

تحلیل مقایسه‌ای روابط خویشاوندی در جمعیت‌های تحت اسارت با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، مطالعه موردی: گوسفند وحشی در مرکز تکثیر در اسارت میانکتل

رسول خسروی^{۱*}، ملیکا روح‌بخش^۲، رویا آداودی^۳ و محمد کابلی^۴

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۱)

چکیده

اگرچه روش‌های مختلفی برای تعیین روابط خویشاوندی وجود دارد، اما در مواردی نتایج این روش‌ها با یکدیگر منطبق نیست. از این رو، استفاده هم‌زمان از چند رویکرد تحلیلی می‌تواند به افزایش اعتبار نتایج کمک کند. در این پژوهش، از ۲۰ نمونه خون گوسفند وحشی (*Ovis gmelini*) در مرکز تکثیر در اسارت میانکتل (فارس) برای مقایسه مدل‌های تحلیل روابط خویشاوندی بر مبنای داده‌های ریزماهواره استفاده شد. با استفاده از شبیه‌سازی، قدرت هر جایگاه ژنی در تفکیک روابط خویشاوندی ارزیابی شد. این روابط با استفاده از نرم‌افزارهای CERVUS، COLONY، ML-Relate و شاخص‌های خویشاوندی بررسی شد. جایگاه‌های OarFCB304 و McM527 به ترتیب بیشترین و کمترین میزان اطلاعات را در تعیین روابط نشان دادند. علیرغم انطباق بالا بین روش‌های مختلف، تفاوت‌هایی نیز مشاهده شد. نرم‌افزار CERVUS نشان داد که سه جفت رابطه والد-فرزندی با سطح اطمینان بالا وجود دارد، اگرچه گروه‌بندی این نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای ML-Relate و COLONY عمدتاً نشان‌دهنده رابطه خواهر-برادری بود، محتمل‌ترین الگوی خویشاوندی در جمعیت رابطه خواهر-برادر ناتنی بود، اما ضروری است با اقدامات مدیریتی همچون اضافه نمودن افراد جدید به جمعیت، احتمال درون‌آمیزی را کاهش داد. این مطالعه نشان داد که استفاده تلفیقی از شاخص‌های خویشاوندی، تحلیل‌های والدینی و اطلاعات زیستی می‌تواند تصویری دقیق‌تر از ساختار خویشاوندی ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: تحلیل‌های والدینی، تکثیر در اسارت، روابط خویشاوندی، ریزماهواره‌ها، گوسفند وحشی

۱- دانشیار بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی، بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳- دانشجوی دکتری، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه گدانسک، گدانسک، لهستان

۴- استاد گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، البرز، ایران

*مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: r-khosravi@shirazu.ac.ir

۱- مقدمه

برآورد می‌شود تاکنون بیش از ۶۰۰۰ گونه به دلایل مختلف همچون تخریب زیستگاه، شکار غیرقانونی، گونه‌های مهاجم و تغییرات کاربری اراضی در خطر انقراض قرار گرفته‌اند (۱۰). در صورتی‌که چنین تهدیداتی برطرف نگردد، جمعیت‌های یکپارچه گونه‌ها به جمعیت‌هایی کوچک و منزوی تبدیل می‌شوند و در معرض از دست دهی تنوع ژنتیکی، وقایع تصادفی جمعیت شناختی و تغییرات شرایط محیطی قرار خواهند گرفت (۳۲ و ۳۹). بنابراین، کاهش چشمگیر تنوع ژنتیکی چالش جدی به حساب می‌آید، زیرا نه تنها می‌تواند توانایی گونه‌ها در پاسخ بلندمدت به تغییرات محیطی را کاهش دهد، بلکه بر فنوتیپ‌های فردی اثر گذاشته و کاهش سازگاری را منجر می‌شود (۴۰ و ۴۸). تا زمانی که جمعیت‌های وحشی به دلایل اشاره‌شده در خطر تهدید قرار دارند، حفاظت خارج از زیستگاه (*Ex-situ*) یک راهکار مدیریتی مفید برای حفظ تنوع زیستی تلقی می‌شود (۴۲). این راهکار از جمله تمهیداتی است که اتحادیه جهانی حفاظت از طبیعت و منابع طبیعی (International Union for Conservation of Nature, IUCN) به عنوان آخرین راه حل برای جلوگیری از انقراض گونه‌ها پیشنهاد می‌کند (۲۷). در دو دهه اخیر، برنامه‌های تکثیر و معرفی گونه‌ها شاهد موفقیت قابل توجهی بوده‌اند و گونه‌های بسیاری را از خطر انقراض نجات داده‌اند (۱۸ و ۳۸). اگرچه حفاظت از گونه‌های جانوری در محیط‌های تحت اسارت تاکنون گونه‌های بسیاری را از انقراض نجات داده‌است (۲ و ۵۰)، اما نزدیک به یک سوم از این برنامه‌ها با شکست روبه‌رو شده‌است (۶ و ۵۰). با وجود اینکه عوامل بسیاری همچون مطلوبیت پایین زیستگاه، تغییرات رفتاری افراد و کمبود سایت مناسب برای تکثیر، می‌تواند در شکست این برنامه‌ها دخیل باشد، اما افزایش درون آمیزی، رانش ژنتیکی و به دنبال آن، کاهش تنوع ژنتیکی از مهم‌ترین عوامل عدم موفقیت چنین برنامه‌هایی معرفی می‌شود (۸ و ۲۰). این خطرات در گونه‌هایی که جمعیت مولدین آن‌ها کوچک باشد، به دلیل امکان بروز اثر گردنه بتری، درون آمیزی و رانش ژنتیکی نمود بیشتری

می‌یابند (۲۴ و ۳۳). با توجه به نرخ بالای درون آمیزی در جمعیت‌های تحت اسارت و کاهش تنوع ژنتیکی این جمعیت‌ها، اطلاع از روابط خویشاوندی و شجره‌نامه‌ای افراد پیش‌نیاز ضروری در موفقیت چنین برنامه‌هایی است (۱، ۲۳، ۲۶ و ۳۷). در کنار تنوع نشانگرهای مولکولی به منظور ارزیابی روابط خویشاوندی، در سال‌های اخیر روش‌های متنوعی در نرم-افزارهای مختلف همچون COLONY 2.0.7.1 (۱۳)، CERVUS 3.0.7 (۱۴)، COANCESTRY 1.0.1.11 (۴۵)، ML-Relate (۱۵) و PAPA 2.0 (۵) به منظور تحلیل این روابط توسعه یافته‌است. تاکنون در مطالعات بسیاری از این روش‌ها برای ارزیابی روابط خویشاوندی جمعیت‌ها پستانداران خشکی-زی (۹)، پستانداران آبی (۲۸)، و ماهیان (۳۶ و ۴۹) استفاده شده‌است. علیرغم تنوع در روش‌ها و رویکردهای ارزیابی روابط خویشاوندی، در بسیاری از مواقع نتایج این روش‌ها همخوانی با یکدیگر ندارد که این موضوع می‌تواند نتیجه‌گیری قطعی در خصوص روابط بین افراد یک جمعیت را با چالش مواجه کند. از این رو، استفاده از نشانگرهای مولکولی و یا روش‌های مختلف تحلیل والدینی، امکان مقایسه نتایج را فراهم و اطمینان از روابط پیش‌بینی شده بین افراد یک جمعیت را افزایش می‌دهد. گوسفند وحشی از خانواده Bovidae و جنس Ovis است که پراکنش وسیعی در نیمکره شمالی دارد (۲۹). تاکنون چندین بار نسبت به رده‌بندی قوچ‌های وحشی تجدید نظر شده‌است. طبق آخرین رده‌بندی، گوسفندان وحشی در شش گونه معرفی شده‌اند که از این دو گونه، گوسفند وحشی اورپال (*O. vignei*) در نیمه شرقی و گوسفند وحشی ارمنی (*O. gemelini*) در نیمه غربی کشور پراکنش دارند (۳۴). به جز در مناطق شرقی ایران که قوچ‌های اورپال خالص و شمال غرب ایران که قوچ‌های ارمنی خالص پراکنش دارند، در سایر مناطق گوسفندان وحشی از نظر فرم شاخ، اندازه جثه، رنگ و حتی تعداد کروموزوم‌ها با یکدیگر متفاوت هستند. بر اساس طبقه‌بندی IUCN، این گونه در طبقه آسیب‌پذیر (Vulnerable, VU) و مطابق با طبقه‌بندی کنوانسیون منع تجارت گونه‌های در خطر انقراض (Convention on

در (International Trade in Endangered Species, CITES) پیوست II قرار دارد (۱۶).

استان فارس همچون بسیاری دیگر از استان‌های کشور، میزبان جمعیت‌هایی از گوسفند وحشی در محدوده مناطق تحت حفاظت است (۲۱). در کنار اقدامات انجام شده برای حفاظت از این گونه در زیستگاه‌های طبیعی، جمعیتی از این گونه در سال‌های اخیر به سایت تکثیر در اسارت میانکتل منتقل شده‌است. در مطالعات ژنتیکی انجام شده توسط خسروی و همکاران (۱۴۰۳) با استفاده از هشت جفت نشانگر ریزماهواره، تنوع، ساختار ژنتیکی، و میزان درون‌آمیزی در جمعیت گوسفند وحشی در سایت میانکتل ارزیابی شد. بررسی فراوانی آلل‌های نول (Null allele) نشان داد که نرخ این آلل‌ها در همه جایگاه‌ها به‌جز یک مورد (OarFCB20) ناچیز بود. نتایج این پژوهش نشان داد که در حال حاضر تنوع ژنتیکی مناسب و نرخ درون‌آمیزی اندکی در جمعیت مشاهده می‌شود. نظر به اینکه جمعیت شکل‌گرفته در سایت میانکتل از جمعیت بنیان‌گذار کوچکی متشکل از ۲۰ رأس (۱۱ رأس میش و ۹ رأس قوچ) ایجاد شده‌است، از این‌رو، خطرات ژنتیکی در نتیجه درون‌آمیزی و رانش ژنتیکی یکی از چالش‌های مهم این جمعیت است. با توجه به احتمال بالای درون‌آمیزی در محیط‌های تحت اسارت و به‌منظور داشتن یک جمعیت پایدار پس از انتقال به زیستگاه اصلی، بررسی روابط خویشاوندی این افراد پیش از رهاسازی در طبیعت ضروری است. از سوی دیگر موضوع مهمی که در بررسی روابط خویشاوندی افراد می‌تواند بر صحت نتایج به‌دست‌آمده تأثیرگذار باشد، داشتن اطلاعاتی در خصوص جنسیت و سن افراد نمونه-برداری شده‌است. با توجه به محصور بودن جمعیت میانکتل و امکان ثبت اطلاعات جنس و سن افراد، شرایط ایده‌آلی برای بررسی و مقایسه روش‌های مختلف تعیین روابط خویشاوندی فراهم است. با توجه به موارد اشاره شده، مطالعه حاضر در ادامه پژوهش خسروی و همکاران (۲۰۲۵) به بررسی روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت و مقایسه روش‌های مختلف جهت بررسی روابط خویشاوندی پرداخته است. بدین منظور از

بانک اطلاعاتی بدست آمده در پژوهش خسروی و همکاران (۲۰۲۵) استفاده شد (۱۷). فهرست جایگاه‌های ژنی استفاده شده، شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، و همچنین اطلاعات کامل نمونه‌ها در مطالعه مذکور آورده شده‌است (۱۷). اهداف اصلی پژوهش حاضر شامل (۱) ارزیابی قدرت نشانگرهای ریزماهواره در تفکیک روابط خویشاوندی، (۲) مقایسه روش‌های مختلف تحلیل والدینی و شاخص‌های خویشاوندی و (۳) تعیین محتمل‌ترین الگوهای خویشاوندی در جمعیت مورد مطالعه می-باشد. نتایج مطالعه حاضر نقش مهمی در جهت‌دهی اقدامات مدیریتی آینده به‌منظور حفظ یک جمعیت پایدار از منظر ژنتیکی دارد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- منطقه مطالعاتی و نمونه‌برداری

منطقه حفاظت‌شده ارژن و پریشان در بخش جنوبی رشته کوه‌های زاگرس و در محدوده استان فارس قرار دارد. این منطقه در سال ۱۳۵۱ با وسعت ۱۹۱ هزار هکتار به‌عنوان پارک ملی انتخاب شد؛ اگرچه در سال ۱۳۵۳ وسعت آن به ۶۵ هزار هکتار کاهش یافت و به‌عنوان منطقه حفاظت‌شده و از طرف سازمان ملل متحد تحت عنوان ذخیره‌گاه زیست‌کره معرفی گردید. این منطقه زیستگاه پستانداران مهمی همچون گوزن زرد ایرانی (*Dama mesopotamica*)، خرس قهوه‌ای (*Ursus arctos*)، گرگ (*Canis lupus*)، پلنگ ایرانی (*Panthera pardus*) و کفتار (*Hyaena hyaena*) است. مرکز تکثیر در اسارت میانکتل که در زون امن این منطقه قرار دارد، یکی از مراکز مهم نگهداری و تکثیر گوزن زرد ایرانی در سطح کشور است که در سال ۱۳۷۲ تاسیس گردید. در سال‌های اخیر جمعیتی از گوسفند وحشی، با هدف احیاء مجدد گونه در منطقه حفاظت‌شده ارژن و پریشان به این محدوده محصور منتقل شده‌است. با توجه به این که یکی از اهداف پژوهش حاضر، بررسی روابط خویشاوندی بین افراد منتقل شده به این سایت است، از این‌رو، کسب اطلاعات در خصوص جنسیت و سن افراد نقش مهمی در صحت نتایج

جدول ۱. اطلاعات افراد نمونه برداری شده به منظور ارزیابی روابط خویشاوندی

سن	جنسیت	کد نمونه	سن	جنسیت	کد نمونه
۶ سال	نر	۱۱	۳ سال	نر	۱
۱ سال	نر	۱۲	۳ سال	ماده	۲
۶ سال	ماده	۱۳	۳ سال	ماده	۳
۱ سال	نر	۱۴	۲ سال	ماده	۴
۲ سال	نر	۱۵	۳ سال	نر	۵
۱۰ سال	نر	۱۶	۳ ماه	نر	۶
۱ سال	ماده	۱۸	۴ سال	نر	۷
۱ سال	نر	۱۹	۴ سال	نر	۸
۳ سال	ماده	۲۰	۴ سال	نر	۹
۴ سال	نر	۲۱	۲ سال	ماده	۱۰

به‌دست‌آمده دارد. از این رو، به‌منظور نمونه‌برداری ژنتیکی از گوسفند وحشی در سایت تکثیر در اسارت میانکتل، در حضور کارشناسان اداره، و دامپزشک، ۲۰ رأس شامل ۷ رأس ماده (۴ بالغ و ۳ نابالغ) و ۱۳ رأس نر (۸ بالغ و ۵ نابالغ) از این جمعیت با استفاده از تورهای زنده گیر صید و نمونه‌گیری از خون انجام شد. تمامی اطلاعات افراد نمونه‌برداری شده اعم از سن و جنس ثبت گردید (جدول ۱). از آن جایی که این پژوهش در ادامه مطالعه پیشین (۱۷) در خصوص ارزیابی وضعیت ژنتیکی گوسفند وحشی در مرکز تکثیر در اسارت میانکتل انجام گردید، از اطلاعات هشت جفت نشانگر ریزماهواره استخراج شده در پژوهش مذکور (MaF36، OarFCB304، ILSTS11، OarFCB128، McM527، MaF214، OarFCB20 و OarHH47) استفاده شد.

۲-۲- ارزیابی محتوای اطلاعاتی نشانگرهای ریزماهواره در تعیین روابط خویشاوندی

در ابتدا اطلاعات هر جایگاه ژنی در تعیین روابط خویشاوندی با استفاده از شاخص محتوای اطلاعاتی هر لوکوس در تمایز طبقات مختلف روابط (Informativeness for relationship; I_R) و شاخص میزان اطلاعات هر لوکوس در تخمین شاخص‌های خویشاوندی (Informativeness for relatedness; I_r) در نرم‌افزار KinInfor V2 اندازه‌گیری شد (۴۴). این شاخص‌ها محتوای اطلاعاتی هر جایگاه در تفکیک درجات خویشاوندی بین نمونه‌ها را مشخص می‌کنند (۳۶ و ۴۴). شاخص‌های I_r و I_R برای سه سناریوی تفکیک روابط خویشاوندی شامل (۱) خواهر-برادری تنی از افراد غیر خویشاوند، (۲) خواهر-برادری ناتنی از افراد غیر خویشاوند و (۳) خواهر-برادری تنی از خواهر-برادری ناتنی محاسبه گردید (۳۶). نرم‌افزار KinInfor برای هر یک از سناریوهای اشاره‌شده با یک میلیون جفت-مقایسه، سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و سطح دقت ۰/۰۱ اجرا شد. علاوه بر شاخص‌های اشاره‌شده، شاخص قدرت هر لوکوس در استنباط روابط خویشاوندی (Power for relationship inference; PWR) نیز برای هشت جایگاه ریزماهواره مورد مطالعه محاسبه شد. این شاخص نیز با هدف ارزیابی توان هر جایگاه در تمایز روابط خویشاوندی بین افراد محاسبه می‌شود.

۲-۳- تعیین روابط بین افراد با استفاده از شاخص‌های خویشاوندی

در پژوهش حاضر با استفاده از بسته نرم افزاری RELATED 1.0 (۳۰) سه شاخص روابط ژنتیکی خویشاوندی بین هر جفت

در ابتدا اطلاعات هر جایگاه ژنی در تعیین روابط خویشاوندی با استفاده از شاخص محتوای اطلاعاتی هر لوکوس در تمایز طبقات مختلف روابط (Informativeness for relationship; I_R) و شاخص میزان اطلاعات هر لوکوس در تخمین شاخص‌های خویشاوندی (Informativeness for relatedness; I_r) در نرم‌افزار KinInfor V2 اندازه‌گیری شد (۴۴). این شاخص‌ها محتوای اطلاعاتی هر جایگاه در تفکیک درجات خویشاوندی بین نمونه‌ها را مشخص می‌کنند (۳۶ و ۴۴). شاخص‌های I_r و I_R برای سه سناریوی تفکیک روابط خویشاوندی شامل (۱) خواهر-برادری تنی از افراد غیر خویشاوند، (۲) خواهر-برادری ناتنی از افراد غیر خویشاوند و (۳) خواهر-برادری تنی از خواهر-برادری ناتنی محاسبه گردید (۳۶). نرم‌افزار KinInfor برای هر یک از سناریوهای اشاره‌شده با یک میلیون جفت-مقایسه، سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و سطح دقت ۰/۰۱ اجرا شد. علاوه بر شاخص‌های اشاره‌شده، شاخص قدرت هر لوکوس در استنباط روابط خویشاوندی (Power for relationship inference; PWR) نیز برای هشت جایگاه ریزماهواره مورد مطالعه محاسبه شد. این شاخص نیز با هدف ارزیابی توان هر جایگاه در تمایز روابط خویشاوندی بین افراد محاسبه می‌شود.

۲-۲- ارزیابی محتوای اطلاعاتی نشانگرهای ریزماهواره در تعیین روابط خویشاوندی

در ابتدا اطلاعات هر جایگاه ژنی در تعیین روابط خویشاوندی با استفاده از شاخص محتوای اطلاعاتی هر لوکوس در تمایز طبقات مختلف روابط (Informativeness for relationship; I_R) و شاخص میزان اطلاعات هر لوکوس در تخمین شاخص‌های خویشاوندی (Informativeness for relatedness; I_r) در نرم‌افزار KinInfor V2 اندازه‌گیری شد (۴۴). این شاخص‌ها محتوای اطلاعاتی هر جایگاه در تفکیک درجات خویشاوندی بین نمونه‌ها را مشخص می‌کنند (۳۶ و ۴۴). شاخص‌های I_r و I_R برای سه سناریوی تفکیک روابط خویشاوندی شامل (۱) خواهر-برادری تنی از افراد غیر خویشاوند، (۲) خواهر-برادری ناتنی از افراد غیر خویشاوند و (۳) خواهر-برادری تنی از خواهر-برادری ناتنی محاسبه گردید (۳۶). نرم‌افزار KinInfor برای هر یک از سناریوهای اشاره‌شده با یک میلیون جفت-مقایسه، سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و سطح دقت ۰/۰۱ اجرا شد. علاوه بر شاخص‌های اشاره‌شده، شاخص قدرت هر لوکوس در استنباط روابط خویشاوندی (Power for relationship inference; PWR) نیز برای هشت جایگاه ریزماهواره مورد مطالعه محاسبه شد. این شاخص نیز با هدف ارزیابی توان هر جایگاه در تمایز روابط خویشاوندی بین افراد محاسبه می‌شود.

از افراد شامل LynchLi (r_{LL} ; ۱۹)، QuellerGT (r_{QG} ; ۳۱) و Wang (r_W ; ۴۳) محاسبه گردید (۳۰). شاخص LynchLi بر اساس احتمال به اشتراک‌گذاری آلل‌ها بین دو فرد نسبت به جمعیت مرجع محاسبه می‌شود. شاخص QuellerGT نیز مبتنی بر مقایسه فراوانی آلل‌ها بین دو فرد و کل جمعیت است. شاخص Wang نسبت به شاخص‌های قدیمی‌تر عملکرد بهتری در حضور داده‌های محدود یا خطاهای ژنوتیپی دارد و از یک چارچوب احتمالاتی پیچیده‌تر برای برآورد خویشاوندی استفاده می‌کند. این شاخص‌ها تحت شرایطی که میانگین ضریب خویشاوندی بین افراد جمعیت به صفر نزدیک باشد، مقادیر منفی به خود می‌گیرند (۴۶ و ۴۷). از این رو به منظور اجماع نهایی در روابط خویشاوندی بین افراد، شاخص روابط خویشاوندی بر اساس حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood, ML) نیز در نرم‌افزار ML-Relate محاسبه گردید (۱۵).

پیش از محاسبه شاخص‌های اشاره شده، به منظور ارزیابی کارایی نشانگرهای ریزماهواره در تفکیک روابط خویشاوندی بین افراد و تعیین بهترین شاخص تعیین روابط ژنتیکی، با استفاده از فراوانی آللی جمعیت مورد مطالعه، اقدام به شبیه‌سازی ۱۰۰ جفت-فرد برای هر یک از طبقات غیر خویشاوند (Unrelated, UR)، والد-فرزند (Parent Offspring, PO)، خواهر-برادری تنی (Full Sibling, FS)، خواهر-برادری ناتنی (Half Sibling, HS) گردید. بدین منظور شاخص‌های اشاره‌شده برای تمامی جفت-ژنوتیپ‌های شبیه‌سازی شده در هر طبقه محاسبه گردید. به منظور بررسی کارایی نشانگرهای استفاده شده، نمودار تراکم مقادیر محاسبه‌شده ارتباط برای هر جفت از افراد ترسیم گردید. این نمودار در واقع نشان‌دهنده توانایی نشانگرهای مورد مطالعه در تفکیک روابط خویشاوندی بین افراد است. پس از محاسبه شاخص‌های مذکور، به منظور گروه‌بندی نمونه‌ها و انتساب آن‌ها به گروه‌های خویشاوندی مختلف (والد-فرزند، خواهر-برادر تنی، خواهر-برادر ناتنی، و غیر خویشاوند) بر اساس مقادیر محاسبه‌شده شاخص‌ها، از رویکرد استفاده شده در مطالعه سانچز و همکاران (۲۰۲۲) و بر اساس رویکرد پیشنهادی بلوین و

همکاران (۳) استفاده شد. بدین منظور، مقادیر بیش از ۰/۵ نشان‌دهنده رابطه والد-فرزند، ۰/۳۷۵ تا ۰/۵ نشان‌دهنده رابطه خواهر-برادر تنی، ۰/۱۲۵ تا ۰/۳۷۵ نشان‌دهنده رابطه با خواهر-برادر ناتنی، و کمتر از ۰/۱۲۵ نشان‌دهنده رابطه غیرخویشاوندی در نظر گرفته شد. بر اساس آستانه‌های اشاره‌شده و تمامی شاخص‌ها، روابط خویشاوندی بین افراد تعیین گردید. در نهایت به منظور بررسی میزان انطباق بین نتایج شاخص‌های مختلف، ماتریس همپوشانی بین نتایج تشکیل و درصد همپوشانی بین روش‌ها محاسبه شد.

در گام بعد، میزان خطای نوع اول محاسبه شد. این نوع خطا بیانگر احتمال طبقه‌بندی نادرست نوع رابطه خویشاوندی بین هر جفت از افراد است. برای این منظور، ابتدا میانگین مقادیر مربوط به هر یک از چهار نوع رابطه خویشاوندی به صورت جداگانه محاسبه شد. سپس میانگین بین دو رابطه غیرخویشاوند (UR) و خواهر-برادر ناتنی (HS)، و نیز میانگین بین خواهر-برادر ناتنی (HS) و خواهر-برادر تنی (FS) محاسبه گردید. درصد جفت‌های HS که مقداری بیش از آستانه تخصیص بین HS و FS داشتند و نیز درصد افراد UR که مقداری بیش از آستانه تخصیص بین UR و HS نشان دادند، به عنوان خطای نوع اول در نظر گرفته شد.

۲-۴- تعیین روابط بین افراد با استفاده از تحلیل‌های والدینی

با توجه به اینکه یکی از سؤالات مهم پژوهش حاضر، تعیین روابط والدینی (والد-فرزند) و بررسی احتمال وجود افرادی با رابطه والد-فرزند در جمعیت مورد مطالعه بود، از این رو در گام اول تحلیل‌های والدینی با استفاده از نرم‌افزار CERVUS 3.0.7 انجام شد. این نرم‌افزار با استفاده از روش احتمال زوجی (Pairwise Likelihood, PL)، احتمال روابط والدینی (Logarithm Of the Odds, LOD score) را محاسبه می‌کند. بدین منظور ابتدا شبیه‌سازی برای ۱۰۰۰ فرزند و در نظر گرفتن چهار مادر و هشت پدر احتمالی انجام شد (این اعداد نشان‌دهنده تعداد نمونه‌های نر و ماده بالغ در جمعیت نمونه‌برداری شده بود). در این تحلیل فقط افراد نر و ماده بالغ به عنوان والدین احتمالی

جمع‌بندی نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از سه روش اجرا شده در نرم‌افزارهای CERVUS، COLONY و ML-Relate و همچنین شاخص‌های تشابه ژنتیکی و در نهایت در نظر گرفتن اطلاعات زیستی (سن و جنس) افراد، محتمل‌ترین روابط خویشاوندی بین افراد تعیین گردید. علاوه بر این میزان انطباق بین خروجی نرم-افزارهای استفاده شده بررسی گردید.

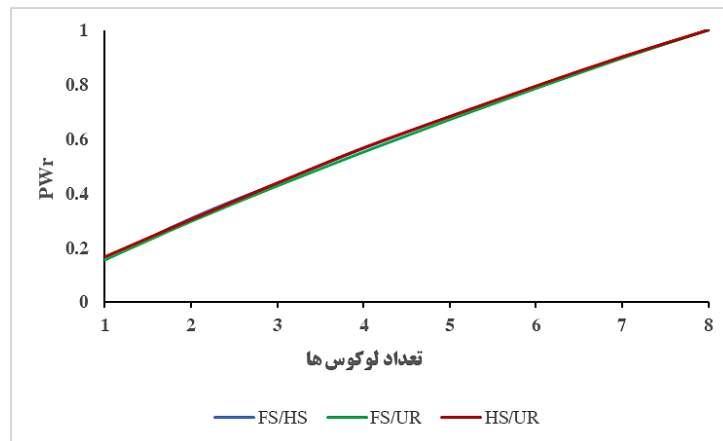
۳- نتایج

۳-۱- ارزیابی محتوای اطلاعاتی نشانگرهای ریزماهواره

بر اساس نتایج شاخص‌های I_R و I_T ، جایگاه‌های ریزماهواره OarFCB304 و McM527 به ترتیب بیشترین و کمترین میزان اطلاعات را برای تعیین روابط خویشاوندی نشان دادند. بر اساس شاخص PW_r نیز در سناریوهای تشخیص افراد با رابطه خواهر-برادر تنی از افراد با رابطه خواهر-برادر ناتنی (FS-HS) و همچنین تمایز خواهر-برادر تنی از غیرخویشاوند (FS-UR)، جایگاه‌های OarFCB304 و McM527 و در سناریوی تمایز افراد با رابطه خواهر-برادر ناتنی از غیرخویشاوند (HS-UR)، جایگاه OarFCB304 و ILSTS11 به ترتیب بیشترین و کمترین میزان اطلاعات را نشان دادند. میانگین شاخص I_R ، I_T و PW_r در سناریوی FS-HS به ترتیب ۰/۰۴۸، ۰/۱۴۲ و ۰/۲۰۴ محاسبه شد. این مقادیر در FS-UR، به ترتیب ۰/۱۴۳، ۰/۱۴۲ و ۰/۳۶۰ و در HS-UR به ترتیب ۰/۰۴۸، ۰/۱۴۲ و ۰/۱۶۸ به دست آمد. قدرت شبیه‌سازی شده جایگاه‌های مورد مطالعه در تشخیص افراد با رابطه خویشاوندی خواهر-برادر تنی (FS) از افراد غیرخویشاوند (UR)، برای جایگاه با بالاترین شاخص PW_r ، ۰/۱۵ به دست آمد که این مقدار با در نظر گرفتن همه جایگاه‌ها به ۱ نزدیک شد. همچنین این مقدار برای تشخیص روابط خواهر-برادر تنی از خواهر-برادر ناتنی بین ۰/۱۵ تا ۱ و برای تشخیص خواهر-برادر ناتنی از افراد غیرخویشاوند نیز بین ۰/۱۶ تا ۱ محاسبه شد (شکل ۱).

در نظر گرفته شدند. با توجه به این که اطمینان کامل از حضور والدین در نمونه‌های بررسی شده وجود نداشت، احتمال نمونه-برداری از والدین ۵۰٪ در نظر گرفته شد و سطوح اطمینان برای تعیین روابط والدینی نیز ۹۵٪ و ۸۰٪ در نظر گرفته شد (۴۹). بر این اساس، روابط والدینی با در نظر گرفتن جنسیت نمونه‌ها برای تمامی ۲۰ نمونه انجام شد.

با توجه به اینکه نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده وجود روابط والدینی بین برخی از نمونه‌ها بود، در گام دوم به منظور ارزیابی نتایج نرم‌افزار CERVUS و همچنین تعیین سایر روابط خویشاوندی (خواهر-برادر تنی و خواهر-برادر ناتنی) از نرم‌افزار COLONY و ML-Relate استفاده شد. بدین منظور آن دسته جفت نمونه‌هایی که در نرم‌افزار CERVUS با سطح اطمینان ۹۵٪ به‌عنوان والد-فرزند شناسایی شده بودند، با استفاده از این نرم-افزارها مورد ارزیابی مجدد قرار گرفتند. نرم‌افزار COLONY نمونه‌ها را به سه زیرگروه (نرهای والد احتمالی، ماده‌های والد احتمالی و فرزندان) گروه‌بندی و روابط خویشاوندی را با استفاده از روش احتمال کامل (Full Likelihood, FL) تعیین می‌کند. نرم‌افزار COLONY با فرض چندهمسری نرها و تک‌همسری ماده‌ها و فرض احتمال وقوع درون آمیزی در جمعیت اجرا شد. احتمال وجود والد نر در نمونه‌ها ۰/۲ و احتمال وجود والد ماده ۰/۴ در نظر گرفته شد. نرم‌افزار ML-Relate نیز روابط خویشاوندی را بر اساس داده ژنتیکی هم‌بارز و با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی برآورد و روابط با بالاترین میزان درست‌نمایی را برای هر جفت تعیین می‌کند. روش حداکثر درست‌نمایی می‌تواند تأثیر آلل‌های نول را در محاسبات مدنظر قرار دهد (۱۵) و خطای استاندارد کمتری نسبت به سایر برآوردگرها دارد (۲۵). با توجه به اینکه تعیین روابط خویشاوندی بین افراد با استفاده از نرم‌افزار COLONY نشان‌دهنده وجود روابط خویشاوندی خواهر-برادر تنی بین برخی از افراد بود، از این‌رو، نتایج این نرم‌افزار با نتایج نرم‌افزار ML-Relate و همچنین گروه‌بندی‌های صورت گرفته با استفاده از شاخص‌های روابط خویشاوندی (بخش ۲-۴) مقایسه گردید. در گام نهایی با



شکل ۱. توانایی ریزماهواره مورد استفاده در تعیین روابط خویشاوندی بین افراد. افراد با رابطه خواهر-برادر ننی، خواهر-برادر ناتنی، و غیرخویشاوند به ترتیب با FS، HS، و UR نشان داده شده‌است. افزایش تعداد جایگاه‌های ریزماهواره منجر به افزایش توان تجمعی جایگاه-ها در تمایز روابط خویشاوندی بین افراد می‌شود.

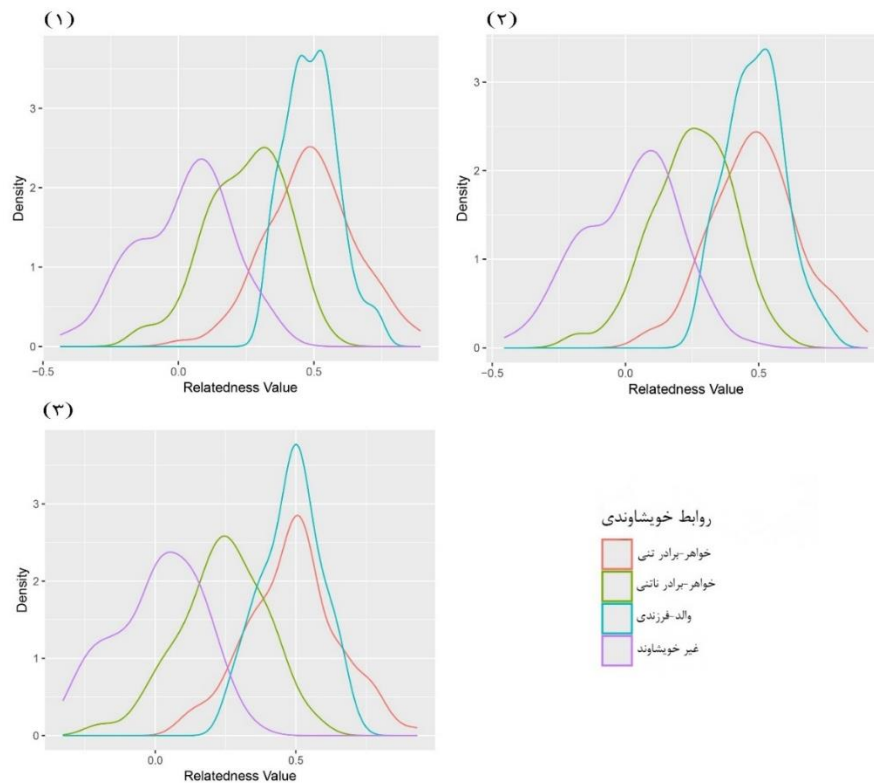
جدول ۲. مقدار خطای نوع اول شاخص‌ها در تعیین روابط خویشاوندی

شاخص روابط خویشاوندی	خطا نوع اول	
	طبقه‌بندی افراد با رابطه غیرخویشاوند به عنوان خواهر-برادر ننی	طبقه‌بندی افراد با رابطه خواهر-برادر ناتنی به عنوان خواهر-برادر ننی
Wang (rW)	۱۲/۹۷	۱۸/۶
LynchLi (rLL)	۱۸/۹۷	۳۰/۴۳
QuellerGT (rQG)	۱۱/۱۸	۹/۰۹
Maximum-Likelihood (ML)	۱/۲۹	۷/۱۴

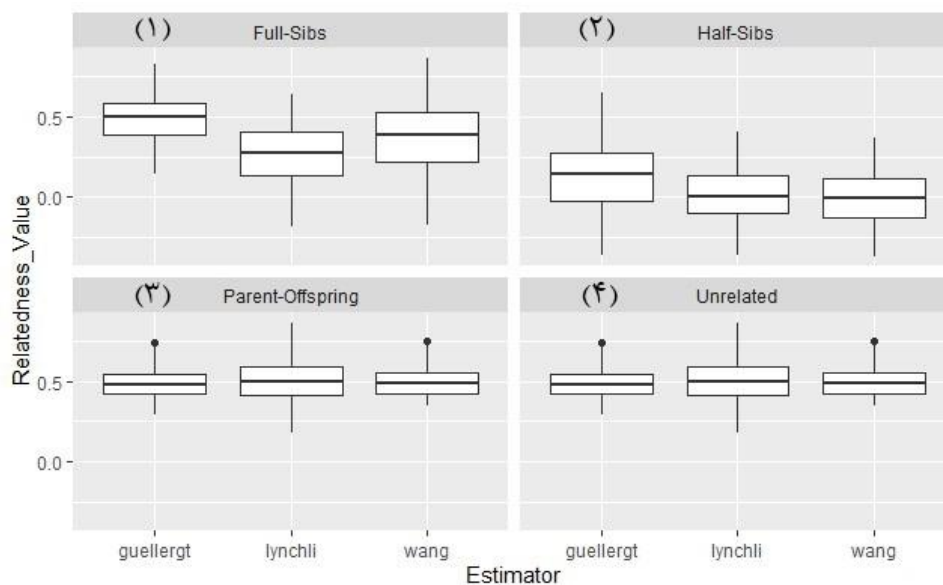
مشاهده شد. میانگین شاخص‌ها برای داده‌های شبیه‌سازی شده به شکل نمودار جعبه‌ای ترسیم شد (شکل ۳). بیشترین میزان خطای نوع اول (طبقه‌بندی افراد غیر خویشاوند به عنوان خواهر-برادر ناتنی و یا طبقه‌بندی خواهر-برادر ناتنی به عنوان خواهر-برادر ننی) در شاخص rLL و کمترین میزان در ML مشاهده شد (جدول ۲). بر اساس نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که شاخص ML و rQG کارایی بیشتری به نسبت سایر شاخص‌ها در تعیین روابط خویشاوندی دارند. از بین ۱۹۰ مقایسه جفتی هرکدام از شاخص‌های rW، rLL، rQG و ML به ترتیب ۶۸٪، ۷۱٪، ۷۹٪ و ۸۰٪ از مقایسات را در طبقه افراد با رابطه غیر خویشاوندی طبقه‌بندی کردند. در مجموع میزان همپوشانی بین نتایج چهار شاخص ۷۴٪ محاسبه شد (شکل ۴).

۳-۲- تعیین روابط خویشاوندی بین افراد با استفاده از شاخص‌های خویشاوندی

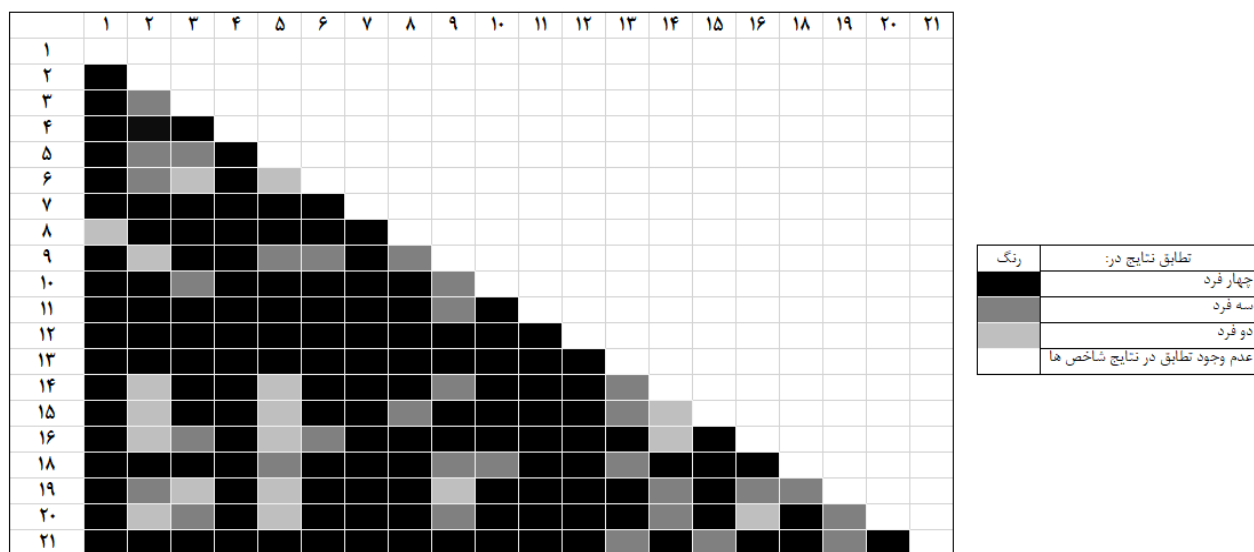
میانگین شاخص روابط خویشاوندی بین افراد برای سه شاخص rLL، rQG و rW به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۴۴- و ۰/۰۲ به دست آمد. نمودارهای تراکم به منظور ارزیابی دقت مقادیر برآورد شده خویشاوندی، برای جفت‌های شبیه‌سازی شده با روابط مشخص و بر اساس فراوانی آللی ترسیم شد (شکل ۲). این نمودار نشان می‌دهد که هر چه میزان همپوشانی هیستوگرام‌ها کمتر باشد، توانایی جایگاه‌ها در تفکیک روابط خویشاوندی مختلف بین افراد بیشتر است. در تحلیل انجام شده، همپوشانی به نسبت یکسانی بین روابط خویشاوندی مختلف در شاخص‌ها



شکل ۲. نمودار تراکم به منظور ارزیابی دقت مقادیر برآورد شده خویشاوندی بر اساس شاخص‌های rW (۱)، rLL (۲) و rQG (۳) برای داده‌های شبیه‌سازی شده. محور افقی مقادیر هر یک از شاخص‌های روابط خویشاوندی و محور عمودی تراکم جفت-افراد شبیه‌سازی شده برای مقادیر مختلف شاخص‌ها است.



شکل ۳. نمودار جعبه‌ای شاخص‌های برآورد خویشاوندی بر اساس داده‌های شبیه‌سازی شده برای هر یک از روابط خواهر-برادر ننی (۱)، خواهر-برادر ناتنی (۲)، والد-فرزندی (۳)، و غیرخویشاوند (۴) است. محور افقی نوع شاخص خویشاوندی و محور عمودی مقادیر شاخص را نشان می‌دهد.



شکل ۴. شاخص‌های روابط خویشاوندی rW ، rLL ، rQG و ML در هر یک از ۱۹۰ جفت (مربوط به ۲۰ فرد) محاسبه و با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج نشان داد که در ۷۴٪ از جفت‌ها، بین نتایج هر چهار شاخص همپوشانی وجود دارد. همچنین در ۱۶٪ از جفت افراد، بین سه شاخص همپوشانی مشاهده شد.

قرار دارد، اما گروه‌بندی این دو نمونه با استفاده از سایر نرم-افزارهای تحلیل والدینی (COLONY و ML-Relate) نشان‌دهنده رابطه خواهر-برادر تنی و شاخص‌های روابط خویشاوندی (rQG و ML) نشان‌دهنده رابطه خواهر-برادر ناتنی بود. علاوه بر سه جفت رابطه والد-فرزندی اشاره‌شده در نرم‌افزار CERVUS، این نرم‌افزار شش رابطه والد-فرزندی دیگر با سطح اطمینان بالای ۸۰٪ مشخص نمود. قابل‌ذکر است که مقدار شاخص ML برای این جفت پایین بوده است که با در نظر گرفتن ویژگی‌های زیستی این رابطه خویشاوندی غیرمحمول به نظر می-رسید (جدول ۳).

نتایج نرم‌افزار COLONY نیز نشان داد که در جمعیت مورد مطالعه، بین پنج جفت از افراد رابطه خواهر-برادر تنی مشاهده می‌شود. مقایسه نتایج COLONY با سایر روش‌ها نشان داد که اگرچه در برخی موارد همپوشانی بین نتایج مشاهده می-شود، اما تفاوت‌هایی نیز بین روش‌ها وجود دارد. به‌طور مثال، در رابطه با نمونه‌های ۱۴ و ۲۱ (نر بالغ و نر بالغ)، نتایج سایر روش-های تحلیل والدینی و همچنین شاخص‌ها نیز با نتایج COLONY

۳-۳- تعیین روابط بین افراد با استفاده از تحلیل‌های والدینی نتایج نرم‌افزار CERVUS نشان داد که در جمعیت مورد مطالعه، سه جفت رابطه والد-فرزندی با سطح اطمینان بالای ۹۵٪ وجود دارد. مقایسه نتایج به‌دست‌آمده از نرم‌افزار CERVUS با سایر روش‌ها نشان داد که اگرچه در برخی موارد همپوشانی بین نتایج مشاهده می‌شود، اما تفاوت‌هایی نیز بین روش‌ها وجود دارد. در دو مورد (جفت نمونه‌های ۳-۵ و ۱۳-۱۵) از سه مورد رابطه والد-فرزندی تشخیص داده شده توسط CERVUS، نتایج COLONY و ML-Relate نتایج یکسان و متفاوت از CERVUS را نشان دادند. برای مثال در رابطه با نمونه‌های شماره ۳ و ۵ (به ترتیب ماده بالغ و نر بالغ)، اگرچه شاخص ML نیز این دو نمونه را در طبقه افراد با رابطه والد-فرزند قرار داد، اما نتایج نرم-افزارهای ML-Relate، COLONY و شاخص rQG این دو فرد را به‌عنوان افراد با رابطه خواهر-برادر تنی طبقه‌بندی نمود که با در نظر گرفتن شرایط زیستی رابطه خواهر-برادر محتمل‌تر بود. همچنین در خصوص نمونه‌های ۱۳ و ۱۵ (به ترتیب ماده بالغ و نر نابالغ) نیز اگرچه CERVUS این افراد را در طبقه والد-فرزند

جدول ۳. روابط والدینی پیش‌بینی شده با درصد اطمینان بالا در ۲۰ نمونه گوسفند وحشی در سایت تکثیر در اسارت میانکتل با استفاده از نرم‌افزارهای Cervus، COLONY، RELATED و ML-Relate

فرد اول / کد نمونه	فرد دوم / کد نمونه	CERVUS	COLONY	ML-Relate	شاخص‌های خویشاوندی	
					Maximum-likelihood (ML) در ML-Relate	QuellerGT (rQG) RELATED در RELATED
					نرم‌افزار	نرم‌افزار
۵ (نر بالغ)	۳ (ماده بالغ)	والد-فرزند	خواهر-برادر تنی	خواهر-برادر تنی	والد-فرزند	خواهر-برادر تنی
۱۴ (نر نابالغ)	۲ (ماده بالغ)	والد-فرزند	غیر خویشاوند	والد-فرزند	خواهر-برادر تنی	خواهر-برادر ناتنی
۱۵ (نر نابالغ)	۱۳ (ماده بالغ)	والد-فرزند	خواهر-برادر تنی	خواهر-برادر تنی	خواهر-برادر ناتنی	خواهر-برادر ناتنی
۶ (نر نابالغ)	۹ (نر بالغ)	-	برادر تنی	برادر ناتنی	برادر ناتنی	برادر ناتنی
۱۸ (ماده نابالغ)	۱۲ (نر نابالغ)	-	خواهر-برادر تنی	خواهر-برادر تنی	خواهر-برادر ناتنی	خواهر-برادر ناتنی
۱۴ (نر نابالغ)	۲۱ (نر بالغ)	-	برادر تنی	برادر تنی	برادر تنی	برادر تنی

خویشاوندی، همخوانی بیشتری با نتایج COLONY داشته و درصد همپوشانی نتایج نرم‌افزارهای COLONY و ML-Relate نزدیک به ۷۸٪ بوده است (جدول ۳ و شکل ۵).

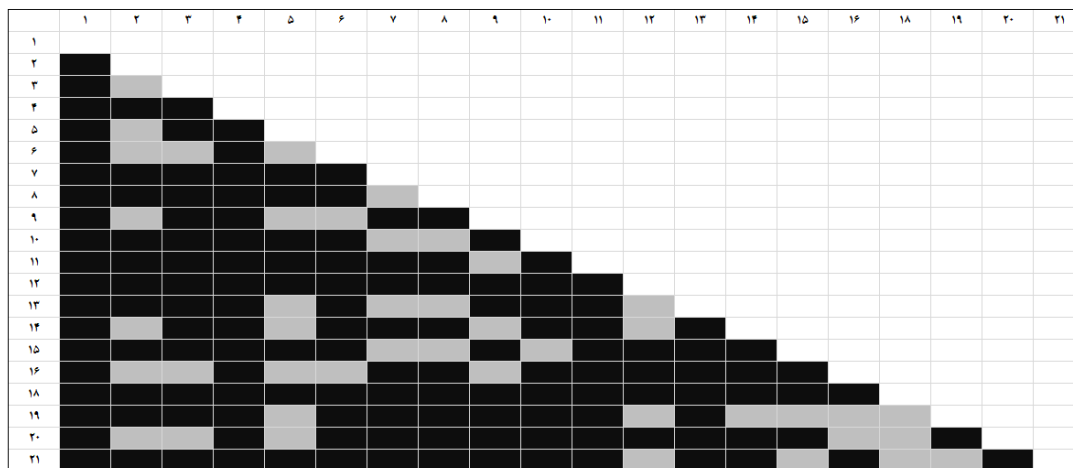
۴- بحث و نتیجه‌گیری

جمعیت بنیان‌گذار گوسفند وحشی در مرکز تکثیر در اسارت میانکتل، متشکل از ۲۰ رأس (۱۱ رأس میش و ۹ رأس قوچ) است که از سال ۱۴۰۰ به این مرکز منتقل شده‌است. بر اساس سرشماری صورت گرفته در سال ۱۴۰۲ تعداد ۴۵ رأس قوچ و میش در این مرکز سرشماری شده‌است که در محدوده فنس‌کشی شده در سایت مذکور نگهداری می‌شود. آن‌چیزی که نگرانی در خصوص این جمعیت را افزایش می‌دهد، کوچک بودن جمعیت بنیان‌گذار اولیه و در نتیجه وجود روابط خویشاوندی بین افراد در نتیجه درون‌آمیزی است. از این‌رو، بررسی روابط خویشاوندی بین افراد ضروری به نظر می‌رسد.

مطالعه حاضر نشان داد جایگاه‌های ریزماهواره استفاده شده می‌توانند اطلاعات ارزشمندی در رابطه با ساختار اجتماعی و خویشاوندی جمعیت مورد مطالعه فراهم آورند. تاکنون از این نشانگرها در مطالعات بسیاری به‌منظور ارزیابی روابط

همخوانی داشت و این نمونه‌ها را در گروه افراد با رابطه برادر تنی قرار داد. در مقابل، در خصوص نمونه‌های ۶ و ۹ (نر بالغ و نر بالغ)، اگرچه COLONY این نمونه‌ها را گروه افراد با رابطه خویشاوندی برادر تنی گروه‌بندی کرد، اما سایر روش‌های استفاده شده نشان از رابطه برادری ناتنی بین آن دو نمونه بود.

در رابطه با روابط خواهر-برادر تنی شناسایی شده توسط نرم‌افزار COLONY نیز نتایج نشان داد که نتایج نرم‌افزار ML-Relate به جزء یک مورد (جفت نمونه‌های ۶-۹) نتایج مشابهی با COLONY ارائه می‌کند. در مقابل، نتایج شاخص‌های روابط خویشاوندی همخوانی بالایی با نتایج COLONY نشان نداد و فقط در یک (ML) یا دو (rQG) مورد نتایج شاخص‌ها با نتایج COLONY یکسان بود. برای مثال، در رابطه با جفت نمونه ۶-۹، اگرچه نرم‌افزار COLONY نشان از رابطه برادر تنی بین افراد بود، اما نتایج ML-Relate و شاخص‌ها نشان داد که رابطه بین این افراد با احتمال زیاد برادر ناتنی است. اگرچه در برخی موارد نیز نتایج شاخص‌های خویشاوندی و تحلیل والدینی انطباق کامل نشان داد. برای مثال، در رابطه با جفت نمونه ۱۴-۲۱، تمامی روش‌های استفاده شده نشان از رابطه برادری تنی بین این نمونه‌ها بود. در مجموع به نظر می‌رسد که نتایج تحلیل‌های والدینی در نرم‌افزار ML-Relate در مقایسه با شاخص‌های روابط



شکل ۵. مقایسه نتایج دو نرم‌افزار COLONY و ML-relate. در این ماتریس رنگ مشکی بیانگر تطابق نتایج بین دو نرم‌افزار و رنگ خاکستری نشان‌دهنده عدم تطابق آن‌ها است. بر اساس این مقایسه، در ۷۸٪ از جفت افراد همپوشانی مشاهده شد.

موضوع نشان از کارایی به نسبت مناسب این شاخص‌ها بعنوان مکمل در تحلیل‌های والدینی و تعیین روابط خویشاوندی است. اگرچه شاخص ML کمترین میزان خطا نوع اول را نشان داد که این یافته‌ها نشان‌دهنده دقت بالاتر شاخص ML در شرایط مطالعه حاضر است. تفاوت در دقت شاخص‌های مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت در روش‌های آماری، فرضیات زیرساختی، و نحوه استفاده از اطلاعات ژنتیکی باشد. شاخص ML با استفاده از مدل‌های احتمالاتی پیچیده‌تر، امکان مقایسه مستقیم بین فرضیات مختلف را فراهم می‌کند و اثر خطای نمونه‌برداری و ساختار آللی جمعیت را بهتر کنترل می‌نماید (۴ و ۲۵). اگرچه در نمونه‌های کوچک، روش‌های بر پایه‌ی درست‌نمایی ممکن است به دلیل کمبود داده یا توزیع نامتعادل آلل‌ها دچار انحراف یا نوسان شوند. از این رو، برآوردگرهای لحظه‌ای مانند rQG که بر پایه‌ی مقایسه میانگین تفاوت‌های آللی بین افراد هستند، در این شرایط می‌توانند تخمین‌های پایدارتری ارائه دهند (۴۱). از آن‌جا که شاخص‌های روابط خویشاوندی تنها یک مقدار عددی از میزان خویشاوندی بین دو فرد ارائه می‌دهند، از این رو در شرایطی که داده‌ها محدود، نرخ خطای ژنوتیپی بالا یا تنوع آللی پایین باشد، ممکن است نتایج این شاخص با نتایج تحلیل‌های والدینی هم‌خوانی نداشته باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد که با ترکیب نتایج به‌دست‌آمده از

خویشاوندی استفاده شده است (۲۸، ۳۵، ۳۶ و ۴۹). اگرچه عملکرد نشانگرهای ریزماهواره در تشخیص روابط خویشاوندی متغیر بود. این تفاوت به‌وضوح نشان می‌دهد که انتخاب نشانگرهای با چندریختی و تفکیک‌پذیری بالا برای مطالعات خویشاوندی ضروری است. علاوه بر این، افزایش تعداد جایگاه‌های ریزماهواره تأثیر معنی‌داری بر بهبود قدرت تفکیک روابط خویشاوندی داشت (شکل ۱). در سایر مطالعات نیز نشان داده شده است که قدرت تشخیص روابط خویشاوندی با افزایش تعداد نشانگرها (به‌ویژه در تفکیک خواهر-برادری تنی و ناتنی)، به‌طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد (۳۶). علیرغم کارایی بالای این نشانگرها در ارزیابی روابط خویشاوندی، توسعه نشانگرهای مولکولی جدید همچون تفاوت‌های چندریختی تک نوکلئوتیدی (SNP)، ورود فناوری‌های پیشرفته‌تر همچون توالی‌یابی کل ژنوم، و همچنین ابزارهای هوش مصنوعی کارایی و دقت تحلیل‌های والدینی را افزایش داده است (۷). بنابراین افزایش تعداد جایگاه‌های ژنی، ترکیب نتایج بدست آمده با داده‌های میتوکندریایی و یا سایر نشانگرهای مولکولی می‌تواند در تایید روابط والد-فرزند و یا خواهر-برادر پیش‌بینی شده موثر واقع شود.

تحلیل شاخص‌های خویشاوندی نشان داد که در ۷۴٪ مقایسات جفتی، نتایج هر چهار شاخص یکسان است، که این

(۱۱). با توجه به موارد اشاره شده، از آن‌جا که در مطالعه حاضر اطلاعاتی از قبل در خصوص روابط خویشاوندی بین ۲۰ فرد نمونه‌برداری شده در دسترس نبود و همچنین احتمال عدم حضور ژنوتیپ والدین در بین نمونه‌ها وجود داشت، صحت‌سنجی روابط خویشاوندی پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزارهای استفاده شده فراهم نبود. اگرچه، به نظر می‌رسد که با توجه به موارد اشاره شده، استفاده از نرم‌افزار Colony در کنار شاخص خویشاوندی حداکثر درست‌نمایی (ML) رویکرد مناسبی برای تعیین روابط خویشاوندی بین افراد در سایر جمعیت‌های گوسفند وحشی در کشور باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد در مواردی که نتایج روش‌های مختلف ارزیابی روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت همپوشانی کامل ندارد، استفاده تلفیقی از شاخص‌های روابط خویشاوندی، تحلیل‌های والدینی و همچنین اطلاعات زیستی (جنسیت و سن) می‌تواند تصویری دقیق‌تر از ساختار خویشاوندی جمعیت‌ها ارائه دهد. همچنین در شرایطی که اطمینان از حضور ژنوتیپ والدین در بین نمونه‌ها وجود ندارد و سیستم تولیدمثلی گونه نیز به صورت چندهمسری است، استفاده از نرم‌افزار Colony رویکرد مناسب‌تری در تعیین روابط خویشاوندی است. با توجه به اینکه در جمعیت مورد مطالعه روابط خویشاوندی نزدیکی بین برخی از افراد مشاهده شد، از این‌رو اقدامات مدیریتی همچون اضافه نمودن افراد جدید به جمعیت و انتقال برخی از افراد جمعیت به سایر مناطق می‌تواند راهکار موثری در کاهش تهدیدات ژنتیکی در نتیجه درون‌آمیزی و افزایش درجه خویشاوندی بین افراد جمعیت باشد. با توجه به کارایی جایگاه‌های ریزماهواره استفاده شده در تعیین روابط خویشاوندی بین افراد در جمعیت میانکتل، از این مجموعه جایگاه‌ها می‌توان برای سایر جمعیت‌های گوسفند وحشی در کشور استفاده نمود.

شاخص‌ها در کنار تحلیل‌های والدینی و در نظر گرفتن شرایط سنی و جنسی افراد، می‌تواند تحلیل دقیق‌تری از روابط بین افراد داشت (۴۹). با توجه به نتایج بدست آمده، به نظر می‌رسد دو شاخص QuellerGT و حداکثر درست‌نمایی (ML) مکمل مناسبی برای نرم‌افزارهای تحلیل والدینی در تعیین روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت است.

بررسی سه نرم‌افزار تحلیلی CERVUS، COLONY و ML-Relate نشان داد که علیرغم وجود همپوشانی در بسیاری از موارد، نتایج یکسانی در تمامی موارد حاصل نمی‌شود. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت‌های بنیادی در رویکرد آماری، نوع داده‌های ورودی، سطح اطمینان تعریف‌شده برای فرضیه‌ها، میزان استفاده از اطلاعات زیستی و توانایی مدل‌ها در تشخیص روابط پیچیده باشد (۴۹). نرم‌افزار CERVUS بر مبنای آزمون‌های احتمالاتی و با هدف شناسایی والد-فرزندی طراحی شده است؛ اما در مواردی مانند نمونه‌هایی با فاصله زمانی و مکانی زیاد، COLONY که از روش درست‌نمایی کامل برای تمایز بین انواع روابط استفاده می‌کند. با توجه به این که یکی از فرضیات مهم نرم‌افزار CERVUS، وجود ژنوتیپ‌های والدین در داده‌ها است، در مواردی که نمونه‌برداری از والدین صورت گرفته باشد، این نرم‌افزار عملکرد بهتری در تعیین روابط خویشاوندی دارد (۱۲). در مقابل، نرم‌افزار COLONY در صورت نبود ژنوتیپ والدین در بین نمونه‌ها یا پیدا نکردن والد کاندید مناسب، قادر به بازسازی ژنوتیپ‌های والدین است (۱۲). بنابراین استفاده از نرم‌افزار COLONY در مواردی که اطمینان از حضور والدین واقعی در داده‌ها وجود ندارد، پیشنهاد می‌شود. عدم دستیابی به نتایج یکسان با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف در مطالعه حاضر را همچنین می‌توان به دلیل سیستم جفت‌گیری چند همسری در گوسفند وحشی توجیه نمود. مطالعات نشان می‌دهد که تشخیص روابط خویشاوندی در جمعیت‌های با سیستم چند همسری چالش برانگیز است (۲۲). افزایش ارتباط بین والد و فرزندان (به عنوان مثال جفت‌گیری پدر با فرزند ماده) می‌تواند منجر به انتساب‌های متعدد شود و اطمینان از نتایج حاصل را کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

ارزشمند اداره کل محیط‌زیست استان فارس (شماره طرح:

۱۴۰۲/۴۰۰/۳۲۶۱ ص) و همچنین دانشگاه شیراز تشکر و

قدردانی به عمل آورند.

بدینوسیله نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های

۵- منابع

1. Ballou, J. D. and Lacy, R. C. 1995. Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigreed populations. pp. 76-111. In: Ballou, J. D., Gilpin, M. E. and Foose, T. J. (Eds.), Population Management for Survival and Recovery. Columbia University Press.
2. Berger, A., Scheibe, K. M., Eichhorn, K., Scheibe, A. and Streich, J., 1999. Diurnal and ultradian rhythms of behavior in a mare group of Przewalski horse (*Equus ferus przewalskii*), measured through one year under semi-reserve conditions. *Applied Animal Behaviour Science* 64(1): 1-17.
3. Blouin, M. S., Parsons, M., Lacaille, V. and Lotz, S. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5(3): 393-401.
4. Dakin, E. E. and Avise, J. C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93(5): 504-509.
5. Duchesne, P., Godbout, M. H. and Bernatchez, L. 2002. PAPA (Package for the Analysis of Parental Allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. *Molecular Ecology Notes* 2(2): 191-193.
6. Fischer, J. and Lindenmayer, D. B. 2000. An assessment of the published results of animal relocations. *Biological Conservation* 96(1): 1-11.
7. Flanagan, S. P. and Jones, A. G. 2019. The future of parentage analysis: From microsatellites to SNPs and beyond. *Molecular Ecology* 28(3): 544-567.
8. Frankham, R. 2008. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology* 17(1): 325-333.
9. Gonçalves da Silva, A., Lalonde, D. R., Quse, V., Shoemaker, A. and Russello, M. A. 2010. Genetic approaches refine ex situ lowland tapir (*Tapirus terrestris*) conservation. *Journal of Heredity* 101(5): 581-590.
10. IUCN. 2024. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2024-2. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland.
11. Jones, A. G. and Ardren, W. R. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12(10): 2511-2523.
12. Jones, A. G., Small, C. M., Paczolt, K. A. and Ratterman, N. L. 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10(1): 6-30.
13. Jones, O. R. and Wang, J. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology and Resources* 10(3): 551-555.
14. Kalinowski, S. T., Taper, M. L. and Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16(5): 1099-1106.
15. Kalinowski, S. T., Wagner, A. P. and Taper, M. L. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6(2): 576-579.
16. Karami, M., Ghadirian, T. and Faizolahi, K. 2016. The Atlas of Mammals of Iran. Jahad Daneshgahi, Kharazmi Branch, Karaj, Iran (In Persian).
17. Khosravi, R., Mahmoudi, D., Kaboli, M. and Julaie, L. 2025. The potential of captive populations as founders in reintroduction programs: a case study of wild sheep at the miankotal captive breeding site. *Iranian Journal of Applied Ecology* 13(3): 1-13. (In Persian).
18. Kleiman, D. G. 1989. Reintroduction of captive mammals for conservation. *BioScience* 39(3): 152-161.
19. Li, C. C., Weeks, D. E. and Chakravarti, A. 1993. Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. *Human Heredity* 43(1): 45-52.
20. Dong, L., Niu, W., Zhou, Z., Hsu, Y. C., Sun, U., Lloyd, H. and Zhang, Y. 2011. Assessing the genetic integrity of captive and wild populations for reintroduction programs: the case of Cabot's Tragopan in China. *Avian Research* 2(2): 65-71.
21. Mahmoudi, D., Khosravi, R., Kaboli, M. and Adavoudi, R., 2024. Genetic variation and population structure of wild sheep in bamou national park in fars province using microsatellite markers. *Iranian Journal of Applied Ecology* 12(4): 45-56. (In Persian).
22. Marshall, T. C., Slate, J. B. K. E., Kruuk, L. E. B. and Pemberton, J.M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7(5): 639-655.

23. Martin, M. K. 2024. Detecting multiple paternity in Mule deer using kinship values. Undergraduate honors thesis. Brigham Young University. Utah, United States.
24. Miller, W., Wright, S. J., Zhang, Y., Schuster, S. C. and Hayes, V. M. 2010. Optimization methods for selecting founder individuals for captive breeding or reintroduction of endangered species. *Biocomputing* 2010: 43-53.
25. Milligan, B.G. 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* 163(3): 1153-1167.
26. Ogden, R., Langenhorst, T., McEwing, R. and Woodfine, T. 2007. Genetic markers and sample types for pedigree reconstruction in Grevy's zebra (*Equus grevyi*). *Der Zoologische Garten* 77(1): 29-35.
27. Pahlavani, A. 2004. Study on reproduction of jebeer gazzelle (*Gazella dorcas*) in Shir-ahmad wildlife sanctuary, Sabzevar. *Journal of Environmental Studies* 30(36): 49-54. (In Persian).
28. Patel, S., Thompson, K. F., Santure, A. W., Constantine, R. and Millar, C. D. 2017. Genetic kinship analyses reveal that Gray's beaked whales strand in unrelated groups. *Journal of Heredity* 108(4): 456-461.
29. Peter, C., Bruford, M., Perez, T., Dalamitra, S., Hewitt, G., Erhardt, G. and Econogene, C. 2007. Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Animal Genetics* 38(1): 37-44.
30. Pew, J., Muir, P. H., Wang, J. and Frasier, T. R. 2015. Related: An R package for analysing pairwise relatedness from codominant molecular markers. *Molecular Ecology Resources* 15(3): 557-561.
31. Queller, D. C. and Goodnight, K. F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43(2): 258-275.
32. Reed, D. H. and Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17(1): 230-237.
33. Reed, D. H., Lowe, E. H., Briscoe, D. A. and Frankham, R. 2003. Fitness and adaptation in a novel environment: effect of inbreeding, prior environment, and lineage. *Evolution* 57(8): 1822-1828.
34. Rezaei, H. R., Naderi, S., Chintauan-Marquier, I. C., Taberlet, P., Virk, A. T., Naghash, H. R., Rioux, D., Kaboli, M. and Pompanon, F. 2010. Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54(2): 315-326.
35. Rueger, T., Buston, P. M., Bogdanowicz, S. M. and Wong, M. Y. 2021. Genetic relatedness in social groups of the emerald coral goby *Paragobiodon xanthosoma* creates potential for weak kin selection. *Molecular Ecology*, 30(5): 1311-1321.
36. Sánchez-Velásquez, J. J., Pinedo-Bernal, P. N., Reyes-Flores, L. E., Yzásiga-Barrera, C. and Zelada-Mázmela, E. 2022. Genetic diversity and relatedness inferred from microsatellite loci as a tool for broodstock management of fine flounder *Paralichthys adspersus*. *Aquaculture and Fisheries*, 7(6): 664-674.
37. Thintip, J., Singchat, W., Ahmad, S. F., Ariyaraphong, N., Muangmai, N., Chamchumroon, W., Pitiwong, K., Suksavate, W., Duangjai, S., Duengkae, P. and Srikulnath, K., 2021. Reduced genetic variability in a captive-bred population of the endangered Hume's pheasant (*Syrnaticus humiae*, Hume 1881) revealed by microsatellite genotyping and D-loop sequencing. *PLoS One* 16(8): e0256573.
38. Toone, W. D. and Wallace, M. P. 1994. The extinction in the wild and reintroduction of the California condor (*Gymnogyps californianus*). pp. 411-419. In: Creative Conservation: Interactive Management of Wild and Captive Animals. Dordrecht: Springer Netherlands.
39. Traill, L. W., Brook, B. W., Frankham, R. R. and Bradshaw, C. J. 2010. Pragmatic population viability targets in a rapidly changing world. *Biological Conservation* 143(1): 28-34.
40. Trask, A. E., Bignal, E. M., McCracken, D. I., Monaghan, P., Piernney, S. B. and Reid, J. M. 2016. Evidence of the phenotypic expression of a lethal recessive allele under inbreeding in a wild population of conservation concern. *Journal of Animal Ecology* 85(4): 879-891.
41. Van de Castele, T., Galbusera, P. and Matthysen, E. 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology* 10(6): 1539-1549.
42. Vié, J. C., Hilton-Taylor, C. and Stuart, S. N. 2009. Wildlife in a Changing World: An Analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Gland, Switzerland
43. Wang, J. 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics* 160(3): 1203-1215.
44. Wang, J. 2006. Informativeness of genetic markers for pairwise relationship and relatedness inference. *Theoretical Population Biology* 70(3): 300-321.
45. Wang, J. 2011. COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11(1): 141-145.
46. Wang, J. 2017. Estimating pairwise relatedness in a small sample of individuals. *Heredity* 119(5): 302-313.
47. Wang, J. 2014. Marker-based estimates of relatedness and inbreeding coefficients: an assessment of current methods. *Journal of Evolutionary Biology* 27(3): 518-530.
48. Wellmann, R. and Bennewitz, J., 2019. Key genetic parameters for population management. *Frontiers in Genetics*, 10: 667-680.

49. Weng, Z., Yang, Y., Wang, X., Wu, L., Hua, S., Zhang, H. and Meng, Z. 2021. Parentage analysis in giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) using microsatellite and SNP markers from genotyping-by-sequencing data. *Genes* 12(7): 1042.
50. Willoughby, J. R., Fernandez, N. B., Lamb, M. C., Ivy, J. A., Lacy, R. C. and DeWoody, J. A. 2015. The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. *Molecular Ecology* 24(1): 98-110.

Comparative analysis of Kinship in Captive Populations Using Microsatellite Markers: A Case Study of Wild Sheep at the Miankotal Captive Breeding Site

Rasoul Khosravi^{1*}, Melika Roohbakhsh², Roya Adavoudi³ and Mohammad Kaboli⁴

(Received: June 16-2025; Accepted: August 12-2025)

Abstract

While numerous methods exist for kinship determination, their results frequently show incomplete concordance. To improve accuracy and reliability, we employed a multi-analytical approach in this study. Using blood samples from 20 wild sheep (*Ovis gmelini*) at the Miankotal Captive Breeding Site (Fars Province, Iran), we conducted a comparative analysis of kinship inference models based on nuclear microsatellite data. Initial simulations assessed each locus's discriminatory power for kinship determination. Kinship relationships were evaluated using multiple parentage analysis software (COLONY, CERVUS, and ML-Relate) and relatedness indices. The OarFCB304 and McM527 ranked as the highest and lowest in terms of information content for relatedness estimation. Although we observed agreement between methods, some discrepancies emerged. CERVUS identified three parent–offspring pairs with high confidence, whereas classification of these samples using ML-Relate and COLONY mainly indicated sibling relationships. Despite the fact the most likely kinship pattern in the population was half-sibling relationships, it is essential to reduce the likelihood of inbreeding through management actions such as introducing new individuals into the population. This study demonstrates that an integrative analytical approach incorporating kinship indices, parentage analyses, and biological information yields a more precise understanding of population kinship structure.

Keywords: Parentage analysis, Captive breeding, Kinship relationships, Microsatellite, Wild sheep

1- Associate Professor, Department of Natural Resources and Environmental Engineering, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

2- BSc Student, Department of Natural Resources and Environmental Engineering, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

3- PhD Student, Faculty of Biology, University of Gdansk, Gdansk, Poland

4- Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* Corresponding Author, Email: r-khosravi@shirazu.ac.ir