

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت اسب آخال - تکه و مقایسه آن با نژادهای دیگر با استفاده از داده‌های تعیین توالی کل ژنوم

Genetic structure analysis of Akhal-Teke horse population and comparison with other horse breeds by using whole genome sequencing data

حجت اسدالله پور نعنایی^۱، مریم نصرتی^{۲*}، محمدرضا محمدآبادی^۱

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته، استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲- استادیار، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

Asadollahpour Nanaei H¹, Nosrati M^{*2}, Mohammadabadi MR¹

1- Graduated, Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran,
Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_nosrati@pnu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۸)

چکیده

اسب آخال - تکه یکی از قدیمی‌ترین نژادهای اسب در جنوب کشور ترکمنستان و شمال ایران است که برای زندگی در شرایط سخت محیطی آسیای مرکزی آداپته شده است. این نژاد نزدیک به ۱۰۰ سال برای صفت سرعت مورد انتخاب قرار گرفته است، لذا بررسی ساختار ژنتیکی آن به انتخاب روند درست برنامه‌های اصلاح نژادی در نژادهای مختلف اسب کمک خواهد کرد. در این پژوهش از داده‌های تعیین توالی کل ژنوم ۸۶ راس اسب از ۱۶ نژاد مختلف از سراسر دنیا استفاده شد. درخت فیلوژنی ترسیم شد و آنالیز مولفه‌های اصلی با نرم‌افزار GCTA و ساختار جمعیت با نرم‌افزار ADMIXTURE ترسیم شد. نتایج درخت فیلوژنی نشان داد که همه نژادها بر اساس مناطق جغرافیایی که انتخاب شده‌اند، دسته‌بندی شده‌اند. همچنین آنالیز مولفه‌های اصلی بیشترین فاصله ژنتیکی بین آخال - تکه با نژادهای استانداردبرد و تروبرد را نشان داد. نتایج ادمیکسچر نشان داد اسب آخال - تکه در جمعیت‌های فرضی $K=4$ و $K=5$ همولوگ ژنتیکی بود، اما زمانی که جمعیت فرضی $K=3$ و $K=2$ اعمال شد، افراد به‌ترتیب به سه و دو رنگ مختلف ظاهر شدند. میانگین تعداد Run Of Homozygosity در اسب آخال - تکه نسبت به نژادهای تروبرد، سریا، استانداردبرد و کوارتر کمتر بود. بیشترین میزان عدم تعادل پیوستگی در تمام فواصل ژنوم مربوط به نژاد تروبرد بود و پس از آن، در مقایسه با سایرین، دو نژاد استانداردبرد و آخال - تکه الگوی مشابه داشتند. نتایج این پژوهش نشان داد که نژاد آخال - تکه کمتر از نژادهای تروبرد و استانداردبرد تحت برنامه‌های اصلاح نژادی قرار گرفته است و نیز میزان هتروزیگوسیتی آن در سطح متوسط است. از این رو، با توجه به استفاده از این نژاد در رشته‌های دو سرعت، دو استقامت، پرش و حرکات نمایشی به‌نظر می‌رسد، از تنوع ژنتیکی موجود در سطح ژنوم این نژاد می‌توان در برنامه اصلاح نژادی مختلف اسب استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

اسب آخال - تکه
ساختار ژنومی
جهش تک نوکلئوتیدی
عدم تعادل پیوستگی
همخوانی

اهلی شدن اسب پس از اهلی کردن بز، گوسفند، گاو، خوک و سگ در حدود ۶۰۰۰-۵۰۰۰ سال قبل در آسیای مرکزی اتفاق افتاده است (Petersen et al. 2013; Outram et al. 2009). به دلیل عدم وجود اختلافات واضح مورفولوژیکی و استخوان‌شناسی بین گونه‌های وحشی و گونه‌های اولیه و نیز کمبود شواهد تاریخی در برخی دوره‌های مهم باستان‌شناسی، اطلاعات کمی در مورد اهلی شدن این حیوان در دسترس می‌باشد (Librado et al. 2016). اهلی شدن اسب نه تنها مانند سایر گونه‌ها برای تولید شیر و گوشت بوده است، بلکه این حیوان نقش مهمی در توسعه حمل و نقل، تجارت و امور نظامی داشته است (Bartosiewicz 2006). علاوه بر این، اهلی شدن اسب نقش عمده‌ای در تبادل زبان، مذهب، علم و هنر بین جوامع بشری داشته است. همچنین استفاده از اسب در کشاورزی منجر به افزایش بهره‌وری در این بخش شد به طوری که هنوز در کشورهای کمتر توسعه یافته به عنوان یکی از حیوانات مهم در این صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Anthony 2010). فعالیت‌های انسان از طریق کاهش جمعیت اسب‌های وحشی، به طور مستقیم و غیر مستقیم در فرآیند اهلی‌سازی اسب تأثیر داشته است، به طوری که به موازات کاهش جمعیت اسب‌های وحشی، نژادهای مختلفی توسط انسان شکل گرفت (Librado et al. 2016). با شکل‌گیری نژادها، تنوع درون نژادی کاهش و تنوع بین نژادی افزایش یافته است و به این ترتیب نژادهای مختلف از نظر خصوصیات مورفولوژیکی و رفتاری شکل گرفته‌اند (McCue et al. 2012). بر اساس گزارش FAO تا سال ۲۰۱۵ در حدود ۸۷ نژاد اسب منقرض شده و از ۹۰۵ نژاد باقی‌مانده یک چهارم آن‌ها در معرض خطر انقراض قرار دارند.

اسب آخال- تکه یکی از قدیمی‌ترین نژادهای اسب مربوط به مناطق مرکزی آسیا در جنوب کشور ترکمنستان و شمال ایران است که برای زندگی در شرایط سخت محیطی آسیای مرکزی آداپته شده است. ریشه اسب آخال- تکه به بیش از ۳۰۰۰ سال قبل برمی‌گردد (Ustyantseva et al. 2019). آخال- تکه از نوادگان اسب‌های باستانی Scythian به‌شمار می‌رود و تکه (Teke) نیز نام قبیله‌ای است که در آبادی آخال (Akhal) زندگی

می‌کرده است. اسب آخال- تکه تنها سویه از نژاد ترکمن است که از نظر ژنتیکی خالص باقی‌مانده است. این نژاد دارای بدنی بلند و باریک با رنگ پوستی خیره‌کننده حاصل زندگی سخت در دشت‌ها می‌باشد. منابع محدود و حیوانات شکارچی باعث شدند این اسب‌ها گردنی بلند، پاهایی باریک و پوستی با رنگ طبیعی طلایی پیدا کنند (Brooks et al. 2010; Goli 1987). این نژاد نزدیک به ۱۰۰ سال برای صفت سرعت مورد انتخاب قرار گرفته است (Leisson et al. 2011). بر اساس نتایج مطالعات مختلف آخال- تکه متعلق به کلاد نژادهای آسیای میانه است که شامل اسب‌های عرب، اسبچه‌های کاسپین و اسب‌های ترکمن است (Bömcke 2011; Petersen et al. 2012; Achilli et al. 2013). این نژاد یک منبع ژنتیکی منحصر به فرد است که از نظر شکل، نوع و استفاده با سایر نژادهای اسب دنیا متفاوت است. ثبت شجره برای این نژاد در سال ۱۸۸۵ آغاز شد و استیود بوک آن در سال ۱۹۳۲ بسته شد (Cozzi et al. 2018).

پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک ملکولی و تعیین توالی کل ژنوم، باعث شده است که محققین بتوانند جنبه‌های مختلفی از ژنوم حیوانات اهلی را مورد مطالعه قرار دهند. در سال‌های اخیر، استفاده از این تکنیک‌ها جهت مطالعه جانوران بومی و حفاظت شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است (Mahmoodi et al. 2018). میزان اطلاعات به‌دست آمده از این تکنیک‌های ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Mohammadabadi. 2017a). همچنین، مطالعه نژادهای بومی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی بسیار مهم و برای طبقه‌بندی آن‌ها مورد نیاز است (Alinaghizadeh et al. 2007; Moazeni et al. 2016). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Askari et al. 2010; Moazeni et al. 2016). تنوع ژنتیکی یک عنصر اساسی برای پیشرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سازگاری به شرایط محیطی متغیر و مختلف می‌باشد (Ghasemi et al. 2010; Mohammadabadi et al. 2017b). ظهور تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی انقلابی شگرفی را برای مطالعات در سطح ژنوم به وجود

BaseRecalibrator در برنامه GATK v3.8 نمره‌های کیفیت بازها مجدداً کالیبره شد. در نهایت، چندریختی‌های تک‌نوکلئوتیدی با استفاده از ابزار UnifiedGenotyper در برنامه GATK به‌دست آمدند.

روابط خویشاوندی ژنومیک می‌توانند به‌عنوان معیاری از تشابهات میان افراد مورد توجه باشند. به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه از روش اتصال مجاورین^۱ در نرم‌افزار Mega v.7 استفاده شد. برای رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار فوق، ۱۰۰۰۰ تکرار بوت استرپ جهت ارزیابی درخت تشکیل شده به‌کار گرفته شد. تحلیل مؤلفه‌های اصلی جهت شناسایی ارتباط بین جمعیت‌ها به‌کمک PLINK و نیز نرم‌افزار GCTA انجام شد (Price et al. 2010). در مرحله اول از فایل VCF به‌عنوان ورودی نرم‌افزار PLINK جهت به‌دست آوردن ماتریس روابط خویشاوندی (GMR) استفاده شد. در مرحله بعد، دو فایل eigenval و eigenvec ایجاد شد و در مرحله آخر در محیط R با استفاده از این دو فایل مؤلفه‌های مورد نیاز جهت تشکیل PCA استخراج شد.

در مباحث ژنتیک جمعیت، اختصاص افراد به جمعیت‌های مربوط به خود اهمیت فراوانی دارد. از انواع الگوریتم‌های مبتنی بر مدل، مدل Admixture برای دستیابی به ساختار جمعیت با استفاده از داده‌های کل ژنوم ارائه شده است. در این مطالعه پس از حذف نوکلئوتیدهایی که در حالت تعادل پیوستگی با یکدیگر قرار داشتند، تعداد SNP ۱۰۸۵۶۲۱۶ جهت آنالیز ساختار ژنتیکی باقی ماند. مدل آمیختگی و فراوانی‌های آللی تصحیح شده در نرم‌افزار مربوطه جهت آنالیز ساختار داده‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا فایل ورودی نرم‌افزار Admixture به فرمت PLINK تهیه شد و مقادیر مختلف K (تعداد جمعیت‌های فرض شده) به تعداد ۴ مرتبه ($K=2, K=3, K=4, K=5$) و همراه با ۱۰۰۰۰ تکرار بوت استرپ در هر مرتبه اعمال شد. از نرم‌افزارهای fineSTRUCTURE و ChromoPainter (Lawson et al. 2012) جهت رنگ‌آمیزی کروموزم‌ها و خوشه‌بندی نژادهای مورد مطالعه استفاده شد. میزان همخونی با استفاده از برآورد رشته‌های هموزیگوت ژنومی (ROH)، به‌عنوان معیاری مناسب در برآورد

آورده است (Kharrati-Koopae et al. 2019) و مطالعات مقایسه‌ای ژنوم به‌طور مؤثری از طریق تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی امکان پذیر شده است. تاکنون مطالعات کمی در زمینه ساختار ژنوم اسب آخال-تکه و مقایسه آن با سایر نژادها صورت گرفته است (Ustyantseva et al. 2019; Petersen et al. 2019; Cozzi et al. 2018). علاوه بر این بیشتر مطالعات انجام شده با استفاده از میکروساتلیت‌ها بوده است که امکان ادغام داده‌ها و مقایسه نتایج را ندارد. بنابراین فقدان مطالعات بررسی ساختار ژنوم اسب نژاد آخال-تکه با روش‌های توالی‌یابی کل ژنوم بارز است. از این رو، این مطالعه با هدف بررسی مقایسه‌ای ساختار ژنوم اسب نژاد آخال-تکه با ۱۵ نژاد اسب دیگر در سراسر دنیا با استفاده از تعیین توالی کل ژنوم انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه داده‌ها Sequence Read Archive حاصل از توالی‌یابی ۱۶ نژاد اسب از طریق پایگاه NCBI دانلود و مورد استفاده قرار گرفت (جدول شماره ۱). کیفیت داده‌های توالی‌یابی شده از نظر امتیاز هر باز و محتوای GC در هر باز پایه، محتوای GC در هر خوانش، محتوای N در باز، توزیع اندازه قطعات خوانده شده در هر خوانش و سطوح تکرار هر توالی با برنامه FastQC بررسی شد. نقشه‌یابی برای ۳۱ جفت کروموزوم اتوزوم و نیز کروموزوم‌های جنسی (X و Y) انجام شد. آخرین نسخه ژنوم مرجع اسب آخال-تکه از سایت Ensembl دانلود شد (Ensembl 95) (<ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-95/>) (Li and Durbin 2009). از برنامه BWA (95/fasta/equus_caballus/dna/ (Durbin 2009) برای شاخص‌بندی (الگوریتم bwtsw) و نقشه‌گذاری نمونه‌های توالی‌یابی شده با ژنوم مرجع (الگوریتم MEM) استفاده شد. برای شناسایی چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی، ابتدا نواحی PCR duplicate ها با کمک برنامه Picard (<https://github.com/broadinstitute/picard>) حذف شد. به‌منظور بهینه کردن نقشه‌گذاری خوانش‌ها، نقشه‌گذاری مجدد موضعی اطراف حذف و اضافه‌های کوچک ژنوم با استفاده از ابزار RealignerTargetCreator در برنامه GATK v3.8 (McKenna et al. 2010) انجام شد. با استفاده از ابزارهای

¹ Neighbour Joining

نژادهایی که دارای حداقل چهار نمونه بودند (تعداد مساوی از هر نژاد) در محاسبات مربوطه استفاده شد.

نتایج و بحث

با توجه به اینکه در این مطالعه از داده‌های ژنومی مربوط به جمعیت‌ها با تنوع فنوتیپی و خصوصیات نژادی مربوط به چند قاره مختلف استفاده شده است، لذا ارتباط‌های مشاهده شده به نوعی منعکس کننده منشاء ژنوگرافیکی، تاریخچه نژادها و فنوتیپ‌های مشترک بین نژادهای مختلف اسب دنیا می‌باشد.

همخوانی واقعی در سطح ژنوم محاسبه شد. به منظور مطالعه سطح همخوانی در جمعیت‌های مورد بررسی از نرم‌افزار PLINK و دو دامنه بالاتر از 100 Kb و بالاتر از 1000 Kb برای هر نژاد اسب استفاده شد. نمودار تغییرات تعداد و متوسط طول ROH در بین نژادهای در محیط (<https://www.r-project.org/>) R رسم شد. جهت بررسی مقدار LD از آماره r^2 استفاده شد. میانگین آماره r^2 در فواصل مختلف ژنوم (1، 5، 15، 60 و 100 کیلو جفت‌باز) با استفاده از نرم‌افزار PLINK مورد محاسبه قرار گرفت. در این مطالعه جهت جلوگیری از خطای نامتعادل بودن تعداد نمونه، از

جدول ۱- اطلاعات مربوط به تعداد نمونه، تیپ، کشور مبدا و نژاد مورد استفاده

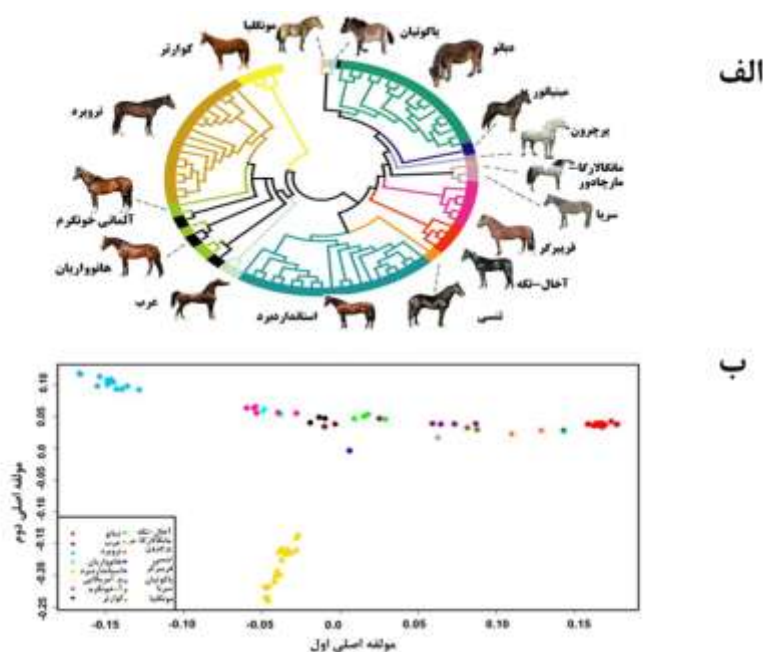
ردیف	نژاد	کشور	تعداد نمونه	تیپ
۱	دبائو	چین	۱۷	پونی
۲	آخال-تکه	ترکمنستان	۴	اسب
۳	مینیاتور آمریکایی	آمریکا	۱	پونی
۴	عرب	خاورمیانه	۲	اسب
۵	فریبرگر	فرانسه	۵	اسب
۶	هانواریان	آلمان	۴	اسب
۷	اسب آلمانی-خونگرم	آلمان	۶	اسب
۸	مانگالارگا-مارچادور	برزیل	۱	اسب
۹	پرچرون	فرانسه	۱	اسب
۱۰	کوارتر	آمریکا	۳	اسب
۱۱	سریا	پرتغال-آلمان	۲	اسب
۱۲	استانداردبرد	آمریکا	۲۰	اسب
۱۳	تنسی	آمریکا	۱	اسب
۱۴	تروبرد	آلمان	۱۷	اسب
۱۵	مونگلیا	مشخص نشده	۱	پونی
۱۶	یاکوتیان	روسیه	۱	پونی

توسط قوم مونگلیان در قرن ۱۳ تا ۱۵ از شمال چین به ناحیه سیبری روسیه برده شده است. از این رو منشاء دبائو و مونگلیا تقریباً یکسان است. همچنین منشاء نژاد یاکوتیان متعلق به سیبری روسیه می‌باشد لذا سه نژاد فاصله ژنتیکی نزدیک را نشان می‌دهند (Librado et al. 2015). اسب تروربد به همراه نژادهای اسب عرب، هانورایان، آلمانی خونگرم و کوارتر در کلاسد دوم قرار گرفتند. مطالعات گذشته نشان داده است که نژاد تروربد دارای اجداد عرب، ترکمن و Barb می‌باشد (Weatherby and Sons 1971) و ۲ نریان عرب با هم در ۲۰ درصد جمعیت اسب‌های مدرن سهم هستند (Cunningham et al. 2001). به علاوه نژادهای کوارتر و هانورایان در گذشته تحت تأثیر جریان ژنی تروربد بوده‌اند (Bower et al. 2012). سایر نژادها به طور مجزا در خوشه‌های ژنتیکی متفاوتی قرار گرفته‌اند.

آنالیز مؤلفه‌های اصلی برای شناسایی روابط بین گروهی و درون نژادها انجام شد. نتایج حاصل به خوبی تمایز بین نژادها را نشان داد (شکل ۱-ب). پلات مؤلفه اصلی اول در مقابل مؤلفه اصلی دوم نتایج درخت فیلوژنی را تایید کرد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین آخال-تکه با نژادهای استاندارد برد و تروربد مشاهده شد.

در این پژوهش داده‌های تعیین توالی ۸۶ رأس اسب از ۱۶ نژاد مختلف مورد بررسی قرار گرفت و پس از آنالیزهای مربوطه تعداد ۱۸/۷۵ میلیون جهش تک نوکلئوتیدی در همه افراد مورد شناسایی قرار گرفته شد. پارامترهای ارزیابی کیفیت داده‌ها شرایط مطلوبی داشت و درصد هم‌ردیفی ژنوم نمونه‌های مورد استفاده با ژنوم مرجع بین ۸۳ تا ۹۵ درصد بود که نشان‌دهنده دقت بالای نقشه‌یابی می‌باشد.

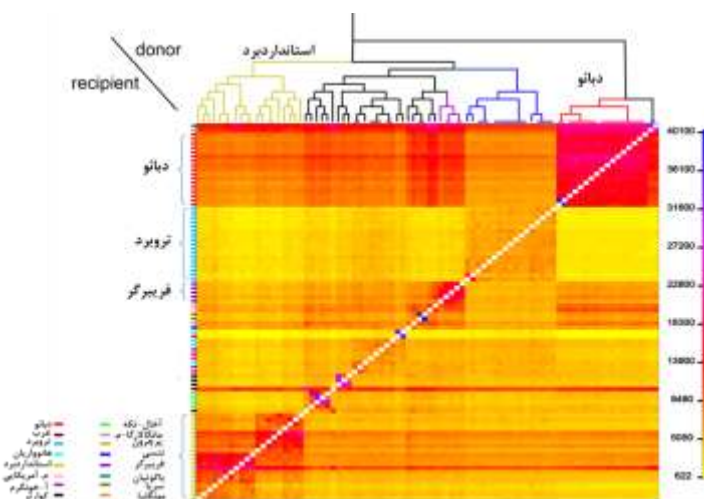
درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس روش اتصال مجاورین در شکل ۱ نشان می‌دهد که همه نژادها بر اساس مناطق جغرافیایی مختلف دسته‌بندی شده‌اند. دو کلاسد اصلی در جمعیت‌های مورد مطالعه وجود داشت، که اسب آخال-تکه همراه با نژادهای استاندارد برد، تنسی، فریبرگر، سریا، مانگالارگا-مارچادور، پرچرون، مینیاتور، دیائو، مونگلیا و یکوتیان در یک کلاسد قرار گرفت. با توجه به منشاء آسیایی نژادهای دبائو، یاکوتیان و مونگلیا، قرار گرفتن این نژادها همراه با آخال-تکه در یک کلاسد قابل پیش‌بینی بود. نتایج به دست آمده در این تحقیق هم راستا با نتایجی می‌باشد که در مطالعات گذشته و با استفاده از نژادهای مختلف گزارش شده است (Bjornstad et al. 2003). نژاد مونگلیا



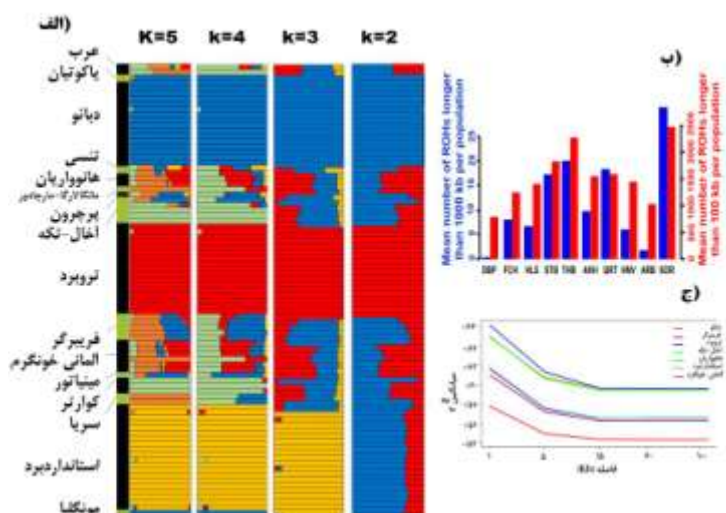
شکل ۱-الف) درخت فیلوژنی ۱۶ نژاد اسب از سراسر دنیا. ب) آنالیز مؤلفه‌های اصلی برای همه نژادها

$K=3$ اعمال شد افراد به سه رنگ و در جمعیت فرضی $K=2$ به دو رنگ مختلف ظاهر شدند. دو نژاد دوباتو و تروبرد در همه K های فرضی به صورت تک رنگ و همولوگ ژنتیکی بودند که نشان دهنده خلوص این دو نژاد در طی سالهای مختلف است. علاوه بر این یک تقسیم بندی واضح بین دو نژاد مشاهده شد. در مطالعه Kader et al. (2016) تمام اسبهای تروبرد در جمعیت های فرضی $K=2$ تا $K=12$ خالص بودند، اما پونی های دباتو در فرض $K=2$ به صورت مخلوطی از دو رنگ مشاهده شد و زمانی که جمعیت $K=4$ و $K=12$ فرض شد، به ترتیب با ۴ و ۶ رنگ مختلف نمایان شدند، که احتمالاً جمعیت دباتوی مورد بررسی توسط این محققین، خالص نبوده و یک جمعیت آمیخته از چند نژاد مختلف بوده است. برای نژاد استاندارد برد در $K=2$ افراد به دو رنگ مختلف مشاهده شدند اما در جمعیت های فرضی $K=3$ ، $K=4$ و $K=5$ تقریباً، اکثر افراد خالص بودند. نتایج حاصل از خوشه بندی نژادهای هانواریان و آلمانی- خونگرم نشان داد که این دو نژاد به صورت آمیخته از چند نژاد ($K=6$) تشکیل شده اند. همچنین اسب های عرب خالص نبودند و از آمیخته گری چند نژاد به وجود آمده اند ($K=2$ تا $K=5$) که نتایج این تحقیق با نتایج Peterson et al. (2015) مطابقت داشت.

نژادهای استاندارد برد، تروبرد و دباتو به طور کامل جدا از سایر نژادها قرار گرفتند. بین نژادهای اسب آخال- تکه و عرب و دو نژاد مونگلیا و یاکوتیان ارتباط ژنتیکی نزدیکی مشاهده شد که با توجه به منشأ آسیایی آنها قابل درک می باشد. علاوه بر این، بین دو نژادهای هانواریان و آلمانی- خونگرم همپوشانی قابل توجهی مشاهده شد که منشأ هر دو نژاد کشور آلمان است لذا تشابه ژنتیکی شناسایی شده قابل انتظار است. فیلورنی حاصل از رنگ آمیزی کروموزوم ها بر مبنای مدل بیزی در شکل ۲ نشان داده شده است. همان گونه که در این شکل ملاحظه می شود، نژادها نسبت به یکدیگر تفکیک شده اند. دو نژاد یاکوتیان و مونگلیا نزدیک ترین فاصله را نسبت به نژاد دباتو حفظ کرده اند. همچنین روابط فیلورنتیکی حاصل از این روش نشان می دهد که نژاد استاندارد برد و پس از آن نژاد تروبرد فاصله زیادی را نسبت به سایر نژادها دارد. یافته های حاصل از این روش تایید کننده نتایج به دست آمده از روش های قبلی می باشد. از نرم افزار Admixture به منظور شناسایی ساختار ژنتیکی و آمیخته گری در مجموع داده های حاصل از توالی یابی کل ژنوم استفاده شد. شکل ۳ نشان می دهد که اکثر اسب های نژاد آخال- تکه در جمعیت های فرضی $K=4$ و $K=5$ خالص بوده اند، اما زمانی که جمعیت فرضی



شکل ۲- نتایج فیلورنی حاصل از رنگ آمیزی کروموزوم ها با استفاده از نرم افزارهای ChromoPainter و Finestructure



شکل ۳- الف) ساختار ژنتیکی به دست آمده از نرم افزار Admixture (ب) روند تغییرات ROH در جمعیت‌های مورد مطالعه (ج) روند تغییرات عدم تعادل پیوستگی بر اساس آماره r^2

جریان‌های ژنی در طی اهلی شدن و استفاده از این گونه در نقل و انتقالات بوده است (Petersen et al. 2013)، درحالی‌که در نریان‌ها به دلیل محدودیت‌های بیشتر، تنوع کمتری بر اساس کروموزم Y گزارش شده است (Ling et al. 2010).

نتایج آنالیز عدم تعادل پیوستگی با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی مربوط به تمام کروموزوم‌های اتوزوم در شکل ۳ ج آمده است. به‌طور کلی با افزایش فاصله، مقدار آماره r^2 در تمام نژادهای مورد مطالعه کاهش یافت. علاوه بر این، کاهش میزان r^2 در $Kb < 5$ شیب تندتری در مقایسه با سایر فواصل داشت. در فاصله $Kb > 15$ ، روند کاهش r^2 در تمام نژادها مشابه بود. بالاترین سطح r^2 را در تمام فواصل ژنوم مربوط به نژاد تروربد بود. پس از این نژاد، دو نژاد استانداردبرد و آخال-تکه الگوی مشابه و بالاتری برای r^2 در فواصل ژنومی ذکر شده نشان دادند. کمترین میانگین‌های r^2 در پونی‌های دبانو در تمام فواصل ژنومی مشاهده شد. با اینکه نژاد تروربد یک جمعیت بزرگ با پراکندگی وسیع در مناطق مختلف دارد اما رکوردهای تاریخی حاکی از آن است که یک نریان مسئول ۹۵٪ خط پدری و ۳۰ ماده مسئول ۹۴٪ لاین مادری هستند. علاوه بر این، از زمان تشکیل اولین استیود بوک در سال ۱۹۷۱ جمعیت برای ورود جریان‌های ژنی بسته شد و برای صفت سرعت تحت فشار انتخاب بوده است (Cunningham et al. 2001; Weatherby and Sons 1791).

به‌منظور شناسایی همخونی ژنومی، رشته‌های هموزایگوت (ROH) بزرگ‌تر از ۱۰۰ Kb شناسایی شد (شکل ۳-ب). نتایج نشان داد که در آخال-تکه $ROH < 1000$ Kb فراوانی بیشتری نسبت به $ROH > 1000$ kb داشتند. میانگین تعداد ROH‌های در آخال-تکه نسبت به نژادهای تروربد، سریا و استانداردبرد و کوآرت‌تر کمتر بود. علاوه بر این، میانگین تعداد $ROH > 1000$ kb که نشان دهند همخونی در نسل‌های جدیدتر است در آخال-تکه نسبت به نژادهای دبانو، فریبرگر، اسب آلمانی خونگرم، هانواریان و عرب بیشتر بود. بیشترین تعداد ROH در نژاد سریا و کمترین آن در نژاد دبانو مشاهده شد. اگر چه میانگین تعداد ROH‌ها در نژاد آخال-تکه نسبت به برخی نژادها بیشتر بود اما سطح همخونی در مقایسه با تروربد و استانداردبرد پایین‌تر بود و به‌نظر می‌رسد، هنوز تنوع در این نژاد در سطح قابل قبولی قرار دارد. در مطالعات دیگر سطح هتروزیگوسیتی اسب آخال-تکه متوسط و مشابه اسب نژاد فنلاندی (Kvist et al. 2019) و نژادهای Andalusian، Lusitano، Mongolian و Tuva (Petersen et al. 2013) گزارش شد. (Naghavian et al. 2019). میانگین ضریب همخونی در اسب‌های اصیل ترکمن ایران ۰/۰۶ گزارش کردند. مطالعات نشان می‌دهد که تنوع موجود در نژادها اسب متأثر از جنس است به‌طوری‌که تنوع ژنتیکی بالا و عدم وجود الگوی ژئوگرافیکی قوی در مادبان‌ها احتمالاً به دلیل

نتیجه‌گیری کلی

درخت فیلوژنی وجود دو کلاد اصلی را نشان داد که همه نژادها بر اساس مناطق جغرافیای مختلف دسته‌بندی شدند. آنالیز مؤلفه‌های اصلی تمایز بین نژادها را نشان داد و بیشترین فاصله ژنتیکی بین اسب آخال- تکه با نژادهای استاندارد برد و ترورد مشاهده شد. نتایج ادمیکسچر در سطح $k=2$ نشان داد اسب‌های نژاد آخال- تکه در جمعیت‌های فرضی $K=4$ و $K=5$ همولوگ ژنتیکی بودند، اما زمانی که جمعیت فرضی $K=3$ و $K=2$ اعمال شد، افراد به ترتیب به سه و دو رنگ مختلف ظاهر شدند نژادهای ترورد و استادار برد در همه جمعیت‌های فرضی همولوگ بودند. میانگین تعداد ROH‌های در آخال- تکه نسبت به نژادهای ترورد، سریا، استانداردبرد و کوارتر کمتر بوده و به نظر می‌رسد سطح همخوانی در مقایسه با این نژادها پایین‌تر است و هنوز تنوع در

این نژاد در سطح متوسط قرار دارد. بالاترین سطح r^2 را در تمام فواصل ژنوم مربوط به نژاد ترورد بود و پس از آن، دو نژاد استاندارد برد و آخال- تکه الگوی مشابه و بالاتری برای r^2 در فواصل ژنومی مورد نظر داشتند. نتایج گزارش شده در این پژوهش در مورد ساختار ژنتیکی اسب آخال- تکه نشان می‌دهد که این نژاد در مقایسه با نژادهای استانداردبرد و ترورد کمتر تحت برنامه‌های اصلاحی قرار گرفته و همخوانی کمتری دارد. از این‌رو، با توجه به استفاده از این نژاد به عنوان یک اسب ورزشی قدرتمند در رشته‌های دو سرعت، دو استقامت، پرش و حرکات نمایشی به نظر می‌رسد از تنوع ژنتیکی موجود در سطح ژنوم این نژاد می‌توان در برنامه اصلاح نژادی درون نژادی در این زمینه استفاده کرد.

منابع

Achilli A, Olivieri A, Soares P, Lancioni H, Hooshir Kashani B, Perego UA, Nergadze SG, Carossa V, Santagostino M, Capomaccio S, Felicetti M, Al-Achkar W, Penedo MC, Verini-Supplizi A, Houshmand M, Woodward SR, Semino O, Silvestrelli M, Giulotto E, Pereira L, Bandelt HJ, Torroni A (2012) Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication. *Proceeding of the National Academy Science of the United States of America* 109:2449-2454.
Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S (2007) Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (*Bos indicus*) using PCR-RFLP. *Pak. Journal of Biological Science* 10:4291-4294.
Anthony DW (2010) *The Horse, the Wheel, and Language: How Bronze-Age Riders from the Eurasian Steppes Shaped the Modern World*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. *Modern Genetic journal* 5:49-56.
Bartosiewicz L (2006) Phenotype and age in protohistoric horses: a comparison between Avar and Early Hungarian crania. In: Ruscillo D, ed. *Recent advances in ageing and sexing animal bones*. Oxford: Oxbow Books 204-215.
Bjornstad G, Nilsen NO, Roed KH (2003) Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horses? *Animal Genetic* 34: 55-58.
Bömcke E, Gengler N, Cothran EG (2011) Genetic variability in the Skyros pony and its relationship with

other Greek and foreign horse breeds. *Genetic Molecular Biology* 34:68-76.
Bower MA, Campana MG, Nisbet RER, Weller R, Whitten M, et al. (2012) Truth in the bones: Resolving the identify of the founding elite Thoroughbred racehorses. *Archaeometry* 54:916-925.
Brooks SA, Makvandi-Nejad S, Chu E, Allen JJ, Streeter C, Gu E, McCleery B, Murphy BA, Bellone R, Sutter NB (2010) Morphological variation in the horse: defining complex traits of body size and shape. *Animal Genetic* 41:159-165.
Cozzi MC, Strillacci MG, Valiati P, Rogliano E, Bagnato A, and Longeri M. (2018) Genetic variability of Akhal-Teke horses bred in Italy. *Peer Journal* 6:e4889.
Cunningham EP, Dooley JJ, Splan RK, Bradley DG (2001) Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. *Animal Genetic* 32: 360.
Ghasemi M, Baghizadeh A, Abadi MRM (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Australian journal of basic and applied sciences* 4:5758-5760.
Goli AL (1987) A look at the socio-political history of the Turkmen 150-165. (In Farsi).
Kader A, Li Y, Dong K, Irwan DM, et al. (2016) Population variation reveals independent selection toward small body size in Chinese Debaos pony. *Genome Biology Evolution* 8:42-50.
Kharrati-Koopae H, Ebrahimie E, Dadpasand M, Niazi A, Esmailzadeh A (2019) Genomic analysis reveals variant

association with high altitude adaptation in native chickens. *Scientific reports* 9:1-22.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets (2016) *Molecular Biology Evolution* 33:1870-4.

Kvist L, Niskanen M, Mannermaa K, et al. (2019) Genetic variability and history of a native Finnish horse breed. *Genetic Selection Evolution* 51:35.

Lawson DJ, Hellenthal G, Myers S, Falush D (2019) Inference of population structure using dense haplotype data. *PLoS Genetic* 8:e1002453.

Leissou K, Alev K, Kaasik P, Jaakma Ü, Seene T (2011) Myosin heavy chain pattern in the Akhal-Teke horses. *Animal* 5:658-662.

Li H, Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754-60.

Librado P, Sarkissian CD, Ermini L, Schubert M, Jónsson H, Albrechtsen A, Fumagalli M, Yang MA, Gamba C, Seguin-Orlando A (2015) Tracking the origins of Yakutian horses and the genetic basis for their fast adaptation to subarctic environments. *Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America* 12:E6889-E6897.

Ling Y, Ma Y, Guan W, Cheng Y, Wang Y, et al. (2010) Identification of y chromosome genetic variations in Chinese indigenous horse breeds. *Journal of Heredity* 101:639-643.

Mahmoodi M, Ayatollahi A, Mohammadabadi MR (2018) Studying exon 4 of kappa-casein gene in Kermani sheep using PCR-RFLP. *Agriculture Biotechnology* 9:19-128.

McCue M E, Bannasch DL, Petersen JL, Gurr J, Bailey E, et al. (2012) A High Density SNP Array for the Domestic Horse and Extant Perissodactyla: Utility for Association Mapping, Genetic Diversity, and Phylogeny Studies. *PLoS Genet* 8:e1002451.

McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* 20:1297-303.

Moazeni S, Mohammadabadi MR, Sadeghi M, et al. (2016) Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. *Journal of Animal Science* 6:1-8.

Mohammadabadi MR (2017a) Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. *Journal of Advances in Agriculture* 7:1117-1121.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017b) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. *Journal of research development* 5:e154.

Naghavian S, Saghi DA, and Mobaraki A. (2019) Estimation of Inbreeding and Survey of the Pedigree

Structure of Iranian Turkmen Horses Population 9:131-137. (In Farsi).

Outram AK, Stear NA, Bendrey R, Olsen S, Kasparov A, Zaibert V, Thorpe N, Evershed RP. (2009) The earliest horse harnessing and milking. *Science* 323:1332-1335.

Petersen JL, Mickelson JR, Cothran EG, Andersson LS, Axelsson J, Bailey E, Bannasch D, Binns MM, Borges AS, Brama P, Da Câmara Machado A, Distl O, Felicetti M, Fox-Clipscham L, Graves KT, Guérin G, Haase B, Hasegawa T, Hemmann K, Hill EW, Leeb T, Lindgren G, Lohi H, Lopes MS, McGivney BA, Mikko S, Orr N, Penedo MC, Piercy RJ, Raekallio M, Rieder S, Røed KH, Silvestrelli M, Swinburne J, Tozaki T, Vaudin M, Wade CM, McCue ME (2013) Genetic diversity in the modern horse illustrated from Genome-Wide SNP data. *PLOS ONE* 8:e54997

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al (2007) PLINK: a tool set for wholegenome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetic* 81:559-575

Ustyantseva AV, Khrabrova LA, Abramova NV, Ryabova TN (2019) Genetic characterization of Akhal-Teke horse subpopulations using 17 microsatellite loci.

IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 341:012070.

Weatherby and Sons (1791) *An Introduction to a General Stud Book*. London, UK.

Yang J, Lee SH, Goddard ME, Visscher PM (2011) GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *American Journal of Human Genetics* 7:76-82.