ارزیابی ژنتیکی جمعیت بنیان‌گذار گوسفند وحشی (*Ovis orientalis*) در مرکز تکثیر چادگان

- **نعیم کاوه‌پیش‌قدم**: دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، کدپستی: ۸٤۱٥٦۸۳۱۱۱
- **منصوره ملکیان***: دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، کدپستی: ۸٤۱٥٦۸۳۱۱۱
- **رویا آداودی**: گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: ٤۱۱۱

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹٥ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹٥

چکیده

تکثیر در اسارت که باهدف افزایش جمعیت گونه‌ها و رهاسازی مجدد آن‌ها در زیستگاه‌های طبیعی صورت می‌گیرد، نقش مهمی در حفاظت از گونه‌ها داشته و انجام مطالعات ژنتیکی از ملزومات آن محسوب می‌شود. در این پژوهش تنوع ژنتیکی و جایگاه رده‌بندی جمعیت گوسفند وحشی در سایت تکثیر چادگان با استفاده از تکثیر قطعه‌ای به طول ٦۸۸ جفت باز از ژن سیتوکروم b ارزیابی شد. نتایج نشان داد که گوسفند وحشی در منطقه چادگان در کلاد *O. vignei* قرارگرفته و به‌عنوان زیرگونه *O. vignei laristanica* از زیرگونه‌های *O. vignei kermanansis* تفکیک شد. در مطالعه حاضر ۳ هاپلوتایپ جدید به ٦۷ هاپلوتایپ مطالعات گذشته اضافه گردید که تنوع ژنتیکی نسبتاً مناسبی را در جمعیت موردمطالعه نشان داد. میزان واگرایی ژنتیکی درون و بین‌گونه‌ای قوچ و میش کلادهای *O.vignei*، *O. orientalis* و *O. canadensis* از کلاد *O. ammon* با توجه به تعداد کم نمونه در این مطالعه با روشK2P محاسبه گردید. بر این اساس حداقل و حداکثر فاصله ژنتیکی درون گونه *O. vignei* ۰/۰۱۳ تا ۰/۰۱٥ به‌دست آمد درحالی‌که فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای *O. vignei* با *O. canadensis* ۰/۰۸٦ تا ۰/۰۸۸ و *O. vignei* با *O. orientalis* ۰/۰۲۱ تا ۰/۰۲٤ برآورد گردید. حداقل فاصله ژنتیکی بین زیرگونه‌های *O. canadensis* و *O. orientalis* و حداکثر آن بین زیرگونه‌های *O. vignei* مشاهده شد. نتایج این مطالعه می‌تواند در انتقال افراد بین جمعیت‌ها و رهاسازی افراد از سایت‌های تکثیر به زیستگاه‌های طبیعی مورداستفاده قرار گیرد تا تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گوسفند وحشی در کشور حفظ شود.

کلمات کلیدی: تکثیر در اسارت، تنوع ژنتیکی، جایگاه فیلوژنی، سیتوکروم b، گوسفند وحشی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mmalekian@cc.iut.ac.ir

مقدمه

تخریب و چندپارگی زیستگاه و شکار بی‌رویه از عوامل اصلی انقراض بسیاری از گونه‌ها در زیستگاه‌های طبیعی محسوب می‌شود (Andrabi و Maxwell، ۲۰۰۷). افزایش فعالیت‌های انسانی در طبیعت و درنتیجه آن روند رو به کاهش جمعیت گونه‌های وحشی، اهمیت برنامه‌های حفاظت در خارج از زیستگاه اصلی (Ex-situ) را دوچندان نموده است (Cseh و Solti، ۲۰۰۰).

حفاظت در خارج از زیستگاه اصلی، نظیر تکثیر در اسارت ازجمله تمهیداتی است که اتحادیه جهانی حفاظت (IUCN) به‌عنوان آخرین راه‌حل برای جلوگیری از انقراض نسل گونه‌های حیات‌وحش پیشنهاد می‌کند که باهدف افزایش جمعیت گونه‌ها و رهاسازی مجدد آن‌ها در طبیعت صورت می‌گیرد (Frankham و همکاران، ۲۰۱۰). برنامه‌های تکثیر در اسارت با مشکلات متعددی روبه‌رو هستند حصول موفقیت در برنامه‌های تکثیر در اسارت به مسائل ژنتیکی مانند افزایش فشار درون آمیزی و برون آمیزی (Marshal و Spalton، ۲۰۰۰)، کاهش تنوع ژنتیکی (Witzenberger و Hochkirch، ۲۰۱۱) و تطبیق با شرایط اسارت (Williams و Hoffman، ۲۰۰۹) بستگی دارد. با توجه به هزینه و امکانات موردنیاز در این‌گونه طرح‌ها و احتمال عدم توفیق به‌دلیل مسائل ژنتیکی نظیر درون آمیزی، انجام مطالعات ژنتیکی از ملزومات برنامه‌های تکثیر در اسارت محسوب می‌شود.

شناخت جایگاه رده‌بندی و فیلوژنی گونه‌های تکثیرشده در اسارت نقش به‌سزایی در برنامه‌ریزی و موفقیت برنامه‌های تکثیر در اسارت دارد و میزان تنوع ژنتیکی و نوع ارتباط افراد درون یک جمعیت می‌تواند اطلاعات با ارزشی را در خصوص نگه‌داری و تکثیر در اسارت برای گونه‌های در معرض خطر انقراض فراهم آورد (O'Brien، ۲۰۰۶). در ایران طرح‌های متعدد تکثیر در اسارت برای احیاء جمعیت حیات وحش کشور انجام شده است. گونه‌هایی نظیر آهو (*Gazella subgutturosa*)، جبیر (*Gazella bennetti*)، گورخر (*Equus hemionus*)، گوزن زرد ایرانی (*Dama dama*) و گوسفند وحشی (*Ovis orientalis*) در مناطق مختلف در اسارت تکثیرشده است. عدم انجام مطالعات ژنتیک مولدها و تعداد کم افراد مولد سبب عدم موفقیت بسیاری از این برنامه‌ها شده است (پهلوانی، ۱۳۸۳).

گوسفند وحشی یکی از گونه‌هایی است که پراکنش وسیعی در نیم‌کره شمالی از شامل قاره آمریکا و کانادا تا مناطق وسیعی از آسیا و قسمت‌هایی از قاره اروپا دارد. جنس *Ovis* یکی از پیچیده‌ترین جنس‌ها در رده پستانداران است و مطالعات صورت گرفته گوسفندهای وحشی جهان را براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مانند اندازه بدن، شکل شاخ و رنگ بدن و تعداد کروموزوم‌ها بین یک تا هفت گونه تقسیم‌بندی شده‌اند (Bunch و همکاران، ۲۰۰۶؛ Nadler و همکاران، ۱۹۷۳). آخرین رده‌بندی که با استفاده از ژنوم میتوکندری انجام گرفت، نشان داد که در ایران دو گونه گوسفند وحشی، اوریال (*O. orientalis vignei*) و ارمنی (*O. ammon gemelini*) وجود دارد و گوسفندهای وحشی که در مطالعات قبلی به‌عنوان زیرگونه در نظر گرفته‌شده بودند در رده‌بندی جدید در دو گونه متفاوت گوسفند وحشی اوریال و ارمنی قرار گرفتند.

دی ان ای میتوکندریایی (mtDNA) به‌عنوان یک نشانگر مولکولی در تشخیص گونه‌ها و ترسیم روابط فیلوژنتیک دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی ازجمله وجود نسخه‌های زیاد میتوکندری در هر سلول، وراثت مادری آن و تغییرپذیری زیاد در توالی‌های آن است، که mtDNA را به ابزاری قدرتمند برای شناسایی گونه‌ها و مطالعات جمعیت تبدیل کرده است. هم‌چنین سرعت بالای تکامل ژن‌های mtDNA در مقایسه با DNA هسته‌ای، باعث شده است که از آن برای مطالعات تکاملی استفاده شود (Rastogi و همکاران، ۲۰۰۷). یکی از ژن‌های میتوکندریایی که در بسیاری از مطالعات برای بررسی روابط فیلوژنتیک در پستانداران مورداستفاده قرارگرفته و اطلاعات توالی از گونه‌های مختلف پستاندار نظیر آهو ایرانی (Fadakar و همکاران، ۲۰۱۳)، آهو کوهی (Wronski و همکاران، ۲۰۱۰)، گوسفند وحشی (Rezaeie و همکاران، ۲۰۱۰)، انتلوپ ها (Lorenzen و همکاران، ۲۰۱۰) و سم داران آفریقایی (Silva و همکاران، ۲۰۱۴) در دسترس است. نتایج به‌دست آمده از بسیاری از مطالعات منجر به طبقه‌بندی جدید گونه‌ها شده که روابط فیلوژنتیک میان گونه‌های موردمطالعه را بهتر نشان می‌دهد.

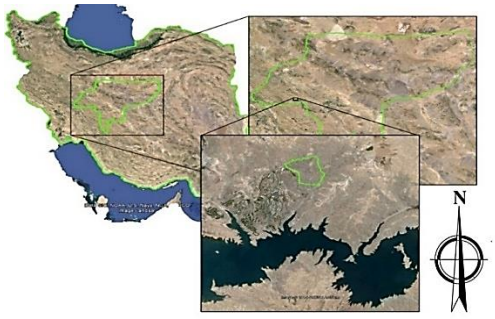
قوچ و میش‌های ایران جز آن دسته از گونه‌هایی هستند که با توجه به هیبرید بین آن‌ها نیاز به مطالعات ژنتیکی و مولکولی فراوان دارند. Zhao و همکاران (۲۰۱۱) خواستگاه و ارتباط فیلوژنی سه نژاد گوسفند وحشی را مورد بررسی قرارداد. توالی‌یابی ژنوم میتوکندری در این مطالعه نشان داد گوسفند وحشی از تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی بالایی برخوردارند. Zachary و همکاران (۲۰۱۲) مدیریت ژنتیکی را در برنامه معرفی مجدد گوسفند وحشی شاخ بزرگ (*O. canadensis*) به محیط مورد ارزیابی قراردادند. تحلیل‌ها موفقیت هیبریدهای حاصل از مدیریت ژنتیکی را نسبت به دورگه‌های حاصل از درون آمیزی نشان داد. از تجزیه‌وتحلیل توالی ژن سیتوکروم b در گونه‌های مختلف گوسفند وحشی نظیر گوسفند برفی (*Ovis nivicola*)، و موفلون (*Ovis orientalis ophion*) (Barbanera و همکاران، ۲۰۱۲؛ Bunch و همکاران، ۲۰۰۶) استفاده‌شده است. یوسفی‌سیاه‌کلرودی و همکاران (۱۳۸۹) برای بررسی تنوع نوکلئوتیدی جمعیت‌های گوسفند وحشی منطقه تنگ صیاد و کرایی خوزستان، حسینی و

همکاران (۱۳۹۳؛ ۱۳۹۴) برای بررسی فیلوجغرافی گوسفندهای وحشی استان یزد و منطقه حفاظت‌شده بوروئیه از ژن سیتوکروم b استفاده کردند.

سایت تکثیر در چادگان در سال ۱۳۸۹ با پنج رأس گوسفند وحشی آغاز به فعالیت کرده است. از آن‌جایی‌که تعداد افراد بنیان‌گذار در این سایت بسیار محدود است و هم‌چنین منشأ افراد مولد مشخص نمی‌باشد، لذا احتمال عدم موفقیت در این طرح به‌دلیل بروز مسائل ژنتیکی مانند درون آمیزی و یا کاهش تنوع ژنتیکی وجود دارد، بدین منظور در این مطالعه جایگاه رده‌بندی، وضعیت تبارشناسی و میزان تنوع ژنتیکی جمعیت بنیان‌گذار گوسفند وحشی در سایت چادگان بررسی شد.

مواد و روش‌ها

منطقه موردمطالعه: منطقه موردمطالعه در ۱۲۰ کیلومتری غرب اصفهان در حوزه شهرستان چادگان، در عرض جغرافیایی ۵۰ درجه و ۳۹ دقیقه و ۵۷ ثانیه و طول جغرافیایی ۴۲ درجه و ۴۵ دقیق و ۱۵ ثانیه قرار دارد (شکل ۱). این سایت با مساحت ۵ هکتار در سال ۱۳۸۹ با تعداد پنج رأس گوسفند وحشی به تفکیک جنسی یک نر بالغ، سه ماده بالغ و یک رأس ماده نابالغ شروع به فعالیت کرد. هویت افراد اولیه دقیقاً مشخص نیست ولی به‌نظر می‌رسد که از یک سایت محصور در حاشیه پارک ملی بمو انتخاب و به سایت چادگان آورده شده‌اند. در حال حاضر جمعیت مذکور شامل ۸ نر و ۷ ماده می‌باشد. زیستگاه ازلحاظ شکل زمین تپه‌ماهوری است و پوشش گیاهی غالب آن‌گونه گون می‌باشد.



شکل ۱: تصویر هوایی محدوده سایت تکثیر در چادگان

نمونه‌گیری و استخراج DNA: نمونه‌برداری از بافت جفت در بازه زمانی زایمان حیوانات در اردیبهشت ماه ۱۳۹۳ انجام شد. شش نمونه بافت از جفت حیوانات پس از زایمان جمع‌آوری و درون ظروف حاوی یخ به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل شد. از آن‌جاکه کیفیت DNA استخراجی در مطالعات ژنتیکی اهمیت به‌سزایی دارد، لذا در این مطالعه برای استخراج DNA از کیت استخراج (AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit) ساخت شرکت BIO NEER استفاده گردید. فرآیند PCR با استفاده از کیت PCR و یک جفت آغازگر CYTB_F (۵'-CCCCACAAAACCTATCACAAA-3') و CYTB_R (۵'-CCTGTTTCGTGGAGGAAGAG-3')استفاده شد (Rezaei و همکاران، ۲۰۱۰) و قطعه‌ای به طول ۶۸۸ جفت باز از ژن سیتوکروم b تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر 1X PCR Buffer complete، ۱ میکرولیتر DNTP، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۵ میکرولیتر Taq-polymerase، ۱ میکرولیتر DNA که با اضافه کردن ۱۸ میکرو لیتر آب مقطر به حجم رسید، انجام شد. دما و زمان چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل ۱۰ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه حرارتی (واسرشته سازی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و ۱۰ دقیقه بسط نهایی آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. به‌منظور اطمینان از تکثیر ناحیه موردنظر، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. درنهایت محصول PCR به‌روش اتوماتیک توالی‌یابی گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به‌منظور بررسی و اصلاح خطاهای موجود در توالی‌های دریافت شده از نرم‌افزار SeqScape ۲/۶ استفاده گردید و هم‌چنین هم‌ردیف شدن توالی‌های موجود با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ۷,۲,۵ الگوریتم Clustalw صورت گرفت (Thompson و همکاران، ۱۹۹۴). علاوه بر نمونه‌هایی که در این تحقیق جمع‌آوری و تعیین توالی شد، ۱۳۸ توالی CYTB از جمعیت‌های گوسفند وحشی مناطق مختلف کشور از سایت NCBI دانلود و در تجزیه‌وتحلیل جایگاه رده‌بندی و فیلوژنی گوسفند وحشی منطقه چادگان مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تعیین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، فراوانی بازهای مختلف و تعیین میزان جانشینی‌های نوع اول و دوم از نرم‌افزار MEGA ۵,۳ و با ۱۰۰۰۰ تکرار استفاده گردید (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱). تعداد هاپلوتایپ‌ها و جایگاه‌های چندشکلی با استفاده از نرم‌افزار DNAsp ۵,۱۰ صورت گرفت (Librado و Rozas، ۲۰۰۹). برای تعیین تعداد شاخص تنوع ژنتیکی (تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی) در جمعیت‌ها و آزمونه‌ای خنثی‌سازی نرم‌افزار Arlequin ۳,۵ مورد استفاده گرفت (Excoffier و Schneider، ۱۹۹۹). هم‌چنین تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از این نرم‌افزار و با ۱۰۰۰۰

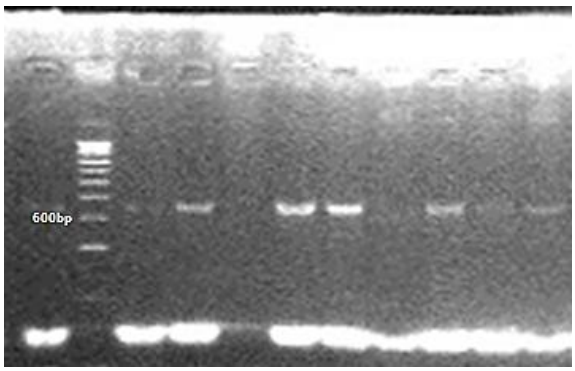
تکرار انجام گرفت. برای تعیین بهترین مدل جانشینی نوکلئوتیدی از نرم‌افزار JModelTest ۲,۱,۵ استفاده گردید (Darriba و همکاران، ۲۰۱۲). سپس با توجه به مدل انتخاب گشته از نرم‌افزار Phylm ۳,۱ برای ترسیم درخت حداکثر درست نمایی (Maximum Likelihood) (Guidon و Gascuel، ۲۰۰۳) و از نرم‌افزار MrBayes ۳,۲,۲ برای ترسیم درخت بیزین استفاده گردید (Huelsenbeck و Ronquist، ۲۰۰۱). تحلیل‌های بیزین با ۱۰ میلیون تکرار و فراوانی نمونه ۱۰۰ براساس چرخه زنجیره مارکوو انجام گرفت. درخت‌های بیزین و حداکثر درست نمایی به‌وسیله برون گروه *Capra aegagrus* ریشه‌دار شدند در آخر درخت‌های ترسیم‌شده به‌وسیله قانون اکثریت (Majority rule) یک‌پارچه گردیدند. برای بررسی ارتباط بین هاپلوتایپ‌ها و ترسیم شبکه هاپلوتایپی با استفاده از منطق اتصال میانه و نرم‌افزار Network۴,۶,۱,۳ انجام گرفت (Bandlet و همکاران، ۱۹۹۹).

نتایج

توالی ژن سیتوکروم b برای ۶ نمونه گوسفند وحشی سایت چادگان به طول ۶۸۸ جفت باز (bp) به‌دست آمد (شکل ۲). ترکیب نوکلئوتیدی توالی‌های به‌دست آمده در نرم‌افزار Mega نتایج نشان داد که در مجموع از ۶۸۸ جفت نوکلئوتیدی موردبررسی، ۵۶۵ جایگاه حفاظت‌شده و ۱۲۳ جایگاه چند شکل (۹۰ جایگاه حاوی اطلاعات پارسیمونی و ۳۳ جایگاه تک متغیر) هستند. فراوانی هر کدام از نوکلئوتیدها برآورد گردید که آدنین (۳۱/۲ درصد) و گوانین (۱۱/۹ درصد) به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی نوکلئوتیدها تشکیل دادند. میزان جانشینی نوع اول (جانشینی بازهای پورین A-G با یکدیگر و جانشینی بازهای پیریمیدن C-T با یکدیگر) و جانشینی نوع دوم (جانشینی بازهای پورین و پیریمیدن با یکدیگر) بررسی شد که جانشینی‌های نوع اول به مراتب بالاتر از جانشینی‌های نوع دوم به دست آمد هم‌چنین میزان جانشینی نوکلئوتید T با C بیش‌تر از سایر جانشینی‌های نوع اول مشاهده گردید.

بررسی تنوع هاپلوتایپی گوسفند وحشی در منطقه لارستان نشان داد که در بین پنج نمونه بررسی شده ۳ هاپلوتایپ شناسایی شد که نشان از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا در جمعیت مطالعه شده می‌باشد. هم‌چنین نتایج تنوع ژنتیکی گوسفند وحشی براساس ۶۸۸ جفت نوکلئوتید ژن Cytb نشان داد که ۷۰ هاپلوتایپ در بین ۱۳۸ توالی مورد بررسی وجود دارد که در مطالعه حاضر ۳ هاپلوتایپ جدید به ۶۷ هاپلوتایپ مطالعات گذشته اضافه گردید.

لازم به ذکر است که از ۳ هاپلوتایپ شناسایی‌شده یک هاپلوتایپ در بین جمعیت‌های *O. orientalis laristanica* و *O. vignei kermanansis* مشترک بوده است. بیش‌ترین تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی در جمعیت‌های *O. orientalis gemelini* و *O. orientalis isphahanica* به‌دست آمد و کم‌ترین مقدار آن در جمعیت‌های *O. vignei kermanansis* و *O. vignei laristanica* مشاهده گردید. تحلیل‌های گسترش جمعیت (range expansion) براساس جمعیت‌های هر زیرگونه صورت گرفت، که در این میان جمعیت‌های زیرگونه‌های *O. vignei kermanansis* و *O.vignei laristanica* براساس آماره Fu's Fs مقدار منفی و معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۱).



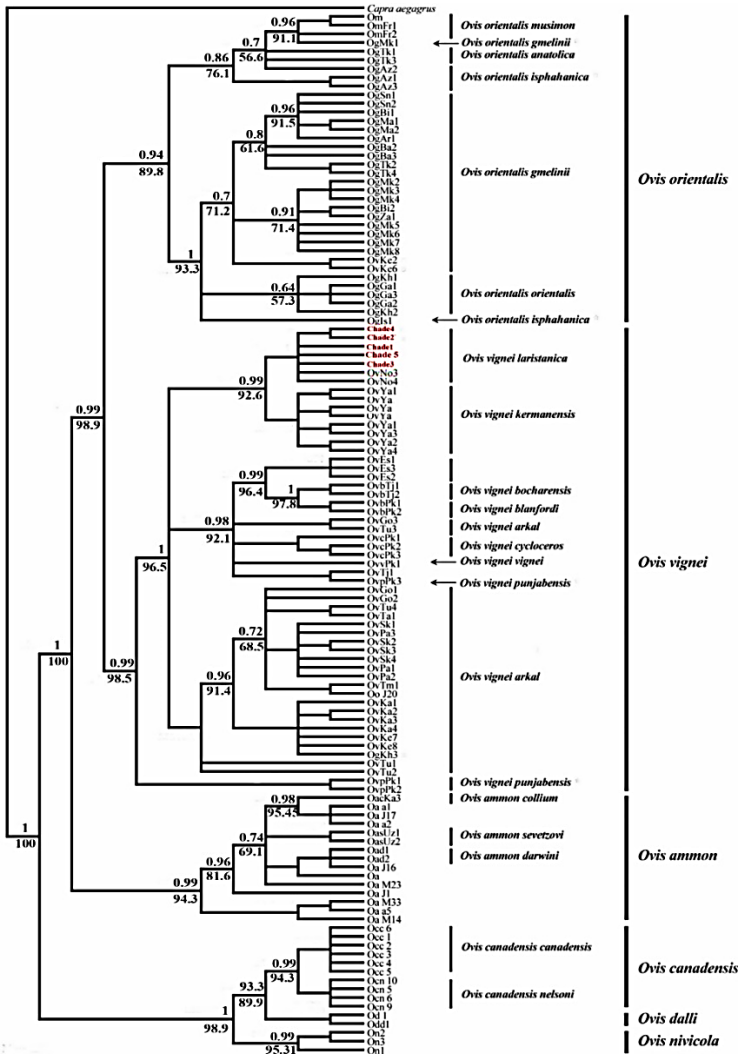
شکل ۲: الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر به طول قطعه ۶۸۸ جفت باز روی ژل آگاروز ۲ درصد

آزمون معیارهای اطلاعات بیزین (BIC) و اطلاعات آکایکه (AIC) نشان داد که مدل HKY+G (G=۰/۶۹۲) به‌عنوان بهترین مدل تکاملی نوکلئوتیدی برای توالی‌های مورد نظر شناسایی شد. نتایج حاصل از تحلیل روش‌های حداکثر درست‌نمایی و بیزین، درخت تبار شناختی یکسانی را نشان دادند، اما تحلیل بیزین نسبت به روش حداکثر درست نمایی با احتمال بالایی جدایی بین جمعیت‌ها را نشان داد (شکل ۲). نتایج درخت تبارشناسی با بوت استرپ و احتمال پسین بالایی، جدایی شش کلاد گوسفند وحشی را براساس ۶۸۸ جفت باز ژن Cytb نشان می‌دهد که به‌طورکلی براساس نمونه‌های ثبت‌شده در بانک ژن گوسفند وحشی ایران به دو کلاد *O.vignei* و *O. orientalis* تقسیم‌بندی می‌شوند که با احتمال پسین ۰/۹۹ و بوت استرپ ۹۸/۹ درصدی از یکدیگر تفکیک‌شده‌اند. بر مبنای این تقسیم‌بندی گوسفند وحشی سایت تکثیر در چادگان در کلاد *O. vignei* قرار می‌گیرند و به‌عنوان زیرگونه‌های *O. vignei laristanica* بااحتمال پسین و بوت استرپ‌های بالایی از زیرگونه‌های *O. vignei kermanansis* تفکیک شده است (شکل ۳). نتایج تحلیل شبکه هاپلوتایپی نشان داد که ۷۰ هاپلوتایپ بررسی‌شده در این مطالعه در سه هاپلوگروپ جداگانه قرار می‌گیرند که دو گروه از این هاپلوگروپ‌ها مربوط به دو گونه گوسفند وحشی

ایران می‌باشند که سه هاپلوتایپ به‌دست آمده از تحلیل نمونه‌های مرکز تکثیر چادگان در هاپلوگروپ گوسفند وحشی اوریال قرار می‌گیرند. هم‌چنین هاپلوگروپ *O. canadensis* از آمریکای شمالی با ۴۸ تا ۶۳ جهش از هاپلوگروپ‌های ایران *O. vignei* و *O. orientalis* جدا شده است.

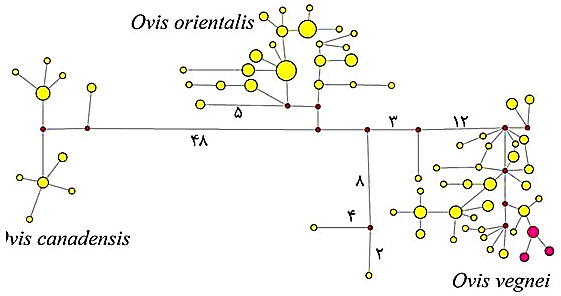
جدول ۱: ویژگی‌های ژنتیکی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از هر جمعیت و آزمونه‌ای تحلیل گسترش جمعیت‌های گونه (Tajima's D و Fu' Fs)

جمعیت	تعداد نمونه	تعداد هاپلوتایپ	تعداد چندریختی	تنوع هاپلوتایپی (h)	تنوع نوکلئوتیدی (p)	Tajima's D	Fu' Fs
O.orientalis gemelinii	۳۲	۱۲	۱۲	۰/۵۰±۰/۱۷۷	۰/۰۱۹۳۶±۰/۰۰۴۶۷	۰/۳۴	۱/۰۲
O.orientalis isphanica	۱۷	۱۲	۱۳	۰/۸۲۵±۰/۰۲۲	۰/۰۱۶۹۱±۰/۰۰۳۱۳	۰/۴۶	۱/۴۶
O.vignei arkali	۱۷	۸	۹	۰/۸۳۳±۰/۲۲۲	۰/۰۱۱۲۹±۰/۰۰۴۲۳	-۰/۳۵	-۱/۵
O.vignei kermanansis	۱۱	۳	۳	۰/۲۳۳±۰/۲۲۲	۰/۰۱۴۵۵±۰/۰۰۴۰۹	-۱/۳۵	-۲/۲۵*
O.vignei laristanica	۸	۳	۴	۰/۲۵۰±۰/۲۶۵	۰/۰۰۴۵۳±۰/۰۰۲۲	-۱/۲۵	-۲/۶۵*
O.canadensis canadensis	۸	۴	۶	۰/۵۰۰±۰/۲۶۵	۰/۰۰۴۵۳±۰/۰۰۲۲	-۰/۲۰	-۱/۳۰
O.canadensis nelson	۸	۵	۵	۰/۶۱۰±۰/۲۶۵	۰/۰۰۴۵۳±۰/۰۰۲۲	۰/۴۰	-۰/۶۵



شکل ۳: درخت تبارشناسی گوسفند وحشی با استفاده از دو روش بیزین و حداکثر درست‌نمایی (توپولوژی یکسان)

شبکه‌هاپلوتایپی گوسفند وحشی با استفاده از منطق اتصال میانه ترسیم‌شد(شکل ۴).اعداد بالای شاخه‌ها نمایانگر احتمال پسین حاصل از درخت بیزین و اعداد پایین شاخه مربوط به شاخص بوت استرپ حاصل از روش حداکثر درست‌نمایی است. گوسفندهای وحشی سایت تکثیر در چادگان که با کلادهای Clade۱ تا Clade۲ نشان داده شده‌اند به‌عنوان زیرگونه لارستان در کلاد *O. vignei* قرار گرفتند.



ERROR! NO TEXT OF SPECIFIED STYLE IN شکل .۴DOCUMENT: شبکه هاپلوتایپی گوسفند وحشی با استفاده از منطق اتصال میانه

اعداد نمایانگر تعداد جهش رخ‌داده در بین هاپلوتایپ‌ها است. هاپلوتایپ‌های قرمز رنگ (تیره) نشان‌دهنده نمونه‌های توالی‌یابی‌شده از سایت تکثیر در چادگان است.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که اگر همه جمعیت‌ها یک گروه در نظر گرفته شود، ۹۰/۰۸ درصد از تغییرات ساختار ژنتیکی در بین جمعیت مختلف و تغییرات ژنتیکی درون جمعیت‌ها ۹/۹۲ درصد است (جدول ۲). در این مطالعه با توجه به تعداد کم نمونه از کلاد *O. ammon* میزان واگرایی ژنتیکی درون و بین‌گونه‌ای گوسفند وحشی کلادهای*O. vignei*، *O. orientalis* و *O. canadensis* با روشK2P محاسبه گردید (جدول ۳). بر این اساس حداقل و حداکثر فاصله ژنتیکی درون گونه *O. vignei* ۰/۰۱۳ تا ۰/۰۱۵ به‌دست آمد درحالی‌که فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای *O. vignei* با *O. canadensis* ۰/۰۸۶ تا ۰/۰۸۸ و *O. vignei* با *O. orientalis* ۰/۰۲۱ تا ۰/۰۲۴ برآورد گردید. هم‌چنین لازم به‌ذکر است که‌به‌ترتیب کم‌ترین فاصله‌ژنتیکی درون‌گونه‌ای در بین زیرگونه‌های*O. canadensis* و *O. orientalis* مشاهده گردید در صورتی‌که بیش‌ترین مقدار آن در زیرگونه‌های *O. vignei* به‌دست آمد.

جدول ۲: تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در بین جمعیت‌های گوسفند وحشی

منابع تغییر	d.f.	مجموع مربعات	درصد واریانس	آماره F
بین جمعیت‌ها	۳	۱۵۹/۷۰	۹۵/۰۸	FST=۰/۹۵
درون جمعیت‌ها	۱۵	۸/۶۲	۴/۹۲	
کل	۱۸	۱۶۸/۳۲		

جدول ۳: واگرایی ژنتیکی گوسفند وحشی براساس ژن سیتوکروم b

گونه	زیرگونه	تعداد	فاصله ژنتیکی					
O. vignei	*Laristanica*	۸						
	Kermanansis	۱۱	۰/۰۱۳					
	Arkal	۱۷	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵				
O. canadensis	*Canadensis*	۸	۰/۰۸۷	۰/۰۸۶	۰/۰۸۳			
	Nelson	۸	۰/۰۸۷	۰/۰۸۷	۰/۰۸۴	۰/۰۰۸		
O. orientalis	*Gemelinii*	۳۲	۰/۰۲۴	۰/۰۲۲	۰/۰۲۶	۰/۰۷۷	۰/۰۷۸	
	Isphahanica	۱۷	۰/۰۲۴	۰/۰۲۱	۰/۰۲۴	۰/۰۷۶	۰/۰۷۸	۰/۰۰۷

بحث

در این مطالعه جایگاه فیلوژنی گوسفند وحشی در مرکز تفرجی و تکثیر در چادگان با توالی یابی ۶۸۸ جفت باز از ژنcytochrome b میتوکندری بررسی شد. این ژن در این مطالعه نیز مانند مطالعات قبلی در ترسیم روابط فیلوژنتیک گوسفند وحشی کارآمد بود. نتایج این مطالعه نشان داد که تنوع ژنی نسبتاً بالایی در جمعیت گوسفند وحشی در این منطقه دیده می‌شود به‌نحوی که در شش نمونه بررسی شده، سه هاپلوتایپ جدید مشاهده شد. بنابراین با وجود این که تعداد افراد بنیان‌گذار در این سایت بسیار محدود است، تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی دارد. Zhao و همکاران (۲۰۱۱) نیز در مطالعه روابط فیلوژنی نژادهای گوسفندوحشی‌بااستفاده از ژنوم میتوکندری، تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی بالایی‌راگزارش نمودند.Zacharyو همکاران(۲۰۱۲) نیز تنوع مطلوبی را در برنامه تکثیر و معرفی مجدد گوسفند

وحشی شاخ بزرگ (*O. canadensis*) نشان دادند و آن را لازمه موفقیت برنامه‌های مدیریت ژنتیکی دانستند چراکه درون آمیزی کم-تری را به دنبال خواهد داشت. این در حالی است که برخی از جمعیت‌های گوسفند وحشی در کشور از تنوع بالایی برخوردار نبوده و نیازمند رهاسازی افزایشی می‌باشند. به‌عنوان مثال در بین ۴۱ نمونه گوسفند وحشی از دو منطقه تنگ صیاد در چهارمحال بختیاری و کرابی خوزستان تنها یک هاپلوتایپ مشاهده شد (یوسفی‌سیاه‌کلرودی و همکاران، ۱۳۸۹).

بررسی ژنتیکی جمعیت گوسفندوحشی در پناهگاه حیات وحش بوروئیه استان یزد نیز هیچ‌گونه تنوع هاپلوتایپی را نشان نداد (حسینی وهمکاران،۱۳۹۴)، اگرچه‌در تحلیل ژنتیکی قوچ و میش‌های استان یزد تعداد ۹ هاپلوتیپ در بین ۳۰ نمونه توالی‌یابی شده مشاهده شد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۳). بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین قوچ و میش‌های منطقه بوروئیه با دیگر جمعیت‌های این استان مشاهده شد که به‌دلیل انزوای جمعیت قوچ و میش منطقه بوروئیه و عدم تبادل ژنتیکی با جمعیت‌های شمال و مرکز این استان از تنوع کمی برخوردار است.

نتایج ترسیم درخت فیلوژنی نشان داد که جمعیت‌های کوسفند وحشی در ایران در دو گونه گوسفند وحشی، اوریال (*O. orientalis vignei*) و ارمنی (*O. ammon gemelini*) قرار دارند که مطالعات قبلی نظیر Rezaei و همکاران (۲۰۱۰) نیز موئد این مطلب است. جمعیت گوسفند وحشی در سایت تکثیر چادگان در کلاد *O. vignei* قرار می‌گیرد و به‌عنوان زیرگونه‌های *O. vignei laristanica* با احتمال پسین و بوت استرپ‌های بالایی از زیرگونه‌های *O. vignei kermanansis* تفکیک شد. تنوع هاپلوتایپی محاسبه‌شده در گوسفند وحشی منطقه مورد مطالعه (۰/۱۶±۰/۸) نشان از بالا بودن تنوع هاپلوتایپی جمعیت بررسی شده در مقایسه با زیرگونه‌های *O. orientalis gemelini*، *O. vignei kemanansis* و کم‌تر بودن تنوع در مقایسه با *O. vignei arkali* و *O. orientalis isphanica* می‌باشد. اما تنوع نوکلئوتیدی محاسبه شده (۰/۰۰۰۶±۰/۰۰۳) در مقایسه با سایر زیرگونه‌های بررسی شده در این مطالعه کم‌تر بود. هم‌چنین پایین بودن تنوع نوکلئوتیدی نشان از پایین بودن سطح تفاوت نوکلئوتیدی بین توالی‌های به‌دست آمده در جمعیت گوسفند وحشی لارستان می‌باشد. این امر نشان از احتمال وقوع گلوگاه (bottleneck) در یک جمعیت است که سبب می‌شود هاپلوتایپ‌های جدید در یک جمعیت با تفاوت‌های نوکلئوتیدی پایین ایجاد شود. بالا بودن تنوع هاپلوتایپی و پایین بودن تنوع نوکلئوتیدی نیز گواهی بر وقوع پدیده گسترش سریع جمعیت در زیرگونه گوسفند وحشی لارستان است. هم‌چنین تحلیل توزیع عدم تطابق (Mismatch distribution) نشان داد که فراوانی تفاوت‌های نوکلئوتیدی مشاهده‌شده بین توالی‌ها در حالت فرضی گسترش سریع جمعیت بیش‌تر از فراوانی مورد انتظار نبوده که این موضوع نیز نشان از وقوع گسترش ناگهانی جمعیت در این زیرگونه می‌باشد(SSD=۰/۰۵;P>۰/۰۵).هم‌چنین میزان شاخص Rajjedness برابر با ۰/۲ محاسبه شد که تأییدکننده نتایج به‌دست آمده از تحلیل‌های گسترش سریع جمعیت در گوسفند وحشی لارستان می‌باشد. در شبکه هاپلوتایپی دو گونه گوسفند وحشی ارمنی و اوریال به خوبی از یکدیگر جداشده‌اند. نمونه‌های سایت چادگان در کلاد اوریال قرارگرفته است. فاصله ژنتیکی بین دو کلاد اوریال و ارمنی به خوبی در شبکه هاپلوتایپی و درخت تبارشناسی قابل‌مشاهده است که بیانگر فاصله ژنتیکی بین این دو گونه در ایران است اما در برخی نقاط از ایران هنوز این واگرایی به اندازه‌ای نیست که این دو گونه کاملاً از یکدیگر جدا شوند و نواحی هیبرید بین دو گونه وجود دارد.

از آن‌جاکه جمعیت گوسفند وحشی در سایت چادگان منزوی می‌باشد، لذا اجرای اقدامات مدیریتی در خصوص حفظ تنوع ژنتیکی جمعیت ضروری به‌نظر می‌رسد. یکی از مهم‌ترین تهدیدات در این خصوص، درون آمیزی بین افراد و درنتیجه کاهش تنوع ژنتیکی می‌باشد.یکی از راه‌های بهبود فشار درون آمیزی، آمیزش جمعیت‌های درون آمیز با سایر جمعیت‌ها و افزایش اندازه جمعیت است. جمعیت بنیان‌گذار باید متشکل از افرادی باشد که از جمعیت‌های متفاوتی جمع‌آوری شده‌اند ولی به یک زیرگونه متعلق باشند، بنابراین به‌طور کلی پیشنهاد می‌شود برای شروع یک پروژه تکثیر در اسارت از تعداد افراد با ژنوتیپ‌های متفاوت استفاده شود. در اغلب موارد جمعیت بنیان‌گذار به‌دلیل مشکل در جمع‌آوری نمونه‌ها و یا عدم دسترسی به نمونه‌های بیش‌تر با تعداد افراد محدودی آغاز به‌کار می‌کنند. برای جلوگیری از گلوگاه جمعیتی توصیه می‌شود که حداقل ۲۰-۳۰ مولد مورداستفاده‌قرارگیرد(Leberg و Firmin، ۲۰۰۸). معرفی مجدد افراد به جمعیت بنیان‌گذار جهت افزایش تنوع ژنتیکی موجود نیز می‌تواند به‌عنوان یک راهکار در نظر گرفته شود اما لازم است که افراد قبل از رهاسازی در جمعیت از لحاظ تبار ژنتیکی مورد بررسی قرار گیرند.

منابع

۱. **پهلوانی، ع.، ۱۳۸۳**. مطالعه تکثیر در اسارت جبیر در پناهگاه حیات‌وحش شیراحمد سبزوار. مجله محیط‌شناسی. دوره ۳۰، شماره ۳۶، صفحات ۵۱ تا ۵۶.

۲. **حسینی، س.م.؛ رضایی، ح.ر.؛ وارسته‌مرادی، ح.؛ نادری، س. و نیکویی، ف.، ۱۳۹۳**.بررسی فیلوژئوگرافی جمعیت قوچ ومیش‌های استان یزد براساس داده‌های ژنوم میتوکندری. فصلنامه محیط‌زیست جانوری. دوره ۶، شماره ۳، صفحات ۱۶۹ تا ۱۷۷.

۳. **حسینی، س.م.؛ رضایی، ح.ر.؛ وارسته‌مرادی، ح.؛ نادری، س. و نیکویی، ف.، ۱۳۹۴**. تجزیه‌وتحلیل تنوع و جایگاه ژنتیکی قوچ و میش‌های پناهگاه حیات‌وحش بوروئیه با کمک ژن سیتوکروم ب. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. دوره ۷، شماره ۳، صفحات ۸۹ تا ۱۰۴.

۴. **یوسفی‌سیاه‌کلرودی، س.؛ خدرزاده، ص. و منتظمی، ش.، ۱۳۸۹**. بررسی تنوع نوکلئوتیدی موجود در جمعیت‌های قوچ و میش دو منطقه حفاظت‌شده تنگ صیاد و کرایی خوزستان با استفاده از توالی‌یابی ناحیه D-loop و ژن Cyt-b میتوکندری. محیط‌زیست جانوری. سال ۲، شماره ۴، صفحات ۲۵ تا ۳۰.

۵. **Andrabi, S.M.H. and Maxwell, W.M.C., 2007.** A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species Animal. Reproduction. Science. Vol. 99, pp: 223-243.

۶. **Bandelt, H.J.; Forster, P. and Röhl, A., 1999**. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molocular Biology and Evolution. Vol. 16, No. 1, pp: 37-48.

۷. **Barbanera, F.; Guerrini, M.; Beccani, C.; Forcina, G.; Anayiotos, P. and Panayides, P., 2012**. Conservation of endemic and threatened wildlife: Molecular forensic DNA against poaching of the Cypriot mouflon (*Ovis orientalis ophion*, Bovidae). Forensic Science International Genetics. Vol. 6, No. 5, pp: 671-67٥.

۸. **Bunch, T.D.; Wu, C.; Zhang, Y.P. and Wang, S., 2006**. Phylogenetic analysis of snow sheep (*Ovis nivicola*) and closely related taxa. Journal of Heredity. Vol 97, pp: 21-30.

۹. **Cseh, S. and Solti, L., 2000**. Importance of assisted reproductive technologies in the conservation of wild, rare or indigenous ungulates: review article. Acta Vet Hung. Vol. 48, No. 3, pp: 313-3٢٣.

۱۰. **Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R. and Posada, D., 2012**. j ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Natural Methods. Vol. 9, No. 8, pp: 772.

۱۱. **Excoffier, L. and Schneider, S., 1999**. Why hunter-gatherer populations do not show signs of Pleistocene demographic expansions. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 96, pp: 10597-10602.

۱۲. **Fadakar, D.; Rezaei, H.R.; Naseri, M.; Mirzakhah, M.; Naderi, S. and Zamani, W., 2013**. Phylogenetic analysis of Persian Gazella, *Gazella subgutturosa* (Artiodactyla: Bovidae) based on cytochrome b in central Iran. Molecular Biology Research Communications. Vol. 2, No. 4, pp: 151-159.

۱۳. **Frankham, R.; Ballou, J.D. and Briscoe, D.A., 2010**. Introduction to Conservation Genetics,2nd ed. University Press, Cambridge. 603 p.

۱۴. **Guindon, S. and Gascuel, O., 2003**. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology. Vol. ٥٢, No. ٥, pp: 696-704.

۱۵. **Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F., 2001**. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics. Vol. 17, No. 8, pp: 754-7٥٥.

۱۶. **Leberg, P.L. and Firmin, B.D., 2008.** Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restoration programmes. Molecular Ecology. Vol. 17, pp: 334-343.

۱۷. **Librado, P. and Rozas, J., 2009.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. Vol 25, pp: 1451-1452.

۱۸. **Lorenzen, E.D.; Masembe, C.; Arctander, P. and Siegismund, H.R., 2010**. A long-standing Pleistocene refugium in southern Africa and a mosaic of refugia in East Africa: insights from mtDNA and the common eland antelope. Journal of Biogeography. Vol. 37, pp: 571-581.

۱۹. **Marshall, T.C. and Spalton, J.A., 2000**. Simultaneous inbreeding and outbreeding depression in reintroduced Arabian oryx. Animal Conservation. Vol. 3, pp: ٢٤١-٢٤٨.

۲۰. **Nadler, C.F.; Hoffmann, R.S. and Woolf, A., 1973**. G-band patterns as chromosomal markers, and the interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (*Ovis*). Experientia. Vol. 29, pp: 117-119.

۲۱. **O'Brien, S.J., 2006**. Animal conservation genetics an overview with relevance to captive breeding programs. EAZA News. Vol. 57, pp: 26-35.

۲۲. **Rastogi, G.; Dharne, M.S.; Walujkar, S.; Kumar, A.; Patole, M.S. and Shouche, Y.S. 2007**. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. Meat science. Vol. ٧٦, No. 4, pp: 666-674.

۲۳. **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. Vol. 54, No. 2, pp: 315-326.

۲۴. **Silva, T. L.; Godinho, R.; Castro, D.; Abaigar, T.; Brito, J.C. and Alves, P.C., 2014**. Genetic identification of endangered North African ungulates using noninvasive sampling. Molecular Ecology Resources. Vol. 15, pp: 652-661.

۲۵. **Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S., 2011**. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. Vol 28, pp: 2731-2739.

۲۶. **Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994**. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic acids research. Vol 22, pp**:** 4673-4680.

۲۷. **Williams, S.E. and Hoffman, E.A., 2009**. Minimizing genetic adaptation in captive breeding programs: A review. Biolgical conservation. Vol. 142, pp: 2388-2400.

۲۸. **Wronski, T.; Wacher, T.; Hammond, R.L.; Winney, B.; Hundertmark, K.J.; Blacket, M.J.; Mohammed, O.M.; Flores, B.; Omer, S.A.; Macasero, W.; Plath, M.; Tiedemann, R. and Bleidorn, C., 2010**. Two reciprocally monophyletic mtDNA lineages elucidate the taxonomic status of Mountain gazelles (*Gazella gazella*) Systematics and Biodiversity. Vol. 8, pp: 119-129

۲۹. **Zachary, H.; Olson, D.G.; Olin, E. and Rhodes, J. 2012.** Evaluation of experimental genetic management in reintroduced bighorn sheep. Ecology and Evolution. Vol. 2, No. 2, pp: 429-443.

۳۰. **Zhao, Y.; Zhao, E.; Zhang, N. and Duan, C., 2011**. Mitochondrial DNA diversity origin and phylogenic relationships of three Chinese large-fat-tailed sheep breeds.Tropical Animal Health and Production. Vol. 43, No. 7, pp: 1405-1410.