مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی ساختار ژنتیکی سگ‌های بومی ایران با استفاده از اطلاعات ژنوم میتوکندری

محبوبه علیزاده[1]، علی‌اکبر مسعودی*[2]، رسول واعظ ترشیزی[3]، دامون الهیارخان خراسانی[4]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

[2]استادیار گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

[3]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

[4]فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی ورامین.

تاریخ دریافت: 1391/08/09، تاریخ پذیرش: 1391/12/27

چکیده

هدف تحقیق حاضر مطالعه ساختار ژنتیکی سگ‌های بومی ایران و مقایسه با دیگر نژادهای خارجی است. برای این منظور نمونه‌های خون از 93 قلاده سگ از جمعیت‌های مختلف، از نقاط مختلف کشور جمع آوری گردید، همچنین به منظور مقایسه نتایج حاصل با دیگر نژادهای آسیایی و اروپایی، 655 توالی 582 جفت بازی از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری از بانک اطلاعات ژنوم دریافت شد. استخراج DNA کلیهٔ نمونه‌های خون صورت گرفت و برای تکثیر و تعیین توالی ناحیهٔ کنترل ژنوم میتوکندری استفاده شد. با مطالعه توالی 582 جفت بازی ناحیهٔ کنترل ژنوم میتوکندری، 25 هاپلوتیپ تشخیص داده شد. مقدار تنوع نوکلئوتیدی کل برای سگ‌های بومی ایران 0/00704±0/01354 بدست آمد. نتایج آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از روش F-Statistics مقدار معنی‌داری را نشان داد (Fst=0/029 و P=0/000). مقادیر شاخص تثبیت با استفاده از این روش دارای دامنه‌ای بین 0/02671- الی 0/37481 بودند. بر اساس این آزمون برخی از این جمعیت‌ها بخصوص جمعیت تازی با جمعیت‌های سرابی، بختیاری، بومی البرز و بومی غرب کشور، جمعیت سرابی با جمعیت‌های کردی، سنگسری، البرز و بومی غرب کشور، جمعیت بختیاری با جمعیت‌های بومی البرز و بومی غرب کشور و جمعیت اروپا با غرب آسیا با یکدیگر از نظر ژنتیکی متفاوت بودند (P<0/05). همچنین جمعیت‌های تازی، سرابی و بومی غرب کشور با نژادهای اروپا و غرب آسیا اختلاف معنی‌داری نشان دادند (P<0/05). جمعیت سگ‌های بومی خراسان با همه جمعیت‌های مورد بررسی شباهت ژنتیکی نشان داد (P>0/05). به طورکلی نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان دهندهٔ تنوع ژنتیکی قابل قبول و وجود شباهت ژنتیکی در برخی از جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سگ بومی ایران، تنوع ژنتیکی، ساختار ژنتیکی، هاپلوتیپ.

*نویسنده مسئول: علی اکبر مسعودی تلفن: 09193650768 Email: masoudia@modares.ac.ir

مقدمه

سگ نخستین حیوانی است که به دست بشر اهلی شده است و تفاوتهای ظاهری و رفتاری زیادی در گونه های این حیوان دیده می-شود (Pang *et al.*, 2009; Ardalan *et al.*, 2011; Ardalan, 2012). سگ‌های اهلی (Canis familaris) همواره دوستان و ملازمان خوبی برای انسان‌ها بوده‌اند. نقاشی‌هایی که در غارهای انسان‌های نخستین کشف شده حاکی از این موضوع است که این دوستی حداقل سابقه‌ای 16 هزار ساله دارد. در آن زمان انسان اولیه برای شکار و نگهبانی از خود، به نگهداری از سگ روی آورده است، امروزه این کاربرد سگ گسترش پیدا کرده، به طوری که از سگ به منظور شرکت در نیروهای پلیس برای کشف مواد مخدر و یا پیدا کردن افراد زنده زیر آوار و حتی مضنونین و قاچاقچیان استفاده می‌شود.

تصور می‌شود که سگ از اهلی شدن گرگ قهوای در شرق آسیا در حدود 16 هزار سال قبل ایجاد شده است. از گرگ‌ها پنج زیر گونه *Canis lupus lupus*، *Canis lupus chanco*، *Canis lupus pallipes*، *Canis lupus arabs* و *Canis lupus panbasilen* شکل گرفته است، که از این پنج زیر گونه چهار زیر گونه در اوراسیا و یک زیر گونه در شمال آمریکا زندگی می‌کند (Tanab, 2006). از نظر مورفولوژی و اکولوژی، گرگ‌ها تنها اجداد سگ‌های اهلی هستند. زیر گونه *Canis lupus lupus* بیشتر در اروپا، *Canis lupus chanco* در شرق آسیا و اخیرا در شمال آسیا، *Canis lupus pallipes* در هند و جنوب شرق آسیا و *Canis lupus arabs* در عربستان، اسرائیل و سوریه یافت می‌شوند (Tanabe, 2006). در بررسی Tanabe و همکاران (2006) بر روی 16 پروتئین چند شکل خون نشان داده شده است که *Canis lupus chanco* جد سگ-های آسیایی است. اگر چه تا کنون ثابت شده است که اجداد سگ‌های اهلی (*Canis Familaris*)، گرگ قهوه‌ای *Canis Lupus* است و بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که اختلافی در حدود 4/6% بین DNA میتوکندری سگ‌ها و گرگ‌های امروزی وجود دارد و این اختلاف ناچیز نشان دهنده‌ی نزدیکی بسیار زیاد این دو موجود به یکدیگر می‌باشد (Pires *et al.*, 2006). حوادث باستانی نشان می‌دهد که سگ-های اهلی در 11500 سال قبل وجود داشته‌اند با این حال فرضیه چگونگی و کجایی منشا گرفتن سگ‌ها از مکان‌های متعدد تأیید نشده است که ممکن است به دلیل وجود مشکلاتی در تشخیص گرگ‌های کوچک و سگ‌های اهلی و یا پایین بودن اقدامات باستان شناسی صورت گرفته در سراسر جهان باشد. با توجه به اولین مطالعه بزرگ روی DNA میتوکندری سگ‌ها و گرگ، Pang و همکاران (2009) بیان داشته‌اند که سگ‌ها در زمان دورتری از 100 هزار سال قبل منشاء گرفته-اند و این خیلی نزدیکتر از چیزی است که حوادث باستانی نشان داده است. چندین اختلاف

در زمان و مکان منشا گرفتن بر اساس گروه‌های فیلوژنی توالی‌های mtDNA سگ مشاهده شده است، با این حال در مطالعات اخیر پیشنهاد شده است که منشاء گرفتن در زمان‌های اخیر احتمال بیشتری دارد (Pang *et al*., 2009).

عناصر ژنتیکی متعددی از قبیل نشانگرهای مایکروساتلایت که دارای تنوع آللی بالایی می‌باشند جهت بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مختلف سگ استفاده می‌شود از جمله می‌توان به مطالعهٔ Parra *et al.* (2008) که در سگ‌های اسپانیا انجام گرفته است و همچنین مطالعهٔ Brown *et al.* (2011) که در نژادهای اروپا و خاورمیانه صورت گرفته است، اشاره نمود. همچنین از توالی D-loop ناحیهٔ ژنوم میتوکندری به علت دارا بودن ساختار خاص خود به عنوان ابزاری قدرتمند برای مطالعهٔ ساختار ژنتیکی موجودات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (Larson *et al*., 2007; Amills *et al*., 2008).

توالی ژنوم میتوکندری جهت مطالعه‌ی تکاملی موجوداتی که گونه‌ی مشابهی دارند به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. بسیاری از این مطالعات در ناحیه D-Loop میتوکندری صورت می‌گیرد، چرا که این ناحیه میزان بالاتری از تنوع را نسبت به دیگر قسمت های ژنوم میتوکندری نشان می‌دهد (Cairn *et al*., 1987; Lutz *et al*., 1988). وجود این نواحی متغیر آن را به ابزاری مناسب جهت مطالعه تنوع و ارتباطات خطوط مادری در درون یک گونه مبدل کرده است (Pires *et al*., 2006; moridi *et al*., 2013). Pang *et al*. (2009) با استفاده از DNA میتوکندری سگ اهلی نشان دادند که مخزن ژنی سگ‌ها اشتراکی جهانی دارد. مطالعات صورت گرفته هاپلوتیپ‌های mtDNA سراسر جهان را در 6 گروه فیلوژنتیکی که کلاد[1] A تا F گفته می‌شود و 10 زیرکلاد تقسیم‌بندی نمودند (Vila *et al*.1997;Savolainen *et al*., 2002; Pang *et al*., 2009). این گروه‌های فیلوژنی با فراوانی‌های کم و زیاد در سراسر جهان مشاهده می‌شوند (Angleby and Savolainen, 2005; Klütsch *et al*., 2011). تنوع بالاتر در سگ‌های جنوب شرقی آسیا نسبت به دیگر مناطق نشان می‌دهد که سگ‌ها از جنوب شرقی آسیا خصوصا جنوب چین یا آسیای جنوب شرقی منشا گرفته‌اند (Pang *et al*., 2009).

پرورش سگ توسط اقوام مختلف، عشایر و روستاییان، این حیوان را به گنجینه‌ای زنده تبدیل نموده است که از هر لحاظ با روحیات و نیاز مردم کشور ایران همخوانی دارد. مقاومت بالا، فرمانبرداری، هوش سرشار، قدرت بدنی و تنوع ظاهری، همه به غنای این ذخایر افزوده‌اند. اگر چه در دهه‌های اخیر توجه زیادی به این حیوان در کشور نشده است اما هنوز هم در برخی از نقاط ایران جمعیت‌هایی از سگ‌های بومی ایران یافت می‌شود به طوری که در حال حاضر جمعیت‌های زیادی همچون تازی، سرابی، بختیاری، سنگسری، بلوچی، کردی، ترکمن، قفقازی، افشاری و پاکوتاه ایرانی در کشور یافت می‌شود. گفته می‌شود که سگ تازی یکی از

[1]- Clade

قدیمی‌ترین سگ‌های دنیا با بیش از پنج هزار سال قدمت است (Ardalan *et al.*, 2011). بسیاری از این سگ‌ها به منظور شکار (همانند تازی، پاکوتاه و افشاری) و یا نگهبانی (سرابی، کردی، ترکمن، بلوچی و بختیاری) استفاده می‌شوند.

در این بررسی با مقایسهٔ ناحیهٔ متغیر 1[1] (HV1) ژنوم میتوکندری در هشت جمعیت سگ بومی ایران، جایگاه‌های نوکلئوتیدی متغیر، تنوع و ساختار ژنتیکی و ارتباط ژنتیکی این سگ‌ها با برخی از جمعیت‌های دیگر کرهٔ زمین (اروپا و جنوب غرب آسیا) مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده از مقادیر شاخص تثبیت جمعیت‌های موجود به میزان شباهت ژنتیکی و نحوهٔ تلاقی‌های صورت گرفته پی برده می‌شود که می‌توان با آگاهی از ساختار ژنتیکی این حیوانات برنامه‌های اصلاح نژادی مناسبی را در این جمعیت‌ها جهت حفظ تنوع ژنتیکی مطلوب در جمعیت و جلوگیری از افزایش همخونی بکار برد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و بدست آوردن توالی‌های موجود از بانک اطلاعات ژنوم

برای اجرای این تحقیق نمونه خون از 93 قلاده سگ از جمعیت‌های مختلف، همانند سگ تازی (8 نمونه)، سرابی (20 نمونه)، کردی (9 نمونه)، بختیاری (15 نمونه)، بومی خراسان (8 نمونه)، سنگسری (6 نمونه)، بومی البرز (19 نمونه) و بومی غرب کشور (8 نمونه) جمع‌آوری شدند. کل محتوی DNA با استفاده از روش شستشوی نمکی (Miller *et al.*, 1988) از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده استخراج شد و به عنوان الگو برای تکثیر ناحیهٔ کنترل ژنوم میتوکندری مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین برای مقایسه با سایر جمعیت‌های سگ موجود در دیگر نقاط جهان 655 توالی 582 جفت بازی متعلق به سگ‌های اروپا و جنوب غرب آسیا از بانک اطلاعات ژنوم[2] (NCBI) دریافت شدند.

انجام واکنش PCR نمونه‌ها و تعیین توالی محصولات PCR

با استفاده از توالی رفرنس DNA میتوکندری سگ اهلی (شماره شناسایی NC_002008)، پرایمر مستقیم با توالی 5'-CCGCCCTCCCTAAGACTCAAG-3' و معکوس با توالی 5'-GAGACCAAATGCGTGTAAGAC-3' برای تکثیر قطعه 1179 جفت بازی طراحی شدند. سپس واکنش‌های PCR در حجم‌های 30 میکرولیتری، حاوی 3 میکرولیتر بافر PCR 10X، 1/26 میلی مولار $MgCl_2$، 0/2 میلی مولار dNTPs، 0/27 میکرو مولار از هر پرایمر، 2 واحد آنزیم Taq پلیمراز و 50 نانوگرم DNA انجام شدند. تمامی واکنش‌های PCR با استفاده از برنامهٔ استاندارد واکنش PCR صورت گرفتند که شامل 5 دقیقه جداسازی آغازین زنجیره‌های الگو در دمای 95 درجهٔ سانتیگراد ، 35 سیکل شامل

1- Hypervariable region 1

2- National Center for Biotechnology Information

یک دقیقه در 95 درجهٔ سانتیگراد، یک دقیقه در 65 درجهٔ سانتیگراد و یک دقیقه در 72 درجهٔ سانتیگراد و در نهایت تکثیر نهایی زنجیرهٔ الگو به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجهٔ سانتیگراد بودند. سپس محصولات PCR بدست آمده پس از بررسی در ژل آگارز 1 درصد، با استفاده از کیت QIAGEN مطابق دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی شدند. همه نمونه‌های خالص‌سازی شده (93 نمونه) با استفاده از کیت BigDye v3.1 توسط دستگاه 3730XL DNA analyzer (ABI, USA) تعیین توالی شدند.

بررسی تنوع موجود در توالی‌های بدست آمده از جمعیت‌های بومی

تمامی توالی‌های ناحیهٔ متغیر ابتدایی ژنوم میتوکندری بدست آمده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999) ویرایش شده و به طول 582 جفت باز درآمدند. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) توسط توالی مرجع زیر یکدیگر مرتب شده و بنابراین جایگاه‌های حذف و اضافه[1] و انواع جهش‌های بوقوع پیوسته تشخیص داده شدند. توالی‌های مشابه به عنوان یک هاپلوتیپ در نظر گرفته شدند.

ترسیم درخت فیلوژنی و بدست آوردن هاپلوگروه‌ها

درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.10 (Librado and Rozas, 2009) و به روش Neighbour-joining (NJ) با 1000 بار نمونه‌گیری مجدد برای هاپلوتیپ‌های تشخیص داده شده و 655 توالی بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم (از نژادهای اروپایی، Border collie، Buhund، Bernese mountain dog، Icelandic sheepdog، Finnish Spitz، Mongrel، Leonberger، Landseer، Welsh corgi (pembroke)، setter Irish، Pointer Galgo، Drever، Basset griffon، Español Pyrenean، German Shepherd، mastiff terrier، Schnauzer، Rottweiler Finnish، retriever Golden، Border retriever، Mongrel، Great Dane، Lapphund French، Bracco Italiano، Labrador setter English، Poodle، bulldog Greyhound، Boxer، Dachshund wirehaired و نژادهای جنوب غرب آسیا، Canaan، Saluki، Akbash، Kangal، Kars، Taigan) ترسیم شد. برای محاسبهٔ فواصل ژنتیکی از روش F-statistics استفاده شد. از گروه‌بندی ارائه شده توسط Vila و همکاران (1977)، Savolainen و همکاران (2002) و Pang و همکاران (2009)، جهت ترسیم درخت فیلوژنی و تقسیم‌بندی هاپلوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه

1- Insertions/Deletions

جهت بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه و مقایسه آنها با توالی‌های دریافت شده از بانک اطلاعات ژنوم، جدول تجزیه واریانس مولکولی[1] (AMOVA) و همچنین مقادیر شاخص تثبیت با استفاده از رابطهٔ شمارهٔ 1، توسط نرم‌افزار ARLEQUIN 3.5 (Excoffier and Lischer, 2009) و به روش F-statistics بدست آمدند.

رابطهٔ 1 $$FST = \Phi ST = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

در رابطهٔ فوق σ^2_a واریانس بین جمعیت‌ها و σ^2_T واریانس کل می‌باشند که از جدول آنالیز واریانس مولکولی بدست می‌آیند.

نتایج

تنوع موجود در توالی‌ها

با بررسی قطعهٔ 582 جفت بازی ناحیهٔ D-loop ژنوم میتوکندری سگ‌های بومی ایران 38 جایگاه نوکلئوتیدی متغیر و 25 هاپلوتیپ بدست آمد. از بین 25 هاپلوتیپ شناسایی شده در این مطالعه 19 هاپلوتیپ قبلا شناسایی شده و در بانک اطلاعات ژنوم موجود است. از بین 38 جایگاه متغیر در 32 جایگاه جهش نوع جانشینی، در یک جایگاه جهش نوع جایگزینی، در یک جایگاه حذف نوکلئوتیدی، در سه جایگاه افزایش نوکلئوتیدی و در یک جایگاه حذف و جانشینی توأم رخ داده بود. مقدار تنوع نوکلئوتیدی کل برای تمامی توالی‌های سگ‌های بومی ایران 0/01354±0/00704 بدست آمد که نشان دهندهٔ وجود تنوع ژنتیکی قابل قبولی در این سگ‌ها می‌باشد. همچنین در میان توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم به ترتیب 49 جایگاه نوکلئوتیدی متغیر و 49 هاپلوتیپ در نژادهای اروپا و 56 جایگاه نوکلئوتیدی متغیر و 58 هاپلوتیپ در نژادهای جنوب غرب آسیا مشاهده شد، میزان تنوع نوکلئوتیدی در این نژادها به ترتیب 0/01541±0/0078 و 0/01579±0/00805 بود.

آنالیزهای فیلوژنی

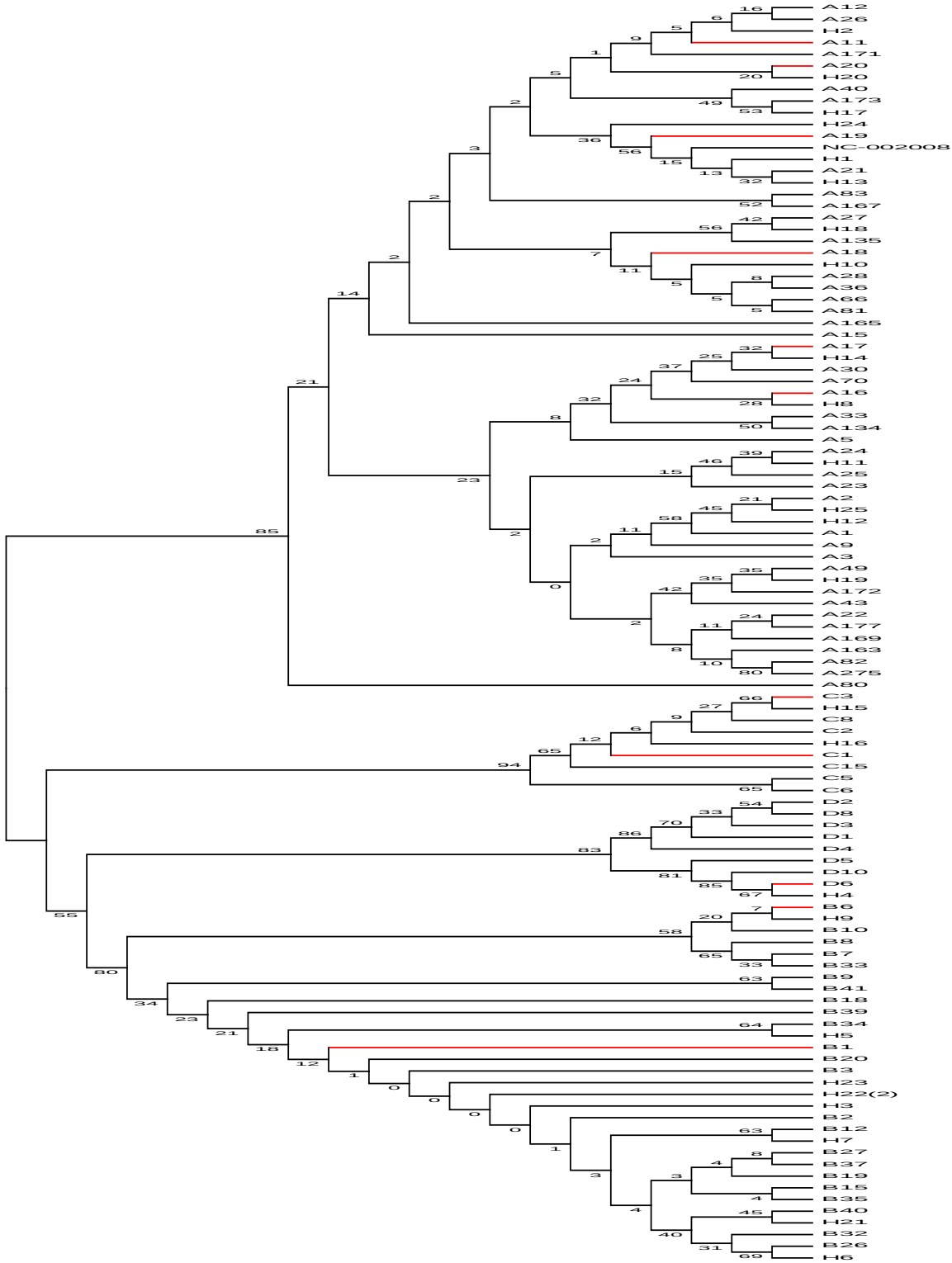
درخت فیلوژنی به روش NJ برای ناحیه HVR1 هاپلوتیپ‌های سگ‌های بومی ایران به همراه توالی‌های از چندین نژاد اروپا و جنوب غرب آسیا جهت مشخص نمودن ارتباط میان چهار کلاد ترسیم شد (شکل 1). توالی‌های نژادهای خارجی با استفاده از بررسی‌های *in Silico* بدست آمد. چهار کلاد A تا D در این درخت مشاهده شد. بیشترین تعداد هاپلوتیپ‌های (74/19 درصد) بدست آمده به همراه نژادهای مختلف سگ از سراسر اروپا Spaniel English Springer، Greenland Dog، Husky siberian، Alaskan Malamute، Lcebandic Sheepdog، Setter Irish، Whippet، Swedish vollhund، Terrier Airedale، Greenland Dog، Kangal، German Shepherd، Terrier Jack Russdl، French Bulldog، Husky، Greenland Dog، German Dog و Pointer، Doberman Hybrid نژادهای جنوب غرب آسیا Taigan، Canaan،

1- Analysis of Molecular Variance

Kangal، Akbash، Kars در درون کلاد A قرار گرفتند. کمترین تعداد هاپلوتیپ‌ها (2/06 درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) شامل هاپلوتیپ H4 بودند که به همراه نژادهای سگ اروپا و جنوب غرب آسیا، Cao Da Serra Do Estrela، Golgo Espanol، Kars و Kangal در هاپلوگروه D قرار گرفتند. هاپلوتیپ‌های H3، H5، H6، H9، H21 و H23 (19/58 درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) در درون هاپلوگروه B به همراه نژادهای مختلف سگ (نژادهای سگ Bearded Cowi، Collie، Dachshund، Doberman Pinscher، Lowchen، Vetriever Golden، Shetland Sheepdog، Terrier Bedlington، Finnish Spitz، Karelian Beardog، Canaandog و Giant Schnauzer از اروپا و Saluki، Canaan، Kangal از جنوب غرب آسیا) شاخه‌بندی شدند. هاپلوتیپ‌های H15 و H16 (3/22 درصد کل هاپلوتیپ) به همراه نژادهای Boxer، Border Collie، Giant Schnauzer، Golgo Espanol، Jamthund، Kangal و Kars در هاپلوگروه C قرار گرفتند. تعداد هاپلوگروه‌ها در جمعیت‌های سگ بومی ایران بین 2 و 3 هاپلوگروه متفاوت بود. جمعیت‌های تازی، کردی، بومی خراسان و سنگسری شامل دو هاپلوگروه A و B، جمعیت بومی غرب کشور شامل دو هاپلوگروه A و C بودند. سه جمعیت باقی‌مانده سه هاپلوگروه نشان دادند، هاپلوگروه‌های A، B و D در جمعیت سرابی و بختیاری، و هاپلوگروه‌های A، B و C در جمعیت بومی البرز دیده شد.

مقایسهٔ ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه و توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم

وجود تمایز ژنتیکی معنی‌دار ما را در اندازه‌گیری اختلاف ژنتیکی کل موجود در زیر جمعیت‌ها کمک می‌کند و عامل Fst نشان‌دهنده وجود تمایز در بین جمعیت‌ها در سطوح مختلف ساختار ژنتیکی است. در روش F-Statistics همانطوریکه در جدول 1 مشاهده می‌شود بیشترین مقدار واریانس برآورد شده به درون جمعیت‌های مورد مطالعه (97/1 درصد) تعلق داشت. آنالیز واریانس صورت گرفته مقدار متوسط (2/9 درصد) را برای واریانس بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد (ΦST=0/029، P=0/0000)، که نشان دهنده وجود تفاوت بین همه یا تعدادی از این جمعیت-ها در سطح احتمال 0/05 می‌باشد. با معنی‌دار بودن این تفاوت، مقادیر شاخص تثبیت (ΦST) بین جفت جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از روش F-Statistics برآورد شدند (جدول 2).



شکل 1- درخت Neighbour-joining ناحیهٔ D-loop ژنوم میتوکندری. هاپلوتیپ‌های بدست آمده در این مطالعه و توالی‌های سگ‌ها از بانک اطلاعات ژنوم. حروف A تا D لاتین نشان دهندهٔ هاپلوگروه‌های تعیین شده می‌باشند.

Figure 1- Neighbour-joining tree for haplotypes of the dog mtDNA

جدول 1- تقسیم‌بندی واریانس ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های مورد مطالعه و توالی‌های بانک اطلاعات ژنوم با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) به روش F-Statistics در سطح احتمال 0/05.

Table 1- Genetic variation within and among populations using the F-Statistics method.

آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) جمعیت‌ها Analysis of molecular variance populations		منبع واریانس Source of variation
درون جمعیت‌ها within populations	بین جمعیت‌ها among populations	
738	9	درجهٔ آزادی degrees of freedom
97.1	2.9	درصد واریانس percentage of variation
	0.000	*P*-value
	0.029	FST

مقادیر شاخص تثبیت با استفاده از این روش در دامنه‌ای بین 0/02671- (بین جمعیت بختیاری و بومی خراسان) الی 0/37481 (بین جمعیت سرابی و بومی غرب کشور) تخمین زده شد. مقادیر ΦST با سطوح معنی‌دار مختلف نشان دادند که از جمعیت‌های مورد مطالعه جمعیت تازی با جمعیت‌های سرابی، بختیاری، بومی البرز و بومی غرب کشور، جمعیت سرابی با جمعیت-های کردی، سنگسری، البرز و بومی غرب کشور ، جمعیت بختیاری با جمعیت‌های البرز و بومی غرب کشور و جمعیت اروپا با غرب آسیا با یکدیگر از نظر ژنتیکی متفاوت هستند (P<0/05). همچنین جمعیت‌های تازی، سرابی و بومی غرب کشور با نژادهای اروپا و غرب آسیا اختلاف معنی‌داری نشان دادند (P<0/05). جمعیت سگ بومی خراسان با همه جمعیت‌های مورد بررسی شباهت ژنتیکی نشان داد (P>0/05).

بحث

در مطالعه حاضر، ساختار ژنتیکی سگ‌های بومی کشور با استفاده از اطلاعات ژنتیکی ژنوم میتوکندریایی مشخص شده و نتایج حاصل با اطلاعات موجود در دیگر جمعیت‌های کره زمین مورد مقایسه قرار گرفت. درخت فیلوژنی برای هاپلوتیپ‌ها و توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم مشخص نمود که 25 هاپلوتیپ بدست آمده از سگ‌های بومی ایران در چهار کلاد از شش کلاد فیلوژنی به همراه پنج زیر شاخه از 10 زیر شاخه مخزن ژنی و زیر هاپلوگروه غیر جهانی d2 قرار گرفتند. نتایج بدست آمده در این مطالعه با نتایج بدست آمده برای سگ‌های غرب آسیا که تنوع ژنتیکی متوسطی را برای این سگ‌ها گزارش کرده‌اند، مطابقت دارند (Ardalan *et al.*, 2011). وجود هاپلوتیپ‌های موجود در آسیای جنوب شرقی در جمعیت‌های سگ بومی ایران به همراه تنوع بالاتر

سگ‌های آسیای جنوب شرقی مؤید این مطلب است که به جز هاپلوگروه d2 که احتمالا در غرب آسیا و از دو رگه گیری سگ و گرگ ایجاد شده است، بقیه هاپلوگروه‌ها از آسیای جنوب شرقی منشاء گرفته‌اند.

جدول 2- مقادیر شاخص تثبیت (Φ_{ST}) جفت جمعیت‌های مورد بررسی بین توالی‌های میتوکندریایی جمعیت‌های مورد مطالعه و توالی‌های بانک اطلاعات ژنوم با استفاده از روش F-Statistics در سطح احتمال 0/05.

Table 2- Index values (ΦST) between pairs of populations using the F-Statistics method.

جمعیت‌ها Populations	تازی Tazi	سرابی Sarabi	کرد Kurdi	بختیاری Bakhtiari	بومی خراسان Khorasan native	سنگسری Sangsari	بومی البرز Alborz native	نمونه‌های غرب کشور Western regions samples	نژادهای اروپا European breeds
سرابی Sarabi	[a] 0.21688								
کردی Kurdi	0.05212	[c] 0.15360							
بختیاری Bakhtiari	[b] 0.09358	0.01151-	0.03421						
بومی خراسان Khorasan native	0.02304	0.09129	0.00487	-0.02671					
سنگسری Sangsari	0.04936	[d] 0.20183	0.01751	0.05221	-0.01278				
بومی البرز Alborz native	[c] 0.04228	[a] 0.20595	0.01056	[a] 0.06717	0.02253-	0.02178-			
نمونه‌های غرب کشور Western regions samples	[d] 0.17857	[a] 0.37481	[d] 0.14918	[d] 0.20335	0.10476	0.06514	0.03146		
نژادهای اروپایی Europe breeds	[c] 0.04360	[a] 0.13195	0.00043	[b] 0.04371	-0.0000	0.02266	0.00987	[a] 0.10501	
نژادهای جنوب غرب آسیا swAsia breeds	[c] 0.04618	[a] 0.10659	-0.00111	0.02491	-0.00937	0.01529	0.01508	[a] 0.10911	[a] 0.01441

[a] P-value = 0.0000، [b] P-value = 0.01802، [c] P-value =0.04505، [d] P-value = 0.00901

تمامی جمعیت‌های سگ بومی کشور هاپلوگروه A را نشان دادند که با یافته‌های بدست آمده در مورد نحوهٔ پراکنش این هاپلوگروه در سراسر کرهٔ زمین مطابقت دارد (Savolienin *et al*., 2002; Pang *et al*., 2009; Ardalan *et al*., 2011). در بررسی Verginelli و همکاران (2005) که روی سگ‌های باستانی ایتالیا مربوط به 3 تا 15 هزار قبل صورت گرفت، این سگ‌ها به کلیدهای A، B و C متصل شدند. در این بررسی هاپلوتیپهای A11، A12، A13، A14، A15 و A65 مربوط به 9000 سال قبل، هاپلوتیپ‌های A18، A19، A20، A63 و A67 مربوط به 3 هزار سال قبل، و هاپلوتیپ‌های C1، C2، C3 و C4 مربوط به 4 هزار سال قبل می‌باشد. از میان این هاپلوتیپ‌ها، هاپلوتیپ‌های A11، A18، A19، A20،C1 و C3 در جمعیت‌های سگ بومی ایران مشاهده شد. از آنجایی که هاپلوتیپ‌های A11، A18 و A19 دارای فراوانی بالا در میان جمعیت‌ها می‌باشد، می‌توان گفت که قدمت این جمعیت‌ها به 3 تا 9 هزار سال قبل برمی‌گردد. هاپلوتیپ‌های C1 و C3 در میان دو جمعیت مجزا، بومی البرز و بومی غرب کشور مشاهده شد، این امر بیان می‌کند که اگر چه این جمعیت‌ها قدمت بیش از 4 هزار سال قبل داشته اند با این حال در این زمان بوده که رگه‌های مادری جدیدی به این دو جمعیت افزوده شده است. وجود این هاپلوتیپ‌ها در سگ‌های بومی ایران بیان کننده این امر است که سگ‌های موجود در ایران خیلی قبل‌تر از این زمان وجود داشته‌اند.

بیشترین درصد هاپلوتیپ مشاهده شده در این مطالعه مربوط به هاپلوتیپ A11 می باشد این هاپلوتیپ نیز در سگ های اروپا فراوانی بالایی دارد. از میان سگ های اروپایی استفاده شده در این تحقیق سگ Rottweiler بیشترین هاپلوتیپ A11 را دارا بود در نتیجه می توان گفت سگ‌های ایران به این نژاد نزدیک تر است. همچنین این هاپلوتیپ دارای بیشترین فراوانی در غرب آسیا بود و چون تعداد این هاپلوتیپ در غرب آسیا بیش از دو برابر آن در اروپا است می‌توان نتیجه گرفت که سگ های ایران به غرب آسیا نسبت به اروپا نزدیکترند.

آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از روش F-Statistics در سطح احتمال 0/05 مقدار معنی‌داری را از تفاوت‌های بین جمعیت‌ها مشخص نمود (جدول 1). بدلیل وجود تفاوت معنی‌دار بین جمعیت‌های مورد بررسی، می‌توان با استفاده از مقادیر شاخص تثبیت، کلیهٔ جمعیت‌ها را مورد مقایسه قرار داد (جدول 2). جمعیت بومی خراسان با همه جمعیت‌ها و همچنین با توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم شباهت ژنتیکی نشان دادند که علت این امر می‌تواند مهاجرت و یا انتقال زیاد این حیوان از شرق به غرب و نواحی مرکزی ایران در گذشته و حال باشد که این امر با در نظر گرفتن راه ابریشم که از خراسان وارد ایران و سپس به نواحی شمال و غرب ایران کشیده می‌شود بعید به نظر نمی‌رسد. جمعیت تازی با دیگر جمعیت‌ها به جز جمعیت کردی، سنگسری و بومی خراسان اختلاف معنی

داری نشان داد. سگ تازی از نوع شکاری بوده و از نظر فنوتیپی ساختار مشخصی دارد. از آنجایی که سگ‌های شکاری در قدیم کاربرد زیادی داشته و خالص بودن این سگ‌ها برای فنوتیپ مناسب اهمیت زیادی داشته است، احتمالاً تلاقی زیادی بین این اکوتیپ با دیگر جمعیت‌ها صورت نگرفته است و این امر دلیلی برای متفاوت بودن آن با دیگر جمعیت‌ها است. متفاوت نبودن جمعیت سگ سنگسری، بومی غرب کشور و بومی البرز، با همدیگر نشان از عدم کنترل تلاقی-های بین جمعیتی می‌باشد. همچنین متفاوت نبودن برخی از این جمعیت‌ها با نژادهای اروپا و غرب آسیا می‌تواند به خاطر گستردگی جهانی بسیاری از هاپلوتیپ‌هایی باشد که در اغلب جمعیت‌ها به صورت مشترک دیده می‌شود. باید بیان نمود که عدم وجود مانعی برای جلوگیری از مهاجرت و انتقال این حیوان از یک جمعیت به جمعیت دیگر علت اصلی شبهاهت برخی از این جمعیت‌ها می‌باشد. البته امکان این امر وجود دارد که کلیهٔ جمعیت‌های سگ موجود در ایران از نظر ژنتیکی با یکدیگر متفاوت بوده و هر یک جمعیتی مجزا را تشکیل دهند. بطورکلی جمعیت-های سرابی و تازی با یکدیگر و با دیگر جمعیت‌ها متفاوت بوده و می‌توان هر کدام از این سگ‌ها را یک جمعیت مجزا در نظر گرفت.

اطلاعات حاصل از آزمایشات ژنوم میتوکندری نشان می‌دهد که سگ یکی از حیواناتی است که بر خلاف سایر حیوانات اهلی و دست‌آموزی که در حال حاضر در ایران یافت می‌شوند در ایران اهلی نشده و محل اهلی شدن آن مناطقی از جنوب شرق آسیا می‌باشد (Pang *et al.*, 2009)، که این امر با توجه به اینکه تنوع و هاپلوگروه‌های شناسایی شده در سگ‌های بومی ایران (5 زیر شاخه از 10 زیر شاخه مخزن ژنی) کمتر از شرق آسیا بخصوص چین (10 زیر شاخه مخزن ژنی) است تایید می‌شود. وجود راه ابریشم به عنوان یک موقعیت استراتژیک سبب شده که ایران محل عبور بسیاری از تجار و کاروان‌ها باشد. این راه که از شرق ایران شروع و از شمال غرب ایران خارج می‌شود سبب اتصال کشورهای جنوب شرق آسیا به اروپا و آفریقا می‌شود. این امر سبب شد که ایران به عنوان گذرگاهی برای ورود سگ‌ها به اروپا و آفریقا تبدیل گردد. نتایج حاصل بیانگر تنوع قابل قبول در جمعیت‌های موجود سگ‌های بومی کشور می‌باشد که مشابه اطلاعات بدست آمده قبلی است (Ardalan *et al.*, 2011). اگر چه تنوع نژادهای اروپا در این مطالعه بیشتر از جمعیت‌های سگ بومی ایران بود اما باید در نظر داشت که تعداد نمونه‌های استفاده شده برای اروپا سه برابر نمونه‌های ایران است. از طرفی باید خاطر نشان کرد که پرورش سگ در اروپا از اهمیت زیادی برخوردار است که باعث شکل‌گیری کلونی‌هایی شده است که با روش‌های اصلاح نژادی مدیریت می‌شوند و جلوگیری از اختلاط نژادهای موجود از اولویت‌های اصلاح نژادی آنها می‌باشد. در صورتیکه در کشور پرورش‌دهندگان این حیوانات به صورت غیر رسمی و ناآگاهانه برای اهداف

اقتصادی خود تلاقی‌های نامناسبی را انجام می‌دهند که خود در اغلب اوقات باعث افزایش هم خونی‌های نژادی و به دنبال آن کاهش تنوع جمعیتی می‌شود. این اولین مطالعه‌ای می‌باشد که خطوط ژنتیکی مادری و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های سگ بومی کشور را با استفاده از توالی‌های ناحیه متغیر ژنوم میتوکندری مورد آنالیز قرار داده است و نتایج بدست آمده اختلاط حاصل از جمعیت‌های مختلف را در شکل‌گیری جمعیت فوق بسیار محتمل می‌داند. از سویی باید خاطرنشان کرد که در حال حاضر قوانین نظارتی و حمایتی برای پرورش سگ و همچنین مراکز نگهداری استاندارد همراه با ثبت مشخصات و پرورش عملی جهت حفظ و حراست از جمعیت‌های موجود سگ در ایران وجود ندارد، چه بسا بسیاری از افراد پرورش این حیوان را به دلیل مسائل عقیدتی نادرست می‌دانند. در راستای حفظ ذخایر ژنتیکی بومی کشور و برای احیاء و اصلاح نژاد این جمعیت‌ها که در شکل‌گیری نژادهای سگ اروپا و آفریقا تأثیر بسزایی داشته‌اند، باید قوانین حفاظتی، مراکز اصلاح نژادی و آزمون‌های ژنتیکی ویژه‌ای در نظر گرفته شود.

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر با حمایت مالی پلیس مبارزه با مواد مخدر ناجا انجام شده است که بدین وسیله از همکاری صمیمانه آنها تقدیر و تشکر شایسته به عمل می آید.

منابع

Amills M, Ramírez O, Tomàs A, Badaoui B, Marmi J, Acosta J, Sànchez A, Capote J (2008). Mitochondrial DNA diversity and origins of South and Central American goats. Animal Genetics 40: 315-322.

Angleby H, Savolainen P (2005). Forensic informativity of domestic dog mtDNA control region sequences. Forensic Science International 154: 99-110.

Ardalan A, Kluetsch CFC, Zhang A, Erdogan M, Uhlén M, Houshmand M, Tepeli C, Ashtiani SRM, Savolainen P (2011). Comprehensive study of mtDNA among Southwest Asian dogs contradicts independent domestication of wolf, but implies dog–wolf hybridization. Ecology and Evolution 1: 373-383.

Ardalan A (2012). Molecular profiling of the population dynamics: Foundation and expansion of an archaic domesticate. Doctoral thesis in Biothechnology, KTH-Royal Institute of Technology, School of Biotechnology, Stockholm, Sweden.

Brown S K, Pedersen NC, Jafarishorijeh S, Bannasch DL, Ahrens KD, Wu JT, Okon M, Sacks BN (2011). Phylogenetic Distinctiveness of Middle Eastern and Southeast Asian Village Dog Y Chromosomes Illuminates Dog Origins. PLoS One 6: e28496.

Cairn RL, Stoneking M, Wilson AC (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. Nature 325: 31-36.

Excoffier L, Lischer H (2009). ARLEQUIN VER: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Ecology and Evolution, University of Berne, Baltzerstrasse 6, 3012 Bern, Switzerland.

Hall TA (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-8.

Klütsch C, Seppälä E, Fall, T, Uhlén M, Hedhammar A, Lohi H, Savolainen P (2011). Regional occurrence, high frequency but low diversity of mitochondrial DNA haplogroup d1 suggests a recent dog-wolf hybridization in Scandinavia. Animal Genetics 42-: 100-103.

Larson G, Albarella U, Dobney K, Rowley-Conwy P, Schibler J, Tresset A, Vigne JD, Edwards C J, Schlumbaum A, Dinu A, Balaçsescu A, Dolman G, Tagliacozzo A, Manaseryan N, Miracle P, Wijngaarden-Bakker LV, Masseti M, Bradley DG, Cooper A (2007). Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 15276–15281.

Librado P, Rozas J (2009). DNASP v5: A software for comperhensive analysis of DNA polymorfism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.

Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S (1998). Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. International journal of legal medicine 111: 67-77.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16: 1215.

Moridi M, Masoudi AA, Vaez Torshizi R, Hill EW (2013). Mitochondrial DNA D-loop sequence variation in maternal lineages of Iranian native horses. Animal Genetics 44: 209-213.

Pang JF, Kluetsch C, Zou XJ, Zhang AB, Luo LY, Angleby H, Ardalan A, Ekstrom C, Skollermo A, Lundeberg J, Matsumura S, Leitner T, Zhang YP, Savolainen P (2009). mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. Molecular Biology and Evolution 26: 2849-64.

Parra D, Mendez S, Canon J, Dunner S (2008). Genetic differentiation in pointing dog breeds inferred from microsatellites and mitochondrial DNA sequence. Animal Genetics 39: 1-7.

Pires AE, Ouragh L, Kalboussi M, Matos J, Petrucci-Fonseca F, Bruford MW (2006). Mitochondrial DNA sequence variation in Portuguese native dog breeds: diversity and phylogenetic affinities. Journal of Heredity 97: 318-30.

Savolainen P, Zhang YP, Luo J, Lundeberg J, Leitner T, (2002). Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. Science 298: 1610-3.

Tanabe Y (2006). Phylogenetic studies of dog with emphasis on Japanese and asian beerds. apan Science and Technology Information Aggregator, Electronic 82: 375-387.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-80.

Verginelli F, Capelli C, Coia V, Musiani M, Falchetti M, Ottini L, Palmirotta R, Tagliacozzo A, Mazzorin IDGM, Mariani-Costantini R (2005). Mitochondrial DNA from prehistoric canids highlights relationships between dogs and south-east European wolves. Molecular Biology and Evolution 22: 2541-2551.

Vila` C, Savolainen P, Maldonado JE, Amorim IR, Rice JE, Honeycutt RL, Crandall KA, Lundeberg J, Wayne RK (1997). Multiple and ancient origins of the domestic dog. Science 276: 1687–1689.

Study of the Genetic Structure of Iranian Native dogs Using Mitochondrial DNA information

Alizade M.[1], Masoudi A.A.[2*], Vaez Torshizi R.[3], Allahyar khan khorasani D.[4]

[1] Graduate Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3] Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[4]Graduate student of Animal Science, Islamic Azad University, Varamin Branch, Iran.

Abstract

The objective of the current study was analysis of the genetic structure of Iranian native dogs in comparison with the exotic breeds. To follow this, blood samples of 93 dogs were obtained from diverse areas of Iran and, in addition, 655 sequences of canine D-loop region obtained from GenBank. Total DNA of the samples were extracted by salting out procedure and applied as template for amplification and sequencing of the D-loop region of mtDNA. Sequence analysis of the 582-bp D-loop region of mtDNA in all samples defined a total of 25 haplotypes. The total nucleotide diversity was 0.01354± 0.00704 for Iranian native dogs. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed significant percent for the variance between the studied populations (ΦST=0.029, P=0.0000). Fixation index values using F-Statistics method ranged from -0.02671 to 0.3748. Analysis of molecular variance displayed significant difference between some of these populations. The variation was especially observed between Tazi and Sarabi, Bakhtiari, Alborz native and Western regions populations or between Sarabi population with Kurdi, Sangsari, Alborz native and Western regions populations. Bakhtiari population showed a significant difference ($P < 0.05$) with Alborz native and Western regions populations, and finally European breeds exhibited a difference with South West Asia breeds. In addition Tazi, Sangsari and Western regions populations displayed significant difference with European breeds and South West Asia breeds ($P < 0.05$). Overall, the results of this study showed an acceptable genetic variation and genetic similarity in some Iranian dog populations.

Keywords: *Genetic structure- Mitochondrial- Iranian native dog, haplotype.*

[*] Corresponding Author: Masoudi A.A. Tel: 09193650768 Email: masoudia@modares.ac.ir