13(4) 19-26, Winter 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Investigation of genetic diversity and genetic resources of mouflon (*Ovis orientalis*) and its domestic breeds (*Ovis aries*) in the north-west of Iran based on whole genome sequences and BeadChip Ovine SNP 50K.

***Wahid Zamani* [*1], *Marzieh Asadi Aghbolaghi* [2], *Saeid Naderi* [3], *Hamid Reza Rezaei* [3]**

[1] *Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran*
[2]*Department of Biodiversity and Ecosystem Management, Environmental Sciences Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran*
[3]*Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Rasht, Iran*
[4]*Department of Environmental Sciences, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*

Key Words
Mouflon
Genetic diversity
Genetic resources
Ovis

Abstract

Iran's mouflons (*Ovis orientalis*) populations have been declined in western regions because of poaching and habitat destruction and categorized as vulnerable in IUCN red list, this populations as ancestors of domestic sheep (*Ovis aries*) breeds all around the world has an international importance. In this study, genetic diversity and structure of mouflons in the north-west of Iran (West Azerbaijan, East Azerbaijan, Kurdistan, Markazi, Hamedan and Qazvin) identified and compared with the domestic breeds via whole genome sequencing and BeadChip Ovine SNP 50K Data. Number of SNPs all over the genome, genetic load and inbreeding coefficient based on whole genome data, as well as expected heterozygosity and inbreeding coefficient as genetic diversity parameters based on c BeadChip data have been compared between wild and domestic groups. Number of discriminator SNPs as the most important parameters showed impressive difference and was calculated about 24 million for wilds and 20 million for domestics. According to the findings of nucleotide diversity for the whole genome, genetic diversity based on complete genome data was higher in the wild group than in the domestic group. Based on the results of this study, mouflon (*Ovis orientalis*) with high levels of genetic diversity as genetic resources for domestic breeds of all domestic sheep in the world are of vital value and should be given priority in conservation programs.

* Corresponding Author's email: w.zamani@uok.ac.ir
Received: 13 September 2020; Reviewed: 11 October 2020; Revised: 6 December 2020; Accepted: 6 January 2021
(DOI):10.22034/AEJ.2020.258518.2413

مقاله پژوهشی

مطالعه تنوع و ذخایر ژنتیکی قوچ و میش ارمنی (*Ovis orientalis*) در شمال‌غربی ایران با استفاده از تراشه‌های میکروآرای DNA و توالی کامل ژنوم

وحید زمانی[1*]، مرضیه اسدی‌آق‌بلاغی[2]، سعید نادری[3]، حمیدرضا رضایی[4]

[1] گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

[2] گروه تنوع زیستی و مدیریت اکوسیستم‌ها، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

[3] گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

[4] گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

کلمات کلیدی

قوچ و میش ارمنی
تنوع ژنتیکی
ذخایر ژنتیکی
Ovis

چکیده

مقدمه: قوچ و میش‌های ارمنی (*Ovis orientalis*) غرب ایران به‌دلایلی ازجمله شکار غیرمجاز و تخریب زیستگاه در فهرست سرخ IUCN در رده آسیب‌پذیر قرار گرفته و از سویی به‌عنوان نیای اجدادی نژادهای اهلی گوسفند (*Ovis aries*) سراسر دنیا ارزش فراملی دارند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با استفاده از توالی‌یابی کل ژنوم و چیپ‌های BeadChip Ovine SNP 50K تنوع و ذخایر ژنتیکی جمعیت‌های قوچ و میش ارمنی شمال‌غرب ایران (آذربایجان‌غربی و شرقی، کردستان، مرکزی، همدان، قزوین) به‌عنوان خاستگاه اهلی‌سازی گوسفند، شناسایی و با گوسفندهای اهلی همان مناطق مقایسه شد. تعداد SNPهای کل ژنوم، ضریب درون آمیزی و ژنتیک لود براساس داده‌های ژنوم کامل، هم‌چنین هتروزیگوسیتی مورد انتظار به‌عنوان پارامترهای مرتبط با تنوع ژنتیکی بین دو گروه اهلی و وحشی مقایسه شدند.

نتایج: براساس نتایج به‌دست آمده تعداد SNPهای تفکیک‌کننده به‌عنوان مهم‌ترین پارامتر تقریباً ۲٤میلیون برای گروه وحشی و در حدود ۲۰ میلیون برای گروه اهلی محاسبه شد که اختلاف چشمگیری را نشان داد. با توجه به یافته‌های تنوع نوکلئوتیدی ژنوم، تنوع ژنتیکی براساس داده‌های ژنوم کامل در گروه وحشی نسبت به گروه اهلی بیش‌تر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس نتایج مطالعه حاضر قوچ و میش ارمنی با داشتن میزان بالای تنوع ژنتیکی به‌عنوان ذخایر ژنتیکی برای نژادهای اهلی تمامی گوسفندان اهلی دنیا ارزش حیاتی دارند و باید در اولویت برنامه‌های حفاظتی قرار بگیرند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: w.zamani@uok.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۳ شهریور ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۲۰ مهر ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱٦ آذر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۷ دی ۱۳۹۹
(DOI):10.22034/AEJ.2020.258518.2413

مقدمه

گونه‌های وحشی جنس *Ovis* در ایران شامل قوچ و میش اوریال (*Ovis vignei*) و قوچ و میش ارمنی (*Ovis orientalis*) به‌ترتیب در مناطق شرقی و غربی ایران پراکنش دارند (۱). این گونه‌ها در اندازه بدن، شکل شاخ و رنگ پشم بدن تفاوت دارند و آنالیز تبارشناسی براساس نشانگرهای میتوکندریایی آن‌ها را به دو گروه منوفیلوتیک[1] تقسیم می‌کند، سایر جمعیت‌های مرکز ایران که ترکیبی از صفات فنوتیپی قوچ اوریال و ارمنی را از خود نشان می‌دهند در واقع هیبریدی از این دو گونه مجزا هستند (۲). براساس مدارک باستان شناسی و داده‌های مولکولی مناطق غرب و شمال‌غربی ایران به عنوان بخشی از خاستگاه اهلی‌سازی گوسفند در دنیا شناخته شده‌اند (۳، ۴ و ۵). بنابر مطالعات صورت گرفته قوچ و میش ارمنی (*Ovis orientalis*) به‌عنوان اجداد نژادهای متنوع گوسفندهای اهلی که در سراسر دنیا پراکنش دارند، محسوب می‌شود و به‌همین دلیل این گونه از دیدگاه ژنتیک حفاظت اهمیت حفاظتی بالایی دارد (۴). هم‌چنین قوچ و میش ارمنی به‌عنوان گونه‌ای آسیب‌پذیر[2] در لیست قرمز اتحادیه جهانی حفاظت از طبیعت طبقه‌بندی شده است (۶). به‌دلایل مختلفی ازجمله تخریب زیستگاه (۱، ۷) و شکار در ایران تقریباً تمامی جمعیت‌های قوچ و میش ارمنی دارای اندازه جمعیت کوچکی هستند و در پارک‌های ملی و مناطق حفاظت شده جمعیت‌های آن‌ها چندپارچه شده‌اند (۸). تنوع ژنتیکی یکی از مهم‌ترین سطوح تنوع زیستی محسوب می‌شود، در مقیاس کوچک تنوع زیستی شامل تغییرات ژنتیکی بین جمعیت‌های یک گونه و یا افراد داخل یک جمعیت واحد است. روش‌های مبتنی بر DNA با مرتفع کردن مشکلات روش‌های سنتی قادرند تا تنوع زیستی را سریع‌تر، ارزان‌تر و بهتر شناسایی کنند (۹). در پژوهش‌های مرتبط با مطالعه تاریخ تکاملی در جانوران وحشی معمولاً ژنوم میتوکندریایی به‌دلیل اندازه کوچک و سهل‌الوصول بودن، نسبت به ژنوم هسته ترجیح داده می‌شود (۱۰) در واقع نشانگرهای ژنتیکی ابزار مناسبی برای مطالعه تغییرات ژنتیکی میان افراد، گونه‌ها و جمعیت‌ها هستند و دانش ما را از گونه‌ها و جمعیت‌های مورد مطالعه افزایش می‌دهند، این نشانگرها انقلابی در اندازه‌گیری و آنالیز تنوع ژنتیکی به‌وجود آورده‌اند (۱۱، ۱۲). ازجمله نشانگرهای مناسب می‌توان به SNP یا پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی اشاره کرد که یکی از متداول‌ترین نشانگرها در مطالعات ژنتیکی مربوط به ژنتیک حفاظت بوده است (۱۳). پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی یا در واقع همان SNP[3] تغییر در یک نوکلئوتید واحد است که در جایگاه‌های خاصی از ژنوم اتفاق می‌افتند، به‌طوری‌که هریک از این تغییرات باید حداقل در بیش‌تر از یک درصد از افراد جمعیت مشاهده شود و قابلیت توارث داشته باشند تا به‌عنوان SNP قلمداد شوند. SNP در نواحی کدکننده و غیرکننده DNA حضور دارد و فاکتورهایی مانند نوترکیبی و نرخ جهش در تعداد و تراکم آن‌ها نقش موثر دارند (۱۴). جدیدترین روش توالی‌یابی، موسوم به توالی‌یابی نسل نو یا NGS[4] می‌باشد که بسیاری از مراکز تحقیقاتی را بر آن داشته که پروژه‌های ژنتیکی را براساس توالی‌یابی ژنوم کامل گونه مورد مطالعه و یا بخش‌های بزرگی از ژنوم آن تعریف کنند. درواقع در طرح توالی‌یابی نسل نو از تکنیک ایلومینا[5] برای توالی‌یابی نمونه‌های استفاده می‌شود و این تکنیک توسط بالاسبرامانیان[6] و کلنرمن[7] توسعه داده شده است (۱۵، ۴). پژوهش حاضر براساس روش توالی‌یابی نسل نو تعریف شده است و برای اولین بار توالی‌یابی کامل ژنوم قوچ و میش ارمنی با استفاده از تکنیک‌های ایلومینا و پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی یا SNP در شمال‌غرب و غرب ایران صورت پذیرفت. هدف اصلی این پژوهش بررسی تنوع و ذخایر ژنتیکی قوچ و میش ارمنی و نژادهای گوسفند اهلی بر گرفته از این گونه براساس توالی کامل ژنوم و تخمین تنوع ژنتیکی قوچ و میش ارمنی با استفاده از داده‌های تراشه‌های ریزآرایه DNA[8] بود. چراکه، داده‌های معتبر و ارزشمند تنوع ژنتیکی که از طریق روش‌های جدید و پیشرفته ژنتیک مولکولی حاصل می‌شوند، مطالعات ژنتیکی را بهبود داده و تاثیرات شگرفی بر ژنتیک حفاظت، تکامل و مدیریت حیات‌وحش برجا خواهند گذاشت (۱۶، ۱۷).

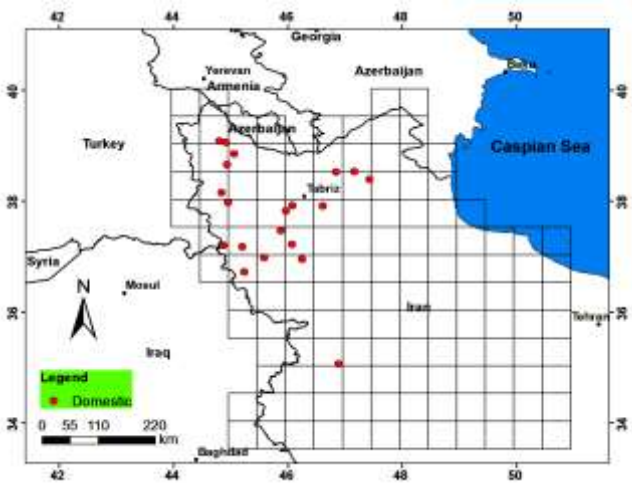
مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه و نمونه‌برداری: بنابر مطالعات پیشین که بر مبنای ژنوم میتوکندری انجام شده‌اند مناطق شمال‌غرب و غرب ایران خاستگاه اهلی‌سازی قوچ و میش ارمنی محسوب می‌شوند (۱۵، ۴). لذا بر این اساس نمونه‌برداری در استان‌های غرب و شمال غربی ایران متمرکز شد (آذربایجان‌غربی، آذربایجان‌شرقی، ارومیه و کردستان، اراک، گلپایگان، همدان، قزوین). برای پرهیز از شدت زیاد نمونه‌برداری ابتدا در محیط GIS شبکه‌ای طراحی شد که اندازه

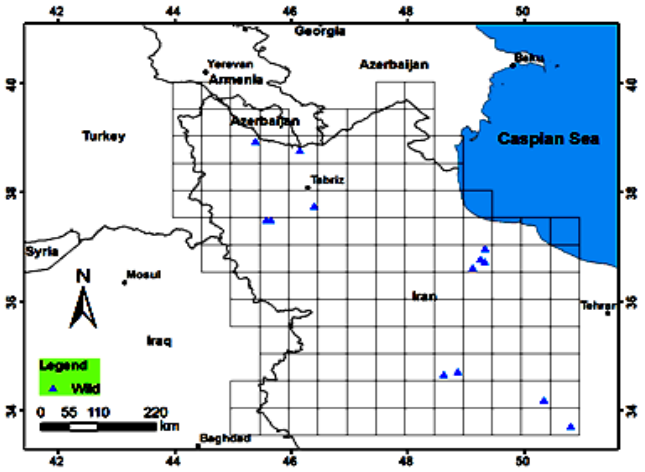
[1] Monophyletic
[2] Vulnerable

[3] Single Nucleotide Polymorphism
[4] Next Generation Sequencing
[5] Illumina
[6] Balasubramanian
[7] Klenerman
[8] DNA microarray

سلول‌های مربع شکل آن نیم درجه عرض و نیم درجه طول جغرافیایی است، این شبکه به شیوه‌ای طراحی شد تا استان‌های غرب و شمال غربی ایران را پوشش دهد، سپس شبکه مذکور زمین مرجع شد و با نرم‌افزار Map Source به گیرنده GPS (Global PositioningSystem) انتقال داده شد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱: نقشه پراکنش جغرافیایی نمونه‌های به‌دست آمده از گوسفند اهلی



شکل ۲: نقشه پراکنش جغرافیایی نمونه‌های به‌دست آمده از قوچ و میش ارمنی

تهیه بافت گوسفند اهلی: نمونه‌برداری از گوسفندان اهلی بومی مناطق با عملیات صحرایی آغاز شد، سعی بر آن بود تا در هریک از سلول‌های شبکه طراحی شده دو راس گوسفند نمونه‌برداری شود تا حداقل نمونه بافت یک راس برای پشتیبان نگه‌داری شود. با استفاده از گیرنده GPS به سلول‌های شبکه طراحی شده (شکل ۱) وارد و سپس با جلب رضایت دامداران محلی نمونه‌برداری از گوسفندان اهلی انجام شد. در هر گله به‌صورت تصادفی یک راس گوسفند انتخاب و نمونه بافت طبق پرتکل برداشته شد، بدین‌صورت که بعد از استریل کردن وسایل نمونه‌برداری توسط حرارت شعله حیوان مورد نظر مهار گردید و قطعه از بافت حاشیه گوش توسط کلیپر برش داده شد و در داخل تیوب ۲۰ میلی‌لیتری حاوی الکل ۹۶ درصد به مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شد. سپس الکل نمونه تخلیه و با سیلیکاژل جایگزین گردید و تا زمان استخراج DNA در دمای اتاق نگه‌داری شد. بدین‌صورت از ۲۰ راس گوسفند اهلی از مناطق تحت مطالعه با روش مذکور نمونه‌برداری شد (شکل ۱ و جدول ۱).

تهیه بافت گوسفند وحشی: نظر به این‌که نمونه‌برداری بافت از قوچ و میش‌های ارمنی که عمدتاً در مناطق چهارگانه سازمان حفاظت محیط‌زیست پراکنش دارند به شیوه گوسفندهای اهلی میسر نیست، رایزنی با سازمان مذکور و ادارات کل محیط‌زیست استان‌ها و ادارات محیط‌زیست شهرستان‌هایی که مناطق چهارگانه آن‌ها در سلول‌های شبکه طراحی شده قرار دارند انجام پذیرفت (شکل ۲، جدول ۲). تعدادی از نمونه‌های بافت از لاشه‌های موجود در ادارات محیط‌زیست که به‌دلیل تلفات جاده‌ای یا تخلفات شکار به‌دست آمده بود و مختصات جغرافیایی نمونه‌ها مشخص بود تهیه گردید. در مواردی هم نمونه بافت در آرشیو نگه‌داری شده بود که با هماهنگی لازم قسمتی از بافت تثبت شده در الکل در دسترس محققین این پژوهش قرار گرفت.

استخراج DNA: استخراج DNA ژنومیک از تمامی نمونه‌ها توسط کیت استخراج Macherey-Nagel Nucleo Spin و طبق روش‌نامه شرکت سازنده آن[1] به‌شرح زیر انجام شد. ابتدا مقدار ۲۵ میلی‌گرم از نمونه‌های بافت توسط توزین جداسازی شد. در ابتدا مرحله پریلیزیز[2] برای هموژنیزه کردن نمونه‌ها با ۱۸۰ میلی‌لیتر بافر TA انجام شد و ۲۵ میکرولیتر پروتئیناز K به نمونه اضافه شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد در هم‌زن حرارتی قرار گرفتند.

[1] Fisher Scientific CO., Ireland
[2] Pre-lysis

جدول ۱: اطلاعات جغرافیایی نمونه‌های گوسفند اهلی ایران (*Ovis aries*)

گوسفند اهلی			
نام منطقه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	کد نمونه
ایلبلاغی	39.044641	44.928195	IROA-B2-5037
ماکو	39.045764	44.929098	IROA-B2-5296
خوری	38.656644	44.93919	IROA-B3-5134
سلماس	38.153121	44.838767	IROA-B4-5190
ارومیه	37.972674	44.952849	IROA-B5-5295
نقده	37.20805	44.876609	IROA-B6-5139
قره زایدین	38.859108	45.060779	IROA-C3-5212
اشنویه	37.179836	45.206082	IROA-C6-5187
نقده	36.728501	45.243618	IROA-C7-5042
ۀذرشهر	37.824031	45.964613	IROA-D5-5081
عجب شیر	37.470274	45.877259	IROA-D6-5152
نقده	36.985121	45.590704	IROA-D7-5033
آسکو	37.925057	46.088053	IROA-E5-5157
مراکان	37.222959	46.075427	IROA-E6-5351
میاندواب	36.952482	46.252342	IROA-E7-5036
سنندج	35.063245	46.887269	IROA-F10-5068
اهر	38.52272	46.85095	IROA-F3-5142
بستان آباد	37.913972	46.613354	IROA-F5-5051
اهر	38.534631	47.164379	IROA-G3-5095
مشکین شهر	38.3934	47.430937	IROA-G4-5205

جدول ۲: اطلاعات جغرافیایی نمونه‌های قوچ و میش ارمنی (*Ovis orientalis*)

وحشی				
محل	نام منطقه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	نمونه
مراکان	مرند	38.931678	45.385152	IROO-C3-0001
کبودان	ارومیه	37.481	45.628	IROO-D6-0002
کبودان	ارومیه	37.485	45.653	IROO-D6-0005
کیامکی	تبریز	38.769	46.147	IROO-E3-5492
سهند	تبریز	37.746767	46.393425	IROO-E5-5146
همدان	همدان	34.704635	48.862971	IROO-J11-0602
همدان	همدان	34.643225	48.621857	IROO-J11-0905
باشگل	قزوین	36.721474	49.32136	IROO-K7-0642
موته	گلپایگان	33.697	50.804	IROO-N13-5061
باشگل	قزوین	36.96578	49.33161	IROO-K7-2301
باشگل	قزوین	36.61114	49.11678	IROO-K7-2303
بشگل	قزوین	36.72	49.3215	IROO-K7-0639
خمین	اراک	34.178	50.344	IROO-M12-9997

به‌منظور تنظیم شرایط باند شدن نمونه‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بافر BQ1 اضافه شد و نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت حرارت داده شدند و ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد متعاقباً اضافه گردید. سه مرحله شستشو به‌ترتیب توسط بافرهای BW و B5 انجام شد و به‌منظور جداسازی ذرات معلق نمونه‌ها در شرایط خلا منهای ۲/۵ بار به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. قبل از شستشوی DNA ژنومیک غشای سیلیکایی پلیت‌ها در شرایط خلا منهای ۰/۶ بار به‌مدت ۱۰ دقیقه خشک شدند. مرحله شستشو توسط ۱۰۰ میکرولیتر بافر BE که از قبل در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد گرم شده بود صورت پذیرفت و سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۳۷۰۰ rpm برای ۵ دقیقه انجام شد. DNA ژنومیک برای جلوگیری از آسیب‌های ناشی از ذوب شدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد و غلظت آن بر حسب نانوگرم بر لیتر توسط روش پیکوگرین[1] و با استفاده از نانودراپ[2] تعیین شد.

[1] Picogreen
[2] Nanodrop

ژنوتیپ کردن توسط BeadChip Ovine SNP 50K: بخشی از DNA ژنومیک استخراج شده برای ژنوتایپینگ توسط چیپ‌های[1] ۵۰ کیلو SNP به آزمایشگاه لودی[2] ایتالیا انتقال داده شد. در آزمایشگاه ژنوتیپ DNA توسط ربات و با نظارت اپراتور انسانی انجام شد و در نهایت SNPهای حاصل در قالب فایل‌های خروجی ped و map آماده سازی شدند. کنترل کیفی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenABEL که یک کتابخانه برای آنالیز داده‌های وسیع ژنومی در نرم‌افزار R است انجام شد (۱۸) و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و هم‌چنین ضریب درون‌آمیزی توسط نرم‌افزار PLINK محاسبه شد (۱۹).

توالی‌یابی: توالی‌یابی ژنوم کامل توسط ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک که توسط دستگاه کواریس[3] E210 به قطعات ۱۵۰ الی ۷۰۰ bp برش داده شده و براساس پروتکل نیمه اتوماتیک برای کتابخانه ایلومینا[4] آماده شده بودند انجام شد. ترمیم انتهای قطعات، دنباله‌گذاری و اتصال آداپتورهای سازگار ایلومینا توسط دستگاه SPRI TE و سیستم آماده‌سازی کتابخانه‌ای SPRIWorks مطابق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت.

شناسایی واریانت‌ها: شناسایی وارینت‌ها با استفاده از سه الگوریتم متفاوت Samtools mpileup، GATK Unified Genotype و Freebayes انجام گرفت (۲۰). جایگاه وارینت‌ها شناسایی شده در دو مرحله فیلتر کیفی شدند. در مرحله اول خوانش همه الگوریتم‌ها باهم تلفیق شد و خوانش‌های با حدود اطمینان پایین حذف شدند. جایگاه وارینت‌هایی که حداقل توسط دو الگوریتم خوانده شدند و کیفیت خوانش بالای ۳۰ را داشتند پذیرفته شدند. آلل‌های آلترناتیو به شرطی که توسط یکی از الگوریتم‌ها خوانده شده باشند و شمارش ژنوتیپ آن‌ها از صفر بیش‌تر باشد مورد قبول قرار گرفتند.

شناسایی ساختار ژنتیکی: به‌منظور شناسایی تنوع ژنتیکی از ابزار VCF برای محاسبه تغییرات ژنتیکی استفاده شد (۲۰) پارامترهای محاسبه شده شامل تعداد کل واریانت‌های پلی‌مورف هر گروه (S)، متوسط تنوع نوکلئوتیدی (π) برای هر گروه و ضریب درون آمیزی برای هر فرد می‌باشد.

ژنتیک load: ژنتیک لود که نشان‌دهنده کاهش برازش افراد جمعیت نسبت به برازش جمعیت ایده‌آل است توسط محاسبه ژنتیک لود هر فرد به‌عنوان مجموع تاثیرات برازشی منفی در قسمت‌هایی از ژنوم که کدکننده پروتئین هستند براساس روش Librado و همکاران محاسبه شد (۲۱).

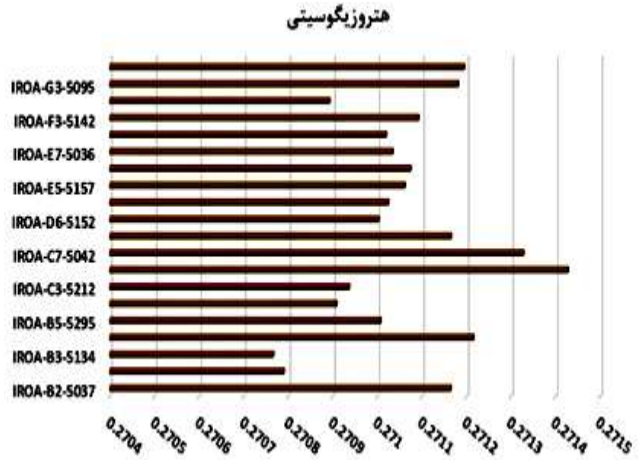
[1] Chip
[2] Lodi Laboratory
[3] Covaris
[4] Illumina® library

نتایج

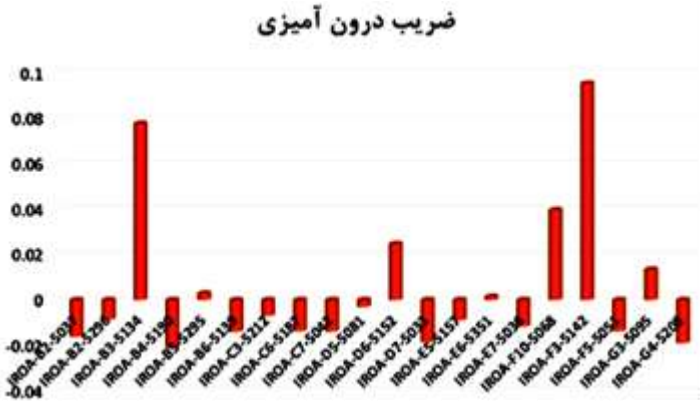
تنوع ژنتیکی ژنوم کامل: براساس نتایج این مطالعه در جنس *Ovis* قوچ و میش‌های وحشی ایران (*Ovis orientalis*) با داشتن ۲۴/۹ میلیون SNP چندریختی با اختلاف از گروه دیگر مورد مطالعه یعنی گوسفندهای اهلی ایران (*Ovis aries*)، که ۲۰ میلیون SNP چندریختی به ثبت رساندند، در رده بالاتر قرار دارد (جدول ۳).

تنوع ژنتیکی داده‌های چیپ BeadChip Ovine SNP 50K:

نتایج محاسبه هتروزیگوسیتی مورد انتظار (Het=Expected heterozygosity) یا همان تنوع ژنی (Gene diversity) و هم‌چنین ضریب درون‌آمیزی افراد (F) به‌عنوان پارامترهای متداول محاسبه تنوع ژنتیکی براساس داده‌های به‌دست آمده از چیپ‌های OvineSNP50k برای قوچ و میش‌های وحشی و گوسفندهای اهلی بومی ایران در جدول ۵ و نتایج مقایسه میانگین گروه‌های اهلی و وحشی برای پارامترهای مذکور در جدول ۴ نشان داده شده است (شکل‌های ۳ الی ۶).



شکل ۳: هتروزیگوسیتی مورد انتظار افراد اهلی محاسبه شده توسط داده‌های چیپ



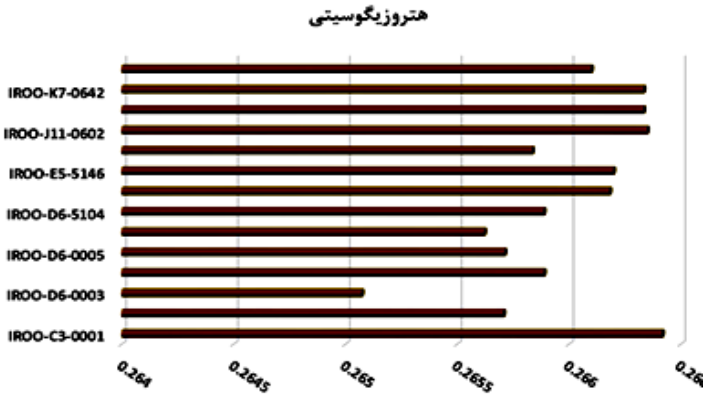
شکل ۴: ضریب درون آمیزی افراد اهلی محاسبه شده توسط داده‌های چیپ

جدول ۳: اندازه نمونه، تعداد SNPهای تفکیک‌کننده (S)، میانگین تنوع نوکلئوتیدی (x10-3)(∏)، میانگین ضریب درون‌آمیزی (Mean F) و میانگین ژنتیک لود ((Mean load (X10-4) برای گروه‌های مورد مطالعه جنس *Ovis* در کل ژنوم

Ovis					
گروه	تعداد نمونه	S	Π (x10-3)	Mean F	Mean load (X10-4)
IROO	13	24,928,891	2.68	0.083	8.1
IROA	20	20,659,837	2.15	0.128	8.4

جدول۴: نتایج مقایسه میانگین تنوع ژنی و ضریب درون‌آمیزی گروه‌های اهلی و وحشی داده‌های چیپ توسط آزمون من ویتنی

	اهلی	وحشی	من ویتنی	گروه غالب	اختلاف معنی‌دار
میانگین مشاهده شده	0.27106486	0.265975806	0	اهلی	✔
ضریب درون آمیزی(F)	0.004306	0.172976429	0	وحشی	✔



شکل ۵: هتروزیگوسیتی مورد انتظار افراد وحشی محاسبه شده توسط داده‌های چیپ

بحث

با توجه به یافته‌های تنوع نوکلئوتیدی برای کل‌ژنوم (جدول ۳)، انتظار می‌رفت یافته‌های حاصل از چیپ ۵۰ کیلو باز نیز نشان‌دهنده هتروزیگوسیتی مورد انتظار بالاتر در قوچ و میش‌های وحشی نسبت به گوسفندهای‌اهلی ایرانی باشد،اما برخلاف انتظارچنان‌که‌در جدول ۵وشکل‌های ۱ و ۳ مشاهده می‌کنید سطح هتروزیگوسیتی گوسفندان اهلی به‌صورت معنی‌داری (p-value= 0.0) در حیوانات اهلی بیش‌تر از وحشی‌ها می‌باشد (جدول ۴). ضریب درون‌آمیزی نیز در روندی مشابه در قوچ و میش‌های وحشی بالاتر از گوسفندان اهلی ایران است(جدول ۵ و شکل‌های ۲ و ۴) مقایسه آماری‌ضریب درون‌آمیزی توسط آزمون من ویتنی این اختلاف را معنی‌دار توصیف می‌کند (p-value= 0.00) (جدول ۴). بالاتر بودن ضریب درون‌آمیزی در میان افرادوحشی مورد مطالعه نسبت به گوسفندهای اهلی ایران هم‌چنین بیش‌تر بودن هتروزیگوسیتی اهلی‌های ایران نسبت به قوچ و میش وحشی ایران نتایجی است‌که در مقابل یافته‌های ما براساس‌داده‌های کل ژنوم است. در واقع تنوع ژنتیکی براساس داده‌های ژنوم کامل در افراد وحشی بیش‌تر است و براساس داده‌های چیپ OvineSNP50k افراد اهلی برتری دارند (جدول ۴) به‌نظر می‌رسد نتایج به‌دست آمده از چیپ‌ها که براساس ۵۰ کیلو SNP شاخص گونه گوسفند اهلی به‌دست آمده دارای خطای ثابت[1]ناشی از طراحی چیپ است. در واقع چیپ‌های میکروآرای DNA براساس ژنوم تعدادی از گوسفندهای اهلی طراحی و ساخته می‌شود.SNPهای چندریختی افراد مورد مطالعه برای ساخت چیپ در نقاط مختلف ژنوم که کنترل کیفی را پاس کرده‌اند، به‌عنوان SNPهای تاثیرگذار روی چیپ‌ها قرار می‌گیرند. بنابراین DNAهای افراد بعدی که توسط چیپ‌ها ژنوتیپ می‌شوند با این SNPها مقایسه می‌شود. در این مطالعه به‌منظور مقایسه تنوع ژنتیکی افرادوحشی‌و اهلی، DNA هردوگونه مذکور توسط چیپ‌های طراحی شده برای گوسفند اهلی ژنوتیپ شده است زیرا طراحی چیپ برای قوچ و میش‌های وحشی مقرون به صرفه نیست و نیاز به اطلاعات ژنوم بیش از ۱۰۰۰ راس قوچ و میش وحشی دارد که از دیدگاه‌حفاظتی میسر نیست. نتایج به‌دست‌آمده برای ۵۰ هزار SNP چیپ در تقابل با نتایج ۲۲ میلیون SNP مستخرج از ژنوم کامل جنس *Ovis* بودکه دلیل آن بررسی تنوع در نقاطی از ژنوم است که روی چیپ‌ها طراحی شده در واقع در نواحی ژنوتایپ شده توسط چیپ‌ها تنوع اهلی‌ها بیش‌تر است و در کل ژنوم تنوع گروه وحشی غالبیت دارد و هر دو مجموعه داده حائز اهمیت است.

بالاترین تنوع مشاهده شده در گروه وحشی‌های مورد مطالعه مربوط به فرد IROO-M12-9997 از منطقه حفاظت‌شده‌موته گلپایگان بود (شکل ۳، جدول ۵) که با اندازه جمعیت بزرگ جمعیت قوچ و میش‌های این منطقه مطابقت داشت هم‌چنین افراد IROO-C3-0001 و IROO-K7-2303 به‌ترتیب از مناطق حفاظت شده مراکان

[1] Ascertainment

آذربایجان‌غربی و باشگل قزوین بیش‌ترین تنوع را به خود اختصاص داده‌اند که دقیقاً با نتایج ضریب درون‌آمیزی هم‌خوانی دارد و این افراد کم‌ترین میزان ضریب درون‌آمیزی را به ثبت رسانده‌اند (شکل‌های ۳ و ۴، جدول ۵). با توجه به ارزش ملی و بین‌المللی تنوع زیستی این گونه ارتقای مناطق مذکور به پارک ملی به‌عنوان بالاترین سطح حفاظتی سازمانی حفاظت محیط‌زیست می‌تواند گام مهمی در راستای حفاظت از ذخائر ژنتیکی قوچ و میش ارمنی به‌عنوان تمامی نژادهای اهلی دنیا باشد.

نوسانات تنوع ژنتیکی مشاهده شده در گوسفندهای وحشی و اهلی مورد مطالعه موضوع چالش برانگیزی است و از دیدگاه حفاظتی باید مورد توجه قرار بگیرد. از سویی گوسفند اهلی به‌عنوان منبع لبنیات و پروتئین نقش بسیار تعیین‌کننده‌ای در اقتصاد کشاورزی ایران دارد و نقش حیاتی در معیشت دامداران و اقشار روستایی کشور بازی می‌کند، از سوی دیگر قوچ و میش‌های وحشی ایران که در فهرست سرخ اتحادیه جهانی حفاظت از طبیعت[1] آسیب‌پذیر شناخته شده‌اند، به‌عنوان نیاکان گوسفندان اهلی آسیب‌های جدی از شکار غیرقانونی و تخریب زیستگاه متحمل شده‌اند.

سازه‌های انسان ساخت اعم از جاده‌ها، گسترش مراکز شهری و روستایی به‌عنوان موانع فیزیکی جمعیت‌های قوچ و میش ارمنی را منزوی کرده‌اند چنان‌که در نتایج مطالعه نمایان است درون‌آمیزی فرد IROO-J11-0602 از استان همدان بالاترین میزان را بین افراد وحشی مورد مطالعه دارد که به جهت منزوی شدن جمعیت و عدم و مهاجرت بین این جمعیت و جمعیت‌های مجاور است. در چنین شرایطی رخداد وقایع زیان‌بار ژنتیکی مانند افزایش درون‌آمیزی و رانش ژنتیکی اجتناب‌ناپذیر است و پیش‌بینی می‌شود که وقوع این فرآیندها، جمعیت‌ها را به سمت انقراض سوق خواهند داد، چرا که جمعیت‌های کوچک و زیستگاه‌های چند پارچه قادر به حفظ جمعیت‌های زیستا در بلندمدت نیستند (۲۲). امروزه تخریب و چندپارچگی زیستگاه‌ها روند رو به افزایشی دارد و یکی از نکات مهم در زیست‌شناسی حفاظت است، اما هنوز بسیاری از اثرات این چندپارچه شدن نامشخص است. یکی از مهم‌ترین نتایج چندپارچگی زیستگاه‌ها و جمعیت‌ها، از دست دادن تنوع ژنتیکی است که خطر انقراض جمعیت‌ها را از افزایش می‌دهد (۲۳).

قوچ و میش ارمنی که سازمان حفاظت محیط زیست آن را گونه حفاظت شده اعلام کرده در اکثر زیستگاه‌های فعال که عمدتاً به مناطق حفاظت‌شده و پارک‌های ملی محدود می‌شوند با تهدیداتی مانند شکار غیرمجاز، اندازه کوچک جمعیت و چندپارچگی[2] دست به گریبانند. از این‌رو طراحی استراتژی‌های حفاظتی در جهت حفاظت و حمایت از قوچ و میش‌های وحشی ایران به‌عنوان ذخایر ژنتیکی[3] آسیب‌پذیر برای گوسفندان اهلی سراسر دنیا باید در اولویت قرار بگیرد. هم‌چنین گوسفندهای اهلی ایران تنوع ژنتیکی قابل توجهی نسبت سایر نژادهای اهلی دنیا دارند (۲۴) و حفظ ذخایر ژنتیکی آن‌ها نیازمند برنامه‌های مدیریتی از سوی جهاد کشاورزی در راستای جلوگیری از اختلاط با نژادهای خارجی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاران اروپایی پروژه Nextgen برای مشارکت در تولید بخشی از داده‌ها صمیمانه تشکر می‌شود.

منابع

1. **Karami, P. and Shayesteh, K., 2018.** Investigation of ecological niche of Wild sheep (*Ovis oriantalis*) in protected areas of Lashgardar-Golparbad, Alvand-Chalkhatoon-Rasvand and Polangab. Journal of Animal Environmental. 10(4): 65-74. (In Persian)
2. **Rezaei, H.R.; Naderi, S.; Chintauan-Marquier, I.C.; Taberlet, P.; Virk, A.T.; Naghash, H.R.; Rioux, D.; Kaboli, M. and Pompanon, F., 2010.** Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae). Molecular phylogenetics and evolution. 54(2): 315-326.
3. **Peters, J.; von den Dreisch, A. and Helmer, D. 2005.** The upper Euphrates -Tigris basin: cradle of agro -pastoralism? The first steps of animal domestication: new archaeozoological techniques. 96-124.
4. **Rezaei, H., 2007.** Phylogénie moléculaire du Genre *Ovis* (Mouton et Mouflons), Implications pour la Conservation du Genre et pour l'Origine de l'Espèce Domestique (Doctoral dissertation).
5. **Zeder, M.A., 2008.** Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. Proceedings of the national Academy of Sciences. 105(33): 11597-11604.
6. **IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2018.** The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-2.
7. **Ashrafzadeh, M.R.; Naghipour, A.A.; Haidarian, M. and Mirzaei, R., 2020.** Modeling the effects of climate change on the geographic distribution of the wild sheep in Lorestan Province, Iran. Journal of Animal Environmental. 12(3): 59-68. (In Persian)
8. **Karami, M.; Ghadirian, T. and Faizolahi, K., 2016.** The atlas of the mammals of Iran. Iran Department of the Environment. Tehran, Iran. (In Persian)
9. **Valentini, A.; Pompanon, F. and Taberlet, P., 2009.** DNA

[1] IUCN

[2] Fragmentation

[3] Genetic resources

barcoding for ecologists. Trends in ecology & evolution. 24(2): 110-117.

10. **Asadi Aghbolaghi, M.; Ahmadzadeh, Kiabi, B. and Keyghobadi, N., 2020.** Variability of the Mitochondrial Genome (d-Loop) in Red squirrel, Japanese squirrel and Persian squirrel. Journal of animal Research. 33(1): 43-54. (In Persian)
11. **Avise, J.C., 1995.** Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. Conservation Biology. 7: 45-67.
12. **Linda, K.P. and Paul, M., 1995.** Developments in molecular genetic techniques in fisheries. In: Carvalho, G.R. and Pitcher, T.J., Eds., Molecular Genetics in Fisheries. Chapman and hall, London. 1-28.
13. **Wolf, A.B.; Caselli, R.J.; Reiman, E.M. and Valla, J., 2013.** APOE and neuroenergetics: an emerging paradigm in Alzheimer's disease. Neurobiology of aging. 34(4): 1007-1017.
14. **Nachman, M.W., 2001.** Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans. TRENDS in Genetics. 17(9): 481-485.
15. **Naderi, S.; Rezaei, H.R.; Taberlet, P.; Zundel, S.; Rafat, S.A.; Naghash, H.R.; El-Barody, M.A.; Ertugrul, O.; Pompanon, F. and Econogene Consortium., 2007.** Large scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. PLoS One. 2(10): e1012.
16. **Morin, P.A.; Luikart, G. and Wayne, R.K., 2004.** SNPs in ecology, evolution and conservation. Trends in ecology & evolution. 19(4): 208-216.
17. **Jehle, R. and Arntzen, J.W., 2002.** Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. Herpetological journal. 12: 1-9.
18. **Aulchenko, Y.S.; Ripke, S.; Isaacs, A. and Van Duijn, C.M., 2007.** GenABEL: An R library for genome-wide association analysis. Bioinformatics. 23(10): 1294-1296.
19. **Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; De Bakker, P.I.; Daly, M.J. and Sham, P.C., 2007.** PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. The American journal of human genetics. 81(3): 559-575.
20. **Danecek, P.; Auton, A.; Abecasis, G.; Albers, C.A.; Banks, E.; DePristo, M.A.; Handsaker, R.E.; Lunter, G.; Marth, G.T.; Sherry, S.T. and McVean, G., 2011.** The variant call format and VCFtools. Bioinformatics. 27(15): 2156-2158.
21. **Librado, P.; Gamba, C.; Gaunitz, C.; Der Sarkissian, C.; Pruvost, M.; Albrechtsen, A.; Fages, A.; Khan, N.; Schubert, M.; Jagannathan, V. and Serres-Armero, A., 2017.** Ancient genomic changes associated with domestication of the horse. Science. 356(6336): 442-445.
22. **Bertorelle, G.; Bruford, M.W.; Hauffe, H.C.; Rizzoli, A. and Vernesi, C., 2009.** Population genetics for animal conservation. Cambridge university press.
23. **Freeland, J.R., 2020.** Molecular ecology. John Wiley & Sons.
24. **Pichler, R.; Hussain, T.; Xu, W.; Aftab, A.; Babar, M.E.; Thiruvenkadan, A.K.; Ramasamy, S.; Teneva, A.; Sebastino, K.; Sanou, M. and Traore, A., 2017.** Short tandem repeat (STR) based genetic diversity and relationship of domestic sheep breeds with primitive wild Punjab Urial sheep (*Ovis vignei punjabiensis*). Small ruminant research. 148: 11-21.