



"مقاله پژوهشی"

بررسی تنوع ژنتیکی ژن BRCA1 در برخی نژادهای گوسفند اهلی و وحشی جهان و ترسیم ساختار فیلوژنتیکی آنها

علیرضا نیک‌منش^۱، مسعود اسدی فوزی^۲، علی اسمعیلی‌زاده کشکویی^۳، حجت اسدالله‌پور نعنائی^۴ و لیلا عزالدین‌لو^۵

۱- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، (نویسنده مسوول : nikmanesh12784@agr.uk.ac.ir)

۲ و ۳- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۴- دانش‌آموخته دکترای تخصصی، گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۵- رئیس گروه ژنتیک، دفتر موزه ملی تاریخ طبیعی و ذخایر ژنتیکی، سازمان حفاظت محیط‌زیست

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۷

صفحه: ۱۷۶ تا ۱۸۶

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: ژن BRCA1 که به آن "دروازه‌بان" می‌گویند؛ نقش مهمی در روند ترمیم آسیب‌های DNA، تنظیم چرخه سلولی، تنظیم فرآیند رونویسی، حفظ پایداری کروموزوم و دیگر مسیرهای مهم برای تعمیر و نگهداری از ثبات ژنوم دارد. تحقیق حاضر با هدف انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی و مقایسه تنوع ژنتیکی و ساختار فیلوژنتیکی ژن BRCA1 در نژادهای مختلف گوسفندان اهلی و وحشی از ۴۹ نژاد در ۶ منطقه جغرافیایی: آسیای غربی، اروپا، چین، شمال آفریقا، جنوب آفریقا و نژاد وحشی (کشور ایران) با استفاده از بانک اطلاعاتی ژنوم NCBI انجام شد.

مواد و روش‌ها: توالی‌های موردنظر با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 هم‌تراز و درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor-Joining ترسیم شد. همچنین تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوئیدی، تعداد جایگاه‌هایی که در آنها جایگزینی مشابه یا غیر مشابه اتفاق افتاده، درصد تفرق ژنی و تبدیل ژنی نیز با استفاده از نرم‌افزار Dnasppv5 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل‌های مربوط به مقایسه نژادهای موجود در ۶ منطقه جغرافیایی، ۱۱۲ چند شکلی را نشان داد که منجر به ایجاد ۱۹ هاپلوئید مختلف با تنوع هاپلوئیدی ۰/۳۵ شد. تنوع نوکلئوتیدی و متوسط تفاوت‌های نوکلئوتیدی (k) در بین نژادها به ترتیب ۰/۲۰۵ و ۰/۰۵۲ برآورد گردید. تمایز ژنتیکی بین جمعیت گوسفندان چین با جمعیت گوسفندان وحشی کمترین بود. میانگین فواصل ژنتیکی بین تمام مناطق جغرافیایی ۰/۲۹ محاسبه گردید. میانگین نسبت نوکلئوتیدی (G+C) : (A+T) برابر با ۳۸/۶۲٪ بود که نشان‌دهنده غالب بودن بازهای سیتوزین و گوانین می‌باشد. میزان توالی حفاظت شده این تحقیق به طور میانگین ۰/۳۱۳ بود که نشان‌دهنده چند شکلی بالای این ژن و به وجود آمدن پروتئین‌های جدید و همچنین عملکردهای جدیدی جهت سازگاری با شرایط مختلف هموستازی می‌باشد. تعداد مؤثر کدون‌ها در این تحقیق ۵۶/۴۱ محاسبه شد. مقدار D تاجیما در آزمون بی‌طرفی تاجیما ۰/۴۷۸ به دست آمد که نشان‌دهنده متعادل بودن فشار انتخاب می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تنوع ژنتیکی بالایی در جمعیت وحشی وجود دارد که از دلایل آن وجود محیط‌های جنگلی و باز، جلوگیری از رانش ژنتیکی و کاهش آمیزش‌های خویشاوندی می‌باشد که بر روی قدرت عضلانی، عادات غذایی، رفتارهای پرخاشگرانه، پاسخ‌های دفاعی، ادراک حسی مقابله با شرایط و استرس‌های محیطی مرتبط با بیان ژن BRCA1 در این جمعیت‌ها تأثیر گذار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ساختار فیلوژنتیکی، گوسفند، منطقه جغرافیایی، BRCA1

مقدمه

حیوانات بومی به‌عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب می‌شوند که حفظ و تکثیر آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این حیوانات بعد از هزاران نسل انتخاب طبیعی و نیز گذر از موانع بسیار و یا غلبه بر شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خود ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند و به بسیاری از محدودیت‌های محیطی سازگاری پیدا کرده‌اند (۳۲).

در مطالعات منابع ژنتیکی حیوانی؛ نژادهای در معرض خطر و سایر نژادها تفاوت چندانی از نظر ژنتیکی نداشته و بررسی چگونگی حفظ حداکثر تنوع ژنتیکی آنها در تحقیقات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بنابراین با توجه به خطر انقراض تعدادی از گونه‌های موجود، مطالعه جمعیت‌ها و حفظ این ذخایر ژنتیکی بسیار حائز اهمیت است (۱۴).

تنوع نوکلئوتیدی نیز به‌عنوان معیاری برای نظارت بر تنوع بین یا درون جمعیت‌ها (۲۲)، یا برای تعیین روابط تکاملی (۴۶) استفاده می‌شود. گوسفندان وحشی پراکنش وسیعی در نیمکره شمالی کره زمین دارند. پراکنش آنها از آمریکا و کانادا تا مناطق وسیعی از آسیا و بخشی از اروپا را شامل می‌شود. در

مطالعاتی که روی قوچ و میش در جهان صورت گرفته است، آنها را بین ۱ تا ۷ گونه تقسیم نموده‌اند. در مطالعات انجام شده مشخص شده است که گوسفندان وحشی (Ovis) از لحاظ رده‌بندی یکی از جنس‌های پیچیده در جهان هستند. گونه گوسفند وحشی یا Ovis orientalis در بیشتر مناطق ایران پراکنده است. اگرچه از تعداد زیرگونه‌های گوسفند وحشی در ایران اطلاعات چندانی در دست نیست؛ اما زیرگونه‌هایی مانند قوچ اوربال، قوچ ارمنی، قوچ اصفهان، قوچ البرز مرکزی، قوچ کرمان و قوچ لارستان تا حدودی شناسایی شده‌اند. قوچ و میش لارستان Ovis orientalis Larstanica یکی از این زیرگونه‌هاست که قوچ مینیاتوری نیز نامیده می‌شود و کوچک‌ترین زیرگونه گوسفند وحشی در ایران است که با خطر انقراض روبرو است (۴۹).

رضایی و همکاران در تحقیقی تکامل و رده‌بندی گونه‌های وحشی جنس قوچ (Ovis) در جهان را مورد بررسی قرار دادند و دیدگاه‌های جدیدی را برای تکامل گوسفند وحشی توسط تکامل نژادی مولکولی با استفاده از روش‌های صرفه‌جویی حداکثر (Maximum parsimony)، بی‌زین (Bayesian)، تشابه حداکثر (Maximum likelihood) و اتصال همسایگی

همچنین رژیم غذایی مدتهاست به‌عنوان یکی از دلایل اولیه تفاوت در میزان بروز سرطان پستان در کشورهای مختلف به صورت یک فرضیه مطرح است. در تحقیق آن ماری و باربارا و همکاران (۶،۳) یک ارتباط قوی بین متوسط میزان دریافت چربی در یک کشور و میزان بروز سرطان پستان در آن کشور نشان داده شد. گفته می‌شود مصرف زیاد چربی از طریق افزایش سطح استروژن اثر خود را اعمال می‌کند.

همولوگ‌ها و ارتولوگ‌های BRCA1 فقط در حیوانات و گیاهان یافت می‌شوند؛ در حالی که BRCA2 در قارچها نیز یافت می‌شود. حضور ژن‌های BRCA1/2 به ۱/۶ میلیارد سال پیش باز می‌گردد زمانی که سه سلسله برای اولین بار از هم جدا شدند (۸). در تحقیقی کرمی و همکاران (۲۱) نشان دادند که ژن BRCA1 به‌عنوان یک ژن مؤثر در مقاومت به ورم پستان می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در تحقیقی دیگر یوان و همکاران (۴۷) ده ژن BRCA1 گاوی را به‌عنوان یک ژن کاندید جدید برای ورم پستان گاوی گزارش کردند؛ اگرچه پلی‌مورفیسم ژن BRCA1 مرتبط با ورم پستان گاوی در نژادهای مختلف گاو مورد بررسی قرار نگرفت. نتایج تحقیق مدسن و همکاران (۲۷) نیز نشان داد که ژن BRCA1 در گونه‌های پستانداران بر عملکرد آن در موجودات مختلف تأثیرگذار است. در تحقیق ایکیمه و همکاران (۱۱) بیشترین زمان واگرایی (۹۵ میلیون سال پیش) این ژن مربوط به نهنگ قاتل و انسان و کمترین زمان واگرایی (۴/۶ میلیون سال پیش) مربوط به گاو و بوفالو آمریکایی مشاهده شد. طی تحقیقی خواص فیزیکیوشیمیایی پروتئین BRCA1 در پنج گونه پستانداران (گاو، گوسفند، خوک، گاو میش آمریکایی و انسان) در طبیعت؛ ناپایدار آبدوست و درون سلولی نشان داده شد. نتیجه حاصل این است که ژن BRCA1 در پستانداران مختلف با ویژگی‌های عملکردی ژن و پروتئین متفاوت یافت می‌شود. اگر چه ژن BRCA1 باعث ایجاد سرطان پستان و تخمدان در انسان و به‌عنوان ژن کاندید برای ورم پستان گاوی شده است؛ ممکن است تعمیم اینکه این ژن مسئول هر گونه تومور پستانی در این پستانداران باشد نیز دشوار است (۴۵). همچنین درصد شباهت در میان گاو، گوسفند، خوک و گاو میش آمریکایی در مقایسه با اسیدهای آمینه BRCA1 انسانی در محدوده ۷۴-۷۲٪ بود که نشان می‌دهد آن‌ها ممکن است الگوی تکاملی مشابهی داشته باشند. درصد شباهت ژن‌های BRCA1 در میان این حیوانات در مقایسه با انسان ۸۳-۸۱٪ بود. نکته مهم این است که توالی‌هایی با درصد شباهت تقریباً ۷۰٪ نشان می‌دهند که همولوژی یکسان، شباهت عملکرد و حفاظت بسیار بالا در ژن BRCA1 وجود دارد یعنی ارگانسیم‌هایی که درصد شباهت بالایی در ژن‌هایشان دارند الگوی تکامل و تمایز مشابهی دارند (۴۵).

رابطه فیلوژنتیکی ژن‌های BRCA1 پستانداران به طریقی است که گونه‌های با عادات غذایی تقریباً مشابه در کنار هم قرار می‌گیرند. این مطلب نشان می‌دهد که هر چه درصد شباهت بین گونه‌ها نزدیک‌تر باشد امکان خوشه‌بندی با هم بیشتر می‌شود (۴۴). هدف از این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار فیلوژنتیکی ژن BRCA1 برخی نژادهای گوسفندان

(Neighbor-Joining) به‌دست آوردند. نتایج این تحقیق نشان داد که در جهان ۶ گونه و در ایران ۲ گونه قوچ و میش زیست می‌کنند (۳۵). ژن breast cancer A1 یا BRCA1 به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندیدا در ایجاد مقاومت به بیماری‌ها از جمله ورم پستان معرفی شده است (۴۷). نقش این ژن در روند ترمیم آسیب‌های DNA، تنظیم چرخه سلولی، تنظیم فرآیند رونویسی، حفظ پایداری کروموزوم و دیگر مسیرهای مهم برای تعمیر و نگهداری از ثبات ژنوم است. این جایگاه ژنی در انسان شامل ۲۴ اگزون است که اگزون ۱۱ بزرگترین اگزون آن بوده و بالغ بر ۶۰٪ از آمینواسیدها را کد می‌کند (۹). در گوسفند این ژن بر روی کروموزوم شماره ۱۱ قرار دارد که شامل ۱۲۱۵ نوکلئوتید و ۲۴ اگزون می‌باشد.

BRCA1 و BRCA2 به‌عنوان ژن‌های "gatekeeper" نیز در نظر گرفته می‌شوند، که وقتی که جهش یافته یا غیرطبیعی بیان می‌شوند؛ باعث اختلال در زیست‌شناسی سلولی طبیعی و تقسیم سلولی آن شده و در نهایت باعث رشد سلول‌های سرطانی می‌شوند (۳۹).

در حالت طبیعی رشد و تکثیر سلول‌ها متناسب با خصوصیات سلول و بافت توسط ژن‌های مختلفی کنترل می‌گردد. ژن‌های دخیل در سرطان‌زایی به دو گروه ژن‌های سرکوب‌گر تومور و ژن‌های تحریک‌کننده رشد تومور تقسیم می‌شوند (۲۸،۱۶).

ژن‌های سرکوب‌گر تومور دارای نقش مهمی در تنظیم چرخه سلولی می‌باشند. این ژن‌ها با کد کردن پروتئین‌هایی که رشد سلولی را مهار می‌کنند از بدخیم شدن سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. اگر این ژن‌های سرکوب‌گر تومور نتوانند عملکرد صحیح خود را اعمال کنند پس از بروز اختلال در DNA سلول به تکثیر خود ادامه داده و سرانجام می‌توانند منجر به تشکیل توده سرطان گردند (۲۸،۱۶). ژن‌های تحریک‌کننده رشد تومور غالباً فرم موتانت ژن‌هایی تحت عنوان پروتوانکوژن‌ها می‌باشند که در سلول سالم نقش تنظیم‌کننده رشد را دارند (۲۸،۱۶). نیگی و همکاران بیان کردند اگر چه صدها جهش آسیب‌رسان نادر از ژن BRCA1 ارائه شده‌اند اما شیوع و فنوتیپ جهش BRCA1 در کشورها و نژادهای مختلف متفاوت است (۳۲)؛ به صورتی که آثار محیطی، جغرافیایی و سایر فاکتورها بر روی شیوع و نوع واریانت جهش‌های BRCA1 و BRCA2 در میان جوامع متفاوت اثر دارند (۲۵،۷).

لندگرن و همکاران نشان دادند تعدادی از این جهش‌ها در نژادهای خاصی ظاهر می‌گردند، لذا به‌عنوان جهش‌های اثر مؤسس^۱ تلقی می‌گردند (۲۵). همچنین طبق تحقیق فرلا و همکاران تفاوت عمده‌ای در فراوانی جهش‌های اختصاصی در جمعیت‌های مختلف گزارش گردید (۱۲). این بدین معنی است که درون جمعیت‌های خاص برخی از جهش‌های خاصی متداول هستند و مختص مناطق جغرافیایی خاص هستند (جهش‌های اثرگذار) (۲۴). بنابراین جهش موروثی در هر یک از این ژن‌ها همراه با فقدان هتروزیگوسیتی، سلول‌ها را به بی‌ثباتی کروموزومی و تا حد زیادی افزایش احتمال به تغییر و توسعه سرطان مستعد می‌کند (۴۰).

ژن BRCA1 از ۴۹ نژاد در ۱۵ کشور به شش منطقه جغرافیایی به ترتیب A تا F: آسیای غربی، اروپا، چین، شمال آفریقا، جنوب آفریقا و ایران (نژاد وحشی) تقسیم بندی گردیدند (جدول ۱).

اهلی و وحشی در شش منطقه جغرافیایی و مقایسه پارامترهای تفاوت‌های احتمالی و روابط تکاملی آنها از جایگاه فیلوژنتیکی و فیلوژئوگرافی بر مبنای آنالیزهای بیوانفورماتیکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق توالی‌های استخراج شده مربوط به

جدول ۱- مناطق جغرافیایی، نژادها و کشورهای دارای گوسفندان اهلی و وحشی استخراجی از پایگاه اطلاعاتی NCBI
Table 1. The geographical regions, breeds and countries with domestic and wild sheep retrieved from the NCBI database

نام منطقه	تعداد نمونه	نام نژادها	نام کشورها
A	۴۳	Afshari (۶) - Baluchi (۲) - Ghezel (۴) - Grey Shiraz (۳) - Makui (۴) - Moghani (۴) - Shal (۳) - Turkish Awassi (۲) - Cine Capari (۱) - Karya (۱) - Karakas (۱) - Norduz (۱) - Sakiz (۲) - Karakul (۳) - Kachi (۱) - Thalli (۲) - Awassi (۲) - Hamdani (۱)	ایران - عراق - ترکیه - پاکستان
B	۲۸	Cheviot (۲) - Dollgellau Welsh Mountain (۱) - Romney (۱) - Scottish Blackface (۱) - Tregaon Welsh mountain (۱) - Welsh Hardy Speckled Face (۱) - Castellana (۲) - Churra (۲) - Ojalada (۲) - Salz (۳) - Swiss Mirror (۱) - Swiss White Alpine (۴) - Valais Blacknose (۱) - Altamura (۲) - Leccese (۱) - Rhoen (۳)	آلمان - انگلستان - اسپانیا - ایتالیا - سوئیس
C	۱۱	Hu	چین
D	۲۲	BRB1 until BRB6 (۱) - BRB8 & 9 (۱) - Barki (۳) - Ossimi (۲) - Rahmani (۲) - BNG1 & 8 (۱) - KEF6 & KEF8 until KEF11 (۱)	مصر - ایتوبی - لیبی
E	۳	Namaqua Afrikaner (۱) - Ronderib Afrikaner (۲)	آفریقای جنوبی
F	۸	Ovis orientalis (۳) - Ovis vignei (۵)	ایران

اعداد داخل پرانتز تعداد نمونه‌های هر نژاد می‌باشد.

$$Q(i, j) = (r - 2)d(i, j) - \sum d(i, k) - \sum d(j, k)$$

(رابطه ۱)

در رابطه بالا $d(i, j)$: فاصله بین شاخه i و j : شاخه k ام درخت، r : تعداد کل شاخه‌ها و $Q(i, j)$: مقدار عددی شاخه‌های i و j است.

از روش حداکثر درستمایی برای بدست آوردن میزان جانمایی به جایگزینی نوکلئوتیدها در بازهای پورینی و پیریمیدینی با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 (۴۱) استفاده شد. آماره D تاجیما که برای بررسی بی‌طرفی یا تأثیر انتخاب استفاده می‌شود؛ در اینجا برای بررسی تنوع نوکلئوتیدی حاصل از مشاهدات با استفاده از تنوع حاصل از فراوانی آلی در جایگاه‌های چندشکلی انجام گرفت (۴۰).

تنوع هاپلوتیپی نیز معیاری از منحصر به فرد بودن یک هاپلوتیپ خاص در یک جمعیت معین است. تنوع هاپلوتیپی (H) در اینجا به صورت فرمول ۲ محاسبه می‌شود (۲).

$$H = \frac{N}{N-1} (1 - \sum x_i^2)$$

(رابطه ۲)

که در آن x_i فراوانی هاپلوتیپی از هر هاپلوتیپ در نمونه و N اندازه نمونه است.

تمايز ژنتیکی نیز بر اساس فرمول ۳ محاسبه می‌گردد:

$$F_{ST} = \frac{F_B - F_W}{F_W}$$

(رابطه ۳)

که در آن F_{ST} شاخص تثبیت ژنتیکی، F_B میانگین بین تفاوت‌های بین دو فرد در بین جمعیت‌های مختلف و F_W میانگین بین تفاوت‌های بین دو فرد در درون یک جمعیت می‌باشد.

سپس جهت مقایسه توالی‌ها و اطلاع از فراسنجه‌های ژنتیکی ابتدا توالی ژن BRCA1 در نژادهای گوسفند اهلی و وحشی که از پایگاه بانک اطلاعاتی داده‌ها NCBI استخراج شده بود با استفاده از رویه ClustalW در نرم‌افزار MEGA11 (۴۱) هم‌رديف شده و تک نوکلئوتیدهای چند شکلی از این طریق شناسایی شدند. تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیدی، تعداد جایگاه‌هایی که در آنها جایگزینی مشابه یا غیرمشابه اتفاق افتاده، درصد تفرق ژنی و تبدیل ژنی نیز با استفاده از نرم‌افزار Dnasppv5 (۲۶) محاسبه گردید.

فراسنجه‌های تمایز ژنتیکی و فاصله ژنتیکی نیز با استفاده از نرم افزار MEGA11 (۴۱) به دست آمد.

ترسیم درخت فیلوژنتیکی توالی ژن BRCA1 برای گونه‌های مورد بررسی با استفاده از نرم افزار MEGA11 (۴۱) انجام گرفت. پس از ویرایش توالی‌ها و حذف نواحی غیر ناهمگون، درخت فیلوژنی با استفاده از روش اتصال-همسایگی (NJ) ترسیم گردید. در این روش از ماتریس (Q) استفاده می‌شود که مشتمل بر کل شاخه‌ها بوده و کمترین مقدار Q که بیان کننده شباهت بالای دو شاخه باشد را انتخاب کرده و در یک انشعاب از درخت فیلوژنی به کار می‌برد. مقادیر Bootstrapping به وسیله ۵۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد به دست آمدند. مقادیر بالای بوت‌استریپ^۱ در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان میدهد که درخت فیلوژنی نوکلئوتیدهای موردنظر از درجه اعتماد بالایی برخوردار است. ترسیم درخت فیلوژنی به وسیله روش NJ با استفاده از فرمول ۱ انجام شد:

کمترین میزان آن در گوسفند آواسی مشخص گردید. که در این تحقیق میزان تنوع ژنتیکی برای ۱۷ نژاد منطقه اروپا (از جمله ۴ نژاد بومی اسپانیا) ۰/۰۱۷ به دست آمد. در تحقیق حاضر تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیپی، واریانس تنوع هاپلوتیپی و متوسط تفاوت‌های نوکلئوتیدی کل به ترتیب ۰/۲۰۵، ۰/۰۳۵، ۰/۰۰۶ و ۰/۰۵۲ به دست آمد. این فراسنجه‌ها در داخل هر منطقه نیز به شرح جدول ۲ می‌باشد.

بوروئیه دارای قوچ ارمنی و سایر مناطق استان یزد دارای قوچ اوریال بودند، که با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان نواحی مرکزی ایران را محل جداسازی زیرگونه‌های *Ovis orientalis* و *Ovis vignei* بدانیم.

در بررسی آرنز و همکاران (۴) نیز ۵ نژاد گوسفند بومی اسپانیا که مرینوس نیز در بین آنها بود، را به همراه گوسفند آواسی (به‌عنوان نژاد مرجع) برای ۱۶ ریزماهواره ژنوتیپ یابی نمودند که بیشترین تنوع ژنتیکی در گوسفند مرینوس و

جدول ۲- تعداد جایگاه‌های پلی‌مورفیک (S)، تعداد هاپلوتیپ‌ها، تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی، واریانس تنوع هاپلوتیپی و متوسط تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی در مناطق جغرافیایی مختلف

Table 2. The number of polymorphic sites (S), the number of haplotypes, nucleotide and haplotype diversity, the variance of haplotype diversity and the average number of nucleotide differences in different geographical regions

منطقه جغرافیایی	تعداد جایگاه‌های پلی‌مورفیک S	تعداد هاپلوتیپ	تنوع نوکلئوتیدی	تنوع هاپلوتیپی	واریانس تنوع هاپلوتیپی
A	۰	۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
B	۲۴	۴	۰/۰۱۷	۰/۲۰۶	۰/۰۱
C	۳	۴	۰/۰۰۱	۰/۴۹۱	۰/۳۰۸
D	۰	۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
E	۵۶	۳	۰/۰۶۹	۱/۰۰	۰/۰۷۴
F	۲۹	۶	۰/۰۲۴	۰/۹۲۹	۰/۰۰۷

دادند که تنوع نوکلئوتیدی در موفلون آسیایی بیشتر از گوسفند اهلی بود که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. همچنین با مقایسه هاپلوتیپ‌های نمونه نژادهای مختلف گوسفندان اهلی و وحشی مشخص شد کلا سه هاپلوگروه وجود دارد که یک هاپلوگروه بین تمام نمونه‌ها مشترک است و بیشترین تعداد این هاپلوتیپ‌ها (شش مورد) مربوط به نوع وحشی و در منطقه ایران می‌باشد.

در تحقیق ژائو و همکاران (۴۸) که خاستگاه و ارتباط فیلوژنی سه نژاد گوسفند وحشی مورد بررسی قرار گرفت؛ مشخص گردید ژنوم میتوکندری گوسفندان وحشی از تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی بالایی برخوردارند که با نتایج این تحقیق در خصوص این تنوع بالا همخوانی دارد.

نکته قابل توجه وجود تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت وحشی نسبت به سایر جمعیت‌ها بود که این امر احتمالاً می‌تواند مربوط به شرایط محیطی و وجود فاصله جغرافیایی زیاد بخصوص در جمعیت وحشی ایران در دو منطقه شرق و غرب و همچنین شکار غیر قانونی و بدون برنامه در جمعیت‌های آزاد و مهاجرت به بیرون در جمعیت‌های حفاظت شده باشد.

محتوای G+C، تنوع نوکلئوتیدی $\Pi(t)$ ، میانگین تعداد نوکلئیدهای جایگزین در هر سایت بین جمعیت‌ها (D_{xy})، تعداد نوکلئیدهای جایگزین در هر سایت بین جمعیت‌ها (D_a) و میانگین تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی بین جمعیت‌ها (k) در بین مناطق جغرافیایی به شرح جدول ۳ آورده شده است.

از آنجایی که تنوع ژنتیکی به وسیله انقراض جمعیت‌ها و فقدان تنوع در درون جمعیت‌های محدود از بین می‌رود؛ کم بودن میزان تنوع در برخی جمعیت‌های مورد مطالعه ممکن است به دلیل کوچکی اندازه نمونه، کاهش فاصله نسلی و کاهش نسبت اندازه موثر جمعیت به اندازه جمعیت باشد (۲۰). نتایج بررسی حاضر نشان داد که این ژن از توان بالایی در تعیین روابط فیلوژنتیکی در بخش حیات وحش و به خصوص در جمعیت‌های گوسفند اهلی و وحشی برخوردار است. هر وقت یک جمعیت مانند جمعیت وحشی مستقل و متمایز از جمعیت‌های دیگر است این موضوع عامل تنوع ژنتیکی بالا در آن جمعیت می‌شود. میزان تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت وحشی در مقایسه با جمعیت‌های دیگر نشان دهنده آن است که محیط‌های جنگلی و باز می‌توانند به افزایش تنوع ژنتیکی گونه‌ها در مقایسه با محیط‌های بسته و کنترل شده در نژادهای اهلی کمک نمایند. همچنین ممکن است یکی از دلایل افزایش این تنوع بین جمعیت‌های گوسفند وحشی جایگزین شدن نرهای جوان با نرهای پیر در هر سال و جلوگیری از رانش ژنتیکی و کاهش آمیزش‌های خویشاوندی باشد که به حفظ جریان ژنی بین جمعیت‌ها کمک شایانی می‌نماید که این مسأله در تحقیق آقازاده و همکاران (۱) نیز گزارش گردید. در تحقیق دیگری که فلورین و همکاران (۱۳) با استفاده از ۱۳ نمونه از موفلون وحشی آسیایی در منطقه ایران و مقایسه آن با ۲۰ نمونه گوسفند اهلی ایران بر روی داده‌های $SNPs$ انجام گرفت، نشان

جدول ۳- محتوای G+C، $\Pi(t)$ ، D_{xy} ، D_a و K جمعیت‌ها

Table 3. G+C, $\Pi(t)$, D_{xy} , D_a and K content of populations.

K	D_a	D_{xy}	$\Pi(t)$	محتوای G+C	منطقه جغرافیایی
۰/۵۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰/۵۷۱	A-B
۰/۵۰۰	۰/۰۰۳۹۷	۰/۰۰۵۶	۰/۰۱۷	۰/۶۶۷	A-F
۰/۶۹۸	۰/۰۰۰	۰/۰۰۸	۰/۰۰۱	۰/۵۸۵	B-C
۰/۶۰۷	۰/۰۰۰	۰/۰۰۶	۰/۰۰۷	۰/۵۸۸	B-D
۱/۱۷۹	۰/۰۰۰۳۳	۰/۰۱۱	۰/۰۰۲	۰/۵۸۹	B-E
۰/۷۳۲	۰/۰۰۱۸۳	۰/۰۱۹	۰/۰۱۱	۰/۶۱۶	B-F
۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۴	۰/۰۰۲	۰/۵۶۸	C-E
۲/۰۵۷	۰/۰۰۰۲۰	۰/۰۱۱	۰/۰۰۱	۰/۶۲۸	C-F
۰/۳۳۳	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۶۱۸	D-E
۰/۵۰۰	۰/۰۰۰۸۹	۰/۰۱۳	۰/۰۰۶	۰/۶۷۵	D-F
۱/۶۶۷	۰/۰۰۰۲۴	۰/۰۱۱	۰/۰۱۲	۰/۶۰۹	E-F

تجمع می‌یابند (۳۳)، یا شاید به دلیل اثر موسس یا اثر گلوگاه یا اثر انتخاب مخرب رخ دهد (۳۱).

در تحقیق تایپو که در رابطه با تعیین قرابت و فیلوژنی گوسفندان اروپایی، قفقازی و آسیای مرکزی با استفاده از انگشت‌نگاری mtDNA انجام شده است؛ هاپلوگروه‌های متعددی تعیین گردید (۴۲).

نتایج آزمون F_s Fu's و آزمون D تاجیما در داخل هر منطقه نشان می‌دهد که آزمون F_s Fu's و D تاجیما فقط در منطقه جغرافیایی اروپا (در سطح ۲٪) معنی‌دار بود (جدول ۴).

بیشترین مجموع تنوع نوکلئوتیدی حاصل بین جمعیت‌ها در اثر واگرایی ژنتیکی مربوط به جمعیت آسیای غربی با وحشی (۰/۰۱۷) و جمعیت اروپا با جنوب آفریقا (۰/۰۲) می‌باشد که نشان‌دهنده کمتر بودن تبادل ژنتیکی بین این جمعیت‌ها در اثر زندگی در محیط‌های متمایز از نظر اکولوژیکی که سبب جهش‌های خاموش یا تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گردیده؛ و بعضاً سبب ایجاد جمعیت‌های جدید می‌گردد. ممکن است این واگرایی و جداسازی تولید مثلی نتایج جهش‌های کوچک متعدد در طول زمان تکاملی باشد که در جمعیتی جدا شده از جریان ژنی

جدول ۴- تعداد جایگاه‌های پلی‌مورفیک (S)، تعداد هاپلوتیپ‌ها، آزمون F_s Fu's و آزمون D تاجیما در مناطق جغرافیایی مختلف
Table 4. Number of polymorphic sites (S), number of haplotypes, Fu's F_s test and Tajima's D test in different geographical regions

منطقه جغرافیایی	تعداد جایگاه‌های پلی‌مورفیک S	تعداد هاپلوتیپ	آزمون F_s Fu's	آزمون D تاجیما
A	۰	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
B	۲۴	۴	-۳/۴۷۸**	-۳/۲۸۴**
C	۳	۴	-۲/۰۳۱	-۱/۸۷۴
D	۰	۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
E	۵۶	۳	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
F	۲۹	۶	-۱/۵۵۵	-۱/۴۱۹

** معنی‌دار بودن در سطح ۲٪

اروپا با جنوب آفریقا (در سطح ۲٪) و اروپا با وحشی (در سطح ۵٪) معنی‌دار بود (جدول ۵).

نتایج آزمون F_s Fu's و آزمون D تاجیما در بین مناطق جغرافیایی نشان می‌دهد که آزمون F_s Fu's و D تاجیما فقط در بین مناطق جغرافیایی اروپا با چین، اروپا با شمال آفریقا و

جدول ۵- آزمون F_s Fu's و آزمون D تاجیما در بین مناطق جغرافیایی مختلف
Table 5. Fu's F_s test and Tajima's D test among different geographical regions

منطقه جغرافیایی	آزمون F_s Fu's	آزمون D تاجیما
B-C	-۵/۰۴۹**	-۵/۰۲۸**
B-D	-۵/۰۴۹**	-۵/۰۲۸**
B-E	-۴/۰۵**	-۳/۹۰**
B-F	-۲/۹۱*	-۲/۷۹*

** معنی‌دار بودن در سطح ۲٪ و * معنی‌دار بودن در سطح ۵٪

پلی‌مورفیسم مشاهده شده نسبت به مورد انتظار است، که ممکن است به دلیل کاهش اندازه جمعیت بعد از تنگنای ژنتیکی و یا انتخاب به خصوص در جمعیت وحشی باشد. نتایج مربوط به فاصله ژنتیکی و تمایز ژنتیکی بین مناطق مختلف جغرافیایی گوسفند در جدول ۶ نشان داده شده است.

آماره D تاجیما (۴۰) برای بررسی تنوع نوکلئوتیدی حاصل از مشاهدات با استفاده از تنوع حاصل از فراوانی آللی در جایگاه‌های چندشکلی ۰/۴۷۸ به دست آمد. که این آزمون D تاجیما در اینجا معنی‌دار است که نشان‌دهنده انتخاب برای آن جایگاه می‌باشد. D تاجیما مثبت نشان‌دهنده فراوانی بالای

جدول ۶- نتایج مربوط به فاصله ژنتیکی (D_{XY}) بالای قطر و تمایز ژنتیکی (F_{ST}) پایین قطر در بین مناطق مختلف جغرافیایی نژادهای اهلی و وحشی گوسفند

Table 6. Results related to genetic distance (D_{XY}) (diagonal up border) and genetic differentiation (F_{ST}) (diagonal down border) among different geographical regions of domestic and wild breeds of sheep

منطقه جغرافیایی	اروپا	چین	شمال آفریقا	آسیای غربی	وحشی	جنوب آفریقا
اروپا	-	۰/۰۱۲	۰/۰۲۷	۰/۰۲۹	۰/۰۱۳	۰/۰۳۸
چین	۰/۳۳۵	-	۰/۰۰۳	۰/۰۳۴	۰/۰۱۱	۰/۰۴۶
شمال آفریقا	۰/۵۹۰	۰/۶۱۲	-	۰/۰۱۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲
آسیای غربی	۰/۶۱۷	۰/۶۶۵	۰/۴۲۳	-	۰/۰۳۳	۰/۰۱۵
وحشی	۰/۴۲۶	۰/۲۸۴	۰/۶۷۴	۰/۷۲۲	-	۰/۰۴۵
جنوب آفریقا	۰/۷۱۵	۰/۷۹۶	۰/۴۳۲	۰/۳۵۹	۰/۸۲۳	-

که ممکن است سازگاری منطقه‌ای یا جدایی اجداد در این رابطه نقش مؤثری داشته باشد. در ارتباط با نزدیکی مشاهده شده بین نژادهای گوسفندان اهلی در برخی مناطق آسیای غربی، اروپا و شمال آفریقا احتمال انتقال نمونه‌هایی از منطقه آسیای غربی به دیگر مناطق وجود دارد. با توجه به کاهش تنوع ژنتیکی در نژادهای گوسفند اهلی چین، که نشان‌دهنده بالابودن درصد همخونی است به دلیل این می‌باشد که در این تحقیق تمام نمونه‌ها از یک نژاد می‌باشند.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل نژادهای مختلف در این تحقیق نشان داد که جریان این ژن بر ساختار ژنتیکی جمعیت گوسفندان نژادهای اهلی و وحشی مؤثر بوده و نقش عمده‌ای بازی می‌کند. در تحقیق رضایی (۳۴) و نادری و همکاران (۲۹) نیز نشان داده شد که جمعیت‌های وحشی متنوع‌تر از هم‌تایان اهلی خود هستند، که می‌تواند به دلیل اندازه مؤثر کمتر در حیوانات اهلی باشد که بین ۱۰۰۰۰ تا ۱۰۵۰۰ سال قبل زیست می‌کردند.

در اینجا ممکن است افزایش بار ژنتیکی در گوسفند نشانه‌ای مبنی بر اهلی سازی آن باشد؛ در جایی که گلوگاه‌های جمعیتی اثر بخشی انتخاب منفی را در از بین بردن جهش‌های مضر از مخزن ژنی کاهش می‌دهند. از دیدگاه متخصصین ژنتیک جمعیت، تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها همزمان با یک تعادل و توازن بین رانش و جریان ژنی شروع شده و هر جمعیت متحمل نرخ جهش و رانش ژنتیکی خود خواهد شد که تمایل به متمایز کردن جمعیت‌ها از یکدیگر داشته و بالعکس جریان ژنی جمعیت‌ها را به یکدیگر شبیه‌تر می‌نماید (۳۷). از سویی در تحقیق فلورین و همکاران (۱۳) آثاری از مسیرهای اهلی شدن در حدود ۸ تا ۱۰ هزار سال قبل گوسفند از ۳ مسیر: یک از ترکیه به سوییس و اسپانیا و آلمان، دو از ترکیه و دریای مدیترانه به ایتالیا و آلمان، سه از ایران به اردن و لبنان و شمال آفریقا مشاهده می‌گردد که با نتایج این تحقیق در یک راستا قرار دارد.

نتایج حاصل از درصد جابجایی توالی نوکلئوتیدهای ژن BRCA1 نیز در جدول ۷ آورده شده است. مقادیر بالای جانیشینی مربوط به بازهای پورینی و پیریمیدینی تقریباً به هم نزدیک است به طوری که این مقدار برای تبدیل آدنین به گوانین ۱۶/۶۴٪ و برای تبدیل گوانین به آدنین ۱۰/۳۹٪ و برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۱۶/۰۷٪ و برای تبدیل سیتوزین به تیمین ۱۰/۰۴٪ می‌باشد.

نتایج جدول فوق نشان داد که یک جمعیت از نظر فاصله جغرافیایی ممکن است نزدیک به جمعیت دیگری باشد اما در فاصله ژنتیکی دورتری نسبت به همان جمعیت یا سایر مناطق جغرافیایی مورد بررسی باشد مانند جمعیت اروپا با شمال آفریقا و آسیای غربی. همچنین تمایز ژنتیکی بین جمعیت گوسفندان چین با وحشی کمترین بود که نشانگر نزدیکی این جمعیت‌ها با هم است؛ که احتمالاً دارای اجداد مشترکی بوده‌اند و یا مربوط به نزدیکی شرایط نگهداری آنها در محیط مصنوعی با محیط طبیعی است به صورتی که تغییرات تکاملی به نحوی سوق پیدا کرده است تا بتوانند با محیط سازگار و نقش بیولوژیک خود را داشته باشند.

تمایز ژنتیکی بین جمعیت گوسفندان اروپا با چین و وحشی، شمال آفریقا با آسیای غربی و جنوب آفریقا، آسیای غربی با جنوب آفریقا کمتر از بقیه مناطق و بین جمعیت گوسفندان وحشی و چین با جنوب آفریقا بیشترین بود که نشان می‌دهد این جمعیت‌ها از هم دورترند.

میانگین فواصل ژنتیکی نیز ۰/۲۹ و در هر گروه A تا E به ترتیب ۰/۳۷، ۰/۴۴، ۰/۱۷، ۰/۴۷، ۰/۲۷ و ۰/۲۸ می‌باشد. فواصل ژنتیکی بین جمعیت گوسفندان چین با وحشی کمترین بود که نشان‌دهنده نزدیکی دو جمعیت و بین جمعیت گوسفندان اروپا با چین و وحشی، شمال آفریقا با آسیای غربی و جنوب آفریقا، آسیای غربی با جنوب آفریقا کمتر از بقیه مناطق با هم بود و بین جمعیت گوسفندان وحشی و چین با جمعیت گوسفندان جنوب آفریقا بیشترین بود که نشان می‌دهد این جمعیت‌ها از هم دورترند.

در این تحقیق بین برخی جمعیت‌ها شباهت ژنتیکی مشاهده شد که ممکن است به دلیل اختلاط جمعیت‌ها باشد. تحقیقات نشان می‌دهد که وجود اختلاف ژنتیکی در درون و همچنین ما بین جمعیت‌های مختلف تحت تاثیر عوامل مختلفی چون تاریخچه مشترک، جریان ژنی حال و گذشته و همینطور فرایندهای مختص جمعیت مانند رانش ژنتیکی و انتخاب انطباقی قرار دارد (۱۰، ۳۶). در تحقیق فلورین و همکاران نشان داده شد که جمعیت‌های بومی گوسفند و بز، از هر دو مرکز اهلی سازی (ایران) و انتهای پایانی مسیر انتشار مدیترانه جنوبی (مراکش) واگرایی پیدا کرده‌اند (۱۳). همچنین داده‌های این بررسی با تحقیق شولز (۳۸) همخوانی داشت و مشخص گردید جمعیت‌هایی که از نظر جغرافیایی به یکدیگر نزدیکتر هستند، شباهت ژنتیکی زیادتری دارند؛ با این توضیح

جدول ۷- درصد جابه‌جایی توالی نوکلئوتیدهای ژن BRCA1 در نژادهای مختلف گوسفند اهلی و وحشی مورد بررسی بر اساس روش حداکثر درست‌نمایی

Table 7. Percentage of BRCA1 gene nucleotide sequence shift in different breeds of domestic and wild sheep investigated based on maximum likelihood method

G	C	T/U	A	نوکلئوتید
۱۶/۶۴	۷/۰۲	۴/۳۹	-	A
۷/۴۰	۱۶/۰۷	-	۴/۶۲	T/U
۷/۴۰	-	۱۰/۰۴	۴/۶۲	C
-	۷/۰۲	۴/۳۹	۱۰/۳۹	G

مساوی از کدون‌های مترادف همان ژن تعیین می‌کند. روشی که ENC محاسبه میکند شباهت‌های آشکاری با محاسبه اندازه مؤثر جمعیت در ژنتیک جمعیت دارد (۲۳).

در تحقیق جلالی و همکاران شاخص تعداد مؤثر کدون‌ها در گونه بز بیشتر از گونه‌های گوسفند و گاو و کزگاو گزارش گردید (۱۹).

به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ژن BRCA1 از تنوع نوکلئوتیدی بالایی بخصوص در نژاد گوسفندان وحشی برخوردار است. همچنین بر اساس این تحقیق، نواحی حفاظت شده بخش اندکی از توالی ژن BRCA1 را تشکیل می‌دهند (۰/۳۱۳ در کل مناطق)؛ که این امر نشان‌دهنده چندشکلی بالای این ژن و همچنین مستعد بودن آن به تغییرهای نوکلئوتیدی و جهش می‌باشد. تعداد کل جایگاه‌های دارای جهش در این بررسی ۵۸۵ جایگاه محاسبه شد که روند انتخاب مثبت در این ژن‌ها را توجیه می‌کند و این امر نقش عمده‌ای در شناخت وظایف بیولوژیکی این ژن خواهد داشت که سبب به وجود آمدن پروتئین‌های جدید و همچنین عملکردهای جدید می‌شود.

نتایج حاصل از این تحقیق برای ژن BRCA1 باعث شناسایی جهش‌هایی گردید که خود منجر به ایجاد ۱۹ هاپلوتیپ در جمعیت‌های مورد مطالعه گردید.

موفقیت در تولیدمثل، قدرت عضلانی، عادات غذایی، رفتارهای پرخاشگرانه، پاسخ‌های دفاعی و ادراک حسی مقابله با شرایط و استرس‌های محیطی و ... که با بیان ژن BRCA1 در ارتباط می‌باشد گوسفندان وحشی را در این ارتباط متمایز نموده است.

در پایان پیشنهاد می‌گردد با آن که توالی‌یابی مستقیم حساس‌ترین روش برای تشخیص موتاسیون‌های BRCA1 است؛ با توجه به بزرگی و پیچیدگی این ژن بررسی کامل توالی آن در نژادهای مختلف گوسفندان اهلی و وحشی در مناطق مختلف جهان انجام گردد تا مقایسات کامل‌تر و جامع‌تری در این زمینه انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته از طرح شماره ۹۸۰۲۸۸۱۴ و بر اساس مجوز نمونه‌گیری شماره ۳۱-۱۰۱ سازمان حفاظت محیط زیست انجام شده است که بدینوسیله از مسؤولین محترم این مؤسسات تشکر و قدردانی می‌نمایم.

مطابق با این جدول میزان احتمال جانشینی نوکلئوتیدی هر باز بر اساس روش تامورا و همکاران (۴۱) محاسبه گردید. میانگین نسبت نوکلئوتیدی G+C به A+T در طول توالی‌ها تقریباً ۶۲:۳۸٪ بود و نشان‌دهنده غالب بودن بازهای سیتوزین (C) و گوانین (G) می‌باشد. حداکثر احتمال ترکیبی الگوی نوکلئوتیدی در مناطق نمونه برداری نیز در جدول فوق آورده شده است. در این بررسی همچنین میانگین فراوانی نوکلئوتیدهای بازهای A، T، C و G به ترتیب ۰/۱۸۷، ۰/۳۰۰ و ۰/۳۱۶ به دست آمد.

محتوای G+C به ترتیب در مناطق A تا E: ۰/۵۶۴، ۰/۵۹۹، ۰/۶۴۴، ۰/۶۱۰ و ۰/۶۲۲ و ۰/۶۳۷ بود.

DNA با محتوای GC پایین نسبت به DNA با محتوای GC بالا پایدارتر است. با این حال، پیوندهای هیدروژنی خود تأثیر خاصی بر پایداری مولکولی ندارند، که در عوض عمدتاً توسط برهم‌کنش‌های مولکولی انباشته شدن پایه ایجاد می‌شوند (۱۵). علیرغم پایداری حرارتی بالاتری که به یک اسید نوکلئیک با محتوای GC بالا اعطا می‌شود، مشاهده شده است که حداقل برخی از گونه‌های باکتری با DNA با محتوای GC بالا با سهولت بیشتری تحت اتولیز قرار می‌گیرند و در نتیجه طول عمر سلول را به خودی خود کاهش می‌دهند (۴۹).

بررسی دیگری نشان داده است میانگین محتوای GC در ژنوم انسان از ۳۵٪ تا ۶۰٪ در قطعات ۱۰۰ کیلوبایتی با میانگین ۴۱٪ متغیر است (۱۸).

میزان توالی حفاظت شده در این تحقیق به طور میانگین ۰/۳۱۳ میباشد که به ترتیب برای مناطق جغرافیایی آسیای غربی ۰/۶۴۶، اروپا ۰/۶۵۵، چین ۰/۸۶۴، شمال آفریقا ۰/۶۵۴، جنوب آفریقا ۰/۸۹۰ و وحشی ۰/۷۹۰ بود.

که این نتایج حاصل از آنالیز نواحی حفاظت شده نشان داد که بخش کوچکی از توالی ژن BRCA1 در طی روند تکامل حفظ شده است که نشان‌دهنده چند شکلی بالای این ژن و مستعد بودن آن به تغییرات نوکلئوتیدی و جهش می‌باشد که سبب به وجود آمدن پروتئین‌های جدید و همچنین عملکردهای جدید آن می‌گردد. این مطلب با نتایج تحقیق اصغری و داشاب (۵) درباره ژن بتالاکتوگلوبین در گونه‌های مختلف پستانداران مشابه می‌باشد.

شاخص تعداد مؤثر کدون‌ها در این تحقیق ۵۶/۴۱ محاسبه شد. که این شاخص یکی از بهترین معیارها برای مطالعه وضعیت سوگیری‌های استفاده از کدون در ژن‌ها و ژنوم‌ها است (۴۳)، که میزان استفاده از کدون یک ژن را در استفاده

منابع

1. Aghazadeh, L., S. Nikbin, F. Mirzaei-Aghjeheshlagh and N. Hedaiat-Evrigh. 2020. Using D-Loop region to study the genetic structure and phylogenetic analysis of Iranian red deer. *Journal of Animal Science*, 29(4): 17-33.
2. Allendorf, F.W. and G. Luikart. 2007. Conservation and the genetics of populations. *Mammalia*, 189-197.
3. Anne-Marie, M. and L. Barbara. 2000. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 92: 1126-1135.
4. Arranz, J.J., Y. Bayon and F.S. Primitivo. 1998. Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Animal Genet*, 29: 435-440.
5. Asghari B. and GH. Dashab. 2018. Phylogeny and evolutionary analysis of nucleotide sequence of β -lactoglobulin gene locus. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 8(30): 61-69.
6. Barbara S.H. and P.G. Moorman. 2001. Breast Cancer: hormones and other risk factors. *The European Menopause Journal*, 38: 103-116.
7. Claes K., B. Poppe, E. Machackova, I. Coene, L. Foretova, A. De Paepe and L. Messiaen. 2003. Differentiating pathogenic mutations from polymorphic alterations in the splice sites of BRCA1 and BRCA2. *Genes Chromosomes Cancer*, 37: 314-20.
8. Claire M . P, N.Ho. Benjamin and T. K. Singh Amaeshwar. 2017. The Evolution, Functions and Applications of the Breast Cancer Genes BRCA1 and BRCA2. *CANCER GENOMICS & PROTEOMICS*, 14: 293-298.
9. Donovan, P.J. and D.M. Livingston. 2010. BRCA1 and BRCA2: breast /ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double. strand break repair, *Carcinogenesis*, 31(6) : 961-967 .
10. Epperson, B.K. 2003. *Geographical Genetics*. Princeton: Princeton University Press.
11. E.V. Ikpeeme, IO.U. Udensi, M.E. Kooffreh, H.E. Etta, B.B. Ushie, E. Echea and M. Ozoje. 2017. In silico Analysis of BRCA1 Gene and its Phylogenetic Relationship in some Selected Domestic Animal Species. *Trends in Bioinformatics*. 10(1): 1-10.
12. Ferla, R., V. Calo, S. Cascio, G. Rinaldi, G. Badalamenti and I. Carreca. 2007. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. *Ann Oncol*, 18(6): 93-98.
13. Florian J. and A. Alberto. 2018. Convergent genomic signatures of domestication in sheep and goats. *Nature communications*, 9: 813.
14. Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Brisco. 2002. *Introduction to conservation genetics*. First published, Cambridge University Press.
15. Freeland, J. 2010. *Molecular ecology*. Translation: M. Malikian, Mashhad Academic Jahad Publications, Mashhad, 304 p (In Persian).
16. Gerald Karp. 2002 . *Cell and Molecular Biology*. 3rd, Willy, 671-695 pp.
17. Hosseini, S.M. 2013. Phylogeny of Wild Sheep based on mtDNA Cytochrome b in Yazd Province. Master's thesis, College of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 143 p (In Persian).
18. Initial sequencing and analysis of the human genome. 2001. International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature*, 409(6822): 860-921 .
19. Jalali, P., GH. Rahimi Mianji, M. Gholizadeh and A. Pakdin Parizi. 2018. Codon usage deviations and bioinformatics analysis of encoding sequence of Calpastatin gene in some mammalian species. *Journal of Ruminant Research*, 6(3): 12-26.
20. Javanroh Ali Abad, A. 2002. Genetic Diversity Evaluation of Six Native Iranian Goat Lumps Using RAPD Marker. Master's Degree in Animal Science Karaj Agricultural College, Tehran University, 74 p (In Persian).
21. Karami, M., S.A. Rafat, G. Moghaddam, J. Shodja and A. Javanmard. 2017. The association between single nucleotide polymorphism of BRCA1 gene with mastitis in Holstein cattle, *Animal Science Journal (Pajouesh & Sazandegi)*, 119: 191-208 (In Persian).
22. Kilian, B; H. Ozkan, A. Walther, J. Kohl, T. Dagan, F. Salamini and W. Martin. 2007. Molecular diversity at 18 loci in 321 wild and 92 domesticated lines reveal no reduction of nucleotide diversity during *Triticum monococcum* (Einkorn) domestication: implications for the origin of agriculture. *Molecular Biology and Evolution*, 24(12): 2657-2668.
23. Kimura, M. and J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49(4): 725-738.
24. Kooshyar M.M., M. Nassiri, M. Mahdavi, M. Doosti and A. Parizadeh. 2013. Identification of germline BRCA1 mutations among breast cancer families in Iran, an experience from Northeastern Iran, *Asian Pac Journal Cancer Prev*, 14(7): 4339-4345.
25. Landgren O., J.A. Katzmann and A.W. Hsing. 2007. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance among men in Ghana. *Mayo Clin Proc*, 82: 1468-1473.
26. Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, 25: 1451-1452.

27. Madsen, O., M. Scally, C.J. Douady, D.J. Kao and R.W. Debry. 2001. Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. *Nature*, 409: 610-614.
28. McGregor, D., B. Ballantyne, T. Marre and T. Syversen. 1999. *General and Applied Toxicology*. 2nd ed. 1099-1117 pp.
29. Naderi, S., H.R. Rezaei, F. Pompanon and P. Taberlet. 2008. The goat domestication process inferred from large-scale mitochondrial DNA analysis of wild and domestic individuals. *Proc. Natl Acad. Sci, USA*, 105: 17659-17664.
30. Nagy, R., K. Sweet and C. Eng. 2004. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*, 23(38): 6445-6470.
31. Nei, M., M. Nei and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS*, 76 (10): 5269-5273.
32. Nesaj Hosseini, M. and M. Shams Bakh. 2010. *Phylogenetic analysis methods*, Haghshenass Publication, 249 p (In Persian).
33. Palumbi Stephen R. 1994. Genetic Divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25: 547-572.
34. Rezaei, H.R. 2007. *Phylogénie moléculaire du Genre Ovis (Moutonnet Mouflons); Implications pour la conservation du genre et pour l'origine de l'espèce domestique*. PhD thesis, Univ. Joseph Fourier, Grenoble I.
35. Rezaei, H.R., S. Naderi, I.C. Chintauan-Marquier, P. Taberlet, A.T. Virk, H.R. Naghash, D. Rioux, M. Kaboli, and F. Pompanon. 2010. Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 315-326.
36. Rousset F. 2004. *Genetic Structure and Selection in Subdivided Populations*. Princeton: Princeton University Press.
37. Schlotterer, C. and J. Pemberton. 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. A critical review, pp: 71-86.
38. Schulz, R. 2000. Status of the noble crayfish *Astacus astacus* (L.) in Germany: monitoring protocol and the use of RAPD markers to assess the genetic structure of populations. *Bulletin France Pêche Piscic*, 356: 123-138.
39. Scully, R. and D.M. Livingston. 2000. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*, 408: 429-432.
40. Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
41. Tamura K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. *MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11*. *Molecular Biology and Evolution*.
42. Tapio, M. 2006. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Mol. Biol. Evol*, 23(9): 1776-1783.
43. Wright F. 1990. The 'effective number of codons' used in a gene. *Gene*, 87(1): 23-29.
44. Xu, J., B. Wang, Y. Zhang, R. Li, Y. Wang and S. Zhang. 2012. Clinical implications for BRCA gene mutation in breast cancer. *Mol.Biol.Rep*, 39: 3097-3102.
45. Yu, N., M.I. Jensen-Seaman, L. Chemnick, O. Ryder and WH. Li. 2004. Nucleotide diversity in gorillas. *Genetics*, 166(3): 1375-1383.
46. Yuan, Z., G. Chu, Y. Dan, J. Li, L. Zhang, X. Gao, H. Gao, J. Li, Sh. Xu and Z. Liu. 2012. BRCA1: a new candidate gene for bovine mastitis and its association analysis between single nucleotide polymorphisms and milk somatic cell score. *Molecular Biology Reports*, 39(6): 6625-6631.
47. Yuan, Z., J. Li, L. Zhang, X. Gao, H.J. Gao and S. Xu. 2012. Investigation on BRCA1 SNPS and its effects on mastitis in Chinese commercial cattle. *Gene*, 505: 190-194.
48. Zhao, Y., E. Zhao, N. Zhang and C. Duan. 2011. Mitochondrial DNA diversity origin and phylogenetic relationships of three Chinese large-fat-tailed sheep breeds. *Tropical Animal Health and Production*, 43(7): 1405-1410.
49. Ziaie, H. 2009. *A field guide to the mammals of Iran*. Publications of the Center for Familiarity with Wildlife, Tehran, 423 p.

Investigating the Genetic Diversity of the BRCA1 Gene in some of Domestic and Wild Sheep Breeds of the World and Drawing their Phylogenetic Structure

Alireza Nik Manesh¹, Masoud Asadi Feyzi², Ali Ismailizadeh Kashkoieh³,
Hojat Asadollahpour Nanaei⁴ and Leila Ezzaldinlo⁵

1-Ph.D Student of Animal breeding, Department of Animal Science Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, (Corresponding author: nikmanesh12784@agr.uk.ac.ir)

2 and 3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

4- Ph.D Graduated of Animal breeding, Department of Animal Science Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

5- Head of Genetic section , Natural History Museum & Genetic resource Bureau, DOE

Received: 16 August, 2022 Accepted: 9 October, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: The BRCA1 gene, which is called “gate keeper” It plays an important role in the process of repairing DNA damage, regulating the cell cycle, regulating the transcription process, maintaining chromosome stability, and other important pathways for the maintenance of genome stability. The current research was conducted with the aim of bioinformatic analysis and comparison the genetic diversity and phylogenetic structure of the BRCA1 gene of different breeds of domestic and wild sheep from 49 breeds in 6 geographical regions: Western Asia, Europe, China, North Africa, South Africa and wild (Iran) using the NCBI genome databas.

Material and Methods: The desired sequences were aligned using MEGA11 software and a phylogenetic tree was drawn by Neighbor-Joining method. Also, the number of mutations, nucleotide diversity, haploid diversity, the number of positions in which similar or non-similar substitutions occurred, the percentage of gene differentiation, gene conversion were also analyzed using Dnaspv5 software.

Results: The analyzes related to the comparison of breeds in 6 geographical regions showed 112 polymorphisms, which led to the creation of 19 different haplotypes with a haplotype diversity of 0.035. Nucleotide diversity and average nucleotide differences (k) among breeds were estimated as 0.205 and 0.052, respectively. The genetic differentiation between the Chinese sheep population and the wild sheep population was the lowest. The average genetic distance between all geographical regions was calculated to be 0.29. The average nucleotide ratio (A+T):(G+C) was equal to 38:62%, which indicates the predominance of cytosine and guanine bases. The amount of conserved sequence (c) in this research was 0.313 on average, which indicates the high polymorphism of this gene and the creation of new proteins as well as new functions to adapt to different homeostasis conditions. The effective number of codons (ENC) in this research was calculated to be 56.41. The value of D in the Tajima neutrality test was 0.478, which indicates that the selection pressure is balanced.

Conclusion:The high genetic diversity in the wild population, the reasons for which are the presence of forest and open environments, prevention of genetic drift and reduction of inbreeding, which affects muscle strength, eating habits, aggressive behaviors, defense responses, sensory perception of confrontation with environmental conditions and stress that related to BRCA1 gene expression in these populations.

Keywords: BRCA1, Genetic diversity, Geographic region, Phylogenetic structure, Sheep