2009). شفق و همکاران (۲۰۰۷) نیز با مطالعه روی DNA میتوکندریایی گوسفندان نژاد بلوچی، هم چندشکلی‌های مشاهده شده در این مطالعه، به غیر از چندشکلی موجود در موقعیت ۱۳ را گزارش کردند (Shafaq *et al.*, 2007). بررسی همولوژی توالی مورد توافق نوکلئوتیدی چندین نژاد گوسفند ایرانی و غیر ایرانی نشان داد که چند شکلی تثبیت شده موجود در موقعیت شماره ۱۳ ناحیه HVR-I ناحیه کنترل DNA احتمالاً فقط مختص گوسفند نژاد زندی می‌باشد، چون هیچ کدام از نژادهای دیگر این چند شکلی را در ساختار نوکلئوتیدی توالی مورد توافق خود نداشتند (شکل ۳). البته، به منظور اطمینان بیشتر از نتیجه چندشکلی گزارش شده موجود در این موقعیت به تعداد توالی‌های بیشتری نیاز است. لازم به ذکر است که این چندشکلی در چند مورد از هاپلوتایپ‌های گوسفند نژاد افشاری نیز وجود دارد ولی به دلیل این که توالی مورد توافق براساس معیار اکثریت محاسبه می‌شود این

<sup>۳</sup>Transversion

<sup>۴</sup> Deletion



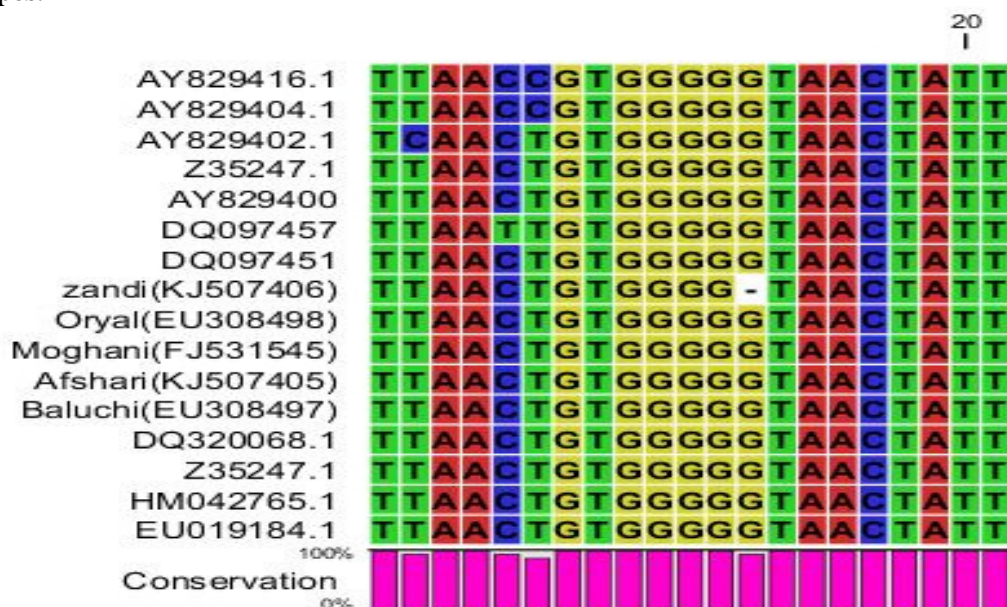
```

1:8 TTAAGTGTGG GG TAACTAT TTAATGAACT TTAACAGGCA TCTGGTCTT TCTTCAGGGC CATCTCATCT AAAATCGCCC 79
2:5 ..... G ..... T ..... T ..... ..... ..... ..... ..... 80
3:7 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 79
4:3 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 79
1:8 ATTCTTTCCT CTAAATAAG ACATCTCGAT GGACTAATGA CTAATCAGCC CATGCCTAAC ATAAGTGTGG TGTCATGCAT 159
2:5 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 160
3:7 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 159
4:3 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 159
1:8 TTGGTATTTT TTAATTTTGG GGGATGCTTG GACTCAGCTA TGGCCGTCTG AGGCCCGGAC CCGGAGCATG AATTGTAGCT 239
2:5 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 240
3:7 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 239
4:3 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 239
1:8 GGACTTAACT GCATCTTGAG CATCCTCATA ATGGTAAGCA TGGGCATAAT ATAATTAATG GTCACAGGAC ATACCTGCTG 319
2:5 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 320
3:7 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 319
4:3 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 319
1:8 TATCGTACAT TTATATATTC TTTTCCCCC CTTCCCTTA AATATTTATC ACCATTTTAA ACACGCTTCC CCCTAGATAT 399
2:5 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 400
3:7 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 399
4:3 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 399
1:8 TAATATAAAT TTAACCCGTC CCTCAATACT AA 431
2:5 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 431
3:7 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 431
4:3 ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... 431

```

شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی بخش HVR-1 از ناحیه کنترلی DNA میتوکندریایی، گوسفندان زندی و هاپلوتایپ‌های مشاهده شده.

Figure 2- sequence of HVR-1 of control region in mitochondrial DNA of Zel sheep and related haplotypes.



شکل ۳- همولوژی قسمتی از توالی ناحیه کنترلی نژادهای مختلف گوسفند به منظور بررسی چندشکلی موقعیت شماره ۱ (جهش موقعیت نوکلئوتید شماره ۱۳).

Figure 3- The homology of part of control region from different sheep breeds to survey polymorphism in number 1 situation (mutation in number 13 nucleotide).

مرجع می‌باشد. شماره دسترسی توالی مرجع گروه هاپلوتایپی A: DQ097451، گروه هاپلوتایپی B: DQ097431، گروه هاپلوتایپی C: DQ097457 و گروه هاپلوتایپی D: DQ242212 می‌باشد.

در شکل ۴ تعیین گروه هاپلوتایپی به وسیله رسم درخت فیلوژنی با استفاده از ناحیه HVR-1، ناحیه کنترلی (D-Loop) میتوکندری بین ۳۳ گونه مختلف گوسفند قابل مشاهده است. با استفاده از این درخت می‌توان موقعیت گوسفند نژاد زندی را به طور کلی در بین گروه‌های هاپلوتایپی و به طور اختصاصی بین نژادهای مختلف تعیین نمود و در نهایت برخی از تغییرات خصوصیات مورفولوژیکی این نژاد را توجیه نمود. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود گروه‌های هاپلوتایپی چهارگانه فوق به صورت کاملا تفکیک شده در خوشه‌های مختلف قرار گرفته‌اند و گوسفند نژاد زندی همراه با سایر گوسفندان ایرانی در گروه هاپلوتایپی A قرار گرفته است.

محققان ایرانی در پژوهش‌هایی که بر روی گوسفندان نژاد مغانی (Mohamadhashemi *et al.*, 2009)، گوسفندان نژاد بلوچی (Shafaq *et al.*, 2007)، همچنین گوسفندان نژاد سنگسری و شال (Mohamadhashemi *et al.*, 2011) و گوسفندان نژاد افشاری (Pirkhazranian *et al.*, 2015) انجام دادند به این نتیجه رسیدند که گوسفندان ایرانی ذکر شده همگی به گروه هاپلوتایپی A تعلق دارند. با توجه

از آنجایی که این ناحیه دارای بالاترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی در افراد مختلف می‌باشد و بیشترین مقدار تجمع جهش در آن دیده می‌شود (Tapio *et al.*, 2006)، در نتیجه تنوع نوکلئوتیدی این ناحیه دامنه وسیعی (۰/۰۰۱۸ تا ۰/۰۸۲۳) را در بین گوسفندان مختلف دارد. به دلیل این‌که نمونه‌های جمع‌آوری شده برای این مطالعه همگی مربوط به یک مرکز تحقیقاتی می‌باشد و غالباً، ایستگاه‌های تحقیقاتی به منظور حفظ ذخیره ژنتیکی و جلوگیری از انقراض گونه‌هایی که اندازه موثر جمعیت<sup>۱</sup> آنها پایین می‌باشد مجبور به تلاقی گوسفندان خویشاوند با هم هستند به نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی در گوسفندان نژاد زندی در واقع بیشتر از مقداری باشد که در این مطالعه گزارش شده است.

در پژوهشی Wood and Phua (1996) دو گروه هاپلوتایپی اصلی A و B را گزارش کردند. سپس محققان بعد از مقایسه توزیع این گروه‌های هاپلوتایپی در چند نژاد آلمانی، روسیه و قزاقستان آنها را به ترتیب دو نژاد آسیایی و اروپایی معرفی کردند (Hiendleder *et al.*, 1998). در مطالعه Guo و همکاران (2005) و همچنین Pedrosa و همکاران (2005) با بررسی نژادهای گوسفند موجود در چین و ترکیه موفق به گزارش هاپلوتایپ جدیدی به نام هاپلوتایپ C شدند (Guo *et al.*, 2005; Pedrosa *et al.*, 2005). هر کدام از این گروه‌های هاپلوتایپی دارای یک توالی

<sup>5</sup> effective population size

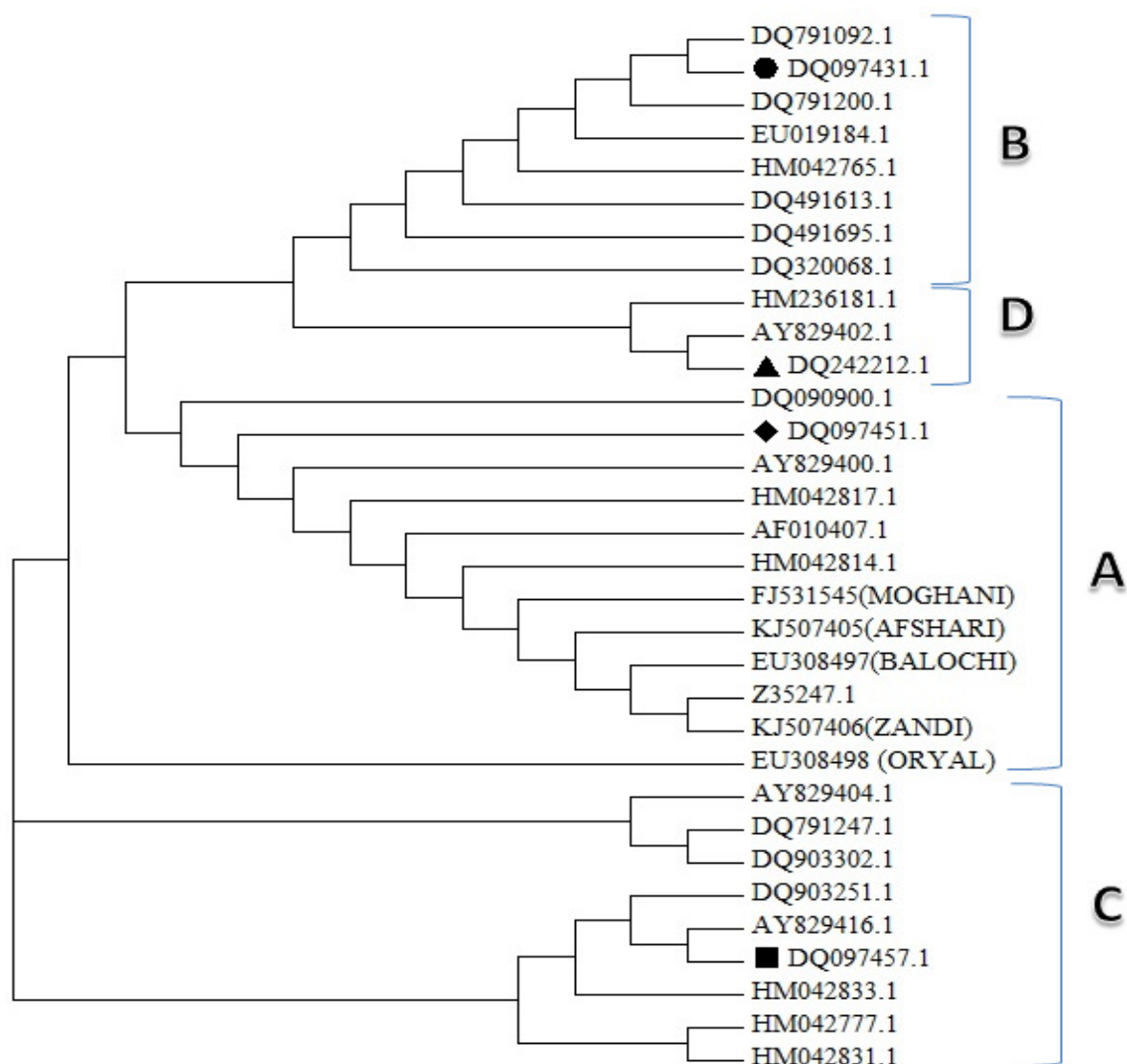
تامل می‌باشد که علت آن ممکن است به دلیل تغییرات اقلیم بین مناطقی که نمونه‌ها در آنها جمع آوری شده است باشد.

### نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان دهنده پایین بودن نسبی تنوع ژنتیکی در گوسفند زندی می‌باشد. پایین بودن تنوع در این جمعیت می‌تواند مبین نیاز به برنامه‌ریزی اصلاح نژادی در این جمعیت از طریق تلاقی‌های برنامه‌ریزی شده و اصطلاحاً طراحی سیستم آمیزشی مناسب برای کنترل همخونی و خویشاوندی است. این مساله کمک می‌کند تنوع و پتانسیل ژنتیکی گوسفند زندی برای فعالیت‌های اصلاح نژادی در آینده حفظ شود. برای تسریع این مساله حتی می‌توان از قوچ‌های برتر گله‌های مردمی در ایستگاه خجیر استفاده نمود تا سازگاری محیطی و مقاومت گوسفند زندی در حد مطلوبی حفظ شود. با توجه به این که داده‌های جمع‌آوری شده برای این مطالعه مربوط به یک ایستگاه تحقیقاتی پرورش گوسفند می‌باشد، ممکن است که در واقع، تنوع ژنتیکی بدست آمده از نمونه‌ها، اندکی کمتر از تنوع حقیقی موجود در جمعیت گوسفند زندی باشد. به منظور تایید نتایج حاصل از این تحقیق، بهره‌گیری از تعداد نمونه بیشتر به ویژه نمونه‌گیری از گله‌های مختلف و گله‌های مردمی پیشنهاد می‌گردد.

به مشترک بودن جد پدری گوسفندان آسیایی O. *orientalis* (Hiendleeret *al al.*, 2002) و همچنین واقع شدن ایران در آسیا و به طور ویژه- ای در خاور میانه، قرار گرفتن گوسفندان ایرانی در هاپلوتایپ A منطقی به نظر می‌رسد. همچنین در بررسی تنوع ژنوم میتوکندری گوسفندان اروپایی، کاسکازین و آسیا گزارش شده است که بیشتر گوسفندان آسیایی در هاپلوتایپ‌های A (۲۲ درصد) و B (۷۱ درصد) قرار می‌گیرند (Tapio *et al.*, 2006) که این گزارش نیز می‌تواند قرار گرفتن گوسفند زندی در گروه هاپلوتایپی A را توجیه کند. اعداد بالایی قطر جدول، فواصل ژنتیکی و اعداد مربوط به پایینی قطر جدول، درصد تشابه ژنتیکی را نشان می‌دهند.

Up the diagonal: Genetic distances & Uner the diagonal: similarity percentage  
به منظور بررسی دقیق تر گروه هاپلوتایپی A، ماتریس فاصله ژنتیکی (میزان اختلاف نوکلئوتیدی) و درصد تشابه ژنتیکی این گروه هاپلوتایپی تعیین شد (جدول ۲). همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود گوسفند نژاد زندی در بین گونه‌هایی که در گروه هاپلوتایپی A قرار گرفته‌اند دارای کمترین فاصله ژنتیکی با گوسفندان ایرانی می‌باشد. فاصله ژنتیکی زیاد و در پی آن درصد شباهت ژنتیکی کم بین توالی مرجع گروه هاپلوتایپی A (DQ097451.1) که در ردیف ۱ قرار گرفته است و گوسفندان ایرانی نسبت به سایر گوسفندان گروه هاپلوتایپی A قابل



شکل ۴ - درخت فیلوژنی ناحیه HVR-I بین نژادهای مختلف گوسفند. شماره دسترسی‌های مربوط به گروه‌های هاپلوتایپی در شکل مشخص شده است (●: گروه هاپلوتایپی B، مثلث ▲: گروه هاپلوتایپی D، ♦: گروه هاپلوتایپی A و ■: گروه هاپلوتایپی C)

**Figure 4- Phylogenetic tree of HVR-I region among different sheep breeds. Accession number of each haplotype is given (●: B haplotype, ▲: D haplotype, ♦: A haplotype and ■: C haplotype).**

جدول ۲- فواصل ژنتیکی و درصد تشابه بین گروه هاپلوتایپی A.

Table 2- Genetic distances and similarity percentage among A haplotype grope

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DQ097451.1#	1	0	0	1	0	0	5	6	6	4	13
HM042814.1	2	100.00	0	1	0	0	5	6	6	4	13
HM042817.1	3	100.00	100.00	1	0	0	5	6	6	4	13
Z35247.1	4	99.76	99.76	99.76	1	1	6	7	7	5	14
AF010407	5	100.00	100.00	100.00	99.76	0	5	6	6	4	13
AY829400.1	6	100.00	100.00	100.00	99.76	100.00	5	6	6	4	13
Balochil(EU308497)	7	98.82	98.82	98.82	98.59	98.82	98.82	1	1	4	14
Zandi(KJ507406)	8	98.59	98.59	98.59	98.35	98.59	98.59	99.76	2	5	15
Afshari(KJ507405)	9	98.59	98.59	98.59	98.35	98.59	98.59	99.76	99.53	5	13
Moghani(FJ531545)	10	99.06	99.06	99.06	98.82	99.06	99.06	99.06	98.82	98.82	13
Oryal(EU308498)	11	96.94	96.94	96.94	96.71	96.94	96.94	96.71	96.47	96.94	

همکاری و مساعدت در امر نمونه‌گیری تشکر و

سپاسگزاری

قدردانی می‌شود.

از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند

زندگی (ایستگاه خجیر) استان تهران به دلیل

منابع

- DiMauro S (2004). Mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1658:80-88.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Guo J, Du LX, Ma YH, Guan WJ, Li HB, Zhao QJ, Li X, Rao SQ (2005). A novel maternal lineage revealed in sheep (Ovisaries). *Animal Genetics* 36: 331-336.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hiendleder S, Kaupe B, Wassmuth R, Janke A (2002). Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proceeding of Royal Society Lond B: Biological Science* 269: 893-904.
- Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A (1998). The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (Ovisaries) and comparison with the other major ovine haplotype. *Journal of Molecular Evolution* 47: 441-448.
- Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmash A, Asadzadeh N (2008). Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bostaurus*) Russian. *Journal of Genetics* 44: 495-497.
- Jazin E, Soodyall H, Jalonen P, Lindholm E, Stoneking M, Gyllensten U (1998). Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism. *Nature Genetics* 18: 109-110.

- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh Koshkoieh A, Moradi-Shahrehabak H, Ansari Namin S (2015a). Study of mutations available in first-half exon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep born from crossing of Romanov rams with Kermani ewes. *Iranian Journal of Animal Science Research* 6: 395-403 (In Farsi).
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Moradi H, Esmailizadeh AK, Ansari NS (2015b). Identify of G→A point mutation at positions 477 and 721 in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Modern Genetics* 10: 261-268 (In Farsi).
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Moradi-Shahrehabak H, Esmailizadeh Koshkoieh A (2016a). Identification of available mutations in the first-half (from 5' end) of exon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep from crossing of Romanov and Lori-Bakhtiari breeds. *Animal Production Research* 4: 15-26 (In Farsi).
- Khodabakhshzadeh R., Mohammadabadi MR, Esmailizadeh Koshkoieh A, Moradi-Shahrehabak H, Bordbar F, Ansari Namin S (2016b). Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 19: 281-289.
- Knudsen B, Knudsen T, Flensburg M, Sandmann H, Heltzen M, Andersen A, Dickenson M, Bardram J, Steffensen P, Mønsted S, Lauritzen T, Forsberg R, Thanbichler A, Jannick D, Görlitz L, Rasmussen J, Tordrup D, Værum M, Nygaard M, Hachenberg C, Fisker E, Dekker P, Schultz J, Hein MK, Sinding J (2007). *CLC Main Workbench. Version 5.5.* Aarhus, Denmark, CLC bio.
- Lalitha S (2000). Primer premier 5. *Biotech Software & Internet Report: The Computer Software Journal for Science* 1: 270-272.
- Mohammadabadi MR, Sattayimokhtari R (2013). Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in kermani sheep. *Slovak Journal of Animal Science* 46: 45-51.
- Mohammadhashemi A (2009). Sequencing of HVR1 region of mtDNA in Iranian moghani sheep breed. MSc Thesis. Tabriz University, Tabriz, Iran.
- Mohammadi A, Nassiry MR, Mosafer J, Mohammadabadi MR, Sulimova GE (2009). Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian Journal of Genetics* 45: 198-202.
- Mohammadipestebik F, Pirany N, Shojaa J, Mohammadhashemi A (2011). Determination the mtDNA d-loop sequence in marandi native chicken population and its phylogenetic relationships with other breeds. MSc Thesis. Tabriz University, Tabriz, Iran
- Mousavizadeh A, Mohammadabadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi, Esmailizadeh AK (2009). Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology* 7: 51-53.
- Naghash H, Naderi S, Taberlet P (2007). Large-Scale Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Goat Reveals Six Haplogroups with High Diversity. *Plos One* 10: 1-10.
- Nass S, Nass MM (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *The Journal of cell biology* 19: 613-629.
- Nei M (1987). *Molecular evolutionary genetics: Columbia University Press.*
- Pardeshi V, Kadoo N, Sainani M, Meadows J, Kijas J, Gupta V (2007). Mitochondrial haplotypes reveal a strong genetic structure for three Indian sheep breeds. *Animal Genetics* 38: 460-466.
- Parvari R, Avivi A, Lentner F, Ziv E, Telor, Burstein Y, Schechter I (1988). Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *The EMBO Journal* 7: 739.

- Pedrosa S, Uzun M, Arranz JJ, Gutiérrez-Gil B, Primitivo FS, 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: 2211–2217.
- Pirani N, Mohammadhashemi A, Alijani S, Rezazadeh R, Ghanbari S (2010). Molecular Analysis of Mazandrani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA. *Journal Agriculture Biotechnology* 1: 53- 60.
- Pirkhezranian Z, Tahmoorespour M, Mohammadhashemi A, Pirani N, Azghandi. M (2015). Genetic and phylogenetic analyses of HVR-I region of mtDNA in Afshari sheep breed. *Agricultural Biotechnology* 6: 65-71.
- Shafaqmotlagh A (2007). Determination the mtDNA D- loop Sequence in goat and sheep breed. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
- Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N, Dayani O (2009). Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. *Animal Science Researches* 19: 81-89.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tapio M, Marzanov N, Ozerov M, Činkulov M, Gonzarenko G, Kiselyova T, Murawski M, Viinalass H, Kantanen J (2006). Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1776-1783.
- Technelysium PL (2007). Chromas lite version 2.01.
- Valizade R, Nassiry MR, Sadeghi B, Ghovati Sh, Javadmanesh A (2012). Genetic and philogenetic analysis of Cyt-b and D-loop rejoin of mitochondrial DNA of Sistani, Sarabi and brown Swiss Iranian cow breeds. *Iranian Journal of Animal Science Research* 394: 444-452.
- Wood N, Phua S (1996). Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Animal Genetics* 27: 25-33.
- Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Research* 132: 123-127.
- Zeder MA, Emshwiller E, Smith BD, Bradley DG (2006). Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends in Genetics* 22: 139-155.

## Genetic and phylogenetic analyses of partial control region of mtDNA in Zandi sheep breed

Pirkhezranian Z. <sup>\*1</sup>, Razmkabir M. <sup>2</sup>, Nazifi N. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>PhD Student of Animal Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

<sup>2</sup>Assistant Professor of Animal Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

### Abstract

Protecting native animal population as genetic and national reserves is essential for animal breeding programs and increasing production of them. Using genetic sequencing mitochondria genome markers is one of the most practical methods for species identification and determination of phylogenetic relationships among populations and species that are close to each other. The purpose of this study is to investigate the diversity of the HVR-I region of the mitochondrial genome in Zandi sheep. For this purpose, blood samples from 25 non-relatives breed Zandi sheep in Khojir station in Tehran was collected. After DNA extraction, amplification of 432 nucleotide fragment of the HVR-I in mitochondrial genome has been done by using the polymerase chain reaction, then successful amplified samples were sequenced. The results of the analysis of sequenced samples suggested existence of four haplotype and four polymorphic sites in the mentioned gene. The study of homology of consensus sequence various breeds of sheep showed that established polymorphism in position 13 probably is specific to zandi sheep. The study of nucleotide diversity showed lower nucleotide diversity in Zandi sheep comparing to Moghani sheep and Balochi sheep. Moreover, the results of phylogenetic analysis that was drawn to determine the position of Zandi sheep among the other breeds of sheep showed that Zandi sheep belongs to haplogroup of A. Also comparing of The HVR-I sequences of Zandi sheep to the sheeps belonging to the haplotype A, showed that this breed has the lowest genetic distance with Baluchi moghani and afshari sheep breed, but it has considerable genetic distance with the reference sequence of A haplotype.

**Keywords:** *Phylogenetic tree, HVR-I region, Nucleotide diversity, Zandi sheep.*

---

\* Corresponding Author: Pirkhezranian Z

Tel: 09189754983

Email: Zana.Pirkhezri@gmail.com