

معرفی هاپلوگروپ DNA میتوکندریایی انسانی از محوطه باستانی

سگز آباد قزوین، ایران

Introducing the human mitochondrial DNA haplogroup from Sagzabad, Qazvin, Iran

فاطمه سعادتمند^{۱*}، محمود تولایی^{۲*}، مصطفی ده پهلوان^۳، مریم رضائی^۴، پیمان زرگری^۵، علی محمدی^۲، مظهر امجدی^۵

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه تاریخ و باستان‌شناسی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- به‌ترتیب استاد، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۳- به‌ترتیب دانشیار، دانش‌آموخته دکتری، گروه باستان‌شناسی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه اوتووش لوراند، بوداپست، مجارستان

Saadatmand F^{*1}, Tavallaie M^{*2}, Dehpahlavan M³, Ramezani M³, Zargari P⁴, Mohammadi A², Amjadi M⁵

1- MSc, Department of Archaeology, Faculty human science, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Professor, MSc, Department of Genetics, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Associate Professor, PhD Graduated, Department of Archaeology, Faculty of Literature and Human sciences of the University of Tehran, Tehran, Iran

4- MSc, Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5- PhD Candidate, Department of Genetics, Doctoral School of Biology, Eötvös Loránd University, ELTE, Budapest, Hungary

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: tavallaie7003@karshenasan.ir,

fatemehsaadatmand86@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۴)

چکیده

موقعیت ویژه‌ی دشت قزوین در فلات مرکزی ایران باعث شده تا این دشت در طول هزاره‌ها از مسیرهای مهم مهاجرتی اقوام مختلف در فلات ایران باشد. با وجود اهمیت ویژه‌ی مطالعات در این منطقه به‌منظور شناخت الگوهای مهاجرتی باستانی تاکنون مطالعات محدودی بر روی فلات ایران به انجام رسیده است. بدین منظور در پژوهش حاضر برای اولین بار به انجام مطالعات ژنتیک باستانی (استفاده از mtDNA به‌عنوان مارکر جمعیت جهت تبار شناسی) در فلات مرکزی ایران پرداخته شد تا شناخت هاپلوگروپ‌های آن گام نخست در بررسی الگوهای مهاجرتی باستانی در پژوهش‌های بعدی باشد. بدین منظور ۳ اسکلت انسانی از محوطه‌ی سگزآباد قزوین مربوط به عصر آهن ۲ و ۳ مورد بررسی قرار گرفتند. در این راستا استخراج DNA از نمونه‌های استخوانی با استفاده از روش Fast DNA Extraction of Bone صورت گرفت. در مرحله‌ی بعد طراحی پرایمر (شرکت Metabion) و پس از آن PCR به انجام رسید. در نهایت محصولات PCR خالص سازی شده و سپس با کیت توالی‌یابی BigDye Terminator v3.1 (طبق پروتکل سازنده) روی آنالایزر ژنتیکی ABI PRISM® 3130xL (Applied Biosystems, USA) توالی‌یابی شدند. سپس با انجام آزمایش‌های بیوانفورماتیک هاپلوگروپ مادری باستانی D از دو اسکلت به دست آمد (هر دو متعلق به زیر شاخه‌ی D4 بودند). هاپلوگروپ D یکی از شاخه‌های ماکروهاپلوگروپ M است که از آسیای شرقی منشأ گرفته و دارای سه شاخه اصلی از جمله D4 است.

واژه‌های کلیدی

DNA باستانی

سگزآباد

عصر آهن

فلات ایران

هاپلوگروپ DNA میتوکندریایی انسانی

مقدمه

توالی‌یابی ژنوم میتوکندری، یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین رابطه‌ی فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و نیز بررسی الگوهای مهاجرتی در عهد باستان و مطالعات انسان‌شناسی عصر حاضر محسوب شود. از جمله ویژگی‌هایی که باعث می‌شود DNA میتوکندریایی مارکر مناسبی برای این امر باشد می‌توان به این موارد اشاره کرد: توارث مادری، بالاتر بودن میزان جهش نسبت به DNA هسته، وجود نسخه‌های متعدد به ازای هر سلول، ساختار ژنتیکی ساده، بدون پیرایش نوترکیبی، وجود سیر تکاملی سریع در مقایسه با DNA هسته، نواحی حفاظت شده، وجود نواحی حفاظت نشده مانند ناحیه‌ی D-Loop (کنترل) در DNA میتوکندریایی (Giles et al. 1980). در این میان ناحیه‌ی کنترل یا غیر کد کننده^۱ (که D-loop در آن واقع شده است) از ۳ قسمت بسیار متنوع تشکیل شده است که آن‌ها را مناطق فوق متغیر^۲ می‌نامند (Niknami and Ramezani 2016). محققین از این مناطق فوق متغیر به‌عنوان مارکر جمعیتی در مطالعات ژنتیک باستانی استفاده می‌کنند (Newton 2011). در پژوهش حاضر نیز از توالی‌یابی HVRs به‌عنوان مارکر ژنتیکی استفاده شده است.

در این میان با وجود اهمیت فلات مرکزی ایران و موقعیت آن در قرارگیری مسیرهای مهم ارتباطی از عصر باستان تاکنون و وجود سوالات و ابهامات بسیار در خصوص الگوهای مهاجرتی عصر باستان در این منطقه، تاکنون مطالعات و پژوهش‌های محدودی در حوزه ژنتیک باستانی در این محدوده به انجام رسیده است. این در حالی است که همان‌طور که پیش از این گفته شد، مطالعات پلی‌مورفیسم DNA میتوکندری (mtDNA) به‌عنوان مارکر جمعیت می‌تواند به درک بهتر الگوهای مهاجرت و تعامل درون و بین جمعیت‌ها کمک کند (Van Oven and Kayser 2009; Newton 2011). بدین منظور این پژوهش با هدف ایجاد تصویری بهتر از ذخایر ژنتیک مادری مردمان باستان در فلات مرکزی ایران به انجام رسیده است. داده‌های مورد مطالعه در این تحقیق، یافته‌های اسکلتی گورستان سگزآباد دشت قزوین (واقع

^۱ Non- coding region^۲ Hyper Variable Region (HVR)

در شمال فلات مرکزی ایران) مربوط به عصر آهن II و III (با قدمت ۱۸۰۰ قبل از میلاد تا ۵۵۰ قبل از میلاد) می‌باشند. از این رو با توجه به عدم وجود مطالعات کافی در این حوزه، بخش عمده‌ی این پژوهش در جهت تعیین هاپلوگروپ‌های میتوکندریایی این محوطه و نیز بررسی و مقایسه‌ی هاپلوگروپ به‌دست آمده در جمعیت‌های باستان و عصر حاضر در جهان تمرکز خواهد داشت.

مواد و روش‌ها

معرفی محوطه‌ی مورد مطالعه:

سگزآباد، با مختصات جغرافیایی N: 3964025-4157 E: 405304-85، یکی از برجسته‌ترین محوطه‌های باستانی در دشت قزوین است که در گوشه شمال غربی فلات مرکزی ایران واقع شده است. آب و هوای این منطقه متغیر و خشک است. این محوطه در حدود ۷ کیلومتری شمال شهر کوچک سگزآباد از توابع شهرستان بوئین زهرا در استان قزوین واقع شده و در بین مردم بومی به قره تپه معروف است (شکل ۱) (Fazeli et al. 2011).



شکل ۱- موقعیت محوطه باستانی سگزآباد در استان قزوین، ایران

سگزآباد یکی از اولین محوطه‌های استان قزوین بود که توسط دانشگاه تهران به سرپرستی دکتر نگهبان در سال ۱۳۵۰ مورد کاوش قرار گرفت (Negahban 1973). از آن زمان تاکنون، این محوطه توسط باستان‌شناسان دیگر مورد مطالعه قرار گرفته است (Talai 2006; Fazeli 2013; Dehpahlavaan 2016-2017). از نظر گاهنگاری، دو دوره فرهنگی عصر مفرغ (از هزاره چهارم قبل از میلاد) و عصر آهن (تا هزاره اول قبل از میلاد) از این محوطه به‌دست آمده است که معمولاً بر اساس یافته‌های باستان‌شناسی

به‌دست آمده‌اند. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، قدمت آن به عصر آهن II و III (حدود ۱۰۵۰-۸۵۰ ق.م) بر می‌گردد (Dehpahlavaan 2016, 2017). از میان تدفین‌های کاوش شده از این گورستان ۳ اسکلت انسانی مورد مطالعه قرار گرفتند. این مطالعات شامل بررسی یافته‌های انسان شناسی^۱ و تحلیل یافته‌های mtDNA بود که در مرکز ژنتیک انسانی نور به انجام رسید. در جدول ۱ اطلاعات کاوش و یافته‌های انسان شناسی یافته‌ها ارائه شده است که شامل شماره اسکلت^۲، شناسه نمونه^۳، سال حفاری^۴، فصل حفاری^۵، شماره ترانسه^۶، وضعیت تدفین (براساس گزارش حفار)، جنسیت (بر اساس مارکرهای مجموعه و لگن)، سن، آسیب‌شناسی پیش از مرگ^۶ می‌باشد.

^۱ Anthropology

شماره اسکلت، شماره‌ای است که در طی مطالعات ژنتیک باستانی در آزمایشگاه به

نمونه داده شده است

شناسه نمونه: اولین شماره‌ای است که حفار به اسکلت کشف شده می‌دهد

هر دوره از حفاری در یک محوطه را فصل حفاری در آن محوطه می‌گویند

به‌منظور ایجاد نظم در عملیات کاوش تمامی سطح محوطه به‌صورت شبکه‌های مربع یا

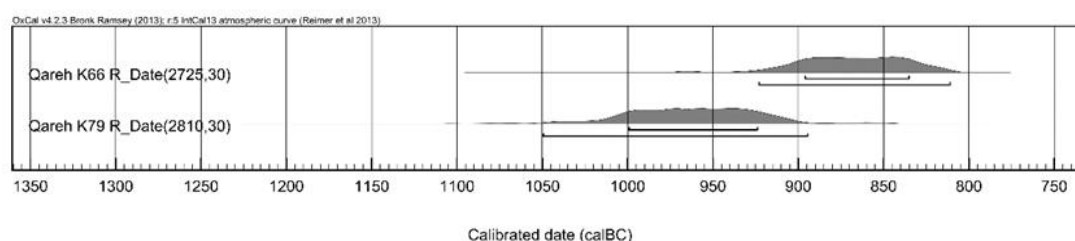
مستطیل شکل شماره‌گذاری می‌شود که به هر کدام یک ترانسه گفته می‌شود

آسیب‌هایی است که پیش از مرگ به وجود آمده و در بقایای به‌جا مانده قابل تشخیص^۶ است premortem pathology

تاریخ‌گذاری می‌شود (Negahban 1977). در طول سال‌های متمادی کاوش در این محوطه یافته‌های غیر منقولی به‌دست آمده است که از جمله آن‌ها می‌توان به بقایای سازه‌ها اشاره کرد که تاریخ آن به اواخر عصر مفرغ و عصر آهن اول برمی‌شود (Talai 1983). علاوه بر آن یافته‌های منقول نیز به‌دست آمده که یافته‌های تدفینی هستند و شامل سفال، اشیاء سنگی، مهرهای استوانه‌ای، مجسمه‌های سفالی، اشیاء استخوانی، مهره‌ها، بقایای جانوران و اشیاء فلزی می‌باشند (Malekshahmirzadi 1977; Dehpahlavaan 2016-2017). گورستان سگزآباد در بخش شرقی تپه‌ی سگزآباد قرار دارد و گاهنگاری آن براساس آزمایش کربن ۱۴ در لایه‌های پایین نشان می‌دهد که قدمت آن به آغاز سکونت در سگزآباد در عصر مفرغ برمی‌شود (Fazeli et al. 2011) و نتایج به‌دست آمده از لایه میانی تا لایه‌های فوقانی نشان‌دهنده عصر آهن II و III (حدود ۸۲۰-۱۰۵۰ calBP) است (Dehpahlavaan. 2016 - 2017) (نمودار ۱).

بررسی یافته‌های اسکلتی:

یافته‌های مورد بحث از کاوش‌های سال ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ به سرپرستی آقای دکتر ده پهلوان توسط تیم کاوش دانشگاه تهران



نمودار ۱- نتیجه کربن ۱۴ برای یافته‌های سگزآباد در لایه‌های میانی و فوقانی (Dehpahlavaan 2016-2017)

جدول ۱- مطالعات انسان شناسی یافته‌های اسکلتی مورد مطالعه

شماره اسکلت	شناسه نمونه	سال حفاری	فصل حفاری	شماره ترانسه	وضعیت تدفین	جنسیت	سن	آسیب شناسی پیش از مرگ
۱	10127	۱۳۹۵	فصل سوم	۱۰	جنینی، منظم	مذکر	۳۵-۴۰	استئوفیت ^۷ در مهره های کمری
۲	11018	۱۳۹۵	فصل سوم	۱۱	جنینی، منظم	مذکر	۲۴-۱۹	استرس مارکر در کتف راست و چپ
۳	12025	۱۳۹۶	فصل چهارم	۱۲	پراکنده و نامنظم	مونث	۴۷-۳۸	استئوفیت در مهره های کمر و لگن

^۷ Osteophyte: رشد استخوان زاید، خار استخوان

آماده‌سازی نمونه‌ها برای استخراج ژن:

۳ نمونه مورد استفاده شامل ۲ استخوان ران^۱ و ۱ دندان آسیاب بزرگ^۲ بودند. اولین مرحله برای تهیه نمونه، بریدن قسمت مناسبی از استخوان‌ها و جداسازی این قسمت‌ها بود. سپس با کمک مته‌لایه ای به قطر ۱-۲ میلی‌متر از سطح نمونه برداشته شد تا آلودگی‌های محیطی از سطح نمونه جدا شود. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سفید کننده ۵ درصد شناور شدند و سپس هر طرف به مدت ۲۰ دقیقه در معرض اشعه ماوراء بنفش (در طول موج ۲۵۴ نانومتر) قرار گرفتند تا هرگونه آلودگی سطحی از بین برود. در مرحله بعد نمونه با استفاده از دستگاه Tissue Lyser پودر شد (Mohammadi et al. 2017).

استخراج DNA و تکثیر PCR:

از تقریباً ۳۰۰ میلی‌گرم استخوان یا پودر دندان به روش FDEB^۳، DNA استخراج شد (Mohammadi et al. 2017). پس از استخراج موفق ژن، طراحی پرایمر مناسب برای تکثیر ژن از توالی‌های بسیار متغیر mtDNA در (HVSII, HVSIII و HVSIII) صورت گرفت. از آنجا که در نمونه‌های باستانی به‌علت

تأثیرگذاری عوامل تخریب کننده نوکلئیک اسیدها، DNA به مقدار زیادی تخریب شده است، لازم است آغازگرها به شکلی طراحی شوند که طول قطعات تولیدی در واکنش PCR کمترین مقدار ممکن را دارا باشد تا بتوان قطعات کوتاه را تکثیر نمود. HVRI در نواحی بین ۱۶۴۱۹-۱۵۹۷۵ با دو قطعه هم پوشان کوتاه و مجاور یکدیگر مورد بررسی قرار گرفت. HVII در منطقه بین نوکلئوتیدهای ۳۸۹-۸ به وسیله سه قطعه کوتاه مجاور یکدیگر و هم‌پوشان بررسی شد. در نهایت ناحیه HVIII بین نوکلئوتیدهای ۵۹۵-۳۶۰ به‌وسیله یک محصول PCR تعیین توالی شد. در مجموع ۶ جفت پرایمر (شرکت Metabion) جهت تکثیر نواحی بسیار متغیر در mtDNA طراحی و استفاده شد (جدول ۲).

پس از طراحی پرایمر، بلست صورت گرفت تا مطمئن شویم پرایمر طراحی شده به بخش‌های غیر اختصاصی متصل نشده و به‌صورت خاص به توالی مورد نظر ما متصل می‌شود. پس از اطمینان از صحت پرایمر، تکثیر ژن به‌وسیله PCR صورت گرفت. تکثیر PCR در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی ۱۲ میکرولیتر محلول DNA، ۱۲.۵ میکرولیتر Taq DNA Polymerase، ۲x Master Mix (Ampliqon) و ۰.۲ میکرومولار از هر پرایمر در حجم ۰.۵ میکرولیتر انجام شد.

^۱ Femur^۲ Molar^۳ Fast DNA Extraction of Bone

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در PCR برای تکثیر مناطق بسیار متغیر در mtDNA

منطقه هدف	توالی آغازگر (5'-3')	طول آغازگر (bp)
HVS-I	CTC CAC CAT TAG CAC CCA CCT AGC TTT GGA GTT GCA GTT GGAT	283
	CAT CAA CTG CAA CTC CAA AT AAT TTC ACG GAG GAT GGT TA	184
	CCT CTA TCA CCC TAT TAA CCGC CAC AGA TAC TGC GAC ATA AT	125
HVS-II	CCT ATG TCG CAG TAT CTG TC TAT GTC TGT GTG GAA AGT AA	۱۶۸
	AA CTT TCC ACA CAG ACA GA ATG GTT AGG CTG GTG TTA CT	۱۲۹
HVS-III	GCT AAC ACC AGC CTA AC TCT GTG AGC CCG TCT AG	266

آزمایشگاهی با سفید کننده و اشعه ماوراء بنفش، استفاده از معرف‌های بدون DNA و تأکید در استفاده از لباس مخصوص برای پرسنل آزمایشگاه. همچنین کنترل‌های منفی در طول هر استخراج DNA به صورت موازی پردازش شدند و تمام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) نیز شامل دو کنترل منفی برای هر مجموعه پرایمر بود. به منظور اطمینان از آلوده نبودن نمونه‌های باستانی با DNA مدرن، نتایج نهایی باستانی با هاپلوگروپ کارشناسان آزمایشگاه مقایسه شد. در شکل ۲ نتایج ژل الکتروفورز را به همراه نمونه کنترل منفی می‌بینیم.

تعیین توالی و تحلیل داده‌ها:

از مجموع ۳ نمونه مورد مطالعه، استخراج ژن از ۲ نمونه با موفقیت صورت گرفت.

شرایط PCR شامل مراحل زیر بود: یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه (denaturation)، ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه (annealing) و ۱ چرخه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (extension). محصولات PCR خالص‌سازی شده و سپس با کیت توالی‌یابی BigDye Terminator v3.1 (طبق پروتکل سازنده) روی آنالایزر ژنتیکی ABI PRISM® 3130xL (Applied Biosystems, USA) توالی‌یابی شدند.

نتایج و بحث

کنترل کیفی:

به منظور جلوگیری از آلودگی با DNA خارجی اقدامات آزمایشگاهی زیر صورت گرفت: ضد عفونی تجهیزات و سطوح



شکل ۲- نتایج ژل الکتروفورز مطالعات فعلی، ستون اول از سمت چپ نشان‌دهنده کنترل منفی است.

جدول ۳- تعیین هاپلوگروپ و واریانت‌ها مربوط به نمونه‌های ۲ و ۳

هاپلوگروپ	واریانت‌های مشاهده شده	واریانت‌ها	شناسه نمونه	شماره اسکلت
mtDNA				
-	-	-	۱۰۱۲۷	*1
D4k	A73G, A93G, T195C, A263G, C309CCT, T310C, T489C, A16183C, A16200d, C16205CGA, T16519C	۱۱	11018	2
D4t	A73G, A93G, T152C, C309CCT, T310C, T489C, T16126C, T16189C, T16189TTC, A16219G, C16223T, A16399G	۱۲	12025	3

* در اسکلت شماره ۱ به دلیل آسیب در ساختار mtDNA ادامه کار روی آن امکان‌پذیر نبود. به عبارت دیگر هیچ میزانی از DNA باستانی به دست نیامد و در نتیجه واریانتی مشاهده نشد.

شرقی ۱۰ تا ۴۳٪ جمعیت‌ها را پوشش می‌دهد. میزان این هاپلوگروپ به سمت غرب و جنوب کاهش می‌یابد تا آن جا که در هند و غرب آسیا به ۲٪ و یا کمتر از آن می‌رسد. اما این مقدار در منطقه‌ی قفقاز و جنوب شرقی آسیا هنوز بالا بوده و بین ۵ تا ۱۰٪ می‌باشد. این هاپلوگروپ همچنین در بعضی از اروپایی‌های شمال شرقی مانند کارلین‌ها، سامی‌ها و اسکاندیناویایی‌ها دیده می‌شود (Derenko et al. 2010).

براساس مطالعاتی که تاکنون بر روی mtDNA در محوطه‌های باستانی به‌عمل آمده است، قدیمی‌ترین نمونه‌ی هاپلوگروپ D مربوط به دوره‌ی میان سنگی (از ۲۰ الی ۱۸ هزار سال قبل تا ۱۲ هزار سال قبل) بوده است و از محدوده‌ی جغرافیایی شرق دریایچه بایکال واقع در جنوب روسیه به‌دست آمده است (Kılınç et al. 2018). این هاپلوگروپ در دوره نوسنگی (از ۱۰ هزار سال قبل تا ۷۵۰۰ سال قبل) در جمهوری آلتایی روسیه (Chikisheva 2007, Ricaut 2004) و شرق و غرب دریایچه بایکال در جنوب روسیه (Kılınç et al. 2018, Mooder et al. 2006) به‌دست آمد. در دوره مس سنگی (از سال ۴۵۰۰ قبل از میلاد تا ۳ هزار سال قبل از میلاد) این هاپلوگروپ از کورگان‌های Dvinsk در شمال قزاقستان به‌دست آمد (Molodin et al. 2012). در بازه‌های زمانی جدیدتر تعداد محوطه‌هایی که هاپلوگروپ D از آن‌ها به‌دست آمده بیشتر شده و نیز فراوانی آن در میان اسکلت‌های باستانی مورد مطالعه بالاتر می‌رود به گونه‌ای که در عصر مفرغ (از ۳ هزار سال قبل از میلاد تا ۱۵۰۰ قبل از میلاد) این هاپلوگروپ علاوه بر محوطه‌هایی که پیش از این از آن‌ها نام برده شد، از کوهستان‌های آلتایی مغولستان (Gonzalez et al. 2012) و چندین محوطه در چین (Li et al. 2022, Kumar et al. 2017 & 2015) نیز به‌دست آمد. تداوم و فراوانی بالای این هاپلوگروپ ژنی در عصر آهن ۱ (از سال ۱۵۰۰ قبل از میلاد تا ۱۲۰۰ قبل از میلاد) و عصر آهن ۲ و ۳ (عصر آهن ۲ از ۱۲۰۰ قبل از میلاد تا ۸۰۰ قبل از میلاد و عصر آهن ۳ از ۸۰۰ قبل از میلاد تا ۵۵۰ قبل از میلاد) در محوطه‌های مورد بحث قابل مشاهده است (جدول ۴). همان‌طور که پیش از این گفته شد این هاپلوگروپ در عصر حاضر از هاپلوگروپ‌های شایع آسیای مرکزی و آسیای شرقی است ولی با توجه به این که نمونه‌های مورد مطالعه‌ی ما مربوط به عصر آهن ۲ و ۳ هستند،

به‌دلیل آسیب در ساختار mtDNA در نمونه ۱۰۱۲۷ (نمونه ۱) ادامه کار روی آن امکان‌پذیر نبود. در نهایت نتایج به‌دست آمده از نمونه‌های ۱۱۰۱۸ و ۱۲۰۲۵ به‌منظور تحلیل و تبارشناسی ژنتیکی و مقایسه با توالی مرجع تجدید نظر شده کمبریج (rCRS)^۱ به وب سایت‌های NCBI^۲ و Mitomaster داده شد تا نوکلئوتیدهای جهش‌یافته و پلی مورفیسم‌های ژنوم میتوکندری تعیین شد.

براین اساس blast (ارزیابی تطبیقی) صورت گرفت تا مطمئن شویم توالی به‌دست آمده مربوط به بخش D-Loop میتوکندری انسان باشد. نتیجه نهایی مربوط به تعیین هاپلوگروپ mtDNA به‌دست آمده از سایت Mitomaster در قالب جدول ۳ ارائه شده است. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، اسکلت شماره ۲ دارای ۱۱ واریانت قابل مشاهده بوده و بر اساس درخت فیلوژنی هاپلوگروپ mtDNA می‌آن، D4k است. اسکلت شماره ۳ نیز دارای ۱۲ واریانت قابل مشاهده است و براساس درخت فیلوژنی هاپلوگروپ آن D4t تشخیص داده شد.

توزیع و پراکندگی هاپلوگروپ D در جمعیت‌های باستانی و امروزی:

هاپلوگروپ D زیر شاخه‌ای از ماکرو هاپلوگروپ M می‌باشد که در حدود ۳۰ تا ۵۰ هزار سال قبل در شرق ایجاد شد (Comas et al. 2004). پس از آن از شرق آسیا به سمت شمال انتشار پیدا کرده و به جنوب سیبری می‌رسد. این پیشروی عمیق‌تر شده و به شمال آسیا و آمریکا گسترش می‌یابد. پیشرفت این هاپلوگروپ به سوی غرب و در امتداد استپ (روسیه) از منچوری (Manchuria) به اروپا می‌رسد (Kong et al. 2003; Metspalu et al. 2006). هاپلوگروپ D دومین هاپلوگروپ مهم در شمال آسیا (بعد از هاپلوگروپ C) است که به‌همراه هاپلوگروپ C، بیش از نیمی از ذخایر ژن‌های میتوکندریایی این ناحیه را شکل می‌دهد (Derenko et al. 2010). حضور این هاپلوگروپ در جمعیت‌های سیبری قابل توجه است (Derenko et al. 2003 & 2010; Volodko et al. 2013; Fedorova et al. 2008). هاپلوگروپ D تقریباً بیش از ۲۰٪ تنوع ژنی در اکثر مناطق شمال آسیا را در برمی‌گیرد. افزون بر این، این هاپلوگروپ در آسیای مرکزی ۱۴ تا ۲۰٪ و در آسیای

¹ The revised Cambridge References Sequence

² National Center for Biotechnology Information

زیرشاخه‌ای اصلی تشکیل می‌دهد. این هاپلوگروپ شایع‌ترین هاپلوگروپ mtDNA در میان جمعیت‌های امروزی از نواحی شمال شرقی آسیا (ژاپن، کره و چین) است (Kong et al. 2003; Umetsu et al. 2005; Lee et al. 2006; Metspalu et al. 2006; Zheng et al. 2011). افزون بر این در جمهوری‌های سیبری (Derenko et al. 2003; 2010; 2012) و نیز آسیای مرکزی در میان ترکمن‌ها، تاجیک‌ها، قزاق‌ها و قرقیزها (Comas et al. 2004) فراوانی و تنوع بالایی دارد. به‌طور کلی می‌توان گفت که توزیع این هاپلوگروپ را در سرتاسر چین، جنوب شرق آسیا، سیبری، آسیای مرکزی و بومیان آمریکا می‌توان دید (Comas et al. 2004).

دامنه‌ی بررسی این هاپلوگروپ تا همین بازه‌ی زمانی محدود شده است. در جدول ۴ نام موقعیت‌های مکانی و دوره‌ی زمانی‌ای که از آن‌ها هاپلوگروپ D به‌دست آمده است ارائه شده است. در شکل ۳ موقعیت این محوطه‌ها به تفکیک بازه زمانی مشخص شده است. همان‌طور که در شکل ۳ قابل مشاهده است، با گذشت زمان پراکندگی و فراوانی این هاپلوگروپ در آسیا رو به افزایش بوده است.

توزیع و پراکندگی زیر هاپلوگروپ D4 در جهان:

زیرهاپلوگروپ D4 یکی از ۳ زیر شاخه اصلی هاپلوگروپ D می‌باشد. قدمت این زیر هاپلوگروپ به ۲۴ تا ۲۸ هزار سال پیش باز می‌گردد و بیشترین زیر شاخه‌های هاپلوگروپ D را با ۱۵

جدول ۴- موقعیت‌های مکانی و پراکندگی هاپلوگروپ D به تفکیک بازه‌های زمانی باستانی

منبع	دوره زمانی					کشور/ منطقه/ نام محوطه
	عصر آهن ۲ و ۳	عصر آهن ۱	عصر مفرغ	مس سنگی	نوسنگی	
Juras et al. 2017	*					اوکراین
Gonzalez et al. 2012	*		*			کوهستان‌های آلتایی مغولستان
Chikisheva 2007- Ricaut 2004	*		*		*	جمهوری آلتایی روسیه
Molodin et al. 2012	*		*	*		کورگان‌های Dvinsk در شمال قزاقستان
Kılınç et al. 2018					*	شرق دریاچه بایکال- جنوب روسیه
Mooder et al. 2006/ Kılınç et al. 2018			*		*	غرب دریاچه بایکال- جنوب روسیه
Kılınç et al. 2018	*					منطقه Amur Oblast- جنوب روسیه
Unterlander et al. 2017	*					جمهوری - Tuva جنوب روسیه
Li et al. 2017		*	*			چین- بخش مرکزی
Li et al. 2015			*			چین گورستان Xiaohu
Kumar et al. 2022	*	*	*			چین- شمال Xinjiang
Kumar et al. 2022	*	*				چین- غرب Xinjiang
Kumar et al. 2022	*					چین- جنوب Xinjiang
پژوهش حاضر	*					ایران- محوطه سگزآباد

توزیع و تنوع هاپلوگروپ D4 در ساکنان فلات ایران (از عصر باستان تا کنون):

در بحث توزیع هاپلوگروپ D در ایران امروز می‌توان به این تحقیقات اشاره کرد. براساس تحقیقات Derenko و همکارانش که در سال ۲۰۰۷ به انجام رسید هاپلوگروپ D4 در منطقه‌ی کردستان در شمال غربی ایران و نیز در مناطق شرقی ایران (D4, D5) به صورت محدود به دست آمد (Derenko et al. 2007). در مطالعات mtDNA عصر حاضر در آسیای مرکزی که توسط Comas و همکارانش در ۲۰۰۴ انجام شد، بخشی از نمونه‌ها به ایران و دیگر مناطق آسیا متعلق بود. از میان نمونه‌های مربوط به ایران تنها یک نمونه از هاپلوگروپ D4c به دست آمد که موقعیت جغرافیایی نمونه‌ی مورد بررسی عنوان نشده بود (Comas et al. 2004). همچنین هاپلوگروپ D4 با فراوانی بسیار پایین در بخش‌های جنوب غربی ایران (قشقایی‌ها) و کمتر از آن در بخش‌های جنوب مرکزی (فارس‌ها) دیده شد (Derenko et al. 2013). در مجموع می‌توان گفت در میان جمعیت‌های امروزی ایران، زیرهاپلوگروپ D4 تنها گروه ژنی به دست آمده از هاپلوگروپ D است که آن هم با فراوانی بسیار پایین به دست آمده است.

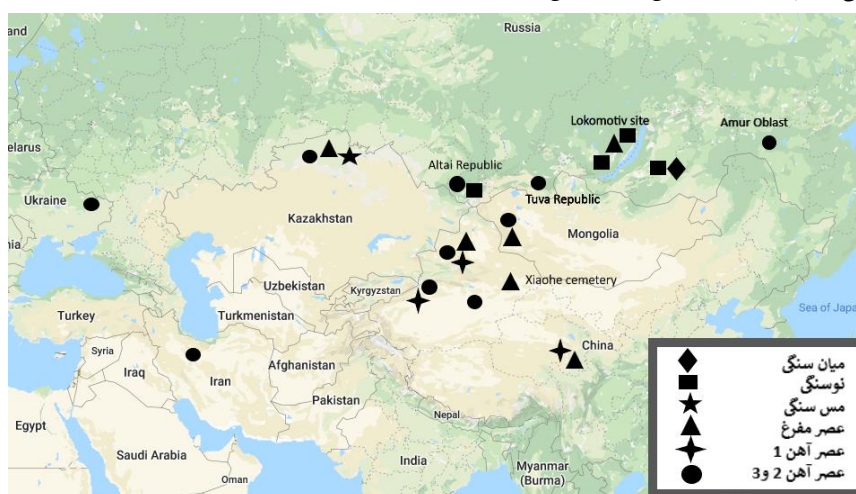
تاکنون تحقیقات بسیار محدودی بر اساس mtDNA در جمعیت‌های باستانی فلات ایران به عمل آمده است. در ادامه به شرح مختصری از مهم‌ترین مطالعات در این زمینه اشاره شده است. در سال ۱۳۹۶ وحدتی نسب و همکارانش ۱۱ تدفین انسان

از عصر آهن در گوهر تپه بین شهرستان نکا و بهشهر استان مازندران مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل هاپلوگروپ مادری از ناحیه بسیارمتغیر ۱ (HVS-I) نشان داد که هاپلوگروپ H در ایران، به ویژه در منطقه جنوب شرقی خزر، همچنان رواج دارد (Vahdati nasab et al. 2018). در پژوهش دیگر رضایی و همکارانش، بقایای ۵ اسکلت انسانی را از محوطه هفت تپه در دشت خوزستان که یکی از اولین مناطق مسکونی فلات ایران بود مورد بررسی قرار دادند. این یافته‌ها متعلق به دوره عیلام میانی (۱۵۰۰ تا ۱۱۰۰ قبل از میلاد) بودند. تجزیه و تحلیل نشان داد که ساکنان هفت تپه در آن دوره از جمله کسانی بودند که دارای هاپلوگروپ‌های مادری R2 و R5 بودند (Niknami and Ramezani 2016).

آنچه که در این پژوهش به دست آمد، اولین یافته‌های mtDNA باستانی از فلات مرکزی بوده است که از محوطه‌ی سگزآباد دشت قزوین به دست آمد.

نتیجه‌گیری کلی

براساس آنچه گزارش شد، هاپلوگروپ D دومین هاپلوگروپ مهم در شمال آسیا بوده و فراوانی بالایی در جمعیت‌های آسیای مرکزی و آسیای شرقی دارد. هاپلوگروپ D دارای سه زیرشاخه‌ی اصلی است که یکی از مهم‌ترین آن‌ها، D4 می‌باشد. زیرهاپلوگروپ D4 شایع‌ترین هاپلوگروپ mtDNA در میان جمعیت‌های امروزی از نواحی شمال شرقی آسیا (ژاپن، کره و چین) است و نیز فراوانی بالایی در آسیای مرکزی دارد.



شکل ۳ - موقعیت‌یابی و پراکندگی هاپلوگروپ D به تفکیک بازه‌های زمانی باستانی

می‌توان نتیجه گرفت این هاپلوگروپ از عصر آهن تا عصر حاضر تداوم داشته است.

سپاسگزاری

در اینجا لازم می‌دانیم از اعضای مؤسسه باستان‌شناسی دانشگاه تهران به‌خاطر کمک در جمع‌آوری داده‌ها کمال تشکر و قدردانی را داشته باشیم. همچنین از کارشناسان مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی نور سپاسگزاریم که در انجام مراحل آزمایشگاهی این پژوهش ما را یاری کردند. در پایان از همهی عزیزانی که برای به انجام رسیدن این پژوهش، به هر شکل مشوق و همراه ما بودند تشکر می‌کنیم.

منابع

- Chikisheva TA, Gubina MA, Kulikov IV, Karafet TM, Voevoda MI, Romaschenko AG (2007) A paleogenetic study of the prehistoric populations of the Altai. *Archaeology, Ethnology and Anthropology of Eurasia* 32: 130-142.
- Comas D, Plaza S, Wells RS, Yuldaseva N, Lao O, Calafell F, Bertranpetit J (2004) Admixture, migrations, and dispersals in Central Asia: evidence from maternal DNA lineages. *European Journal of Human Genetics* 12:495-504.
- Dehpahlavaan M (2016- 2017) Preliminary Report of Educational and Research Excavation of the Department of Archeology, University of Tehran in Ghareh Teppe, Sagzabad, Ministry of Cultural Heritage, Handicrafts and Tourism, Tehran, Iran. (In Farsi).
- Derenko MV, Grzybowski T, Malyarchuk BA, Dambueva IK, Denisova GA, Czarny J, Zakharov IA (2003) Diversity of mitochondrial DNA lineages in South Siberia. *Annals of human genetics* 67:391-411.
- Derenko M, Malyarchuk B, Grzybowski T, Denisova G, Dambueva I, Perkova M, Zakharov I (2007) Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in northern Asian populations. *The American Journal of Human Genetics* 81:1025-1041.
- Derenko M, Malyarchuk B, Grzybowski T, Denisova G, Rogalla U, Perkova M, Zakharov I (2010) Origin and post-glacial dispersal of mitochondrial DNA haplogroups C and D in northern Asia. *PloS one* 5:e15214.
- Derenko M, Malyarchuk B, Denisova G, Perkova M, Rogalla U, Grzybowski T, Zakharov I (2012) Complete mitochondrial DNA analysis of eastern Eurasian haplogroups rarely found in populations of northern Asia and eastern Europe. *PloS one* 7:e32179.
- Derenko M, Malyarchuk B, Bahmanimehr A, Denisova G, Perkova M, Farjadian S, Yepiskoposyan L (2013) Complete mitochondrial DNA diversity in Iranians. *PloS one* 8:e80673.

این زیرهاپلوگروپ با فراوانی محدود در جمعیت‌های حال حاضر ایران گزارش شده است. براساس مطالعات ژنتیک باستان‌شناسی انجام شده، هاپلوگروپ D در ادوار مختلف تاریخ از دوره میان سنگی (از ۴۵۰۰ قبل از میلاد تا ۳ هزار قبل از میلاد) تا عصر حاضر مشاهده شده است که نشان دهنده‌ی تداوم هاپلوگروپ D در طول این هزاره‌ها می‌باشد. از آن‌جا که تحقیق حاضر منجر به شناسایی اولین حضور هاپلوگروپ D4 در میان ساکنان فلات ایران در عصر آهن ۲ و ۳ (از ۱۲۰۰ قبل از میلاد تا ۵۵۰ قبل از میلاد) شده است و در عین حال در جمعیت‌های امروزی ایران نیز ما شاهد این هاپلوگروپ در میان اقوام ایرانی هستیم. پس

- Fazeli Nashli H, Darabi H, Naseri R, Fallahian Y (2011) Relative and Absolute Dating of Tepe Sagzabad, Qazvin Plain. *Journal of Archaeological Studies* 3:134-158. (In Farsi).
- Fazeli Nashli H (2013) The Archaeology of The Qazvin from The Sixth to the first Millennium BC Second ed, University of Tehran, Tehran, Iran. (In Farsi).
- Fedorova SA, Reidla M, Metspalu E, Metspalu M, Rootsi S, Tambets K, Villems R (2013) Autosomal and uniparental portraits of the native populations of Sakha (Yakutia): implications for the peopling of Northeast Eurasia. *BMC evolutionary biology* 13:1-18.
- González-Ruiz M, Santos C, Jordana X, Simón M, Lalueza-Fox C, Gigli E, Malgosa A (2012) Tracing the origin of the east-west population admixture in the Altai region (Central Asia). *PloS one* 7:e48904.
- Juras A, Krzewińska M, Nikitin AG, Ehler E, Chyleński M, Łukasik S, Götherström A (2017) Diverse origin of mitochondrial lineages in iron age Black Sea Scythians. *Scientific reports* 7(1), 43950.
- Kılınç Kılınç GM, Kashuba, N, Yaka R, Sümer AP, Yüncü E, Shergin D, Götherström, A (2018) Investigating Holocene human population history in North Asia using ancient mitogenomes. *Scientific reports* 8:8969.
- Kong QP, Yao YG, Sun C, Bandelt HJ, Zhu CL, Zhang YP (2003) Phylogeny of East Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. *The American Journal of Human Genetics* 73:671-676.
- Kumar V, Wang W, Zhang J, Wang Y, Ruan Q, Yu J, Fu, Q (2022) Bronze and Iron Age population movements underlie Xinjiang population history. *Science* 376:62-69.
- Lee HY, Yoo JE, Park MJ, Chung U, Kim CY, Shin KJ (2006) East Asian mtDNA haplogroup determination in Koreans: Haplogroup-level coding region SNP analysis and subhaplogroup-level control region sequence analysis. *Electrophoresis* 27:4408-4418.

- Li C, Ning C, Hagelberg E, Li H, Zhao Y, Li W, Zhou H (2015) Analysis of ancient human mitochondrial DNA from the Xiaohe cemetery: insights into prehistoric population movements in the Tarim Basin, China. *BMC genetics*, 16:1-11.
- Li J, Zeng W, Zhang Y, Ko AMS, Li C, Zhu H, Zhou H (2017) Ancient DNA reveals genetic connections between early Di-Qiang and Han Chinese. *BMC evolutionary biology* 17:1-13.
- Malekshahmirzadi S (1977) Preliminary Report of excavation in Sagzabad during 1970- 1971, *Marlik* 2:81-90. (In Farsi).
- Metspalu M, Kivisild T, Bandelt HJ, Richards M, Villems R (2006) The pioneer settlement of modern humans in Asia. *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens* 181-199.
- Mohammadi A, Ghorbani Alvanegh A, Khafaei M, Habibi Azarian S, Naderi M, Kiyani E, Tavallaei M (2017) A new and efficient method for DNA extraction from human skeletal remains usable in DNA typing. *Journal of Applied Biotechnology Reports* 4:609-614.
- Molodin VI, Pilipenko AS, Romaschenko AG, Zhuravlev AA, Trapezov RO, Chikisheva TA, Pozdnyakov DV (2012) Human migrations in the southern region of the West Siberian Plain during the Bronze Age: Archaeological, palaeogenetic and anthropological data. *Population dynamics in prehistory and early history* 93:112.
- Mooder KP, Schurr TG, Bamforth FJ, Bazaliiski VI, Savel'ev NA (2006) Population affinities of Neolithic Siberians: a snapshot from prehistoric Lake Baikal. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists* 129:349-361.
- Negahban E (1973) The two-month preliminary report of excavation in Qazvin Plain in Sagzabad site. *Marlik* 1:1-24. (In Farsi).
- Negahban E (1977) The excavation of Qazvin Plain. *Marlik* 2:33-51. (In Farsi).
- Newton JR (2011) Ancient Mitochondrial DNA From Pre-historic Southeastern Europe: The Presence of East Eurasian Haplogroups Provides Evidence of Interactions with South Siberians Across the Central Asian Steppe Belt, Masters Theses. Grand Valley State University. United States. <http://scholarworks.gvsu.edu/theses/5>.
- Niknami K, Ramezani M (2016) An Introduction to Genetic Archaeology. Samt, Tehran, Iran. (In Farsi).
- Ricaux FX, Keyser-Tracqui C, Cammaert L, Crubézy E, Ludes B (2004) Genetic analysis and ethnic affinities from two Scytho-Siberian skeletons. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 123:351-360.
- Talai H (1983) Late Bronze Age and Iron Age I Architecture in Sagzabad – Qazvin Plain – The Central Plateau of Iran. *Iranica Antiqua* 18:51-57. (In Farsi).
- Umetsu K, Tanaka M, Yuasa I, Adachi N, Miyoshi A, Kashimura S, Osawa M (2005) Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms for haplogrouping of East Asian populations. *Electrophoresis* 26:91-98.
- Unterländer M, Palstra F, Lazaridis I, Pilipenko A, Hofmanová Z, Groß M, Burger J (2017) Ancestry and demography and descendants of Iron Age nomads of the Eurasian Steppe. *Nature communications* 8:14615.
- Vahdati nasab H, Anvaari Z, Ghamari M, Sheikholeslami AM, Akbari MT, Lesaani N (2018) Dispersals of the Aryans into the Iranian Plateau in the Light of New Genetic Discoveries, Case Study: Gohar Teppe Iron Age Cemetery, Behshahr. *Journal of Iranian Anthropological Research* 7:117-143. (In Farsi).
- Van Oven M, Kayser M (2009) Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human mutation* 30:E386-E394.
- Volodko NV, Starikovskaya EB, Mazunin IO, Eltsov N P, Naidenko PV, Wallace DC, Sukernik RI (2008) Mitochondrial genome diversity in arctic Siberians, with particular reference to the evolutionary history of Beringia and Pleistocene peopling of the Americas. *The American Journal of Human Genetics* 82:1084-1100.
- Zheng HX, Yan S, Qin ZD, Wang Y, Tan JZ, Li H, Jin L (2011) Major population expansion of East Asians began before neolithic time: evidence of mtDNA genomes. *PloS one* 6:e25835.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI): [1988]-[cited 2017 Apr 06]. Homo sapiens mitochondrion, complete genome available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_012920.1
- MITOMAP, (2008): A Human Mitochondrial Genome Database. <https://www.mitomap.org>.