



## Original Research Paper

### Assignment test in Kurdish horse population using SNP chip

**Faezeh Nazari<sup>1</sup>, Hamid Reza Seyedabadi<sup>2\*</sup>, Alireza Noshari<sup>3</sup>, Nasser Emamjomeh Kashan<sup>1</sup>,  
Mohammad Hossein Banabazi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education & Extension Organization, Karaj, Iran

<sup>3</sup> Department of Animal Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

#### Key Words

Assignment test  
Genetic structure  
SNP chip  
Phylogeny relationships  
Kurdish horse

#### Abstract

**Introduction:** According to the characteristics of Iranian horse breeds and the demand for export, their identification, preservation and reproduction have become important. Kurdish horse is one of the native breeds of Iran, which is distinguished from other native breeds of Iran by having special characteristics.

**Materials & Methods:** In this research, single nucleotide markers (SNP chip) were used to investigate the genetic structure or assignment in a 72 Iranian Kurdish breed horses population. After extracting the DNA of the samples, the genotype was determined using the GGP Equine 70K SNP genomic chip. Quality control of genomic data was done using PLINK v1.07 software. After the quality control steps, PLINK v1.9 Admixture software was used to study the relationship and genetic differentiation between populations, principal component analysis (PCA), Admixture, and phylogenetic relationships. The results of PCA, admixture and phylogeny analyzes were displayed in Python (using Matplotlib library), R (in ggplot2 package) and FigTree environments, respectively. Recent and past effective population sizes were estimated using SNeP software, which uses average linkage disequilibrium between different SNP pairwise intervals. The linkage disequilibrium pattern of the entire Kurdish horse genome was calculated using the  $r^2$  statistic.

**Results:** The results of genomic linkage disequilibrium (LD) analysis indicated a relatively high reduction of the linkage pattern between 0-50 kb intervals ( $0.2 \geq r^2 \geq 0.1$ ) in this population. For the assignment test, SNPs with minimum allelic frequency (MAF) less than 50%, samples with more than 10% unhealthy genotype and SNPs out of Hardy-Weinberg equilibrium (probability less than  $10^{-6}$ ) were excluded.

**Conclusion:** Therefore, according to the pattern observed from the results of this study and according to the origin of different Iranian horse populations (with the exception of the Kurdish population), it is possible to divide the Iranian horse populations into two categories of horses on the eastern and southern coasts of the Mazandaran Sea. (Turkmen and Caspian) and the horses of southwest Iran (Asil and Dareh Shuri). Also, due to the decreasing trend in the effective size over the generations, it is necessary to design appropriate programs to protect the Kurdish horse breed.

\* Corresponding Author's email: [hseyedabady@gmail.com](mailto:hseyedabady@gmail.com)

Received: 14 October 2022; Reviewed: 16 November 2022; Revised: 18 January 2023; Accepted: 18 February 2023

(DOI): [10.22034/AEJ.2023.378935.2920](https://doi.org/10.22034/AEJ.2023.378935.2920)

## مقاله پژوهشی

## آزمون انتساب در جمعیت اسب کرد با استفاده از SNP chip

فائزه نظری<sup>۱</sup>، حمیدرضا سیدآبادی<sup>۲\*</sup>، علیرضا نوشری<sup>۳</sup>، ناصر امام جمعه کاشان<sup>۱</sup>، محمدحسین بنابازی<sup>۲</sup><sup>۱</sup> گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران<sup>۲</sup> بخش پژوهش های بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران<sup>۳</sup> گروه علوم دامی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

## کلمات کلیدی

آزمون انتساب  
ساختار ژنتیکی  
تراشه ژنومی  
روابط فیلوژنی  
اسب کرد

## چکیده

**مقدمه:** با توجه به خصوصیات نژادهای اسب ایرانی و تقاضا برای صادرات، شناسایی، حفظ و تکثیر آن ها اهمیت یافته است. اسب کرد یکی از نژادهای بومی ایران است که با داشتن ویژگی های خاص از سایر نژادهای بومی ایران متمایز است.

**مواد و روش ها:** در این تحقیق به منظور بررسی ساختار ژنتیکی یا انتساب در یک جمعیت اسب کرد (۷۲ راس) از نشانگرهای تک نوکلئوتیدی (SNP chip) استفاده شد. پس از استخراج DNA نمونه ها، تعیین ژنوتایپ با استفاده از تراشه ژنومی GGP Equine 70K SNP انجام شد. کنترل کیفی داده های ژنومی با استفاده از نرم افزار PLINK v 1.07 انجام شد. بعد از مراحل کنترل کیفیت، برای مطالعه ارتباط و تمایز ژنتیکی بین جمعیت ها، تجزیه و تحلیل مولفه اصلی (PCA)، Admixture و روابط فیلوژنی از نرم افزارهای Admixture، PLINK v1.9، نتایج آنالیزهای PCA، Admixture و روابط فیلوژنی به ترتیب در محیط های Python (با استفاده از کتابخانه Matplotlib)، R (در پکیج ggplot2) و FigTree نمایش داده شد. اندازه جمعیت مؤثر اخیر و گذشته با استفاده از نرم افزار SNeP که از میانگین عدم تعادل پیوند بین فواصل زوجی مختلف SNP استفاده می کند برآورد شد. الگوی عدم تعادل لینکاژی کل ژنومی اسب کرد با استفاده از آماره  $r^2$  محاسبه شد.

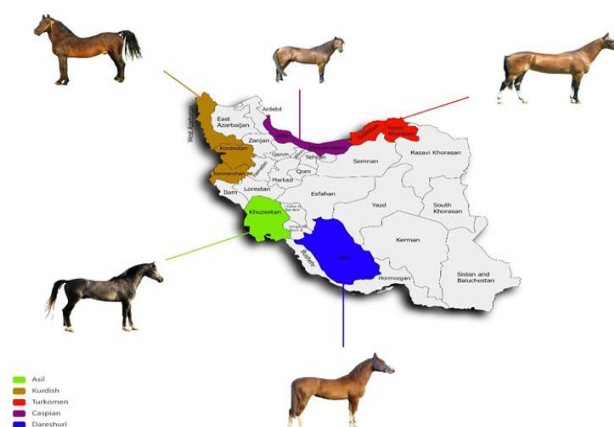
**نتایج:** نتایج آنالیز عدم تعادل پیوستگی ژنومی (LD) حاکی از یک کاهش نسبتاً بالای الگوی پیوستگی بین فواصل ۵۰-۰ کیلوباز ( $0/2 \leq r^2 \leq 0/1$ ) در این جمعیت بود. برای آزمون انتساب، SNP های با حداقل فراوانی آللی (MAF) کم تر از ۰.۰۵ درصد، نمونه های با بیش از ۱۰ درصد ژنوتیپ ناسالم و SNP های خارج از تعادل هاردی واینبرگ (احتمال کم تر از  $10^{-6}$ ) حذف شدند.

**بحث و نتیجه گیری:** با توجه به الگوی مشاهده شده از نتایج حاصل از این مطالعه و با توجه به خاستگاه جمعیت های مختلف اسب ایرانی (به استثنای جمعیت کرد) می توان جمعیت های اسب ایران را در دو دسته اسب های سواحل شرقی و جنوبی دریای مازندران (ترکمن و کاسپین) و اسب های جنوب غرب ایران (اصیل و دره شوری) تقسیم بندی نمود. هم چنین با توجه به روند کاهشی در اندازه مؤثر در طی نسل ها، طراحی برنامه های مناسب برای حفاظت از نژاد اسب کرد ضروری است.

## مقدمه

افراد یک جمعیت و یا بین جمعیت‌ها حاصل می‌شود (۷). در سال‌های اخیر با توسعه SNP Chip ها در گونه‌های مختلف، شناسایی نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم گسترش یافته و تحقیقات زیادی در گونه‌های مختلف طراحی شده و ژن‌های موجود در این مناطق کروموزومی و حتی عملکرد بیولوژیکی آن‌ها نیز شناسایی شده است (۲). چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP)، تغییر در یک نوکلئوتید واحد است که در جایگاه‌های خاصی از ژنوم اتفاق می‌افتند، به‌طوری که هریک از این تغییرات باید حداقل در بیش‌تر از یک درصد از افراد جمعیت مشاهده شود و قابلیت توارث داشته باشند تا به‌عنوان SNP قلمداد شوند. SNP در نواحی کدکننده و غیرکدکننده DNA حضور دارد و فاکتورهای مانند نوترکیبی و نرخ جهش در تعداد و تراکم آن‌ها نقش موثر دارند (۳۲). از روش آماری تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) برای بررسی تعدادی از متغیرهای مرتبط با یکدیگر و تحلیل‌های ژنتیکی جمعیت‌ها استفاده می‌شود. با این روش بدون نیاز به در نظر گرفتن فرض اولیه در مورد مدل ژنتیکی جمعیت‌ها، ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها شناسایی می‌شود (۱۸). با روش PCA وجود ساختار جمعیتی در داده‌های ژنتیکی آزمون می‌شود (۱۷). با روش‌های جدید فن‌آوری توالی‌یابی، تعداد زیادی داده ژنومی در بخش دامپروری شناسایی شده که برای بررسی تاریخچه تکامل جمعیت‌ها و بازسازی وقایع استفاده می‌شود. وجود تفاوت در منشا تاریخی و انتخاب طبیعی و مصنوعی سبب ایجاد نژادهای مختلف با تنوع فنوتیپی شده است (۱، ۱۳). برای گسترش فعالیت و اجرای برنامه‌های حفاظتی برای اسب‌ها، بررسی تنوع جمعیت اسب‌های کنونی ضروری به نظر می‌رسد. لذا ترسیم درخت فیلوژنی و شناسایی ارتباطات بین جمعیت اسب‌های مختلف برای درک بیش‌تر از تکامل و اهلی نمودن این حیوانات امری ضروری است (۲۳). در آزمون انتساب از اطلاعات ژنتیکی برای تعیین عضویت افراد در جمعیت‌ها استفاده می‌شود. از این آزمون برای تعیین مبدا افراد ناشناخته استفاده می‌شود. از کاربردهای عملی این روش‌ها تجزیه و تحلیل و ردیابی نسب حیوانات می‌باشد (۱۰). در یک تحقیق آزمون انساب در ۹۵ راس اسب تروبرد با استفاده از ۵۳ SNP انجام شد. نتایج نشان داد که با این تعداد SNP روابط خویشاوندی بین اسب‌ها با دقت زیاد ( $PE = 0.999$ ) قابل تشخیص است. لذا این پنل JPN۵۳SNP برای اسب تروبرد توصیه شد (۱۶). در یک تحقیق دیگر ژنوتیب تعداد ۷۲۹ راس اسب از ۳۲ نژاد مختلف با استفاده از نشانگر SNP تعیین و آزمون انساب انجام شد. نتایج نشان داد که کارایی این نشانگر برای انجام آزمون مذکور زیاد است (۱۷). در کشور عمان ژنوتیب تعداد ۶۳ اسب عرب با استفاده از تراشه Illumina Equine SNP70 تعیین شد. بررسی ژنوتیپ‌های SNP تعداد ۱۲ اسب عربستان سعودی، ۲۷ اسب فرانسوی،

اسب در حدود ۶۰۰۰ سال قبل در بخش‌هایی از نواحی استپی جنوب روسیه و اکراین کنونی اهلی شد و تا قبل از اختراع و رایج شدن موتورهای بخار نقش زیادی در توسعه سیاسی و شهرنشینی داشته و در افزایش روابط اجتماعی بین جوامع بشری تا اوایل قرن بیست میلادی موثر بوده است (۹). در دنیا نژادهای مختلف اسب پرورش داده می‌شوند که از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی (نظیر اندازه، وزن، رنگ و غیره) با یکدیگر تفاوت دارند (۴). ولی در سال‌های اخیر تعداد اسب (به ویژه اسب‌های کار و اسب‌های وحشی) رو به کاهش می‌باشد (۱۴). براساس آمار فائو ۲۰۱۴ در ایران حدود ۱۴۰ هزار رأس اسب وجود دارد (۱۵). براساس مستندات موجود در ایران بر حسب مناطق پراکنش یا اقوام پرورش دهنده پنج جمعیت اصلی و متمایز اسب ترکمن، کاسپین، اصیل یا عرب ایران، دره شوری و کرد وجود دارد. اسب کرد به‌عنوان یکی از نژادهای اصیل و بومی ایران است که با داشتن ویژگی‌های خاص از سایر نژادهای بومی ایران متمایز است (۲۸).



شکل ۱: پراکنش جغرافیایی نژادهای اسب در ایران (KU کرد، CA کاسپین، TU ترکمن، DA دره شوری و AS اصیل)

عامل اصلی در تکامل این نژاد پرورش در شرایط کوهستانی و انتخاب طبیعی در شرایط سخت زیستگاه اصلی این اسب به‌طور عمده در مناطق غربی ایران از جمله استان کردستان و در زمین‌های ناهموار و مناطق کوهستانی یافت می‌شوند. اما امروزه پراکنش این اسب تا استان‌های آذربایجان، کرمان، همدان، اصفهان، کرمانشاه و ایلام و هم چنین در بخش‌هایی از کشور عراق و ترکیه قابل مشاهده است (۲۵). امروزه از نشانگرهای ژنتیکی برای مطالعات مرتبط با منشا، تاریخچه و سیر تکاملی جوامع دامی استفاده می‌شود (۲۰). با مطالعه یک نشانگر ژنتیکی اطلاعات مفیدی در مورد تفاوت‌های ژنتیکی بین

۷۷ اسب مصری، ۱۱ اسب لهستانی، ۳۶ اسب آمریکایی، ۱۷ اسب ترابرد و ۲۱ اسب بزرگ و کوچک به عنوان گروه خارجی با روش تجزیه و تحلیل MDS و فیلوژنتیک نشان داد که اسب‌های عرب در عمان عمدتاً با اسب‌های عرب فرانسوی و با چند اسب در میان اسب‌های عرب لهستانی، آمریکایی هم خوشه می‌شوند (۳). بررسی ساختار جمعیت و شناسایی نواحی تحت انتخاب در ژنگان اسب‌های کرد و عرب ایرانی (شامل ۳۸ اسب عرب و ۵۸ اسب کرد)، توسط 670k Axiom Equine Genotyping Array تعیین ژنوتایپ شد. تحلیل مؤلفه‌های اصلی این دو جمعیت نشان داد که این دو نژاد از لحاظ ژنتیکی به هم نزدیک هستند. تنوع ژنتیکی اسب‌های عرب ایرانی نسبت به اسب‌های کرد بیش‌تر بود (۲۲).

## مواد و روش‌ها

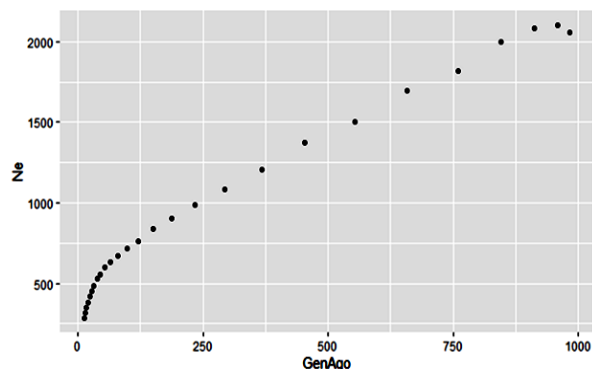
در این تحقیق از گله‌های دارای تعدادی اسب نژاد کرد تحت نظارت مرکز اصلاح دام کشور نمونه‌گیری شد. برای این منظور دسته‌ای از موهای یال یا دم (شامل حداقل ۵۰ تار مو) به نحوی از ریشه جدا شد که پیاز مو به تارهای آن متصل بود. سپس نمونه‌ها به کیسه‌های زیپ‌دار نمونه‌گیری منتقل شد. پس از خارج کردن هوای درون کیسه و بستن درب آن، مشخصات اسب بر روی کیسه درج و در محیط دور از رطوبت و نور نگه‌داری گردید. ژنوتایپ اسب‌ها با استفاده از تراشه ژنومی GGP Equine 70K SNP تعیین شد. با این تراشه‌ها می‌توان ژنوتایپ حدود ۶۵ هزار SNP را تعیین نمود. پس از تعیین ژنوتایپ دام‌ها، کلیه SNP‌های موجود در تراشه‌های ژنومی بررسی شد. برای اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتایپ، در آنالیزهای نهایی مراحل مختلف کنترل کیفیت بر روی داده‌های اولیه با استفاده از نرم‌افزار PLINK v1.9 اعمال شد (۱۸). برای بررسی مقایسه‌ای از نمونه‌های تعیین ژنوتایپ شده ۷۱ اسب عرب (اصیل)، ۱۱ اسب ترکمن، ۷ اسب کرد، ۷ اسب کاسپین و ۵ اسب دره شوری نیز استفاده شد (۲۹). ژنوتایپ نمونه‌های با استفاده از تراشه BeadChip 670K SNP تعیین ژنوتایپ شده بود (۲۹). از آن جایی که نمونه‌های اسب کرد با تراشه GGP Equine 70K SNP تعیین ژنوتایپ شده بود از هم ردیف‌سازی (merge) داده‌ها استفاده شد. با استفاده از اطلاعات حاصل در این بخش می‌توان برای تفکیک نژادهای اسب بومی، بررسی ساختار جمعیتی اکوتیپ‌های حیوانات، آزمون انتساب و هم‌چنین تعیین روابط خویشاوندی ژنومی بین افراد برای تفکیک لایه‌بندی جمعیتی و شناسایی حیوانات خارج از گروه نژادی خود تصمیم‌گیری کرد. میانگین همبستگی بین جایگاهی بر مبنای اطلاعات جمعیت‌ها و آزمون تعادل هاردی-واینبرگ و عدم تعادل پیوستگی

(LD) برای جمعیت منفرد و برآورد همبستگی بین جایگاهی میان و درون جمعیت‌ها برای جمعیت‌های چندگانه با استفاده از نرم‌افزار PLINK v 1.9 محاسبه شد (۱۸). مقادیر حاصل و عدم تعادل پیوستگی (LD) در نرم‌افزار PLINK برآورد شد. با پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های ژنومی امکان استفاده از روش‌های تک نسلی برای برآورد Ne فراهم شده است. انتظار می‌رود با استفاده از داده‌های حاصل از SNPs در سرتاسر ژنوم مقدار Ne برآورد شود (۲۹). اندازه جمعیت مؤثر اخیر و گذشته با استفاده از نرم‌افزار SNeP (۷) که از میانگین عدم تعادل پیوند بین فواصل زوجی مختلف SNP استفاده می‌کند برآورد شد. در آنالیز PCA روابط خویشاوندی ژنومی برای تفکیک لایه‌بندی جمعیتی و شناسایی حیوانات خارج از گروه نژادی تعیین می‌شود. یکی دیگر از آنالیزهایی که می‌توان برای شناسایی ساختار ژنتیکی آمیختگی بین جمعیت‌ها براساس داده‌های ژنومی انجام داد Admixture است. این آنالیز که بیش‌تر به عنوان تجزیه و تحلیل اجداد زیست جغرافیایی شناخته می‌شود برای تعیین منشأ جغرافیایی افراد بر اساس تجزیه و تحلیل تبار ژنتیکی آن‌ها می‌باشد. این آنالیز بر اساس مدل زنجیره مارکو-مونت کارلو (MCMC) است (۵). آنالیز روابط فیلوژنی یکی دیگر از روش‌های مناسب برای خوشه بندی جمعیت‌ها بر اساس داده‌های ژنومی است. روش Neighbour-joining یکی از روش‌های مورد استفاده برای تعیین روابط فیلوژنی است و به‌طور گسترده برای تعیین روابط فیلوژنی بین گونه‌ها و داخل گونه‌ها استفاده می‌شود (۲۰، ۲۸). برای مطالعه تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها و ارتباط آن‌ها، تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA)، Admixture و روابط فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزارهای PLINK v1.9، Admixture و VCF-kit (K=2, K=3, K=4, K=5) انجام شد (۵، ۱۰). نتایج آنالیزهای PCA، Admixture و روابط فیلوژنی به ترتیب در محیط‌های Python (با استفاده از کتابخانه Matplotlib)، R (در پکیج ggplot2) و FigTree نمایش داده شد. برای نمایش نمودار نتایج آنالیز روابط فیلوژنی بین افراد مورد مطالعه از گزینه Show Root، Polo tree layout، scale، bar، Tip labels استفاده شد.

## نتایج

پارامترهای کنترل کیفیت داده مطلوب بود و درصد تعیین ژنوتایپ در ۷۲ اسب مورد مطالعه برابر ۹۸/۰ بود (جدول ۱). ویرایش داده‌های حاصل از تعیین ژنوتایپ پس از هم‌ردیف‌سازی داده‌های اسب کرد با نمونه‌های اسب‌های بومی دیگر در جدول ۲ ارائه گردید.

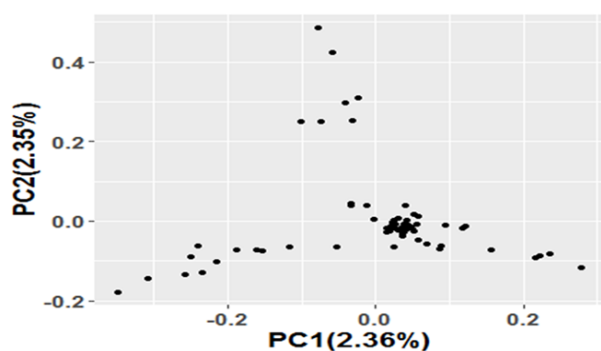
Ne از ۹۸۳ تا ۱۳ نسل پیش نزولی است. بنابراین باید مقدار Ne در این جمعیت برای حفظ این نژاد در حال کنترل باشد.



شکل ۲: نمودار روند تغییرات اندازه جمعیت موثر در طی ۱۰۰۰ سال گذشته

محور X نسل‌های گذشته و روی محور Y اندازه جمعیت موثر در اسب کرد

آنالیز مولفه‌های اصلی برای شناسایی روابط بین گروهی و درون نژادها انجام شد. نتایج حاصل به خوبی تمایز بین نژادها را نشان داد. نتایج این آنالیز نشان داد که PC1 و PC2 باعث جدا شدن کلیه نژادها براساس منطقه جغرافیایی از یکدیگر شده است. اکوتیپ‌های اسب به خوبی از هم جدا شده‌اند و هر اکوتیپ تقریباً در گروه‌بندی خود قرار گرفته است (شکل ۳). مولفه‌های اول و دوم به ترتیب ۲/۳۶ درصد و ۲/۳۵ درصد واریانس موجود را توجیه می‌کنند.



شکل ۳: نمودار پراکندگی اولین (PC1)، دومین و مولفه اصلی (PC2) براساس داده‌های اسب کرد

نتایج آنالیز PCA (شکل ۴) نشان داد که نژادهای اسب به خوبی از هم جدا شده‌اند و هر نژاد تقریباً در گروه مربوط به خود قرار دارد. باتوجه به نتایج تحلیل مؤلفه‌های اصلی و نزدیکی مکانی محل زندگی دو نژاد اصیل و کرد، ممکن است این اسب‌ها جد مشترکی داشته باشند. هم‌چنین احتمال دارد نژاد اسب کرد در به وجود آمدن نژاد اسب اصیل نقش داشته باشند.

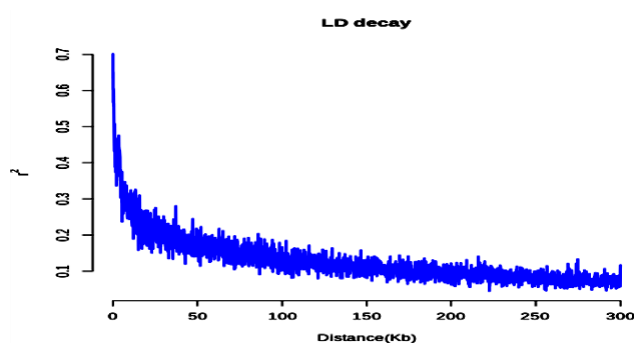
جدول ۱: ویرایش داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ اسب کرد

| تعداد اسب                                               | ۷۲    |
|---------------------------------------------------------|-------|
| تعداد کل SNPها قبل از کنترل کیفیت                       | ۶۵۱۱۲ |
| تعداد SNP حذف شده با حداقل فراوانی آلی کم‌تر از ۰/۰۱    | ۴۵۷۹  |
| تعداد SNP در حالت عدم تعادل هاردی-واینبرگ ( $10^{-6}$ ) | ۱۹۸۳  |
| تعداد SNPها با حداقل فراوانی ژنوتیپی کم‌تر از ۰/۰۱      | ۲۵۳۳  |
| افراد دارای حداقل SNP                                   | .     |
| تعداد کل SNPهای مورد مطالعه بعد از کنترل کیفیت          | ۵۶۱۰۷ |

جدول ۲: ویرایش داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ اسب بومی

| تعداد اسب                                               | ۱۷۳    |
|---------------------------------------------------------|--------|
| تعداد کل SNPها قبل از کنترل کیفیت                       | ۳۶۶۸۸۸ |
| تعداد SNP حذف شده با حداقل فراوانی آلی کم‌تر از ۰/۰۱    | ۲۷۶۵   |
| تعداد SNP در حالت عدم تعادل هاردی-واینبرگ ( $10^{-6}$ ) | ۴      |
| تعداد SNPها با حداقل فراوانی ژنوتیپی کم‌تر از ۰/۰۱      | ۳۴۲۱۰۷ |
| افراد دارای حداقل SNP                                   | .      |
| تعداد کل SNPهای مورد مطالعه بعد از کنترل کیفیت          | ۲۱۴۱۸  |

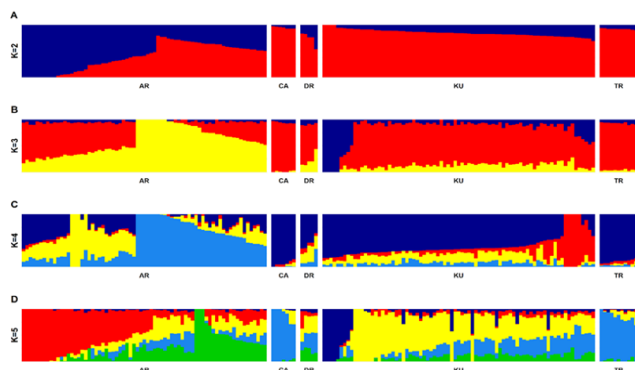
بعد از کنترل کیفیت داده‌ها، مقدار LD مورد بررسی در نرم‌افزار Plink محاسبه شد و در فایل خروجی مقادیر  $r^2$  و فاصله SNP کروموزوم‌ها بر حسب جفت باز (kb) مشاهده شد. نتایج آنالیز عدم تعادل پیوستگی (LD) با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌یابی مربوط به کلیه کروموزوم‌های اتوزوم در (شکل ۱) ارایه شده است. مقدار LD در نژاد کرد در فاصله کم‌تر از ۵۰ kb در مقایسه با سایر فواصل کم‌تر بود. این میزان کاهش تا فاصله بین ۰/۱ تا ۰/۲ ادامه دارد و تا ۲۵۰ kb که کاملاً صاف شده است.



شکل ۱: نمودار روند کاهش عدم تعادل پیوستگی در فواصل مختلف ژنوم براساس  $r^2$

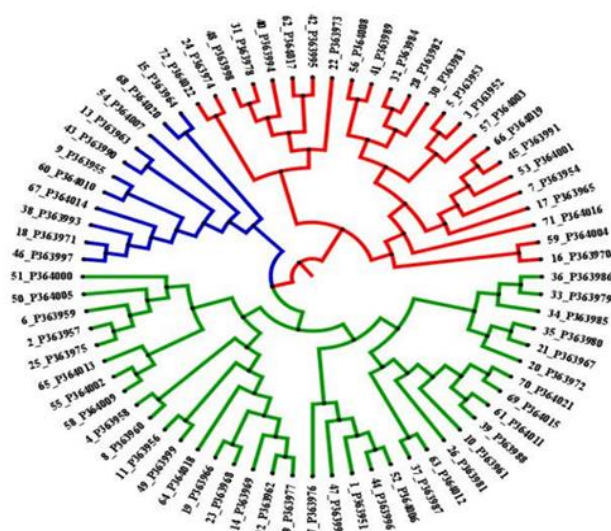
نمودار گرافیکی مقادیر (Ne) در هر زمان از ۹۸۳ نسل تا ۱۳ نسل قبل برای جمعیت اسب مورد مطالعه در شکل ۲ ارایه شده است. اندازه موثر جمعیت موثر اسب کرد در ۱۳ نسل گذشته ۲۸۵ راس بوده است که با نتایج Abdoli، مطابقت دارد (۱). روند مقدار

می توان نتیجه گیری نمود اسب اصیل از نژاد اسب کردی حاصل شده است (شکل ۶).

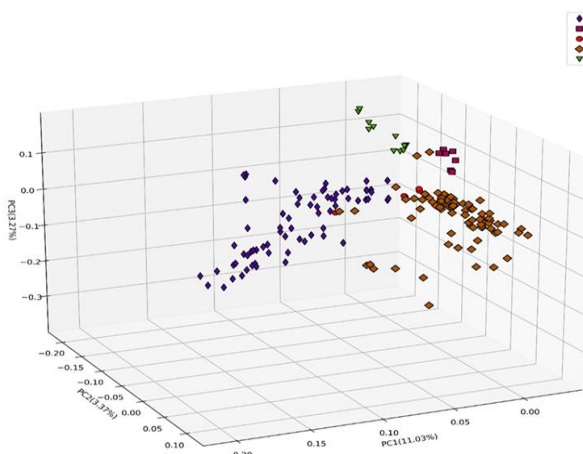


شکل ۶: ADMIXTURE براساس نژاد اسب (از چپ به راست شامل اسب اصیل: AR، اسب کاسپین: CA، اسب دره شوری: DR، اسب کرد: KU، اسب ترکمن: TR)

جدا شدن قسمتی از یک جمعیت و ایجاد زیر جمعیت های کوچک تر در طی نسل های متمادی می تواند سبب تغییر در ساختار ژنتیکی آن ها شود. این امر نشانگر جریان ژن بین مناطق زیست مختلف از طریق مهاجرت و آمیزش بین افراد می باشد. به عبارتی وجود رابطه بین این گروه ها، نشانه روابط خویشاوندی بین افراد این جمعیت ها می باشد. آنالیز Neighbour-joining اسب های نژاد کرد با استفاده از اسنپ های فیلتر شده در شکل ۷ داده شده است. باتوجه به این درخت فیلوژنی کل جمعیت اسب نژاد کرد در سه گروه قرار دارند. چگونگی نمودار درخت فیلوژنی نتایج آنالیز PCA و Admixture تایید شد.

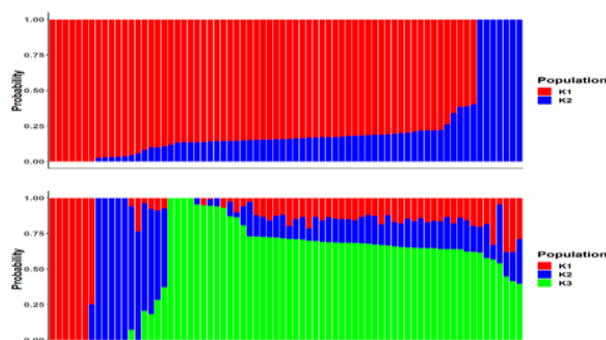


شکل ۷: روابط فیلوژنی اسب کرد مورد مطالعه



شکل ۴: پراکندگی سه بعدی اولین (PC1)، دومین (PC2) و سومین (PC3) مولفه اصلی بر اساس داده های ژنوتیپ ۵ نژاد اسب (اسب اصیل: AR، اسب کاسپین: CA، اسب دره شوری: DR، اسب کرد: KU، اسب ترکمن: TR)

در مباحث ژنتیک جمعیت، اختصاص افراد به جمعیت های مربوط به خود اهمیت دارد. از انواع الگوریتم مبتنی بر مدل، مدل ADMIXTURE برای دستیابی به ساختار جمعیت با استفاده از داده های کل ژنوم ارائه شده است (۱). اعمال ۳ مولفه مفروض  $K=3$  (فرض بر این که فقط سه جمعیت اسب تمامی تغییرات را در داده ها توجیه می کند) انجام شد. گزینه  $K=3$  تقسیم بندی نژاد کرد به ۳ گروه را نشان می دهد و نتایج PCA را تایید کرد (شکل ۵).



شکل ۵: برآورد مقادیر K توسط نرم افزار ADMIXTURE برای اسب کرد

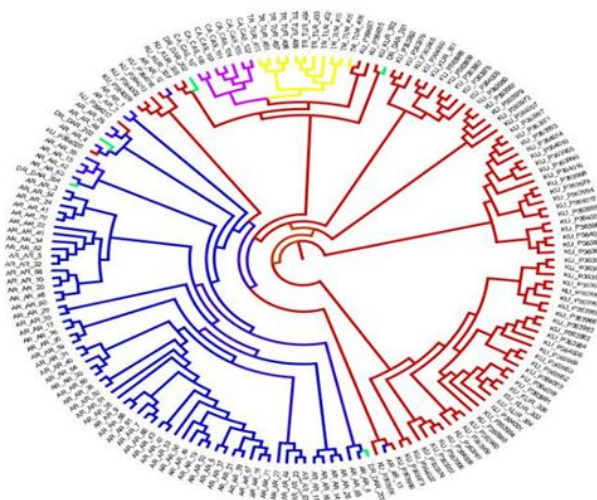
در شکل ۶ چگونگی انتساب ۵ نژاد مختلف به خوشه ها در ۴ مقدار K ارائه شده است. آنالیز Admixture برای پنج نژاد (کردی، دره شوری، ترکمن، کاسپین و اصیل) با استفاده از ۵ مولفه فرضی ( $K=5$ ) انجام شد. در این حالت تشابه ژنی کلیه نژادها نسبت به Kهای دیگر تغییر کرد. اسب کرد ۳ گروه را تشکیل داد. رنگ زرد و سرمه ای برای اسب نژاد کردی و سبز برای نژاد اصیل می باشد و

آنالیز PCA، با گزارش (۲۹، ۲۲) مطابقت دارد. ولی با نتایج (۱۹، ۳۰) مطابقت ندارد. در (K=5)، آنالیز Admixture آثار آمیخته بودن در بین نژادهای کردی، دره شوری و اصیل ظاهر شد، علت این تغییر را نیز شاید بتوان با تشابه محل پرورش و شباهت‌های فتوتیپی توجیه کرد که با نتایج حاصل در PCA مطابقت دارد. نتایج آنالیز Neighbour-joining نشان داد اسب نژاد کرد در طول زمان در اثر عواملی نظیر منطقه جغرافیایی، جهش و جفتگیری غیر تصادفی در گروه دوم قرار دارد. خوشه‌های اسب‌های ترکمن، دره شوری و کاسپین در بین خوشه‌های اصیل و کرد قرار دارند (شکل ۶). هم چنین باتوجه به روند کاهشی در اندازه مؤثر در طی نسل‌ها، طراحی برنامه‌های مناسب برای حفاظت از نژاد اسب کرد ضروری است.

## منابع

1. **Abdoli, M., 2017.** Genetic structure survey of Iranian horse breed by SSR and SNP markers. Zanjan: Faculty of Agriculture Department of Animal Science. 175 p.
2. **Akey, J.M., 2009.** Issues in Detecting Natural Selection in Humans. In American Journal of Physical Anthropology. 75 p.
3. **Al Abri, M.A., Brooks, S.A., Al-Saqri, N., Alkharousi, K., Johnson, E.H., Alqaisi, O., Al-Rawahi, A. and Al Marzooqi, W., 2021.** Investigating the population structure and genetic diversity of Arabian horses in Oman using SNP markers. *Animal Genetics*. 52(3): 304-310.
4. **Ala Amjadi, M., 2016.** Studying the genetic diversity of Iranian Kurdish horse population using microsatellite markers. Karaj: University of Tehran College of Agriculture and Natural Resources Department of Animal Sciences. 87 p.
5. **Alexander, D.H., Shringarpure, S.S., Novembre, J. and Lange, K., 2015.** Admixture 1.3 software manual. Los Angeles: UCLA Human Genetics Software Distribution.
6. **Asadollahpour Nanaei, H., Nosrati, M. and Mohammadabadi, M.R., 2021.** Genetic structure analysis of Akhal-Teke horse population and comparison with other horse breeds by using whole genome sequencing data. *Scientific Quarterly Journal of Modern Genetics*. 10: 299-307.

جدا شدن حیوانات یک جمعیت و تشکیل زیرجمعیت‌های کوچک‌تر در طی نسل‌های احتمالاً باعث تغییر در ساختار ژنتیکی آن‌ها می‌شود. شکل ۸ نشان می‌دهد که از دو گروه اصلی چندین زیرگروه ایجاد شده به صورت بین گروهی با یکدیگر مرتبط هستند. این موضوع جریان ژنی بین مناطق مختلف از طریق مهاجرت و آمیزش بین افراد را نشان می‌دهد. اسب نژاد کرد در طول زمان در اثر عواملی نظیر منطقه جغرافیایی، جهش و جفتگیری غیر تصادفی در گروه دوم قرار دارد. نتایج نشان داد که خوشه‌های اسب‌های ترکمن، دره شوری و کاسپین در بین خوشه‌های اصیل و کرد قرار دارند (شکل ۸).



شکل ۸: نمودار روابط فیلوژنی اسب‌های مورد مطالعه (که شاخه‌های قرمز نژاد کرد، آبی نژاد اصیل، زرد نژاد ترکمن، بنفش نژاد کاسپین و سبز نژاد دره شوری می‌باشند)

## بحث

نتیجه آزمون انتساب افراد به جمعیت مبدأ خود نشان داد که اکثر افراد هر نژاد در جمعیت خود قرار گرفتند. اسب‌های نژاد دره شوری در بخش مرکزی (شکل ۴) و بین نژاد اسب کرد و اصیل قرار گرفته‌اند. این نتایج ایجاد، نژاد دره شوری از تلاقی اسب‌های کرد و اصیل را تایید می‌کند که با در نظر گرفتن شرایط زیست‌بوم نژادهای مذکور این نتیجه دور از انتظار نیست. این گروه‌بندی می‌تواند ناشی از وجود منشا مشترک و جریان ژن به مناطق جغرافیایی متفاوت باشد. با توجه به الگوی مشاهده شده از نتایج حاصل از این مطالعه و با توجه به خاستگاه جمعیت‌های مختلف اسب ایرانی (به استثنای جمعیت کرد) می‌توان جمعیت‌های اسب ایران را در دو دسته اسب‌های سواحل شرقی و جنوبی دریای مازندران (ترکمن و کاسپین) و اسب‌های جنوب غرب ایران (اصیل و دره شوری) تقسیم‌بندی نمود. نتایج

17. Jombart, T., Devillard, S. and Balloux, F., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*. 11(1): 1-5.
18. Khamisabadi, H., Badbarin, S. and Seyed Sharifi, R., 2018. Investigation of genetic structure and assignment tests of Kurdish horse breeds based on Microsatellite markers. *New genetics*. 14(4).
19. Khasali Aghtaei, A., Vafaye Valleh, M., Dashab, G.R. and Moradi Shahrababak, H., 2019. Comparison of the different clustering methods for population structure of Sarabi and Nadjdi cows by using dense genetic markers. *Agricultural Biotechnology Journal*. 11(1): 25-54.
20. Levy, D., Yoshida, R. and Pachter, L., 2006. Beyond pairwise distances: neighbor-joining with phylogenetic diversity estimates. *Molecular Biology and Evolution*. 23(3): 491-498.
21. Maghsoodi, S.M., Mehrabani Yeganheh, H., Nejati Javaremi, A. and Yousefi Mashouf, N., 2017. Investigating population structure and identifying signatures of selection in Iranian Kurdish and Arabian horses. *Iranian Journal of Animal Science*. 48(3): 429-438.
22. Mills, D.S. and McDonnell, S.M., 2005. The domestic horse: the origins, development and management of its behaviour. Cambridge University Press.
23. Nomura, T., 2009. Interval Estimation of the Effective Population Size from Heterozygote-Excess in SNP Markers. *Biometrical Journal: Journal of Mathematical Methods in Biosciences*. 51(6): 996-1016.
24. Omri Kolankoh, M., Hedayat Evrigh, N., Boustan, A., Seyedsharifi, R., Vahedi, V. and Khalkhali Evrigh, R., 2019. Maternal Haplogroup identification of horse population in Ardabil province using mitochondrial control region. *Journal of Animal Environment*. 11(2): 63-68. (In Persian)
25. Patterson, N., Price, A.L. and Reich, D., 2006. Population structure and eigenanalysis. *PLoS genetics*. 2(12): e190.
26. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P.I., Daly, M.J. and Sham, P.C., 2007. PLINK: 7. Barbato, M., Orozco-terWengel, P., Tapio, M. and Bruford, M.W., 2015 SNeP: a tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data. *Frontiers in genetics*. 6: 109.
8. Belletti, P., Monteleone, I. and Ferrazzini, D., 2008. A population genetic study in a scattered forest species, wild service tree [*Sorbus torminalis* (L.) Crantz], using RAPD markers. *European Journal of Forest Research*. 127: 103-114.
9. Bowling, A.T. and Ruvinsky, A., 2000. Genetic aspects of domestication, breeds and their origins. In *The genetics of the horse*. Wallingford UK: CAB International. 25-70
10. Cook, D.E. and Andersen, E.C., 2017. VCF-kit: assorted utilities for the variant call format. *Bioinformatics*. 33(10): 1581-1582.
11. Dalvit, C., De Marchi, M., Dal Zotto, R., Gervaso, M., Meuwissen, T. and Cassandro, M., 2008. Breed assignment test in four Italian beef cattle breeds. *Meat Science*. 80(2): 389-395.
12. Davis, G.H., Galloway, S.M., Ross, I.K., Gregan, S.M., Ward, J., Nimbkar, B.V., Ghalsasi, P.M., Nimbkar, C., Gray, G.D., Inounu, I. and Tiesnamurti, B., 2002. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biology of reproduction*. 66(6): 1869-1874.
13. Epps, C.W., Castillo, J.A., Schmidt-Küntzel, A., du Preez, P., Stuart-Hill, G., Jago, M. and Naidoo, R., 2013. Contrasting historical and recent gene flow among African buffalo herds in the Caprivi Strip of Namibia. *Journal of Heredity*. 104(2): 172-181.
14. FAO. 2014. FAOSTAT. FAO statistics website. <http://www.fao.org/statistics/en>.
15. Hirota, K.I., Kakoi, H., Gawahara, H., Hasegawa, T. and Tozaki, T., 2010. Construction and validation of parentage testing for thoroughbred horses by 53 single nucleotide polymorphisms. *Journal of Veterinary Medical Science*. 72(6): 719-726.
16. Holl, H.M., Vanhnasy, J., Everts, R.E., Hoefs-Martin, K., Cook, D., Brooks, S.A., Carpenter, M.L., Bustamante, C.D. and Lafayette, C., 2017. Single nucleotide polymorphisms for DNA typing in the domestic horse. *Animal genetics*. 48(6): 669-676.

- a tool set for whole-genome association and population based linkage analyses. The American journal of human genetics. 81(3): 559-575.
27. **Rafeie, F., Amirinia, C., Javaremi, A.N., Mirhoseini, S.Z. and Amirmozafari, N., 2011.** A study of patrilineal genetic diversity in Iranian indigenous horse breeds. African Journal of Biotechnology. 10(75): 17347-17352.
  28. **Sadeghi, R., Moradi-Shahrababak, M., Miraei Ashtiani, S.R., Schlamp, F., Cosgrove, E.J. and Antczak, D.F., 2019.** Genetic diversity of Persian Arabian horses and their relationship to other native Iranian horse breeds. Journal of Heredity. 110(2): 173-182.
  29. **Seyedsharifi, R., Badbarin, S., KHAMISABADI, H., Hedayat, E.N. and SEIF, D.J., 2019.** Study of Genetic Structure and Accuracy of Assignment of Individuals to Five Horse Populations using Microsatellite Markers. Research on Animal Production. 10(24): 120-126.
  30. **Yousefi Mashoof, N., 2015.** Phenotypic and Genetic Characterization of the Iranian Kurdish Horse. Karaj. University of Tehran College of Agriculture and Natural Resources Department of Animal Sciences. 132 p.
  31. **Zamani, W., Asadi Akbalghi, M., Naderi, S. and Rezaei, H.R., 2022.** Investigation of genetic diversity and genetic resources of mouflon (*Ovis orientalis*) and its domestic breeds (*Ovis aries*) in the north-west of Iran based on whole genome sequences and BeadChip Ovine SNP 50K Journal of Animal Environment. 13(4):19-26. (In Persian)