

برآورد اندازه مؤثر جمعیت گاومیش‌های آبی ایران با استفاده از اطلاعات ژنومی

مهدی مخبر^{۱*}، محمد مرادی شهربابک^۲، مصطفی صادقی^۳، حسین مرادی شهربابک^۴ و جواد رحمانی‌نیا^۵

۱. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲، ۳ و ۴. استاد، دانشیار و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۵. استادیار، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲)

چکیده

به منظور تعیین اندازه مؤثر جمعیت‌های گاومیش ایران از ۴۰۷ رأس حیوان (۲۶۰ آذری، ۱۲۰ خوزستانی و ۲۷ مازندرانی) نمونه‌گیری به عمل آمد. نمونه‌ها بعد از استخراج DNA، با استفاده از آرایه‌های ژنومیکی Axiom Buffalo Genotyping 90K Array، تعیین ژنوتیپ شدند. اندازه مؤثر جمعیت از ۷۰۰ تا ۴ نسل قبل با استفاده از اطلاعات پیوستگی که برای نمونه تصحیح شده بودند و برای نسل حاضر با استفاده از نرم‌افزار NeEstimator (V2) و بر اساس روش هتروزیگوسیتی اضافی، محاسبه گردید. نتایج به دست آمده برای نسل حاضر نشان می‌دهد که اندازه مؤثر جمعیت‌های آذری و خوزستانی نسبتاً بالا است و این جمعیت‌ها از لحاظ ژنتیکی در معرض انقراض قرار ندارند. ولی شیب بالای کاهش اندازه جمعیت برای این جمعیت‌ها نگران‌کننده است و بایستی جهت حفظ اندازه مؤثر جمعیت مطلوب و تنوع قابل قبول برای این جمعیت‌ها برنامه‌ریزی صورت گیرد. همچنین نتایج به دست آمده برای جمعیت مازندرانی نشان می‌دهد این جمعیت از لحاظ ژنتیکی در معرض انقراض قرار دارد. بنابراین بایستی اندازه مؤثر جمعیت به دقت کنترل گردد و نیز با اقتصادی کردن تولید و طراحی تلاقی‌های مناسب از افزایش هم‌خونی و انقراض ژنتیکی این جمعیت جلوگیری کرده و جمعیت را حفاظت ژنتیکی کرد.

واژه‌های کلیدی: اندازه مؤثر جمعیت، عدم تعادل لینکاژی، گاومیش آبی.

Estimation of effective population size of Iranian water buffalo by genomic data

Mahdi Mokhber^{1*}, Mohammad Moradi Shahrabak², Mostafa Sadeghi³, Hossein Moradi Shahrabak⁴ and Javad Rahmani-Nia⁵

1. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science, Urmia university, Urmia, Iran

2, 3, 4. Professor, Associated Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

5. Assistant Professor, Department of Animal Breeding and Genetics, Animal Science Research institute of Iran (ASRI), Karaj, Iran

(Received: Feb. 20, 2017 - Accepted: Nov. 23, 2017)

ABSTRACT

In order to estimate the effective population size (Ne) in Iranian water buffalo blood and hair samples of 407 individual from Azari (N=260), Khuzestani (N=120) and Mazandrani (N=27) buffalo populations were gathered. After DNA extraction, the samples were genotyped using Axiom® Buffalo Genotyping 90K Array. The Ne was estimated from 700 to 4 generations ago and also for the present generation by linkage disequilibrium data and based on heterozygote-excess method using NeEstimator (V2), respectively. Estimated Ne for Azari, Khuzestani and Mazandarani were calculated 1530, 1375 and 1141, respectively, for 700 generations ago. Ne for the present generation in Azeri, Khuzestani and Mazandarani were estimated 447, 226 and 35, respectively. The Ne for Azeri and Khuzestani were relatively high and these two populations were not endanger to extinction, but their Ne has been declined in the resent generations massively and it is necessary to care about the maintenance of Ne and relatively high diversity for these populations. However, the Mazandarani population is endangered because of low Ne and so it is necessary to carefully monitor their effective population size, improve the profitability of production and planning a suitable mating scheme to control inbreeding and genetically conserve this population.

Keywords: Effective population size, Linkage disequilibrium, water buffalo.

* Corresponding author E-mail: mehdi.mokhber@urmia.ac.ir

مقدمه

هنگامی که عوامل سیستماتیک از قبیل جهش، انتخاب و مهاجرت وجود نداشته باشند، خصوصیات ژنتیکی از قبیل هتروزیگوسیتی، تعداد آلل‌ها، فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی در یک جایگاه ژنی برای یک جمعیت بی‌نهایت بزرگ در طی زمان ثابت خواهد ماند. در مقابل، وقتی اندازه مؤثر جمعیت (N_e) محدود باشد در نتیجه فرآیند تصادفی نمونه‌گیری، تعداد محدودی از گامت‌ها در طی تولیدمثل و زنده‌مانی به نسل بعد منتقل شده و منجر به تغییر خصوصیات ژنتیکی خواهد شد. قدرت این فرآیند تصادفی و میزان تغییر خصوصیات ژنتیکی مذکور به مفهوم N_e بستگی دارد که توسط Wright (1931) معرفی و توسط محققان دیگر توسعه داده شد (Crow & Kimura, 1970). به طوری که تغییرات تصادفی خصوصیات ژنتیکی در جمعیت‌های با N_e بالا نسبت به جمعیت‌های با N_e پایین‌تر، کندتر می‌باشد (Hayes et al., 2003).

میزان N_e در کنار نیروهای سیستماتیک از قبیل جهش، انتخاب، مهاجرت و نوترکیبی میزان تنوع ژنتیکی موجود در یک جمعیت را تعیین می‌کند. بنابراین، N_e برای توصیف میزان و الگوی تنوع ژنتیکی مشاهده شده یک جمعیت و تفسیر مکانیسم‌های تکاملی درگیر در شکل‌دهی تنوع در جمعیت‌های طبیعی و نیز درک تکامل جنسیت و نوترکیبی کمک می‌کند (Barton & Charlesworth, 1998). همچنین N_e به پیش‌بینی تنوع ژنتیکی جایگاه‌های خنثی، احتمال تثبیت آلل‌های مفید یا حذف آلل‌ها (Robertson, 1961) و شایستگی و زنده‌مانی یک جمعیت کوچک (Lynch et al., 1995)، کمک می‌کند. در واقع N_e یک پارامتر مهم در اکولوژی، بیولوژی تکامل و بیولوژی محافظت می‌باشد (Wang, 2005). به‌رحال دانستن N_e ، طراحی برنامه‌های انتخاب مصنوعی در اصلاح گیاهان و حیوانات و مدیریت کارآمد جمعیت‌های مربوط به گونه‌های در معرض انقراض را تسهیل می‌کند (Caballero, 1991; Wang, 2004). بنابراین علاقه زیادی برای شناسایی N_e در جمعیت‌های طبیعی و مصنوعی در بین محققان حوزه‌های ژنتیک جمعیت، ژنتیک کمی، بیولوژی

تکامل و محافظت وجود دارد (Barton & Charlesworth, 1998).

روش‌های مختلفی برای تخمین N_e توسط محققان متفاوت ارائه شده است که می‌توان این روش‌ها را در سه دسته کلی قرار داد. این سه دسته شامل روش‌های مبتنی بر جمعیت‌شناختی (دموگرافی)، شجره و اطلاعات نشانگری هستند (Flury et al., 2010). داده‌های شجره به‌طور سنتی برای به‌دست‌آوردن N_e در حیوانات اهلی استفاده می‌شود. در هر حال در این روش، برای داشتن یک تخمین قابل اعتماد از N_e نیاز به کامل بودن شجره می‌باشد. در مورد روش‌های مبتنی بر دموگرافی بایستی در نظر داشت که اطلاعات دموگرافیک فقط در مورد برخی از دام‌های اهلی موجود است و این در شرایطی امکان‌پذیر است که پارامترهای دموگرافیک به‌طور دقیق برای نسل‌های زیاد تحت کنترل باشند. در هر صورت، در عمل کاربرد این روش‌ها برای موارد نادری شامل نژادهای با مدیریت بالا، محدود است (Flury et al., 2010). یک راه‌حل برای غلبه بر محدودیت‌های یک شجره ناقص تخمین روند اخیر N_e با استفاده از داده‌های ژنومی است. محققان نشان داده‌اند که می‌توان N_e را در طی نسل‌های گذشته و حال با استفاده از اطلاعات عدم تعادل لینکاژی (LD) تخمین زد (Sved, 1971; Hayes et al., 2003). Hayes et al. (2003) با شبیه‌سازی نشان دادند که عدم تعادل لینکاژی در فواصل کوتاه تابعی از N_e در نسل‌های قبلی دورتر است، ولی در فواصل بلند منعکس کننده وضعیت جمعیت در نسل‌های اخیر می‌باشد. بنابراین با تعیین میزان LD برای فواصل مختلف، می‌توان N_e را به‌عنوان یک عامل کلیدی برای نسل‌های مختلف در گذشته تعیین کرد. دو آماره r^2 و D' برای محاسبه LD در بین دو جایگاه مارکری به‌کار می‌رود (Bohmanova et al., 2010). از این میان آماره r^2 در مقایسه با D' کمتر تحت تأثیر فراوانی آلی و اندازه نمونه قرار دارد. بنابراین r^2 یک آماره کلیدی در تعیین LD می‌باشد (Bohmanova et al., 2010).

پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی‌های تعیین ژنوتیپ (استفاده از آرایه‌های ژنومی با هزاران پروب برای

(MAF) کمتر از ۰.۲٪ و نیز جایگاه‌های با بیش از ۰.۵٪ ژنوتیپ از دست‌رفته (CR_{SNP})، حذف شدند. فیلتراسیون برای MAF و ژنوتیپ‌های از دست‌رفته برای افراد و SNPها برای کل حیوانات به‌طور یکجا انجام گرفت. سپس جهت داشتن یک دیدگاه کلی در خصوص ساختار جمعیتی حیوانات و نژادهای مورد مطالعه و شناسایی حیواناتی که خارج از گروه نژادی خود قرار گرفته‌اند، آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) صورت گرفت. آنالیز مؤلفه‌های اصلی بر اساس اطلاعات ماتریس خویشاوندی ژنومی (Price *et al.*, 2006) و به‌وسیله نرم‌افزار GeneABEL در محیط R صورت گرفت. در ادامه مراحل ویرایش داده، آزمون تعادل هاردی-واینبرگ بر روی همه SNPهای باقیمانده از مراحل قبلی انجام گرفت و SNPهای با p-value کمتر از $10^{-7} \times 6/8$ از فایل داده‌ها کنار گذاشته شدند. سطح معنی‌داری در این تحقیق با استفاده از تصحیح بنفرونی ($\beta = \alpha/n$)، که n در اینجا برابر تعداد SNP ($n = 73935$) و α همان خطای آزمایش است که در این بررسی ۰.۰۵ در نظر گرفته شده بود. فیلتراسیون برای عدم تعادل هاردی-واینبرگ بعد از آنالیز مؤلفه‌های اصلی و مشخص شدن تمایز جمعیتی حیوانات، برای هر جمعیت به‌طور جداگانه انجام گرفت.

بعد از کنترل کیفیت و فیلتراسیون، SNPهای مربوط به کروموزوم‌های جنسی از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شدند. نسبت کم ژنوتیپ‌های از دست‌رفته با استفاده از نرم‌افزار BEAGLE ایمپوت شدند (Browning & Browning, 2007). در مرحله بعد هر کدام از جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار SnpLD (Sargolzaei M, University of Guelph, Canada) به‌طور مجزا ویرایش شده و مقادیر r^2 بین جفت بازها در فواصل تعیین شده با استفاده از فرمول Hill & Robertson (1968) به‌دست آمد. سپس این اطلاعات برای تعداد نمونه تصحیح گردید (Villa-Angulo *et al.*, 2009). اطلاعات تصحیح‌شده LD مربوط به هر کدام از جمعیت‌ها برای محاسبه اندازه مؤثر جمعیت استفاده شد. سپس Ne با رابطه زیر محاسبه شد (Sved, 1971):

$$Ne = \left(\frac{1}{4c}\right) \left(\frac{1}{r^2} - 1\right)$$

که در آن Ne برابر اندازه مؤثر جمعیت در نسل T

توالی‌یابی هزاران مارکر (SNP) امکان به‌دست آوردن داده‌های عدم تعادل پیوستگی در سطح کل ژنوم را فراهم آورده است و این اطلاعات جهت تخمین Ne در جمعیت‌های انسانی و حیوانات اهلی ایده‌آل هستند (Kijas *et al.*, 2012). هدف از مطالعه حاضر استفاده از اطلاعات ژنومی جهت تخمین Ne جمعیت‌های گاو میش ایرانی می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از این بررسی در تحلیل ساختارهای جمعیتی مفید می‌باشد و در صورت نیاز سیاست‌گذاری‌های حفظ تنوع ژنتیکی با استفاده از این اطلاعات انجام می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از ۴۰۷ رأس گاو میش (۲۶۰ آذری، ۱۲۰ خوزستانی و ۲۷ مازندرانی) از گله‌هایی که تحت سیستم ثبت شجره و رکوردگیری مرکز اصلاح نژاد کشور قرار داشتند (این گله‌ها که اصطلاحاً به گله‌های پشتیبان معروف هستند، همان گله‌های مردمی هستند که حداقل استانداردهای پرورشی تعیین شده از سوی مرکز اصلاح نژاد را دارند و از سوی این مرکز، حمایت‌های مالی و فنی دریافت می‌کنند و در ازای آن در برنامه‌های پژوهشی این مرکز مشارکت داشته و رکود تولید و تولیدمثلی خود را در اختیار مرکز قرار می‌دهند و برنامه رکوردگیری از گاو میش در این گله‌ها از سال ۱۳۶۷ در حال انجام است)، نمونه‌گیری به‌عمل آمد. نمونه‌های مو به همراه ریشه مو از بخش‌هایی از بدن دام که آلودگی کمتری داشت (ناحیه نزدیک به جدوگاه)، به‌دست آمد (Campbell *et al.*, 1997) و نمونه‌های خون از سیاهرگ و داج زیر دمی گاو میش تهیه گردید. تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها (خون و ریشه مو) در آزمایشگاه ژنومیک مرکز تحقیقات پادانو (Parco Tecnologico Padano) کشور ایتالیا و با استفاده از آرایه‌های Axiom® Buffalo Array Genotyping 90K مربوط به شرکت افی‌متریکس (Affymetrix) صورت گرفت.

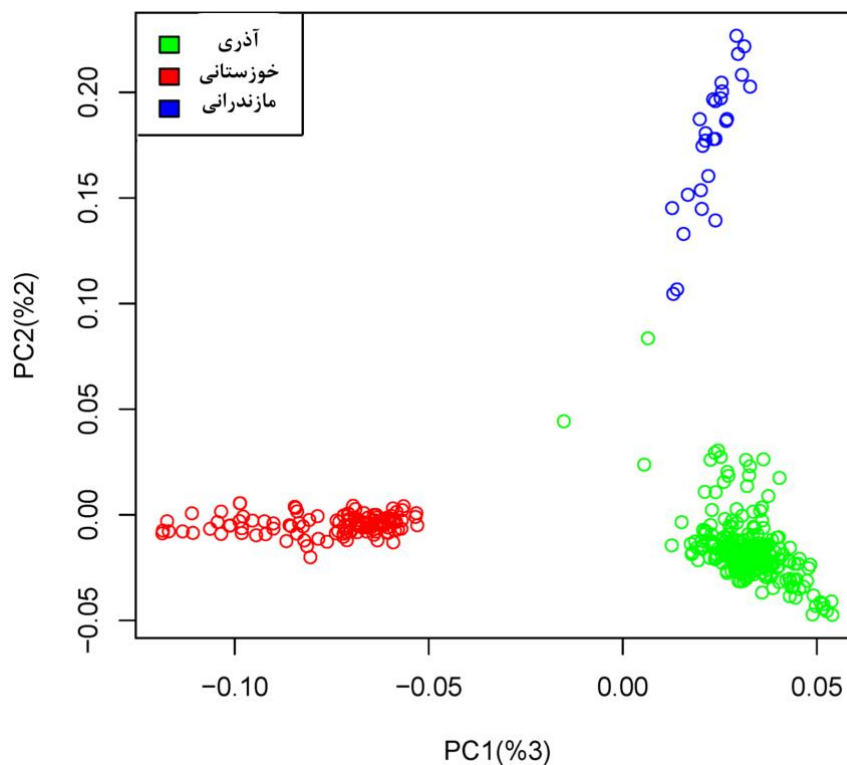
ویرایش داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Plink انجام گرفت (Purcell *et al.*, 2007). ابتدا حیوانات با بیش از ۰.۵٪ ژنوتیپ از دست‌رفته (CR_{IND}) از مراحل بعدی ویرایش داده کنار گذاشته شدند. سپس ژنوتیپ‌های مونومورف و ژنوتیپ‌های دارای حداقل فراوانی آلی

اطلاعات کنترل کیفی داده‌های خام در نهایت ژنوتیپ ۴۰۷ حیوان با تعداد ۶۲۱۶۱ نشانگر SNP برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. نرخ ژنوتایپینگ در افراد باقی مانده ۰/۹۹۶۸ بود. نتایج آنالیز PCA نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس اطلاعات PC1 و PC2 در گروه‌های کاملاً مجزا قرار دارند. فقط ۳ حیوان از نژاد آذری به دلیل قرار داشتن در خارج از گروه‌بندی‌های ژنتیکی از آنالیزهای بعدی حذف شدند. دو ویژه بردار اول در مجموع حدود ۵٪ از کل واریانس را توجیه می‌کنند که ۳٪ مربوط به PC1 و ۲٪ مربوط به PC2 بود و هرکدام از ویژه‌بردارهای بعدی میزان کم‌تر از ۱٪ از واریانس را توجیه می‌کردند. جمعیت گاومیش خوزستانی با PC1 به‌طور کاملاً مجزا از جمعیت‌های آذری و مازندرانی جدا شد و با در نظر گرفتن PC2، جمعیت‌های مازندرانی و آذری از هم تفکیک شدند. در گونه‌های اهلی دیگر از قبیل گاو و گوسفند و خوک نیز، حیوانات فقط بر اساس ویژه بردارهای یک و دو بر اساس نژاد و منطقه جغرافیایی دسته‌بندی می‌گردند (Yang et al., 2014).

است. مقدار r^2 میانگین عدم تعادل لینکاژی در فاصله تعیین شده و c فاصله مارکر به مورگان است (یک سانتی مورگان به‌طور میانگین تقریباً معادل یک مگا جفت باز) است. Flury et al. (2010) نشان دادند که استفاده از فاصله فیزیکی به‌عنوان تقریبی از فاصله ژنتیکی (یک سانتی‌مورگان برابر یک مگا جفت باز) باعث ایجاد اریب رو به بالا در هنگام محاسبه Ne بر اساس روش مبتنی بر LD در نسل‌های بالاتر از ۵۰ می‌شود، درحالی‌که برای نسل‌های اخیر تأثیر ندارد. شماره نسل جهت محاسبه اندازه مؤثر جمعیت (T) بر اساس فاصله ژنومی و با استفاده از فرمول ($T=1/2c$) محاسبه شد (Hayes et al., 2003). در این بررسی Ne مربوط به نسل‌های پیشین در ۲۱ نقطه از ۷۰ تا ۴ نسل قبل با استفاده از اطلاعات پیوستگی و برای نسل حاضر با استفاده از نرم‌افزار NeEstimator (V2) براساس روش هتروزیگوسیتی اضافی محاسبه گردید (Do et al., 2014).

نتایج و بحث

پس از انجام مراحل مختلف غربالگری بر اساس



شکل ۱. آنالیز مؤلفه‌های اصلی جمعیت‌های گاومیش مورد مطالعه با PCAهای ۱ و ۲

Figure 1. Principal components analysis of the studied buffalo populations by PCA1 and 2

کمترین و بیشترین مقادیر را دارند (جدول ۱). این تفاوت احتمالاً به دلیل تعداد متفاوت نشانگرهای SNP در نژادهای مورد بررسی است، به طوری که با کم تر شدن تعداد SNP، میزان انحراف معیار بیشتر می شود.

اندازه مؤثر جمعیت‌های مورد بررسی به طور جداگانه محاسبه گردید. این محاسبات برای نسل‌های گذشته تا نسل چهارم بر مبنای اطلاعات LD محاسبه گردید ولی برای نسل حاضر این محاسبات با استفاده از نرم‌افزار NeEstimator (V2) بر اساس اطلاعات هتروزیگوسیتی اضافی برآورد شد. نتایج هر دو روش محاسبه برای نسل اخیر تقریباً باهم منطبق بود و همدیگر را تأیید می کردند. نتایج مربوط به Ne از ۷۰۰ نسل قبل تا نسل حاضر برای هر کدام از جمعیت‌ها آورده شده است (شکل ۲ و جدول ۲). همان‌طور که در جدول مشخص است در محاسبه نسل‌های گذشته ارتباط معکوسی بین فواصل SNP (ستون اول) و تعداد نسل‌های گذشته (ستون سوم) وجود دارد، به طوری که فواصل کم SNPها برای محاسبه نسل‌های گذشته دورتر و فواصل بالاتر SNP برای محاسبه نسل‌های گذشته نزدیک استفاده می شود (جدول ۲).

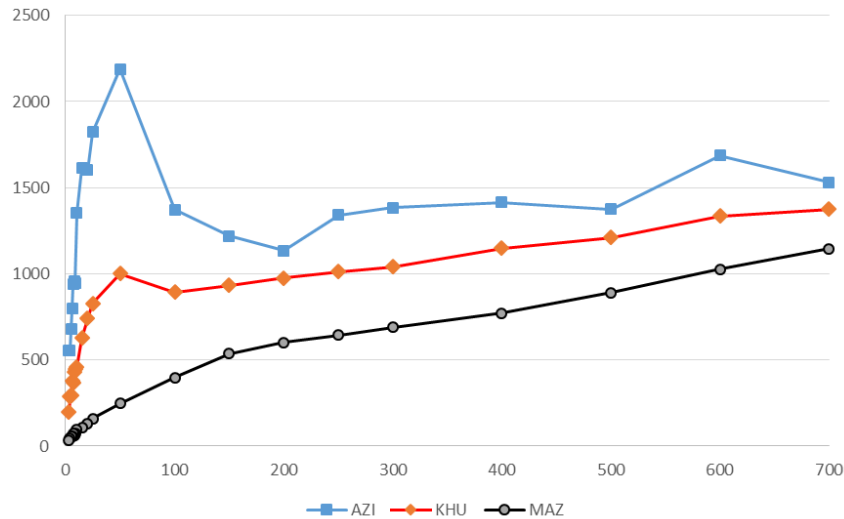
پس از انجام ویرایش نهایی داده‌ها با نرم‌افزار SnpLD، در نهایت تعداد ۶۱۱۶۶، ۶۰۱۹۸ و ۵۷۱۵۱ نشانگر SNP به ترتیب برای نژادهای آذری، خوزستانی و مازندرانی جهت محاسبه r^2 انتخاب شدند. اطلاعات مربوط به فاصله مارکری، میانگین و انحراف معیار r^2 های تصحیح شده برای اندازه نمونه در ۲۱ نقطه تعیین شده، در جدول ۱ آورده شده است. این اطلاعات در نهایت در محاسبه Ne به کار برده می شود. همان‌طور که در جدول مشخص است در هر کدام از نژادها میزان r^2 با افزایش فاصله بین SNPها (ستون اول جدول ۱) کاهش می یابد. نتایج مندرج در جدول ۱ همچنین نشان می دهد که نژاد مازندرانی و آذری به ترتیب بالاترین و پایین ترین میزان r^2 را در فواصل تعیین شده دارند. همچنین، همان‌طور که در جدول مشخص است، میزان انحراف معیار با افزایش فاصله SNPها کاهش می یابد (جدول ۱). این کاهش می تواند به دلیل تعداد r^2 های بیشتر محاسبه شده در فاصله‌های بالاتر باشد، زیرا با افزایش فاصله امکان حضور تعداد بیشتر نشانگرهای SNP جهت محاسبه r^2 بیشتر است. همچنین میزان انحراف معیار در نژاد آذری و مازندرانی برای تمام فواصل نشانگری به ترتیب

جدول ۱. اطلاعات مربوط به r^2 تصحیح شده مربوط به سه نژاد گاو میش‌های آذری (AZI)، خوزستانی (KHU) و مازندرانی (MAZ)

بر اساس فاصله SNP

Table 1. The r^2 for Azeri (AZI), Khuzestani (KHU) and Mazandarani (MAZ) buffalo populations based on SNP distance

Distance (Kb)	Adj $r^2 \pm SD$ (AZI)	Adj $r^2 \pm SD$ (KHU)	Adj $r^2 \pm SD$ (MAZ)
70	0.191±0.231	0.21±0.241	0.252±0.237
80	0.158±0.199	0.193±0.232	0.247±0.233
100	0.156±0.19	0.175±0.209	0.234±0.219
125	0.121±0.173	0.147±0.194	0.214±0.199
170	0.098±0.142	0.127±0.168	0.191±0.176
200	0.087±0.126	0.114±0.154	0.178±0.163
250	0.083±0.137	0.097±0.136	0.159±0.143
330	0.06±0.095	0.079±0.115	0.14±0.124
500	0.037±0.067	0.057±0.088	0.128±0.111
1000	0.013±0.033	0.029±0.047	0.108±0.091
2000	0.009±0.012	0.019±0.025	0.089±0.072
2500	0.008±0.011	0.017±0.022	0.087±0.07
3330	0.007±0.008	0.016±0.02	0.083±0.065
5000	0.006±0.006	0.015±0.018	0.067±0.049
5560	0.007±0.008	0.014±0.016	0.074±0.056
6250	0.006±0.006	0.013±0.015	0.076±0.059
7140	0.006±0.006	0.014±0.015	0.065±0.047
8330	0.006±0.006	0.012±0.012	0.068±0.051
10000	0.006±0.006	0.013±0.013	0.06±0.042
12500	0.006±0.006	0.011±0.012	0.06±0.042
15000	0.005±0.005	0.013±0.013	0.065±0.047



شکل ۲. تغییر در اندازه مؤثر جمعیت در طی ۷۰۰ نسل اخیر بر مبنای اطلاعات LD (AZI، KHU، MAZ) به ترتیب مربوط به جمعیت های آذری، خوزستانی و مازندرانی هستند.

Figure 2. Variation in Iranian buffalo effective population size in the last 700 generations based on LD information (The AZI, KHU and MAZ represents Azeri, Khuzestani and Mazandarani populations, respectively)

جدول ۲. برآوردهای اندازه مؤثر جمعیت های گاو میش ایران (Mean±SE) از ۷۰۰ نسل قبل تا نسل حاضر

Table 2. The effective population size estimation of Iranian buffalo populations (Mean±SE) from 700 generations ago until present generation

Distance (Kb)	C	Generation (T)	AZI	KHU	MAZ
70	0.0007	700	1530±38	1375±33	1147±28
80	0.0008	600	1686±40	1335±30	1027±24
100	0.001	500	1374±33	1210±27	890±18
125	0.0013	400	1416±28	1150±23	773±14
170	0.0017	300	1385±27	1042±21	690±14
200	0.002	250	1341±28	1013±21	643±13
250	0.0025	200	1134±19	975±18	601±11
330	0.0033	150	1220±22	932±17	537±8
500	0.005	100	1372±22	894±15	399±4
1000	0.01	50	2189±23	1000±15	249±3
2000	0.02	25	1824±33	828±14	161±3
2500	0.025	20	1602±28	741±13	132±2
3330	0.0333	15	1617±29	627±10	107±2
5000	0.05	10	1354±24	460±8	96±2
5560	0.0556	9	946±17	445±8	75±1
6250	0.0625	8	958±23	429±8	64±1
7140	0.0714	7	938±17	367±7	71±1
8330	0.0833	6	797±18	382±7	56±1
10000	0.1	5	678±12	295±6	57±1
12500	0.125	4	557±11	287±5	46±1
-	-	Present	447±14	226±9	35±5

ستون های AZI، KHU و MAZ به ترتیب مربوط به جمعیت های آذری، خوزستانی و مازندرانی هستند.

The AZI, KHU and MAZ columns are related to Azeri, Khuzestani and Mazandarani populations, respectively.

کدام از جمعیت ها در نسل های مختلف نشان می دهد که مقادیر Ne با دقت بالایی برآورد شده اند. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می گردد یک روند کاهشی برای هر کدام از جمعیت ها به جز آذری که یک افزایشی در طی ۱۰۰ تا ۲۵ نسل قبل نشان می دهد، در طی نسل های گذشته وجود داشته است و این روند کاهشی در طی نسل های اخیر شدت بیشتری

نتایج تخمین های مربوط به میانگین اندازه مؤثر جمعیت ها نشان می دهد که Ne در نسل ۷۰۰ برای جمعیت های آذری، خوزستانی و مازندرانی به ترتیب برابر ۱۵۳۰، ۱۳۷۵ و ۱۱۴۷ می باشد، این مقادیر در نسل حاضر برای جمعیت های آذری، خوزستانی و مازندرانی به ترتیب ۴۴۷، ۲۲۶ و ۳۵ رأس بود (جدول ۲). مقادیر مربوط به انحراف استاندارد برای هر

ژنتیکی قرار دارد. به هر حال، جمعیت گاومیش مازندرانی به دلیل اقتصادی نبودن سطح تولید آن در مقایسه با نژادهای گاوهای اصیل خارجی و استفاده از ماشین آلات کشاورزی به جای گاومیش به عنوان نیروی کار در مزارع، در دهه‌های اخیر شدیداً رو به کاهش بوده و میزان پایین Ne دور از انتظار نیست. همچنین علی‌رغم پایین بودن فشار انتخاب و عدم استفاده از تلقیح مصنوعی برای این جمعیت پایین بودن Ne می‌تواند مربوط به سیستم پرورشی، واقع شدن بخش عمده‌ای از جمعیت در منطقه حفاظت شده میانکاله و جدائی جغرافیایی این جمعیت و در نتیجه تبادل ژنتیکی کم با جمعیت‌های دیگر، باشد. بنابراین انجام کارهای اصلاح نژادی جهت بالا بردن عملکرد تولیدی این جمعیت گاومیشی ضروری است. چرا که اقتصادی بودن برای ترغیب دامداران به پرورش گاومیش در این منطقه از کشور اهمیت دارد. همچنین، بایستی Ne به‌دقت کنترل گردد و سریعاً طرح‌های آمیزشی مناسب و نیز استفاده از دام‌های درون نژادی خارج از منطقه حفاظت شده جهت جلوگیری از افزایش همخونی و انقراض ژنتیکی این جمعیت در نظر گرفته شود.

در خصوص دو جمعیت مورد بررسی دیگر یعنی گاومیش‌های آذری و خوزستانی، تعداد بالای Ne در نسل‌های پیشین و تعداد نسبتاً بالای آن در نسل‌های حاضر برای جمعیت‌های نژادهای آذری و خوزستانی می‌تواند بخاطر فشار انتخاب پایین و عدم استفاده از روش‌های تولید مثلی جدید مثل تلقیح مصنوعی باشد. بررسی‌های نسل حاضر نشان می‌دهد که Ne برای جمعیت‌های آذری و خوزستانی بالاتر از تعداد آستانه‌ای در معرض انقراض ژنتیکی می‌باشد. بالاتر بودن از حد آستانه گویای این است که جمعیت از لحاظ تنوع ژنتیکی به‌طور بلندمدت زنده خواهد بود (Meuwissen, 2009). در هر صورت شیب بالای کاهش اندازه جمعیت برای این جمعیت‌ها نگران‌کننده است و ضرورت ایجاد می‌کند تا جهت حفظ Ne مطلوب و تنوع قابل‌قبول برای این جمعیت‌ها کوشش به‌عمل آید. با توجه به این‌که انجام برنامه‌های محافظت از ذخایر ژنتیکی پرهزینه بوده و امکان

پیدا کرده است. با توجه به اینکه مطالعات نشان می‌دهد. گاومیش اولین بار حدود ۴۵۰۰ سال پیش به ایران وارد شده است و با احتساب فاصله نسلی ۶ سال برای گاومیش (Colli et al., 2016)، افزایش جمعیت ۱۰۰ تا ۲۵ نسل قبل گاومیش آذری مربوط به ۶۰۰ تا ۱۵۰ سال پیش است، این افزایش می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد که یکی از آن‌ها می‌تواند ورود دام‌های جدید به درون جمعیت باشد. همچنین روند کاهش سریع جمعیت که به ۶۰ ساله اخیر مربوط می‌شود، می‌تواند در اثر تغییر نوع سیستم پرورشی، تغییر کارایی گاومیش در کشاورزی ایران و کاهش تمایل دامداران به پرورش این حیوان در سال‌های اخیر، باشد.

با توجه به این‌که تنوع ژنتیکی و محافظت بیولوژیکی به Ne وابسته است (Wang, 2005)، برآورد صحیح اندازه جمعیت جهت جلوگیری از کاهش تنوع و حفظ بقای یک جمعیت بسیار مهم است و عموماً مبنای اصلی تصمیم‌گیران محافظت ژنتیکی خواهد بود. در این حوزه بر اساس گزارش‌های FAO (1992) زمانی که Ne برابر ۲۵، ۵۰، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ باشد، تنوع ژنتیکی در طی ۱۰ نسل به ترتیب در حدود ۱۸، ۱۰، ۴، ۱/۶ و ۰/۸ درصد کاهش خواهد یافت. همچنین شواهد به‌دست آمده از سال ۱۹۸۰ تاکنون مؤید این است که Ne بیشتر از ۱۰۰ فرد برای کاهش محدود در شایستگی (کمتر از ۱۰٪) در طی ۵ نسل برای جمعیت‌های وحشی ضروری است. در حالی‌که جهت حفظ پتانسیل تکاملی جمعیت در بلند مدت این میزان بهتر است بیشتر از ۱۰۰۰ فرد باشد (Frankham et al., 2014). همچنین Meuwissen (2009) نشان داد که اگر Ne بیشتر از ۱۰۰ فرد باشد، جمعیت از لحاظ تنوع ژنتیکی در بلندمدت زنده خواهد بود.

همان‌طور که نتایج بررسی این سه جمعیت نشان می‌دهد، مقدار Ne برای جمعیت گاومیش مازندرانی در نسل حاضر ۳۵ رأس برآورد گردیده است. این مقدار با توجه به تعداد آستانه‌ای برای حفظ جمعیت بسیار پایین‌تر است و نشان می‌دهد که این جمعیت وضعیت نگران‌کننده‌ای داشته و در معرض انقراض

برای جمعیت مازندرانی نشان می‌دهد این جمعیت از لحاظ ژنتیکی در معرض انقراض قرار دارد. بنابراین بایستی Ne به دقت کنترل گردد و نیز با اقتصادی کردن تولید و طراحی تلاقی‌های مناسب از افزایش هم‌خونی و انقراض ژنتیکی این جمعیت‌ها جلوگیری کرده و جمعیت را حفاظت ژنتیکی کرد.

سپاسگزاری

از مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور و مراکز امور دام استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، خوزستان، کرمانشاه و مازندران که حمایت مالی این پروژه را بر عهده داشتند و به‌خاطر همکاری‌شان در نمونه‌برداری و ثبت رکورد صفات تیپ و تولید همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد. هماهنگ‌کننده این تحقیق، شرکت دانشگاهی و دانش‌بنیان «توسعه کشت و دام نواندیش البرز (تکدانا)» بوده است که از آن شرکت نیز تقدیر و تشکر می‌گردد. همچنین از مؤسسه تحقیقاتی Padano به‌خاطر کمک‌های ارزنده‌یشان در خصوص تعیین ژنوتیپ حیوانات داده‌ها قدردانی می‌گردد.

ذخیره‌کردن تمام تنوع در محیط‌های آزمایشگاهی و ایستگاه‌های تحقیقاتی وجود ندارد، بنابراین حفظ تنوع ژنتیکی در محل زندگی حیوان یکی از راه‌کارهای مفید در جهت حفظ تنوع ژنتیکی می‌باشد (Nei, 1973). در این روش بایستی از کسانی که از این تنوع بهره می‌برند حمایت کرده و در آنها ایجاد انگیزه نمود. ایجاد انگیزه در پرورش‌دهندگان بستگی به این دارد که دام مورد نظر عملکرد قابل قبول داشته و پرورش آن به‌لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه باشد، یکی از مؤثرترین روش‌ها، افزایش عملکرد مداوم دام با ابزارهای اصلاح نژادی است.

نتیجه‌گیری کلی

اندازه مؤثر جمعیت‌های گاومیش آذری و خوزستانی نسبتاً بالا است و این جمعیت‌ها از لحاظ ژنتیکی در معرض انقراض قرار ندارد. ولی شیب بالای کاهش اندازه جمعیت برای این جمعیت‌ها نگران‌کننده است و بایستی جهت حفظ Ne مطلوب و تنوع قابل‌قبول برای این جمعیت‌ها برنامه‌ریزی صورت گیرد. تخمین Ne

REFERENCES

- Barton, N. H. & Charlesworth, B. (1998). Why sex and recombination? *Science*, 281, 1986-1990.
- Bohmanova, J., Sargolzaei, M. & Schenkel, F. S. (2010). Characteristics of linkage disequilibrium in North American Holsteins. *BMC genomics*, 11, 421-432.
- Browning, S. R. & Browning, B. L. (2007). Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole genome association studies by use of localized haplotype clustering. *The American Journal of Human Genetics*, 81, 1084-1097.
- Caballero, A. (1994). Developments in the prediction of effective population size. *Heredity*, 73(6), 657-679.
- Campbell, A. M., Williamson, J., Padula, D. & Sundby, S. (1997). Use PCR & single hair to produce a "DNA Fingerprint". *The American Biology Teacher*, 59(3), 172-178.
- Charlesworth, B., Nordborg, M. & Charlesworth, D. (1997). The effects of local selection, balanced polymorphism and background selection on equilibrium patterns of genetic diversity in subdivided populations. *Genetics Research*, 70, 155-174.
- Colli, L., Milanese, M., Vajana, E., Iamartino, D. & et al. (2016). Water buffalo genomic diversity and post domestication migration routes. PAG (Plant and Animal Genome XXIII Conference), Buffalo Session, San Diego, CA (USA).
- Crow, J. F. & Kimura, M. (1970). *An Introduction to Population Genetics Theory*. New York: Harper and Row.
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J. & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14, 209-214.
- Flury, C., Tapio, M., Sonstegard, T., Drögemüller, C., Leeb, T., Simianer, H., Hanotte, O. & Rieder, S. (2010). Effective population size of an indigenous Swiss cattle breed estimated from linkage disequilibrium. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 127(5), 339-347.
- Frankham, R., Bradshaw, C.J.A. & Brook, B.W. (2014). Genetics in conservation and management Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, 170, 56-63.
- Hayes, B. J., Visscher, P. M., McPartlan, H. C. & Goddard, M. E. (2003) Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome Research*, 13(4), 635-643.

13. Hill, W. & Robertson, A. (1968). Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 38(6), 226-231.
14. Kijas, J. W., Lenstra, J. A., Hayes, B., Boitard, S., Neto, L. R. P., San Cristobal, M., Servin, B., McCulloch, R., Whan, V., Gietzen, K. & Paiva, S. (2012). Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS Biology*, 10(2), e1001258. doi:10.1371/journal.pbio.1001258.
15. Lynch, M., Conery, J. & Burger, R. (1995). Mutation accumulation and the extinction of small populations. *The American Naturalist*, 146, 489-518.
16. Meuwissen, T. (2009). Genetic management of small populations: A review. *Act Agriculture Sand Section A*, 59(2), 71-79.
17. Nei, M. (1973). Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(1), 3321-3323.
18. Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A. & Reich, D. (2006). Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 38, 904-909.
19. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J. & Sham, P. C. (2007). PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *The American Journal of Human Genetics*, 81, 559-575.
20. Robertson, A. (1961). Inbreeding in artificial selection programmes. *Genetics Research*, 2, 189-194.
21. Smith, J. M. & Haigh, J. (1974). The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetics Research*, 23, 23-35.
22. Sved, J. (1971). Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theoretical Population Biology*, 2(2), 125-141.
23. Villa-Angulo, R., Matukumalli, L. K., Gill, C. A., Choi, J., Van-Tassell, C. P. & Grefenstette, J. J. (2009). High-resolution haplotype block structure in the cattle genome. *BMC Genetics*, 10, 19. doi:10.1186/1471-2156-10-19.
24. Wang, J. (2005). Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1459), 1395-1409.
25. Wang, J. L. (2004). Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conservation Biology*, 18, 332-343.
26. Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16, 97-159.
27. Yang, S., Li, X., Li, K., Fan, B. & Tang, Z. (2014). A genome-wide scan for signatures of selection in Chinese indigenous and commercial pig breeds. *BMC Genetics*, 15(7), 9. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/15/7>.