

ارزیابی ژنتیکی اندازه مؤثر جمعیت برخی از نژادهای گوسفند ایرانی با استفاده از اطلاعات عدم تعادل پیوستگی

محمد حسین مرادی^{۱*}، امیر حسین فراهانی^۱ و اردشیر نجاتی جوارمی^۲
۱. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۲. دانشیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲)

چکیده

هدف از این تحقیق برآورد اندازه مؤثر (Ne) برخی از نژادهای گوسفند ایرانی با استفاده از اطلاعات نشانگرهای SNP در سطح ژنگان (ژنوم) بود. به این منظور از اطلاعات ژنتیکی مجموع ۲۱۷ نمونه حیوان شامل ۴۵، ۳۷، ۳۴، ۳۵، ۴۵ و ۱۱ نمونه به ترتیب از نژادهای زل، افشاری، مغانی، قزل، لری-بختیاری و یک نژاد گوسفند وحشی ایرانی که با استفاده از آرایه‌های Illumina OvineSNP50K Beadchip تعیین ژنوتیپ شده‌اند، استفاده شد. این تحقیق با همکاری پروژه Sheep HapMap انجام شد. اندازه مؤثر با استفاده از اطلاعات نداشتن تعادل پیوستگی (لینکاژی) در طی ۴ تا ۳۵۰۰ نسل پیش محاسبه شد. نتایج تجزیه مؤلفه‌های واریانس (PCA) نشان داد که همه نژادها با استفاده از دو مؤلفه اول از همدیگر مجزا می‌شوند. میانگین ناخالصی (هتروزیگوسیت) مورد انتظار و مشاهده شده در نژادهای مختلف به ترتیب در دامنه ۰/۳۶-۰/۳۷ و ۰/۳۷-۰/۴۳ به دست آمد. نتایج به دست آمده از محاسبه اندازه مؤثر در نژادهای مختلف، نشان‌دهنده روند کاهش تدریجی Ne در طی ۳۵۰۰ سال گذشته تاکنون با یک شیب کاهشی زیاد در حدود ۵۵۰ نسل پیش برای همه نژادها بود. اندازه Ne در نسل‌های حاضر (۴ نسل قبل) در نژادهای گوسفند ایرانی در دامنه ۹-۸۹ رأس بود. بیشترین Ne در نژاد زل (۸۹ رأس) و کمترین در نژادهای افشاری (۴۴ رأس) و نژاد وحشی گوسفند (۹ رأس) مشاهده شد. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که با وجود تنوع ژنتیکی مناسب در این جمعیت‌ها، اندازه مؤثر آن‌ها به‌ویژه در نژاد گوسفند افشاری و نژاد وحشی در طی نسل‌های اخیر به شدت کاهش یافته است و طراحی برنامه‌های مناسب برای حفاظت از حیوانات خالص باقی‌مانده این نژادهای بومی ضروری است.

واژه‌های کلیدی: تجزیه مؤلفه واریانس، ژنتیک حفاظت، نژادهای گوسفند ایرانی، ناخالصی، نشانگرهای تک نوکلئوتیدی.

Genome-wide evaluation of effective population size in some Iranian sheep breeds using linkage disequilibrium information

Mohammad Hossein Moradi^{1*}, Amir Hossein Farahani¹ and Ardeshir Nejati-Javaremi²

1. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2. Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran
(Received: Aug. 21, 2016 - Accepted: Feb. 20, 2017)

ABSTRACT

The aim of the present study was to estimate the effective population size (Ne) in some Iranian sheep breeds using genome wide SNP data. A total of 217 animal samples consisting of 45, 37, 34, 35, 45 and 11 samples from Zel, Afshari, Moghani, Qezel, Lori-Bakhtiari and a wild-type of Iranian sheep breeds, genotyped by Illumina OvineSNP50K Beadchip assay were used in this study respectively. This study has been performed in collaboration with the Ovine HapMap project. The Ne was estimated using linkage disequilibrium across 4 up to 3500 generations ago. The result of principal component analysis (PCA) indicated that all breeds will be separated from each other in the first two principal components. Average expected and observed heterozygosity for different breeds ranged 0.36-0.37 and 0.37-0.43 respectively. The Ne results showed a decreasing trend over the last 3500 generations for all breeds, with an increasingly slope since about last 550 generations. The Ne in Iranian sheep breeds for 4 generations ago were ranged from 9 up to 89. The highest historically effective population size was found for Zel breed (89 heads) and the lowest for Afshari (44 heads) and wild_type (9 heads) sheep breeds. Generally, the results indicated that although a considerable genetic variation exists in these populations, however Ne has been decreased strongly in Iranian sheep breeds especially in Afshari and wild-type sheep breeds during recent years and designing of appropriate programs is necessary to conserve remaining purebred animals of these indigenous sheep breeds.

Keywords: Effective population size, genetic conservation, genome wide evaluation, Iranian sheep breeds.

مقدمه

بنابر شواهد و مدارک موجود ایران یکی از مهدهای اصلی اهلی‌سازی گوسفند در جهان به‌شمار می‌آید (Zeder *et al.*, 1999). یافته‌های باستان‌شناسی پیشنهاد می‌کنند که اهلی‌سازی گوسفند حدود ۹۰۰۰ سال پیش (Kijas *et al.*, 2009) در مناطقی در شمال عراق امروزی و مناطق مجاور آن در ایران رخ داده است (Zeder *et al.*, 1999). اما باوجود پیشینه درازمدت در پرورش این دام در کشور، هنوز تغییرپذیری زیادی در این بخش صورت نگرفته است و به‌طور عمده نگاهی سنتی به گوسفند و گوسفندداری وجود دارد. نداشتن شجره مناسب و رکوردهای دقیق برای دیگر صفت‌ها و مشخص نبودن هدف‌های اصلاح نژادی از جمله مشکلاتی است که اجرای برنامه‌های تحقیقاتی و کاربردی در این زمینه را محدود می‌کند. بنابراین در شرایط موجود و با توسعه روش‌های ژنتیکی (ژنومی)، طراحی و اجرای پژوهش‌هایی که بتوانند با در نظر گرفتن این مشکلات، در توسعه این بخش و اجرای تحقیقات بعدی تأثیرگذار باشند، ضروری به‌نظر می‌رسد.

نیاز به تولید بیشتر، توجه ویژه به نژادهایی با عملکرد بالا، ورود حیوانات اصلاح‌شده خارجی و گاهی استفاده گسترده از تلاقی‌های برنامه‌ریزی نشده باعث شده است تا هم‌اکنون فراوانی بسیاری از نژادهای بومی جهان کاهش یابد و در نتیجه بسیاری از این نژادها در معرض خطر انقراض و فرسایش ژنتیکی قرار گیرند (Moradi *et al.*, 2013). اندازه مؤثر جمعیت (N_e) یکی از مهم‌ترین فراسنجه‌ها در ژنتیک جمعیت به‌شمار می‌آید که میزان تنوع ژنتیکی، هم‌خونی و رانش تصادفی را در جمعیت مشخص می‌کند (Frankham, 2005). اندازه مؤثر نه تنها اطلاعاتی از روند تکاملی گونه‌ها و نژادهای مختلف فراهم می‌کنند، بلکه درک ما را در فهم و مدل‌سازی معماری ژنتیکی صفات پیچیده توسعه می‌دهند (Tenesa *et al.*, 2007). هنگامی که اندازه مؤثر کوچک است، تنوع ژنتیکی درون جمعیت نیز محدود می‌شود که روی میزان پیشرفت ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی تأثیرگذار است. از سویی پیش از انجام هرگونه اقدام

در ارتباط با حفاظت از ذخایر ژنتیکی یک جمعیت دامی، بایستی از اندازه مؤثر و تنوع ژنتیکی آن نژاد اطلاعات کسب کرد (Zhao *et al.*, 2014).

اندازه مؤثر جمعیت را می‌توان بر پایه یکی از سه روش جمعیت‌شناختی (دموگرافیک)، شجره و نشانگر محاسبه کرد (Flury *et al.*, 2010). فراسنجه‌های جمعیت‌شناختی تنها برای جمعیت‌هایی که اطلاعات آن‌ها برای نسل‌های طولانی در دسترس است قابل‌پیگیری است، به‌ویژه در جمعیت‌های کوچک دامی به‌طور معمول این اطلاعات موجود نیستند. شجره به‌صورت مرسوم برای برآورد اندازه مؤثر در جمعیت‌های دامی استفاده می‌شود که به‌عنوان نمونه می‌توان به محاسبه اندازه مؤثر در نژادهای گوسفند ایرانی مغانی (Mokhtari *et al.*, 2015)، افشاری (Ghafouri-Kesbi, 2011) و بلوچی (Tahmoorespur & Sheikhloo, 2011) با استفاده از این اطلاعات اشاره کرد. به‌رحال برآورد به‌دست‌آمده از شجره تا حد زیادی به عمق شجره و کامل بودن آن بستگی دارد که این اطلاعات تنها برای برخی از جمعیت‌های دامی در دسترس است و در عمل استفاده از این روش‌ها تنها در شمار بسیار کمی از نژادها با مدیریت بالا امکان‌پذیر است (Uimari & Tapio, 2011).

یک راه‌حل برای رفع این محدودیت استفاده از اطلاعات ژنتیکی است. پیشرفت‌های اخیر در زمینه تعیین ژنوتیپ و طراحی آرایه‌های SNP (SNP Chip) امکان گردآوری مقادیر بالای اطلاعات نشانگری و نداشتن تعادل پیوستگی (LD: Linkage Disequilibrium) را برای محاسبه اندازه مؤثر در جمعیت‌های مختلف انسانی و دامی فراهم آورده است (Corbin *et al.*, 2010; Kijas *et al.*, 2012). نتایج تحقیقات مختلفی نشان داده‌اند که امکان برآورد اندازه مؤثر از روی اطلاعات نداشتن تعادل پیوستگی (لینکاژی) (LD) وجود دارد (Sved, 1971; Hill, 1981). LD به‌صورت ارتباط غیرتصادفی آلل‌ها در جایگاه‌های مختلف در اثر عملکرد نوترکیبی بین موقعیت‌های فیزیکی جایگاه‌های مختلف ژنگان تعریف می‌شود (Sved, 1971). بیشتر تحقیقات در زمینه برآورد اندازه مؤثر در دام‌ها روی گاو شیری متمرکز

شده است (Saatchi et al., 2011). به عنوان نمونه Qanbari et al. (2010) گزارش کردند که اندازه مؤثر جمعیتی در نژاد هلشتاین آلمانی در چهار نسل پیش نزدیک به ۱۰۳ رأس بوده است. به هر حال شمار بسیار کمی از تحقیقات اندازه مؤثر جمعیتی در گوسفند را با استفاده از فناوری آرایه‌های SNP برآورد زده است. Buren et al. (2014) با استفاده از اطلاعات نداشتن تعادل پیوستگی بین ۴۹۰۳۴ نشانگر SNP تعیین ژنوتیپ شده در هفت نژاد سوئسی، به صورت موفقیت‌آمیزی اندازه مؤثر را بررسی کردند. بر پایه بررسی منابع انجام شده تحقیقات بسیار اندکی در این زمینه در نژادهای گوسفند ایرانی انجام نشده است. Moradi et al. (2012) با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب در نژادهای زل و لری بختیاری، اندازه مؤثر را در این نژادها بین ۲۰۰۰-۲۰ نسل پیش محاسبه کردند و گزارش کردند که اندازه مؤثر در این نژادها از حدود ۴۹۰۰ حیوان در ۲۰۰۰ نسل پیش به ترتیب به ۸۴۰ و ۵۳۲ حیوان در نژادهای زل و لری بختیاری در حدود ۲۰ نسل پیش کاهش یافته است. هدف از این تحقیق برآورد اندازه مؤثر جمعیت در پنج نژاد بومی ایرانی شامل زل، قزل، مغانی، افشاری و لری بختیاری با استفاده از اطلاعات LD در سطح ژنگان بود که با همکاری پروژه Sheep HapMap انجام شد. در این تحقیق همچنین از اطلاعات یک نژاد وحشی گوسفند ایرانی نیز که با استفاده از آرایه همسان تعیین ژنوتیپ شده، استفاده شد. نتایج این تحقیق می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه درک بهتر و مدل کردن معماری ژنتیکی نژادهای بومی فراهم آورد.

داده‌های تعیین ژنوتیپ مربوط به نژادهای افشاری، قزل و مغانی از پروژه بین‌المللی HapMap گوسفندی تهیه شد. داده‌های مربوط به نژاد وحشی گوسفند ایرانی نیز در یک پروژه مستقل از یک باغ وحش در منطقه مرکزی ایران واقع در شهر اراک گردآوری شد که در قالب یک طرح مشترک با مرکز AgResearch نیوزیلند تعیین ژنوتیپ شدند. استخراج DNA در نمونه‌های مربوط به نژادهای زل، لری-بختیاری و گوسفند وحشی با استفاده از روش بهینه استخراج نمکی (Helmes, 1990) از خون کامل انجام شد. تعیین ژنوتیپ در همه نمونه‌ها نیز با استفاده از آرایه‌های Illumina Ovine SNP 50K BeadChip که امکان ژنوتیپ همزمان حدود ۵۰۰۰۰ جایگاه نشانگری را فراهم می‌آورد انجام شد.

ویرایش داده‌ها

در این تحقیق برای اطمینان از کیفیت داده‌های به دست آمده از تعیین ژنوتیپ در تجزیه‌های نهایی مراحل مختلف کنترل کیفیت روی داده‌های اولیه اعمال شد (جدول ۱). در آغاز مجموع ده حیوان در نژادهای مختلف که دارای بیش از ۵ درصد ژنوتیپ از دست‌رفته بودند و یا بر پایه تجزیه PCA خارج از گروه نژادی خود قرار داشتند از تجزیه‌های بعدی کنار گذاشته شدند. تجزیه PCA با استفاده از نرم‌افزار R و با استفاده از تابع prcomp اجرا شد. قابل بیان است اجرای این مرحله از ویرایش در نژادهای زل، لری-بختیاری و نژاد وحشی در این تحقیق انجام شد و در نژادهای افشاری، مغانی و نژاد قزل پیشتر در پروژه Sheep HapMap اجرا شده بود. از آنجاکه چگونگی

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و تعیین ژنوتیپ

در این بررسی برای محاسبه اندازه مؤثر جمعیت برخی گوسفندان بومی ایران از اطلاعات ژنوتیپی مجموع ۲۱۷ حیوان مربوط به نژادهای زل (۴۷ رأس)، لری بختیاری (۴۷ رأس)، افشاری (۴۱ رأس)، قزل (۳۵ رأس)، مغانی (۳۵ رأس) و یک نژاد وحشی گوسفند ایرانی (۱۲ نمونه) استفاده شد. داده‌های مربوط به نژادهای گوسفند زل و لری بختیاری از تحقیق

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و تعیین ژنوتیپ

در این بررسی برای محاسبه اندازه مؤثر جمعیت برخی گوسفندان بومی ایران از اطلاعات ژنوتیپی مجموع ۲۱۷ حیوان مربوط به نژادهای زل (۴۷ رأس)، لری بختیاری (۴۷ رأس)، افشاری (۴۱ رأس)، قزل (۳۵ رأس)، مغانی (۳۵ رأس) و یک نژاد وحشی گوسفند ایرانی (۱۲ نمونه) استفاده شد. داده‌های مربوط به نژادهای گوسفند زل و لری بختیاری از تحقیق

باید توجه کرد که هرچند نداشتن تعادل هاردی واینبرگ در جایگاه‌های مختلف به‌حتم نشان‌دهنده خطای تعیین ژنوتیپ نیست و عامل‌های مختلفی همچون انتخاب، رانش و جهش نیز می‌توانند باعث انحراف از تعادل شوند، با این وجود همان‌طور که در مقاله Teo *et al.* (2007) به تفسیر بیان شده است انحراف‌های شدید از این تعادل به‌احتمال زیاد به دلیل خطای تعیین ژنوتیپ و اشتباه در مراحل اتصال آغازگر (پرایمر)ها در هنگام ژنوتیپ نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های SNP Chip رخ می‌دهد. در نهایت ژنوتیپ‌های از دست‌رفته با استفاده از بسته Beagle نرم‌افزار R ایمپیوت شدند (Browning & Browning, 2009) و با حذف نشانگرهای با موقعیت ناشناخته، SNP‌های باقی‌مانده در تجزیه‌های بعدی استفاده شدند. در نهایت، برای SNP‌های باقی‌مانده ناخالصی (هتروزیگوسیتی) مشاهده شده و مورد انتظار نیز در بسته R بر پایه رابطه Nei *et al.* (1978) محاسبه شد.

وراثت جایگاه‌های موجود در کروموزوم‌های X و Y بین دو جنس نر و ماده با هم متفاوت است (Karimi *et al.*, 2015) به‌منظور یکسان شدن نشانگرهای مورد استفاده در هر دو جنس، در این تحقیق از نشانگرهای کروموزومی غیرجنسی (اوتوزومی) استفاده شد. به همین خاطر در این مرحله، ۱۲۰۳ نشانگر SNP که روی کروموزوم‌های جنسی X و Y واقع شده بودند و سپس SNP‌هایی که در هر نژاد فراوانی آلل نادر کمتر از ۰/۰۲ داشتند، از مجموعه داده‌ها حذف شدند. برای SNP‌های باقی‌مانده آن‌هایی که در هر کدام از نژادهای مورد بررسی تعادل هاردی-واینبرگ نداشتند به‌عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ (Teo *et al.*, 2007) کنار گذاشته شدند. برای به‌دست آوردن سطح معنی‌داری در این آزمون از تصحیح بنفرونی ($\beta = \alpha/n$) استفاده شد. که در این رابطه n شمار آزمون و همان شمار نشانگرهای SNP ($n=5000$) و خطای آزمایش $\alpha=0.05$ در نظر گرفته شدند که در نتیجه سطح احتمال معنی‌داری $\beta=10^{-6}$ خواهد شد.

جدول ۱. مراحل مختلف ویرایش اعمال‌شده روی داده‌های ژنوتیپی نژادهای مختلف گوسفند مورد بررسی

Step	Zel	Lori_Bakhtiari	Afshari	Moghani	Qezel	Wild_type
Number of animals	47	47	41	35	35	12
Animals excluded due to >5% genotyping failure and PCA admixture	2	2	4	1	0	1
Remaining animals	45	45	37	34	35	11
Number of SNPs	49018	49018	49018	49018	49018	49018
Excluding the sexual chromosomes SNPs	1203	1203	1203	1203	1203	1203
SNPs excluded with MAF<2%	1558	1883	2613	1911	1555	14948
SNPs excluded with deviation from HWE ($<10^{-6}$)	41	45	13	22	31	0
Excluding unknown SNPs	318	307	307	305	301	215
Remaining SNPs	45898	45580	44882	45577	45928	32652

است. ارزش‌های LD محاسبه شده (r^2) برای برآورد اندازه مؤثر جامعه در طی نسل‌های گذشته استفاده شد. Corbin *et al.* (2012) رابطه LD و اندازه مؤثر جمعیتی را با رابطه زیر نشان دادند که امکان تصحیح برای اندازه جامعه و نامشخص بودن حالت گامتی را فراهم می‌کند:

$$N_{T(t)} = (4f(c_t))^{-1} (E[r_{adj}^2 | c_t]^{-1} - \alpha)$$

که در این رابطه N_t اندازه مؤثر جمعیت در t نسل گذشته است که $t = (2f(c_t))^{-1}$ است (Hayes *et al.*, 2003) و c_t میزان نوترکیبی است که بر پایه فاصله‌های

برآورد اندازه مؤثر جمعیتی

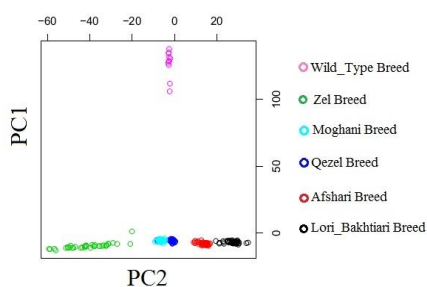
در این تحقیق در آغاز نداشتن تعادل پیوستگی بین جایگاه‌های نشانگری با استفاده از معیار ضریب مربع همبستگی بین دو جایگاه (r^2) به روش Hill & Robertson (1968) محاسبه شد:

$$r^2 = \frac{\text{freq}(A1B1) \times \text{freq}(A2B2) - \text{freq}(A1B2) \times \text{freq}(A2B1)}{\text{freq}(A1) \times \text{freq}(A2) \times \text{freq}(B1) \times \text{freq}(B2)}$$

در این رابطه برای مثال $\text{freq}(A1-B1)$ فراوانی نشانگر ۱ آلل ۱ و نشانگر ۲ آلل ۱ است و $\text{freq}(A1)$ فراوانی نشانگر ۱ آلل ۱ و $\text{freq}(B1)$ فراوانی نشانگر ۲ آلل ۱

مشاهده می‌شود بیشترین و کمترین شمار نشانگر باقی‌مانده به ترتیب در نژادهای قزل و نژاد وحشی گوسفند مشاهده می‌شود. این مشاهده را می‌توان به اریب ناشی از انتخاب SNPها در ایجاد آرایه‌ها نسبت داد. با توجه به اینکه اطلاعات ژنگانی نژاد قزل در طراحی آرایه‌های SNP Chip در گوسفند استفاده شده، درحالی‌که در طراحی این آرایه‌ها از شمار اندکی نژاد وحشی جهان استفاده شده است و نژادهای وحشی ایرانی مورد توجه نبوده‌اند (Zhao *et al.*, 2014; Lachance & Tishkoff, 2013).

نتایج تجزیه PCA نشان داد که PC1 باعث جدا شدن نژادهای اهلی و وحشی از یکدیگر شده و سپس همه نژادهای اهلی نیز روی PC2 از گروه نژادی خود فاصله می‌گیرد (شکل ۱). این تجزیه به‌منظور بررسی چگونگی قرار گرفتن حیوانات در گروه‌های نژادی خود و اطمینان از نبود اختلاط جمعیتی بین نمونه‌های باقی‌مانده استفاده شد که نتایج به‌خوبی نشان‌دهنده تمایز جمعیت‌ها از همدیگر بر پایه اطلاعات ژنگانی آنها بود. در این تجزیه PC1 و PC2 به ترتیب ۴/۷ درصد و ۲/۷ درصد کل واریانس را به خود اختصاص می‌دادند.



شکل ۱. خوشه‌بندی حیوانات بر پایه تجزیه PCA با استفاده از اطلاعات ژنوتیپ نمونه‌ها

Figure 1. Animals clustered on the basis of principal components analysis using individual genotypes

ناخالصی مشاهده‌شده و مورد انتظار از فراسنجه‌های مهم در بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای مختلف و محاسبه بسیاری از شاخص‌های ژنتیکی هستند. در این تحقیق

فیزیکی بین نشانگرها به دست می‌آید، α عامل تصحیح برای جهش (Ohta & Kimura, 1971) و r^2_{adj} ارزش LD تصحیح‌شده بر پایه اندازه نمونه و حالت گامتی است که به صورت زیر محاسبه می‌شود (Weir & Hill, 1980).

$$r^2_{adj} = r^2 - (\beta n)^{-1}$$

که در این رابطه n اندازه نمونه و برای β میزان ۲ در صورت مشخص بودن حالت گامتی و ۱ در صورت نامشخص بودن حالت گامتی در نظر گرفته می‌شود.

چندین تقریب برای استنباط میزان نوترکیبی (c) با استفاده از فاصله‌های فیزیکی (δ) بین دو جایگاه و تبدیل آن به فاصله‌های پیوستگی (d) استفاده شده است که به صورت $Mb(\delta) = cM(d)$ نمایش داده می‌شود. در ارزش‌های پایین d تقریب به دست‌آمده قابل اعتماد است اما برای ارزش‌های بالای d احتمال نوترکیبی‌های چندگانه افزایش می‌یابد و با توجه به اینکه رابطه بین فاصله فیزیکی و میزان نوترکیبی به صورت خطی نیست (چون بیشترین میزان نوترکیبی برابر ۰/۵ است) این تقریب قابل اعتماد نیست. به همین خاطر در این تحقیق برای ارتباط بین d و c از روش Sved (1971) استفاده شد که بر پایه رابطه:

$$c = \frac{(1 - \frac{d}{2})}{(1 - d)^2}$$

در این تحقیق از نظام تعیین Bin برای محاسبه ارزش‌های میانگین r^2 در فاصله‌های ۰/۱ تا ۱۰ Mb استفاده شد (BarBato *et al.*, 2015) که LD را در فاصله‌های مختلف و در نتیجه اندازه مؤثر جمعیت را در نسل‌های مختلف در گذشته از فاصله ۳۵۰۰ تا ۴ نسل پیش منعکس می‌کند. همه تجزیه‌های انجام‌شده برای محاسبه اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از نرم‌افزار محاسبه اندازه مؤثر جمعیت (BarBato *et al.*, 2015) SNeP v1.1 و فایل‌های ورودی برنامه PLINK v1.07 شامل ped و map. (Purcell *et al.*, 2007) انجام شد.

نتایج و بحث

مراحل مختلف ویرایش داده‌ها روی ۴۹۰۱۸ جایگاه نشانگری SNP در ۲۱۷ نمونه از نژادهای مختلف گوسفند ایرانی اجرا شد. همان‌طور که در جدول ۱

توجه قرار گرفته است. Al Mamun *et al.* (2015) با استفاده از آرایه SNP Chip تنوع ژنتیکی را در پنج نژاد گوسفند استرالیایی شامل سه نژاد خالص لسیستر، مرینوس و دورست بی شاخ و دو نژاد آمیخته بررسی و ناخالصی مورد انتظار را در دامنه ۰/۳۰-۰/۳۸ و ناخالصی مشاهده شده را در دامنه ۰/۴۰-۰/۳۰ گزارش کردند. در حالی که تنوع مورد انتظار و مشاهده شده در نژادهای خالص لسیستر، دورست بی شاخ و مرینوس همسان با هم و به ترتیب ۰/۳۰، ۰/۳۴ و ۰/۳۸ به دست آمده است، نتایج بررسی تنوع ژنتیکی در نژادهای ایرانی نشان می دهد، تنوع در همه نژادها بالا و با تنوع گزارش شده در نژاد مرینوس در تحقیق پیش همخوانی دارد. نکته شایان توجه در این بخش تنوع ژنتیکی مناسب مشاهده شده در نژاد وحشی گوسفند است. با توجه به شمار کم این حیوانات و انجام آمیزش های خویشاوندی شدید در بین این حیوانات در باغ وحش بر پایه بررسی های محلی، نتایج این تحقیق نشان می دهد هنوز تنوع مناسبی در بین این حیوانات وجود دارد که امکان انجام برنامه های حفظ گونه ای را فراهم می آورد. میانگین فراوانی کمینه در همه نژادها حدود ۰/۲۸ به دست آمد که با تحقیق Al Mamun *et al.* (2015) همخوانی دارد. درصد آلل های در حال نداشتن تعادل هاردی واینبرگ ($p < 0.05$) در نژادهای مختلف با هم متفاوت و بیشترین درصد در نژاد قزل (۵/۲ درصد) و کمترین میزان در نژاد وحشی (۲/۹ درصد) گوسفند مشاهده شد. Karimi *et al.* (2015) در تحقیقی همسان در جهت برآورد اندازه مؤثر گاو بومی سرابی میانگین MAF و درصد آلل های در حال نداشتن تعادل را به ترتیب ۰/۲۳ و ۱/۸ درصد گزارش کردند که مقادیر مشاهده شده در گوسفندان بومی بیشتر از این مقادیر است.

تنوع ژنتیکی مورد انتظار و مشاهده شده در نژادهای مختلف گوسفند ایرانی به ترتیب در دامنه ۰/۳۶-۰/۴۳ و ۰/۳۷-۰/۴۳ به دست آمد (جدول ۲). بیشترین تنوع ژنتیکی مورد انتظار در نژادهای قزل و مغانی (۰/۳۷۳) و کمترین تنوع در نژاد افشاری (۰/۳۶۴) مشاهده شد. این فراسنجه ها در گذشته با استفاده از نشانگرهای محدود در گونه های مختلف محاسبه می شدند. Esmailkhanian & Banabazi (2006) تنوع ژنتیکی را در پنج نژاد گوسفند ایرانی سنجایی، کردی کردستان، کردی خراسان، مهربان و مغانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای بررسی کردند و کمترین و بیشترین تنوع را بین ۰/۷۴۴ تا ۰/۸۴۷ به ترتیب در نژادهای کردی خراسان و مغانی گزارش کردند. همچنین Molaee *et al.* (2009) نیز با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای تنوع ژنتیکی را در شش نژاد گوسفند ایرانی قشقایی، لری، کبوده شیراز، بختیاری، سنجایی و عربی خوزستان بررسی و مشاهده کردند که هتروزیگوسیتی مورد انتظار بین ۰/۷۴۷ در نژاد قشقایی تا ۰/۷۹۲ در نژاد کبوده شیراز متغیر است. Pons *et al.* (2015) میانگین ناخالصی مورد انتظار و مشاهده شده را در نژادهای گوسفند بالریک با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای به ترتیب ۰/۶۹ و ۰/۶۲ و Moradi *et al.* (2013) میانگین ناخالصی مورد انتظار را در بین توده های بز مرخز با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهورهای ای SSR، ۰/۳۴ گزارش کرده اند. یکی از دلایل اصلی گسترش استفاده از نشانگرهای ریزماهورها در بررسی تنوع ژنتیکی بالا بودن میزان چندشکلی و هتروزیگوسیتی در این نشانگرها است (Molaee *et al.*, 2009). با این وجود، این نوع نشانگرها قادر به پوشش کل ژنگان نیستند. با گسترش آرایه های ژنگانی در گونه های مختلف محاسبه تنوع ژنتیکی در سطح ژنگان نیز مورد

جدول ۲. میانگین ناخالصی مشاهده شده و مورد انتظار، فراوانی آلل نادر و درصد آلل های در حال نداشتن تعادل هاردی-واینبرگ در مجموعه داده های SNP ویرایش شده در نژادهای مختلف گوسفند ایرانی

Table 2. The mean of expected and observed heterozygosity, minor allele frequency and percent of alleles with deviation from Hardy-Weinberg equilibrium in genotyping data after cleaning of Iranian sheep breeds

Characteristic	Zel	Lori_Bakhtiari	Afshari	Moghani	Qezel	Wild_type
Expected Heterozygosity	0.370	0.369	0.364	0.373	0.373	0.367
Observed Heterozygosity	0.373	0.378	0.377	0.379	0.374	0.439
Average of MAF	0.283	0.282	0.277	0.285	0.286	0.278
Number (percent) of SNPs with deviation from HWE (<0.05)	2196 (4.8%)	2230 (4.9%)	1908 (4.3%)	2163 (4.8%)	2379 (5.2%)	970 (2.9%)
Number (percent) of SNPs with deviation from HWE (<0.01)	568 (1.3%)	622 (1.4%)	412 (0.91%)	562 (1.2%)	639 (1.4%)	215 (0.65%)

نژادهای گوسفند ایرانی مغانی و بلوچی با استفاده از اطلاعات شجره‌ای به ترتیب ۲۲۶ و ۱۳۴ رأس گزارش کردند. Leroy *et al.* (2013) اندازه مؤثر را در ۴۰ نژاد گوسفند با استفاده از اطلاعات شجره‌ای بررسی و گزارش کردند، میانگین اندازه در نژادهای مختلف در طی این نسل‌ها حدود صد رأس است. Danchin-berg *et al.* (2010) نیز از شجره برای برآورد اندازه مؤثر در هفت نژاد کوچک در فرانسه استفاده و گزارش کردند، اندازه بین ۶۵ تا ۲۳۱ رأس متغیر است. این نتایج تا حدودی با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. به‌رحال اشتباهاتی که به‌طور معمول در ثبت شجره‌ها رخ می‌دهد، روی اندازه برآورد زده‌شده تأثیرگذار هستند (Corbin *et al.*, 2010). به همین خاطر در این تحقیق از اطلاعات نداشتن تعادل پیوستگی (LD) به‌دست‌آمده از آرایه‌های SNP در برآورد اندازه مؤثر نژادهای مختلف گوسفند ایرانی استفاده شده است. در مجموع LD در فاصله‌های نوترکیبی بزرگ‌تر دارای اطلاعاتی برای برآورد اندازه مؤثر در این نسل‌ها و فاصله‌های نوترکیبی کوتاه‌تر برای برآورد اندازه مؤثر در نسل‌های دیرتر است. Moradi *et al.* (2012) با بررسی اندازه مؤثر جمعیت در نژاد زل و لری بختیاری از ۲۰ تا ۲۰۰۰ نسل پیش نشان دادند، اندازه مؤثر جمعیت از ۴۹۰۰ رأس در حدود ۲۰۰۰ نسل پیش در هر دو نژاد، به ۸۴۰ حیوان در نژاد زل و ۵۳۲ حیوان در نژاد لری بختیاری در ۲۰ نسل پیش کاهش یافته است. نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد، اندازه مؤثر در این نژادها از حدود ۴۷۵۰ و ۴۸۰۰ رأس در ۲۰۰۰ نسل پیش به ۳۸۲ و ۲۶۱ رأس در ۲۰ نسل پیش به ترتیب در نژادهای زل و لری بختیاری رسیده است. هرچند مقایسه روند تغییر اندازه مؤثر این دو نژاد در طی نسل‌های مختلف، روند کاهشی همسانی را در دو تحقیق نشان می‌دهد اما تفاوت در کمیت اندازه مؤثر محاسبه‌شده را می‌توان به روش مورد استفاده در این دو تحقیق نسبت داد به‌طوری‌که در این بررسی اندازه مؤثر برای میزان جهش و اندازه نمونه نیز تصحیح شده است (Corbin *et al.*, 2012). Zhao *et al.* (2014) نیز با استفاده از آرایه‌ها SNP اندازه مؤثر را در سه نژاد گوسفند سونیت (Sunite)، مرینوس آلمانی و دورپر

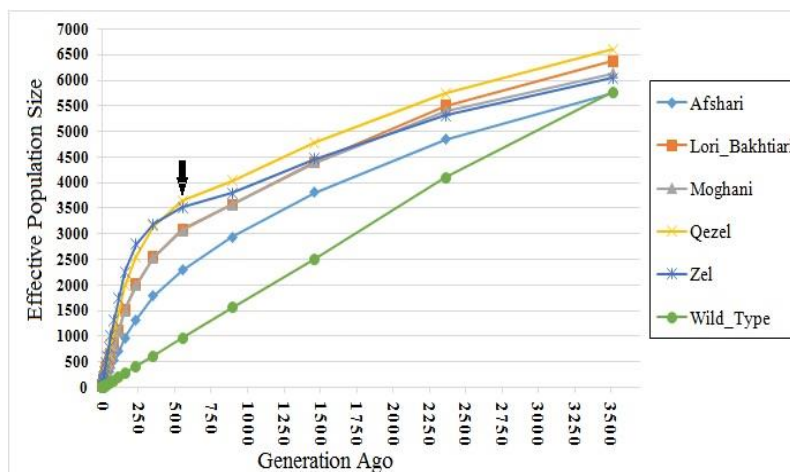
یکی از مهم‌ترین فراسنجه‌ها در تصمیم‌گیری در برنامه‌های ژنتیک حفاظت و موفقیت در برنامه‌های اصلاحی اندازه مؤثر جمعیت‌ها است. Frankham *et al.* (2014) پیشنهاد کرده‌اند به‌منظور حفظ تنوع ژنتیکی و جلوگیری از ضعف ناشی از هم‌خونی در جمعیت‌های مختلف اندازه مؤثر در کوتاه‌مدت (۵ نسل پیش) باید دست‌کم صد فرد باشد. همچنین در درازمدت اندازه مؤثر باید بیش از هزار فرد باشد تا بقای درازمدت جمعیت‌ها حفظ شود، این به قانون سرانگشتی ۱۰۰ در ۱۰۰۰ شناخته می‌شود. در این تحقیق اندازه مؤثر جمعیت در نژادهای مختلف گوسفند ایرانی از ۴ تا ۳۵۰۰ نسل گذشته محاسبه شد (شکل ۲). نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده کاهش تدریجی N_e در همه نژادهاست به‌طوری‌که اندازه مؤثر جمعیت در این نسل‌ها (۴ نسل پیش) در نژادهای زل، لری بختیاری، قزل، مغانی، افشاری و نژاد وحشی به ترتیب به ۸۹، ۷۲، ۶۹، ۵۵، ۴۴ و ۹ رأس می‌رسد. نتایج نشان می‌دهد در پنج نسل گذشته تنها نژاد زل بالاتر از ۱۰۰ رأس دارد.

بیشتر تحقیقات در زمینه برآورد اندازه مؤثر در دام‌ها روی گاو شیری متمرکز شده است. به‌عنوان نمونه Qanbari *et al.* (2011) گزارش کردند، اندازه مؤثر جمعیتی در نژاد هلشتاین آلمانی در چهار نسل پیش نزدیک به ۱۰۳ رأس بوده است. Lee *et al.* (2011) اندازه مؤثر را در جمعیت گاو بومی هانو کره جنوبی بررسی کردند. نتایج آنان نشان‌دهنده کاهش تدریجی N_e در این نژاد طی نسل‌های گذشته بوده است به‌طوری‌که در سه نسل پیش به ۹۸ رأس کاهش یافته بود. در تحقیقات مختلف طیف گسترده‌ای از N_e در نژادهای مختلف گاو از ۴۴ رأس (Marquez *et al.*, 2010) تا ۶۵۴ رأس (Saatchi *et al.*, 2011) گزارش شده است. بیشتر تحقیقات در زمینه محاسبه اندازه مؤثر در گوسفند بر پایه اطلاعات شجره انجام شده است. Ghafouri-Kesbi (2011) اندازه مؤثر را با استفاده از اطلاعات شجره‌ای در نژاد افشاری بررسی و این فراسنجه را در این نژاد ۵۰ رأس گزارش کرد. همچنین Mokhtari *et al.* (2015) و Tahmoorespur & Sheikhloo (2011) اندازه مؤثر جمعیت را در

(Dorper) بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که اندازه مؤثر در طی ۲۰۰۰ تا ۷ نسل پیش به ترتیب در نژاد سونیت از ۱۵۰۶ به ۲۰۷، در نژاد مریوس آلمانی از ۱۶۷۸ به ۷۴ و در نژاد دورپر از ۱۵۰۶ به ۶۷ کاهش یافته است. در این تحقیق روند کاهشی در اندازه مؤثر در همه نژادها به تاریخچه انتخاب در آنها نسبت داده شده است به طوری که نژاد بومی سونیت که در طی نسل‌های مختلف کمتر هدف انتخاب‌های مختلف قرار گرفته است بیشترین N_e را دارد. هرچند روش آماری استفاده شده در دو تحقیق کمی با هم متفاوت است اما نتایج اندازه مؤثر در نژادهای بومی ایرانی در طی هفت نسل پیش در دامنه همین تحقیق قرار دارند. Buren *et al.* (2014) با استفاده از اطلاعات نداشتن تعادل پیوستگی اندازه مؤثر را در ۲۴ نمونه از هر یک از نژادهای گوسفند سیاه-قهوه‌ای سوئیسی (Swiss Black-Brown Sheep)، گوسفند قرمز انگادین (Engadine Red sheep)، نژاد والیس بلک نوپس (Valis Blacknose sheep)، گوسفند والیس قرمز (Valais Red sheep)، میرر سوئیسی (Swiss Mirror sheep)، نژاد بوندر ابرلندر (Bunder Oberlander sheep) و آلپاین سفید سوئیسی (White Alpine) بررسی کردند. در این تحقیق نیز روند کاهشی N_e در طی نسل‌های گذشته تاکنون در همه نژادها گزارش شده است به طوری که اندازه مؤثر در نژادهای بالا در طی پنج نسل پیش به ترتیب به ۱۸، ۳۰، ۲۹، ۲۷، ۲۹، ۲۶ و ۳۱ رأس رسیده است. اندازه مؤثر در نژادهای سوئیسی کمتر از نژادهای بومی ایرانی در نسل همسان بوده که این می‌تواند به دلیل اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی بیشتر و در نتیجه کاهش N_e در نژادهای سوئیسی باشد.

تفاوت در اندازه مؤثر انعکاس دهنده رویدادهایی است که در طول تاریخ در جمعیت مورد نظر رخ داده است. بنابراین اندازه مؤثر قسمتی از تاریخچه تکاملی جمعیت مورد بررسی را توصیف می‌کند و اطلاعات ارزشمندی را برای حفاظت به‌ویژه در نژادهای بومی ارائه می‌دهد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد در بین نژادهای بومی نژاد زل بیشترین و نژاد افشاری کمترین N_e در طی نسل‌های اخیر را دارد که این مشاهده با روند اجرای برنامه‌های

اصلاحی در این نژادها نیز همخوانی دارد. هرچند N_e در جمعیت‌های مختلف می‌تواند تحت تأثیر عامل‌های متفاوتی قرار گیرد اما انتخاب و رانش دو عامل تأثیرگذار و مهم در این زمینه به‌شمار می‌آیند (Zhao *et al.*, 2014). بررسی‌ها نشان می‌دهد نژاد افشاری به‌عنوان یکی از نژادهای گوشتی با افزایش وزن روزانه مناسب در طی سال‌های مختلف به‌عنوان یکی از نژادهای مطلوب برای پرورش در بین دامداران مورد توجه بوده است (Mohammadi *et al.*, 2009) و به‌ویژه در سال‌های اخیر به‌شدت در مناطق مختلف برای پروراندی و گاهی آمیخته‌گری با دیگر نژادها استفاده شده است که نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نیز با کم بودن N_e این نژاد در طی سال‌های مختلف و کاهش شدید آن در طی این نسل‌ها این موضوع را نشان می‌دهد. افزون بر این بررسی N_e در نژاد وحشی نیز نشان‌دهنده کاهش شدید و به نسبت خطی اندازه مؤثر در این نژاد در طی نسل‌های اخیر است. با توجه به نظام نگهداری این حیوانات در باغ‌وحش به‌ویژه شمار کم حیوانات و انجام تلاقی‌های خویشاوندی شدید در بین آنها، نتایج نشان‌دهنده فاصله زیاد این عدد با مقادیر پیشنهاد شده برای حفاظت جمعیت‌ها است که اجرای برنامه‌های حفاظتی ضروری را پیشنهاد می‌دهد. همچنین بررسی روند تغییرپذیری N_e در طی نسل‌های مختلف (شکل ۲) نشان می‌دهد با وجود اینکه در نژاد وحشی تغییر به نسبت خطی است اما در نژادهای اهلی یک نقطه زمانی در حدود ۵۵۰ نسل پیش مشاهده می‌شود که در این زمان اندازه مؤثر نژادهای بومی به‌ویژه در نژادهای دنبه‌دار با شیب و شدت بیشتری کاهش پیدا می‌کند. اگر فاصله نسل در گوسفند ۴-۵ سال در نظر گرفته شود، این نقطه هنگامی در محدوده زمانی خواهد بود که نخستین شواهد باستان‌شناسی مربوط به نژادهای دنبه‌دار در تخت جمشید ایران (حدود ۲۵۰۰ سال پیش) به دست آمده است. هرچند در ارائه این پیشنهاد نیاز به شواهد بیشتری است، اما نتایج این تحقیق می‌تواند در قوت گرفتن این فرضیه که صفت دنبه‌داری در نژادهای بومی ایران دست‌کم در حدود ۲۵۰۰ سال پیش شکل گرفته است و سپس با توجه به مطلوب بودن آن، نژادهای دنبه‌دار با شدت بیشتری انتخاب شده‌اند، تقویت کند.



شکل ۲. روند تغییر اندازه مؤثر نژادهای مختلف گوسفند ایرانی در طی نسل‌های گذشته

Figure 2. Trend of effective population size changes in Iranian sheep breeds across last generations

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه مرکز اصلاح نژاد کشور به دلیل در اختیار گذاشتن حیوانات تحت پوشش مربوط به نژادهای زل و لری‌بختیاری، پروژه Sheep HapMap به خاطر در اختیار قرار دادن اطلاعات ژنوتیپی نژادهای افشاری، مغانی و قزل، مرکز باغ‌وحش اراک به خاطر تلاش‌های ارزشمندشان در نمونه‌گیری گوسفندان وحشی ایرانی، استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمد مرادی شهراباک و دیگر کارمندان محترم دانشکده مهندسی علوم دامی دانشگاه تهران و همچنین دکتر John McEwan از مؤسسه ژنومیکس و تولیدمثل AgResearch نیوزلند به خاطر کمک‌های ارزنده‌شان برای تعیین ژنوتیپ و تجزیه داده‌ها کمال تشکر را دارند. این تحقیق با حمایت‌های مالی مرکز اصلاح نژاد و مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، مؤسسه مبارک‌اندیش و مرکز تحقیقاتی AgResearch نیوزلند انجام شد که بدین‌وسیله از این مراکز، تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق برای نخستین بار اندازه مؤثر جمعیت‌های گوسفند بومی و یک نژاد گوسفند وحشی ایرانی با استفاده از آرایه ژنگانی SNP Chip بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد، باوجود تنوع ژنتیکی مناسب در این جمعیت‌ها، اندازه مؤثر آن‌ها به‌ویژه در نژاد گوسفند افشاری و نژاد وحشی در طی نسل‌های اخیر به‌شدت کاهش یافته است. کاهش اندازه مؤثر این جمعیت‌ها باعث افزایش حساسیت آن‌ها نسبت به تغییر محیطی پیش‌رو و چالش‌های ژنتیکی مختلف در آینده خواهد شد. به همین خاطر ضرورت دارد، در جهت حفاظت از این نژادهای بومی برای استفاده از راه‌کارهای مختلفی همچون کنترل تلاقی‌گری‌ها و طراحی برنامه‌های آمیزشی مناسب، اقتصادی کردن سامانه‌های تولیدی به‌ویژه در نژادهای بومی گوسفند ایرانی و شناسایی و پرورش نژادهای خالص برنامه‌ریزی کرد.

REFERENCES

1. Al-Mamun, H. A., Clark, S. A., Kwan, P. & Gondro, C. (2015). Genome-wide linkage disequilibrium and genetic diversity in five populations of Australian domestic sheep. *Genetic Selection and Evolution*, 47, 90.
2. Barbato, M., Wengell, P. O., Tapio, M. & Bruford, M. W. (2015). SNeP: a tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data. *Frontier in Genetics*, 6, 109.
3. Browning, B. L. & Browning, S. R. (2009). A unified approach to genotype imputation and haplotype-phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals. *American Journal of Human Genetics*, 84, 210-223.
4. Burren, A., Signer-Hasler, H., Neuditschko, M., Tetens, J., Kijas, J. W., Drögemüller, C. & et al. (2014). Fine-scale population structure analysis of seven local Swiss sheep breeds using genome-wide SNP data. *Animal Genetic Resources*, 55, 67-76.

5. Corbin, L. J., Liu, A. Y. H., Bishop, S. C. & Woolliams, J. A. (2012). Estimation of historical effective population size using linkage disequilibria with marker data. *Journal of Animal Breeding Genetics*, 129, 257-270.
6. Danchin-Burge, C., Palhière, I., François, D., Bibé, B., Leroy, G. & Verrier, E. (2010). Pedigree analysis of seven small French sheep populations and implications for the management of rare breeds. *Journal of Animal Science*, 88, 505-516.
7. Esmailkhanian, E. & Banabazi, M. H. (2006). Genetic variation within and between five Iranian sheep populations using microsatellite markers. *Pakistan Journal of Biological Science*, 9(3), 2488-2492.
8. Flury, C., Tapio, M., Sonstegard, T., Drögemüller, C., Leeb, T., Simianer, H. & *et al.*, (2010). Effective population size of an indigenous Swiss cattle breed estimated from linkage disequilibrium. *Journal of Animal Breeding Genetics*, 127, 339-347.
9. Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126, 131-140.
10. 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.
11. Ghafouri-Kesbi, F. (2012). Using pedigree information to study genetic diversity and reevaluating a selection program in an experimental flock of Afshari sheep. *Archiv für Tierzucht*, 55: 375-384.
12. 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, 635-643.
13. Helms, C. (1990). Salting out Procedure for Human DNA extraction. In: The Donis-Keller Lab - Lab Manual Homepage. From http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/dna/dna2.html.
14. Hill, W. G. & Robertson, A. (1968). Linkage Disequilibrium in Finite Populations. *Theoretical Applied Genetics*, 38, 226-231.
15. Hill, W. G. (1981). Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetic Resources*, 38, 209-216.
16. Karimi, K., Esmaelizadeh, A. K. & Asadi Fozzi, M. (2015). Estimation of effective population size in Sarabi cattle based on single nucleotide polymorphism markers. *Iranian Journal of Animal Science*, 46(3), 335-343. (in Farsi)
17. Kijas, J. W., Lenstra, J. A., Hayes, B. J., Boitard, S., Porto Neto, L. R., San Cristobal, M. & *et al.* (2012). Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS Bio*, 10, e1001258.
18. Kijas, J. W., Townley, D., Dalrymple, B. P., Heaton, M. P., Maddox, J. F. & *et al.* (2009). A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. *PLoS ONE*, 4, e4668.
19. Lachance, J. & Tishkoff, S. A. (2013). SNP ascertainment bias in population genetic analyses: Why it is important, and how to correct it. *Bioessays*, 35 (9), 780-786.
20. Lee, S. H., Cho, Y. M., Lim, D., Kim, H. C., Choi, B. H. & *et al.* (2011). Linkage disequilibrium and effective population size in Hanwoo Korean cattle. *Asian Australas Journal of Animal Science*, 24, 1660-1665.
21. Leroy, G., Mary-Huard, T., Verrier, E., Danvy, S., Charvolin, E. & Danchin-Burge, C. (2013). Methods to estimate effective population size using pedigree data: examples in dog, sheep, cattle and horse. *Genetic Selection and Evolution*, 45, 1-10.
22. Marquez, G. C., Speidel, S. E., Enns, R. M. & Garrick, D. J. (2010). Genetic diversity and population structure of American Red Angus cattle. *Journal of Animal Science*, 88, 59-68.
23. Mohammadi, A. R., Abbasi, M. A., Moghaddam, A. A. & Zare Shahneh A. (2009). Estimation of growth traits in Iranian Afshari sheep breed under rural production system. *Journal of Animal and Veterinary advances*, 8(7), 1449-54.
24. Mokhtari, M. S., Miraei-Ashtiani, S. R., Jafaroghli, M. & Gutiérrez, J. P. (2015). Studying genetic diversity in Moghani sheep using pedigree analysis. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17, 1151-1160.
25. Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds K. G. & McEwan, J. C. (2012). Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. *BMC Genetics*, 13, 10.
26. Moradi, M. H., Rostamzadeh, J., Rashidi, A., Vahabi, K. & Farahmand, H. (2013). Analysis of genetic diversity in Iranian Mohair goat and its color types using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Journal of Agricultural Communications*, 1, 2.
27. Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
28. Ohta, T. & Kimura, M. (1971). Linkage disequilibrium between two segregating nucleotide sites under the steady flux of mutations in a finite population. *Genetics*, 68, 571-580.

29. Pons, A. L., Landi, V., Martinez, A. & Delgado, J. V. (2015). The biodiversity and genetic structure of Balearic sheep breeds. *Journal of Animal Breeding Genetics*, 132(3), 268-76.
30. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D. & et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81, 559-575.
31. Qanbari, S., Pimentel, E. C., Tetens, J., Thaller, G., Lichtner, P., Sharifi, A. R. & Simianer, H. (2010). The pattern of linkage disequilibrium in German Holstein cattle. *Animal Genetics*, 41, 346-356.
32. Saatchi, M., McClure, M. C., McKay, S. D., Rolf, M. M., Kim, J. & et al. (2011). Accuracies of genomic breeding values in American Angus beef cattle using K-means clustering for cross-validation. *Genetic Selection and Evolution*, 43, 40.
33. Sved, J. A. (1971). Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theoretical Population Biology*, 141, 125-141.
34. Tahmoorespur, M. & Sheikhloo, M. (2011). Pedigree analysis of the closed nucleus of Iranian Baluchi sheep. *Small Ruminant Research*, 99, 1-6.
35. Tenesa, A., Navarro, P., Hayes, B. J., Duffy, D. L., Clarke, G. M., Goddard, M. E. & Visscher P. M. (2007). Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. *Genome Research*, 17, 520-526.
36. Teo, Y. Y., Fry, A. E., Clark, T. G., Tai, E. S. & Seielstad, M. (2007). On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Human Genetics*, 71, 701-703.
37. Uimari, P. & Tapio, M. (2011). Extent of linkage disequilibrium and effective population size in Finnish Landrace and Finnish Yorkshire pig breeds. *Journal of Animal Science*, 89, 609-614.
38. Villa-Angulo, R., Matukumalli, L. M., Gill, C. A., Choi, G., Van Tassle, C. P. & Grefenstette, J. J. (2009). High-resolution haplotype block structure in the cattle genome. *BMC Genetics*, 10, 19.
39. Weir, B. S. & Hill, W. G. (1980). Effect of mating structure on variation in linkage disequilibrium. *Genetics*, 95, 477-488.
40. Zeder, M. A. (1999). Animal domestication in the Zagros: a review of past and current research. *Pale'orient*, 25, 11-26.
41. Zhao, F., Wang, G., Zeng, T., Wei, C., Zhang, L. & et al. (2014). Estimations of genomic linkage disequilibrium and effective population sizes in three sheep populations. *Livestock Science*, 170, 22-2.