

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

- **نعیم کاوه‌پیش‌قدم:** دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، کدپستی: 8415683111
- **منصوره ملکیان*:** دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، کدپستی: 8415683111
- **رویا آدادوی:** گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: 4111

تاریخ پذیرش: آبان 1395

تاریخ دریافت: مرداد 1395

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 688 جفت باز از ژن سیتوکروم b ارزیابی شد. نتایج نشان داد که گوسفند وحشی در منطقه چادگان در کلا *O. vignei* قرار گرفته و به‌عنوان زیرگونه *O. vignei laristanica* از زیرگونه‌های *O. vignei kermanensis* تفکیک شد. در مطالعه حاضر 3 هاپلوتایپ جدید به 67 هاپلوتایپ مطالعات گذشته اضافه گردید که تنوع ژنتیکی نسبتاً مناسبی را در جمعیت مورد مطالعه نشان داد. میزان واگرایی ژنتیکی درون و بین‌گونه‌ای قوچ و میش کلاهای *O. vignei*، *O. orientalis* و *O. canadensis* از کلا *O. ammon* با توجه به تعداد کم نمونه در این مطالعه با روش K2P محاسبه گردید. بر این اساس حداقل و حداکثر فاصله ژنتیکی درون گونه *O. vignei* 0/013 تا 0/015 به‌دست آمد درحالی‌که فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای *O. vignei* با *O. canadensis* 0/086 تا 0/088 و *O. vignei* با *O. orientalis* 0/021 تا 0/024 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 مورد استفاده 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

مقدمه

اسارت به مسائل ژنتیکی مانند افزایش فشار درون آمیزی و برون آمیزی (Spalton و Marshal، 2000)، کاهش تنوع ژنتیکی (Hochkirch و Witzemberger، 2011) و تطبیق با شرایط اسارت (Hoffman و Williams، 2009) بستگی دارد. با توجه به هزینه و امکانات مورد نیاز 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 تکثیر شده 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 نگاه‌داری و تکثیر در اسارت برای گونه‌های در معرض خطر انقراض فراهم آورد (O'Brien، 2006). 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

تخریب و چندپارگی زیستگاه و شکار بی‌رویه از عوامل اصلی انقراض بسیاری از گونه‌ها در زیستگاه‌های طبیعی محسوب می‌شود (Maxwell و Andrabi، 2007). افزایش فعالیت‌های انسانی در طبیعت و در نتیجه آن روند رو به کاهش جمعیت گونه‌های وحشی، اهمیت برنامه‌های حفاظت در خارج از زیستگاه اصلی (Ex-situ) را دوچندان نموده است (Solti و Cseh، 2000).

حفاظت در خارج از زیستگاه اصلی، نظیر تکثیر در اسارت از جمله 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، 2010). برنامه‌های تکثیر در اسارت با مشکلات متعددی روبه‌رو هستند حصول موفقیت در برنامه‌های تکثیر در

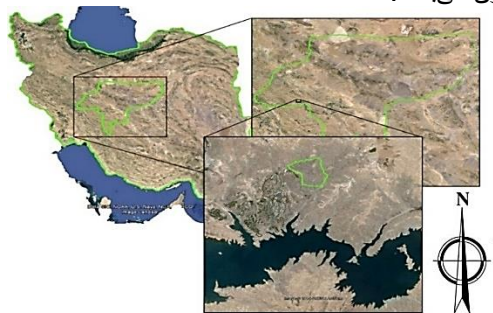


استفاده شده است. یوسفی‌سیاه‌کلودی و همکاران (1389) برای بررسی تنوع نوکلئوتیدی جمعیت‌های گوسفند وحشی منطقه تنگ صباد و کرایه خوزستان، حسینی و همکاران (1393؛ 1394) برای بررسی فیلوجغرافی گوسفند‌های وحشی استان یزد و منطقه حفاظت‌شده برونیه از ژن سیتوکروم b استفاده کردند.

سایت تکثیر در چادگان در سال 1389 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 به دلیل 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 مورد مطالعه: منطقه مورد مطالعه در 120 کیلومتری غرب اصفهان در حوزه شهرستان چادگان، در عرض جغرافیایی 50 درجه و 39 دقیقه و 57 ثانیه و طول جغرافیایی 42 درجه و 45 دقیقه و 15 ثانیه قرار دارد (شکل 1). این سایت با مساحت 5 هکتار در سال 1389 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 به نظر می‌رسد که از یک سایت محصور در حاشیه پارک ملی بمو انتخاب و به سایت چادگان آورده شده‌اند. در حال حاضر جمعیت مذکور شامل 8 نر و 7 ماده می‌باشد. زیستگاه از لحاظ شکل زمین تیمه‌ماهوری است و پوشش گیاهی غالب آن گونه گون می‌باشد.



شکل 1: تصویر هوایی محدوده سایت تکثیر در چادگان

نمونه‌گیری و استخراج DNA: نمونه‌برداری از بافت جفت در بازه زمانی زایمان حیوانات در اردیبهشت ماه 1393 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 آغازگر و یک جفت CYTB_F (5'-CCCCACAAAACCTATCACAAA-3')

ایرانی (*Dama dama*) و گوسفند وحشی (*Ovis orientalis*) در مناطق مختلف در اسارت تکثیر شده است. عدم انجام مطالعات ژنتیک مولدها و تعداد کم افراد مولد سبب عدم موفقیت بسیاری از این برنامه‌ها شده است (پهلوانی، 1383).

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 ریخت-شناسی مانند اندازه بدن، شکل شاخ و رنگ بدن و تعداد کروموزوم‌ها بین یک تا هفت گونه تقسیم‌بندی شده‌اند (Bunch و همکاران، 2006؛ Nadler و همکاران، 1973). آخرین رده‌بندی که با استفاده از ژنوم میتوکندری انجام گرفت، نشان داد که در ایران دو گونه گوسفند وحشی، اورپال (*O. orientalis vigniei*) و ارمنی (*O. ammon gemelini*) وجود دارد و گوسفند‌های وحشی که در مطالعات قبلی به عنوان زیرگونه در نظر گرفته شده بودند در رده‌بندی جدید در دو گونه متفاوت گوسفند وحشی اورپال و ارمنی قرار گرفتند.

دی ان ای میتوکندریایی (mtDNA) به عنوان یک نشانگر مولکولی در تشخیص گونه‌ها و ترسیم روابط فیلوژنتیک دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی از جمله 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، 2007). یکی از ژن‌های میتوکندریایی که در بسیاری از مطالعات برای بررسی روابط فیلوژنتیک در پستانداران مورد استفاده قرار گرفته و اطلاعات توالی از گونه‌های مختلف پستاندار نظیر آهو ایرانی (Fadakar و همکاران، 2013)، آهو کوهی (Wronski و همکاران، 2010)، گوسفند وحشی (Rezaeie و همکاران، 2010)، انتلوپ‌ها (Lorenzen و همکاران، 2010) و سم داران آفریقایی (Silva و همکاران، 2014) در دسترس است. نتایج به‌دست آمده از بسیاری از مطالعات منجر به طبقه‌بندی جدید گونه‌ها شده که روابط فیلوژنتیک میان گونه‌های مورد مطالعه 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 (2011) خواستگاه و ارتباط فیلوژنی سه نژاد گوسفند وحشی را مورد بررسی قرار داد. توالی-یابی ژنوم میتوکندری در این مطالعه نشان داد گوسفند وحشی از تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی بالایی برخوردارند. Zachary و همکاران (2012) مدیریت ژنتیکی را در برنامه معرفی مجدد گوسفند وحشی شاخ بزرگ (*O. canadensis*) به محیط مورد ارزیابی قرار دادند. تحلیل‌ها موفقیت هیبرید‌های حاصل از مدیریت ژنتیکی را نسبت به دورگه‌های حاصل از درون آمیزی نشان داد. از تجزیه و تحلیل توالی ژن سیتوکروم b در گونه‌های مختلف گوسفند وحشی نظیر گوسفند برقی (*Ovis nivicola*)، و موفلون (*Ovis orientalis ophion*) (Barbanera و همکاران، 2012؛ Bunch و همکاران، 2006)

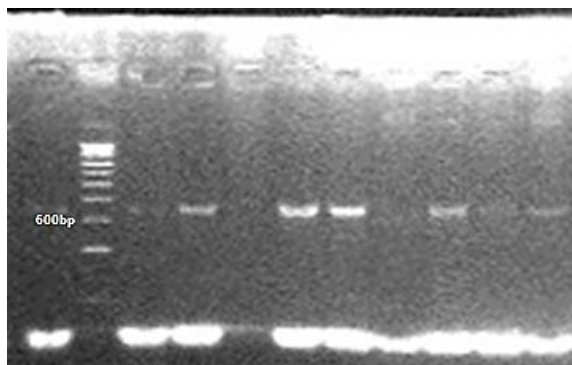
شبکه هاپلوتایپی با استفاده از منطق اتصال میانه و نرم افزار Network 4.6.1.3 انجام گرفت (Bandlet و همکاران، 1999).

نتایج

توالی ژن سیتوکروم b برای 6 نمونه گوسفند وحشی سایت چادگان به طول ۶۸۸ جفت باز (bp) به دست آمد (شکل ۲). ترکیب نوکلئوتیدی توالی های به دست آمده در نرم افزار Mega نتایج نشان داد که در مجموع از 688 جفت نوکلئوتیدی مورد بررسی، 565 جایگاه حفاظت شده و 123 جایگاه چند شکل (90 جایگاه حاوی اطلاعات پارسیمونی و 33 جایگاه تک متغیر) هستند. فراوانی هر کدام از نوکلئوتیدها برآورد گردید که آدنین (31/2 درصد) و گوانین (11/9 درصد) به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی نوکلئوتیدها تشکیل دادند. میزان جانشینی نوع اول (جانشینی بازهای پورین A-G با یکدیگر و جانشینی بازهای پیریمیدین C-T با یکدیگر) و جانشینی نوع دوم (جانشینی بازهای پورین و پیریمیدین با یکدیگر) بررسی شد که جانشینی های نوع اول به مراتب بالاتر از جانشینی های نوع دوم به دست آمد هم-چنین میزان جانشینی نوکلئوتید T با C بیشتر از سایر جانشینی های 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 می باشد. همچنین نتایج تنوع ژنتیکی گوسفند وحشی براساس 688 جفت نوکلئوتید ژن Cytb نشان داد که 70 هاپلوتایپ در بین 138 توالی مورد بررسی وجود دارد که در مطالعه حاضر 3 هاپلوتایپ جدید به 67 هاپلوتایپ مطالعات گذشته اضافه گردید.

لازم به ذکر است که از 3 هاپلوتایپ شناسایی شده یک هاپلوتایپ در بین جمعیت های *O. vignei* و *O. orientalis laristanica* و *O. vignei kermanensis* مشترک بوده است. بیشترین تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی در جمعیت های *O. orientalis gemelini* و *O. orientalis isphahanica* به دست آمد و کمترین مقدار آن در جمعیت های *O. vignei laristanica* و *O. vignei kermanensis* مشاهده گردید. تحلیل های گسترش جمعیت (range expansion) براساس جمعیت های هر زیرگونه صورت گرفت، که در این میان جمعیت های زیرگونه های *O. vignei kermanensis* و *O. vignei* براساس *Fu's Fs* مقدار منفی و معنی داری را نشان دادند (جدول 1).



CYTb_R (5'-CCTGTTTCGTGGAGGAAGAG-3') استفاده شد (Rezaei و همکاران، 2010) و قطعه ای به طول 688 جفت باز از ژن سیتوکروم b تکثیر شد. واکنش زنجیره ای پلی مرز در حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل 2/5 میکرولیتر 1X PCR complete، 1 میکرولیتر DNTTP، 1 میکرولیتر از هر آغازگر، 0/5 میکرولیتر

1 Taq-polymerase، 1 میکرولیتر DNA که با اضافه کردن 18 میکرو لیتر آب مقطر به حجم رسید، انجام شد. دما و زمان چرخه های حرارتی واکنش زنجیره ای پلی مرز شامل 10 دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای 95 درجه سانتی گراد، 35 چرخه حرارتی (واسرشته سازی 30 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی-گراد، اتصال آغازگر 30 ثانیه در دمای 60 درجه سانتی گراد و بسط آغازگر 1 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد) و 10 دقیقه بسط نهایی آغازگر در دمای 72 درجه سانتی گراد انجام شد. به منظور اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز 2 درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت. در نهایت محصول PCR به روش اتوماتیک توالی یابی گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها: به منظور بررسی و اصلاح خطاهای موجود در توالی های دریافت شده از نرم افزار 2/6 SeqScape استفاده گردید و همچنین هم ردیف شدن توالی های موجود با استفاده از نرم افزار 7.2.5 BioEdit الگوریتم Clustalw صورت گرفت (Thompson و همکاران، 1994). علاوه بر نمونه هایی که در این تحقیق جمع آوری و تعیین توالی شد، 138 توالی CYTB از جمعیت های گوسفند وحشی مناطق مختلف کشور از سایت NCBI دالود و در تجزیه و تحلیل جایگاه رده بندی و فیلوژنی گوسفند وحشی منطقه چادگان مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تعیین فاصله ژنتیکی بین جمعیت ها، فراوانی بازهای مختلف و تعیین میزان جانشینی های نوع اول و دوم از نرم افزار 5.3 MEGA و با 10000 تکرار استفاده گردید (Tamura و همکاران، 2011). تعداد هاپلوتایپ ها و جایگاه های چندشکلی با استفاده از نرم افزار 5.10 DNAsp صورت گرفت (Rozas و Librado، 2009). برای تعیین تعداد شاخص تنوع ژنتیکی (تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی) در جمعیت ها و آزمونه ای خنثی سازی نرم افزار 3.5 Arlequin مورد استفاده گرفت (Excoffier و Schneider، 1999). همچنین تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از این نرم افزار و با 10000 تکرار انجام گرفت. برای تعیین بهترین مدل جانشینی نوکلئوتیدی از نرم افزار 2.1.5 JModelTest استفاده گردید (Darriba و همکاران، 2012). سپس با توجه به مدل انتخاب گشته از نرم افزار 3.1 Phylm برای ترسیم درخت حداکثر درست نمایی (Maximum Likelihood) (Gascuel و Guignon، 2003) و از نرم افزار 3.2.2 MrBayes برای ترسیم درخت بیزین استفاده -گردید (Ronquist و Huelsenbeck، 2001). تحلیل های بیزین با 10 میلیون تکرار و فراوانی نمونه 100 براساس چرخه زنجیره مارکوف انجام گرفت. درخت های بیزین و حداکثر درست نمایی به وسیله برون گروه *Capra aegagrus* ریشه دار شدند در آخر درخت های ترسیم شده به وسیله قانون اکثریت (Majority rule) یک-پارچه گردیدند. برای بررسی ارتباط بین هاپلوتایپ ها و ترسیم

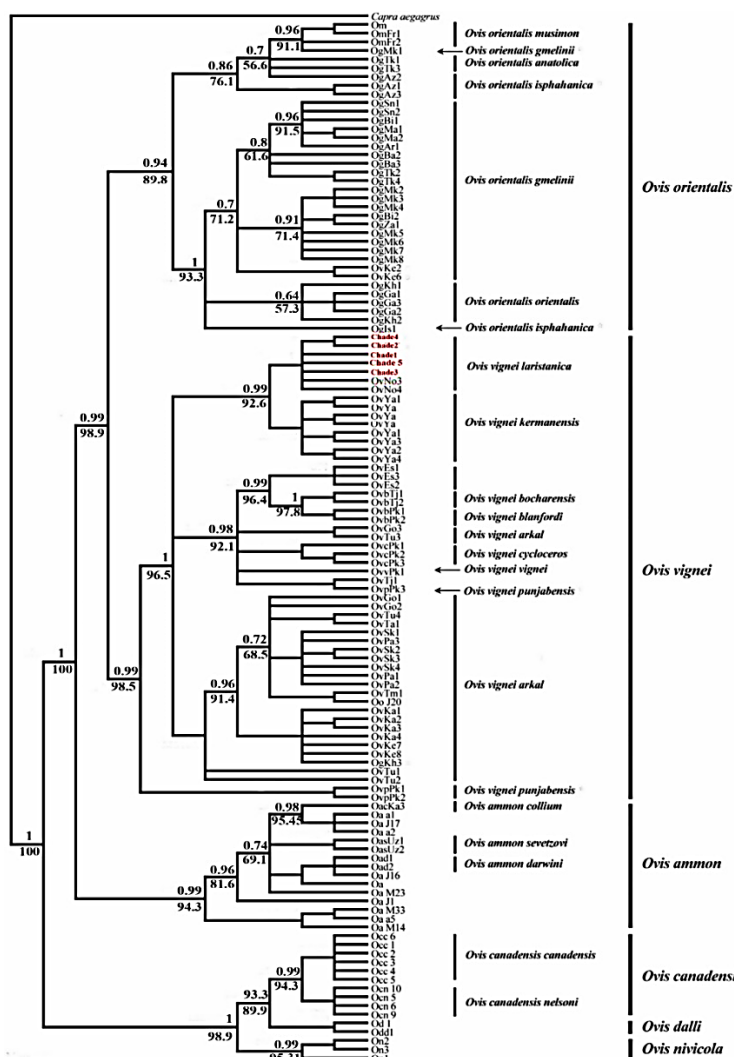
شکل 2: الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر به طول قطعه ۶۸۸ جفت باز روی ژل آگاروز 2 درصد

آزمون معیارهای اطلاعات بیزین (BIC) و اطلاعات آکایکه (AIC) نشان داد که مدل HKY+G ($G=0/692$) به عنوان 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 درست‌نمایی با احتمال بالایی جدایی بین جمعیت‌ها را نشان داد (شکل 2). نتایج درخت تبار شناسی با بوت استرپ و احتمال پسین بالایی، جدایی شش کلاد گوسفند وحشی را براساس 688 جفت باز ژن Cytb نشان می‌دهد که به‌طور کلی براساس نمونه‌های ثبت‌شده در بانک ژن گوسفند وحشی ایران به دو کلاد *O. vignei* و *O. orientalis* تقسیم‌بندی می‌شوند که با احتمال پسین 0/99 و بوت استرپ 98/9 درصدی از یکدیگر

تفکیک‌شده‌اند. بر مبنای این تقسیم‌بندی گوسفند وحشی سابیت تکثیر در چادگان در کلاد *O. vignei* قرار می‌گیرند و به عنوان زیرگونه‌های *O. vignei laristanica* با احتمال پسین و بوت استرپ‌های بالایی از زیرگونه‌های *O. vignei kermanansis* تفکیک شده است (شکل 3). نتایج تحلیل شبکه هاپلوتایپی نشان داد که 70 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 اورپال قرار می‌گیرند. هم-چنین هاپلوگروپ *O. canadensis* از آمریکای شمالی با 48 تا 63 جهش از هاپلوگروپ‌های ایران *O. vignei* و *O. orientalis* جدا شده است.

جدول 1: ویژگی‌های ژنتیکی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از هر جمعیت و آزمون‌های تحلیل گسترش جمعیت‌های گونه (Fu' Fs و Tajima's D)

جمعیت	تعداد نمونه	تعداد هاپلوتایپ	تعداد چندریختی	تنوع هاپلوتایپی (h)	تنوع نوکلئوتیدی (p)	Tajima's D	Fu' Fs
<i>O.orientalis gemelinii</i>	32	12	12	0/50±0/177	0/01936±0/00467	0/34	1/02
<i>O.orientalis isphanica</i>	17	12	13	0/825±0/022	0/01691±0/00313	0/46	1/46
<i>O.vignei arkali</i>	17	8	9	0/833±0/222	0/01129±0/00423	-0/35	-1/5
<i>O.vignei kermanansis</i>	11	3	3	0/233±0/222	0/01455±0/00409	-1/35	-2/25*
<i>O.vignei laristanica</i>	8	3	4	0/250±0/265	0/00453±0/0022	-1/25	-2/65*
<i>O.canadensis canadensis</i>	8	4	6	0/500±0/265	0/00453±0/0022	-0/20	-1/30
<i>O.canadensis nelson</i>	8	5	5	0/610±0/265	0/00453±0/0022	0/40	-0/65

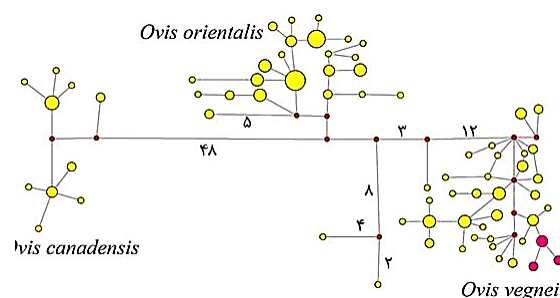


شکل 3: درخت تبارشناسی گوسفند وحشی با استفاده از دو روش بیزین و حداکثر درست‌نمایی (توپولوژی یکسان)

شکل 4: شبکه هاپلوتایپی گوسفند وحشی با استفاده از اعداد نمایانگر تعداد جهش رخ داده در بین هاپلوتایپ‌ها است. هاپلوتایپ‌های قرمز رنگ (تیره) نشان‌دهنده نمونه‌های توالی‌یابی شده از سایت تکثیر در چادگان است.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که اگر همه جمعیت‌ها یک گروه در نظر گرفته شود، 90/08 درصد از تغییرات ساختار ژنتیکی در بین جمعیت مختلف و تغییرات ژنتیکی درون جمعیت‌ها 9/92 درصد است (جدول 2). در این مطالعه با توجه به تعداد کم نمونه از کلاد *O. ammon* و اگرایی ژنتیکی درون و بین‌گونه‌ای گوسفند وحشی کلادهای *O. vignei*، *O. orientalis* و *O. canadensis* محاسبه گردید (جدول 3). بر این اساس حداقل و حداکثر فاصله ژنتیکی درون گونه *O. vignei* 0/013 تا 0/015 به‌دست آمد درحالی‌که فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای *O. vignei* با *O. canadensis* 0/086 تا 0/088 و *O. vignei* با *O. orientalis* 0/021 تا 0/024 برآورد گردید. همچنین لازم به‌ذکر است که به‌ترتیب کمترین فاصله ژنتیکی درون‌گونه‌ای

شبکه هاپلوتایپی گوسفند وحشی با استفاده از منطق اتصال میانه ترسیم شد (شکل 4). 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 Clade1 تا Clade2 نشان داده شده‌اند به‌عنوان زیرگونه لارستان در کلاد *O. vignei* قرار گرفتند.



در بین زیرگونه‌های *O. canadensis* و *O. orientalis* مشاهده گردید در صورتی‌که بیش‌ترین مقدار آن در زیرگونه‌های *O. vignei* به دست آمد.

جدول 2: تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در بین جمعیت‌های گوسفند وحشی

منابع تغییر	d.f.	مجموع مربعات	درصد واریانس	آماره F
بین جمعیت‌ها	3	159/70	95/08	FST=0/95
درون جمعیت‌ها	15	8/62	4/92	
کل	18	168/32		

جدول 3: واگرایی ژنتیکی گوسفند وحشی براساس ژن سیتوکروم b

گونه	زیرگونه	تعداد	فاصله ژنتیکی
<i>O. vignei</i>	<i>Laristanica</i>	8	
	<i>Kermanansis</i>	11	0/013
	<i>Arkal</i>	17	0/015
<i>O. canadensis</i>	<i>Canadensis</i>	8	0/087
	<i>Nelson</i>	8	0/087
<i>O. orientalis</i>	<i>Gemelinii</i>	32	0/024
	<i>Ispahanica</i>	17	0/024
			0/021
			0/026
			0/084
			0/083
			0/078
			0/077
			0/076
			0/024
			0/007

بحث

در این مطالعه جایگاه فیلوژنی گوسفند وحشی در مرکز تفرجی و تکثیر در چادگان با توالی یابی 688 جفت باز از ژن *cytochrome b* میتوکندری بررسی شد. این ژن در این مطالعه نیز مانند مطالعات قبلی در ترسیم روابط فیلوژنتیک گوسفند وحشی کار آمد بود. نتایج این مطالعه نشان داد که تنوع ژنی نسبتاً بالایی در جمعیت گوسفند وحشی در این منطقه دیده می‌شود به نحوی 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 (2011) نیز در مطالعه روابط فیلوژنی نژادهای گوسفند وحشی با استفاده از ژنوم میتوکندری، تنوع هاپلوتایپی و نوکلئوتیدی بالایی را گزارش نمودند. Zachary و همکاران (2012) 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 کمتری 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. به عنوان مثال در بین 41 نمونه گوسفند وحشی از دو منطقه تنگ صیاد در چهارمحال بختیاری و کرابی خوزستان تنها یک هاپلوتایپ مشاهده شد (یوسفی‌سیاه‌کلودی و همکاران، 1389).

بررسی ژنتیکی جمعیت گوسفند وحشی در پناهگاه حیات وحش بوروبه استان یزد نیز هیچ‌گونه تنوع هاپلوتایپی را نشان نداد (حسینی و همکاران، 1394)، اگرچه در تحلیل ژنتیکی قوچ و میش‌های استان یزد تعداد 9 هاپلوتیپ در بین 30 نمونه توالی‌یابی شده مشاهده شد (حسینی و همکاران، 1393). بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین قوچ و میش‌های منطقه بوروبه با دیگر جمعیت‌های این استان مشاهده شد که به دلیل انزوای جمعیت قوچ و میش منطقه بوروبه و عدم تبادل ژنتیکی با جمعیت‌های شمال و مرکز این استان از تنوع کمی برخوردار است.

نتایج ترسیم درخت فیلوژنی نشان داد که جمعیت‌های گوسفند وحشی در ایران در دو گونه گوسفند وحشی، اورپال (*O. orientalis vignei*) و ارمنی (*O. ammon gemelini*) قرار دارند که مطالعات قبلی نظیر Rezaei و همکاران (2010) نیز موند این مطلب است. جمعیت گوسفند وحشی در سایت تکثیر چادگان در کلاد *O. vignei* قرار می‌گیرد و به عنوان 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 ($0/8 \pm 0/16$) نشان از بالا بودن تنوع هاپلوتایپی جمعیت بررسی شده در مقایسه با زیرگونه‌های *O. gemelini orientalis* و *O. vignei kermanansis* و کمتر بودن تنوع در مقایسه با *O. vignei arkali* و *O. orientalis isphanica* می‌باشد. اما تنوع نوکلئوتیدی محاسبه شده ($0/003 \pm 0/0006$) 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 به دست 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 ($P > 0/05$); $SSD = 0/05$). همچنین میزان شاخص $R_{ajjedness}$ برابر با $0/2$ محاسبه شد که تأییدکننده نتایج به دست آمده از تحلیل‌های گسترش سریع جمعیت در گوسفند وحشی لارستان می‌باشد. در شبکه هاپلوتایپی دو گونه گوسفند وحشی ارمنی و اورپال به

6. Bandelt, H.J.; Forster, P. and Röhl, A., 1999. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 16, No. 1, pp: 37-48.
7. 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: 671-675.
8. 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.
9. 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: 313-323.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Frankham, R.; Ballou, J.D. and Briscoe, D.A., 2010. *Introduction to Conservation Genetics*, 2nd ed. University Press, Cambridge. 603 p.
14. Guindon, S. and Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. Vol. 52, No. 5, pp: 696-704.
15. Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. Vol. 17, No. 8, pp: 754-755.
16. 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.
17. Librado, P. and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. Vol. 25, pp: 1451-1452.
18. Lorenzen, E.D.; Masembe, C.; Arctander, P. and Siegmund, 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.
19. Marshall, T.C. and Spalton, J.A., 2000. Simultaneous inbreeding and outbreeding depression in reintroduced Arabian oryx. *Animal Conservation*. Vol. 3, pp: 241-248.
20. 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.
21. O'Brien, S.J., 2006. Animal conservation genetics an overview with relevance to captive breeding programs. *EAZA News*. Vol. 57, pp: 26-35.
22. 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

خوبی از یکدیگر جدا شده‌اند. نمونه‌های سایت چادگان در کلاد اورپال قرار گرفته است. فاصله ژنتیکی بین دو کلاد اورپال و ارمنی به خوبی در شبکه هاپلوتایپی و درخت تبارشناسی قابل مشاهده 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 به نظر می‌رسد. یکی از مهمترین تهدیدات در این خصوص، درون آمیزی بین افراد و در نتیجه 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 به دلیل مشکل در جمع‌آوری نمونه‌ها و یا عدم دسترسی به نمونه‌های بیش‌تر با تعداد افراد محدودی آغاز به کار می‌کنند. برای جلوگیری از گلوگاه جمعیتی توصیه می‌شود که حداقل 20-30 مولد مورد استفاده قرار گیرد (Leberg و Firmin, 2008). معرفی مجدد افراد به جمعیت بنیان‌گذار جهت افزایش تنوع ژنتیکی موجود نیز می‌تواند به عنوان 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

1. پهلوانی، ع.، 1383. مطالعه تکثیر در اسارت جبر در پناهگاه حیات وحش شیر احمد سبزوار. *مجله محیط‌شناسی*. دوره 30، شماره 36، صفحات 51 تا 56.
2. حسینی، س.م.؛ رضایی، ح.ر.؛ وارسته‌مرادی، ح.؛ نادری، س. و نیکویی، ف.، 1393. بررسی فیلوژنوگرافی جمعیت قوچ و میش‌های استان یزد براساس داده‌های ژنوم میتوکندری. *فصلنامه محیط‌زیست جانوری*. دوره 6، شماره 3، صفحات 169 تا 177.
3. حسینی، س.م.؛ رضایی، ح.ر.؛ وارسته‌مرادی، ح.؛ نادری، س. و نیکویی، ف.، 1394. تجزیه و تحلیل تنوع و جایگاه ژنتیکی قوچ و میش‌های پناهگاه حیات وحش برونیه با کمک ژن سیتوکروم ب. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*. دوره 7، شماره 3، صفحات 89 تا 104.
4. یوسفی سیاه‌کلودی، س.؛ خدرزاده، ص. و منتظمی، ش.، 1389. بررسی تنوع نوکلئوتیدی موجود در جمعیت‌های قوچ و میش دو منطقه حفاظت‌شده تنگ صیاد و کرای خوزستان با استفاده از توالی‌یابی ناحیه D-loop و ژن Cyt-b میتوکندری. *محیط‌زیست جانوری*. سال 2، شماره 4، صفحات 25 تا 30.
5. 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.



- specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic acids research. Vol 22, pp: 4673-4680.
27. Williams, S.E. and Hoffman, E.A., 2009. Minimizing genetic adaptation in captive breeding programs: A review. Biological conservation. Vol. 142, pp: 2388-2400.
28. Wronski, T.; Wachter, 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
29. 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.
30. Zhao, Y.; Zhao, E.; Zhang, N. and Duan, C., 2011. Mitochondrial DNA diversity origin and phylogenetic relationships of three Chinese large-fat-tailed sheep breeds. Tropical Animal Health and Production. Vol. 43, No. 7, pp: 1405-1410.
- mitochondrial and nuclear markers. Meat science. Vol. 76, No. 4, pp: 666-674.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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-

