

بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت اسب کاسپین با استفاده از اطلاعات میکروستلایت

• سیده فاطمه موسوی^۱، حمیدرضا سید آبادی^۲، علی جوانروح^۳، محمود امیری رودبار^۴ (نویسنده مسئول)

- ۱- دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
- ۲- دانشیار، بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۳- استادیار، بخش ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۴- استادیار، بخش علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد-دزفول، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، دزفول، ایران.

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۳

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۵۹۴۷۴۶۵۴

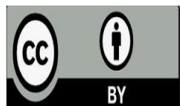
Email: mahmood.amiri225@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ ASJ.2024.365773.2391

چکیده

هدف از انجام این تحقیق بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی با کمک آنالیز توالی‌های تکرار شونده کوتاه در جمعیت اسب کاسپین ایران بود. برای انجام این تحقیق از اطلاعات ۱۷ جایگاه STR بدست آمده از ۵۱۴ اسب کاسپین استفاده گردید. برای تمامی جایگاه‌های STR مورد مطالعه فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، غنای آللی، میزان کمبود هتروزیگوت در جمعیت (F_{IS})، محتوای اطلاعات چند شکلی، آزمون هاردی-واینبرگ، تنوع ژنی، محاسبه گردید. همچنین در این مطالعه اندازه‌ی موثر جمعیت (N_e) برای نسل حال حاضر با کمک یک برآوردگر تک جمعیتی بر پایه‌ی اطلاعات LD با در نظر گرفتن حد آستانه‌های مختلف جهت حذف آلل‌های کمیاب محاسبه گردید. نتایج نشان داد که تنوع آللی مشاهده شده برای جایگاه‌های STR در جمعیت کاسپین بسیار بیشتر از آن مقداری بوده که قبلاً تصور می‌شد. همچنین روند تغییرات میزان هموزایگوسیتی در سال‌های اخیر افزایشی بوده که احتمالاً به دلیل تلاقی‌های بیشتر در بین افراد خویشاوند می‌باشد. میزان N_e برآورد شده بین ۸۴/۵ (با حذف آلل‌هایی با فراوانی کمتر از ۰/۰۵ درصد) تا ۱۳۹/۶ (بدون حذف آلل‌ها) متغیر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که وضعیت تنوع ژنتیکی این جمعیت در شرایط مطلوبی نبوده و برای حفظ این تنوع، می‌بایست برنامه‌های حفاظتی و تلاقی‌های کنترل شده اجرا گردد.

واژه‌های کلیدی: اسب کاسپین، اندازه موثر جمعیت، تنوع ژنتیکی، توالی‌های تکرار شونده کوتاه.



Research Journal of Livestock Science No 146 pp: 43-54**Assessment of structural composition and genetic diversity in the Caspian horse population through microsatellite analysis**

By: Seyedeh Fatemeh Mousavi¹, Hamid-Reza Seyedabadi², Ali Javanrouh³, Mahmoud Amiri Roudbar (Corresponding author)⁴

1: PhD of Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Engineering, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

2: Associate Professor of Department of Biotechnology, Animal science research institute of Iran, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3: Assistant professor of Animal Breeding and Genetic Department, Animal science research institute of Iran, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

4: Assistant professor of Department of Animal Science, Safiabad-Dezful Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Education & Extension Organization (AREEO), Dezful, Iran. Email: mahmood.amiri225@gmail.com

Received: May 2024

Accepted: July 2024

The purpose of this research was to investigate the structure and genetic diversity of the Caspian horse population in Iran using short tandem repeats (STR) analysis. Data from 514 Caspian horses were utilized, including information from 17 STR loci. Allelic frequency, observed and expected heterozygosity, allelic richness, heterozygous deficiency in the population (Fis), polymorphic information content, Hardy-Weinberg test, and gene diversity were calculated for all studied STR loci. Additionally, the effective population size (Ne) for the current generation was determined using a single population estimator based on LD information, considering various thresholds to eliminate rare alleles. The results revealed that the observed allelic diversity for STR loci in the Caspian population exceeded previous estimations. Moreover, there has been an increasing trend in homozygosity changes in recent years, likely attributable to increased mating among relatives. The estimated Ne varied between 84.5 (with alleles having a frequency less than 0.05% removed) to 139.6 (without allele removal). These findings indicate that the genetic diversity of this population is not in favorable conditions, and the implementation of conservation programs and controlled crossings are necessary to maintain diversity.

Key words: Caspian horse, Effective population size, Genetic diversity, Short tandem repeats.

مقدمه

برای بررسی معیار در خطر بودن یک جمعیت برای انقراض، معیارهای مختلفی چون اندازه جمعیت، تعداد ماده های مولد، تعداد نر های مولد، تمرکز جغرافیایی، اندازه مؤثر جمعیت (effective population size (Ne)) و ضریب همخوانی حائز اهمیت می باشند. جمعیت های در خطر همواره دارای جمعیت کوچک و جدا بوده که به دلیل تلاقی با خویشاوندان نزدیک دارای همخوانی نسبتاً بالایی بوده که خطر انقراض به موجب افزایش افت ناشی از همخوانی افزایش می یابد (Neaves

نژادهای بومی برای ذخایر ملی و مخزن ژنتیکی ضروری هستند. بنابراین، حفظ نژادهای بومی یک اولویت در سیاست کلیدی برای کشورهای سراسر جهان می باشد. تنوع ژنتیکی پیش نیاز تکامل تطبیقی است و حفظ تنوع ژنتیکی به تلاش های حفاظتی برای بقای طولانی مدت گونه های اهلی نیاز دارد. بر اساس گزارش FAO در سال ۲۰۰۰ اسب کاسپین به عنوان نژاد در معرض خطر معرفی گردید (Scherf, ۲۰۰۰). پس از گذشت بیش از ۲۰ سال گزارش دقیقی از وضعیت جمعیت اسب های کاسپین ارائه نشده است.

از تنوع را در جمعیت های خاورمیانه نسبت به جمعیت های غربی نشان داد (A. Khanshour و همکاران، ۲۰۱۳). در یک مطالعه دیگر که بر روی اسب های کرد صورت گرفته، با کمک اطلاعات STR تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت مورد بررسی قرار گرفت (Amjadi و همکاران، ۲۰۲۱). در این مطالعه آماره هایی مانند میانگین تعداد آلل های مشاهده شده و موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، محتوای اطلاعاتی چندشکلی (polymorphism information content) و شاخص اطلاعات شانون (Shannon's Information Index) ارائه گردید. در مطالعه دیگر که بر روی اسب کاسپین صورت گرفت، وجود گلوگاه ژنتیکی (genetic Bottleneck) با کمک مطالعه بر روی ۸ جایگاه STR پیشنهاد گردید (Amirinia و همکاران، ۲۰۰۷). مهمترین پیامد گلوگاه ژنتیکی کاهش تنوع ژنتیکی و به تبع آن کاهش در N_e به دلیل رانش ژنتیکی خواهد بود که می تواند تاثیر قابل توجهی در ماندگاری نژاد داشته باشد (Nei و همکاران، ۱۹۷۵). در ژنتیک جمعیت، N_e که اولین بار توسط رایت معرفی شد (Wright، ۱۹۳۱)، یکی از مهمترین ابزارهای برای ارزیابی تنوع ژنتیکی برای اهداف حفاظتی استفاده می باشد. N_e به صورت تعداد افرادی که به طور موثر در تولید نسل بعدی شرکت می کنند، تعریف می شود (Falconer و Mackay، ۱۹۹۶). فرآیندهای تکاملی تا حد زیادی تحت تاثیر اندازه جمعیت (یا به طور دقیق تر N_e) قرار می گیرند. به طور کلی انتظار می رود تخمین های مبتنی بر اطلاعات مولکولی مانند SNP و STR دقیق تر از تخمین های مبتنی بر شجره (مخصوصاً برای شجره های با کیفیت پایین) باشد (Keller و همکاران، ۲۰۱۱). با وجود اهمیت این آماره در ژنتیک جمعیت، اما تا کنون گزارشی در خصوص N_e جمعیت در نژادهای اسب ایرانی با کمک اطلاعات STR ارائه نشده است. بنابراین، هدف اصلی این مطالعه بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی در جمعیت اسب کاسپین ایران با کمک آنالیز اطلاعات STR بود.

و همکاران، ۲۰۱۵). با استفاده از معیارهای مهم جمعیتی به همراه اطلاعات مربوط به نژاد و زیستگاه آن می توان پس از ارزیابی در سیستم های مختلف، اقدامات اولیه برای حفاظت نژاد را مشخص کرده و جهت تجزیه و تحلیل حیاتی جمعیت و پیش بینی احتمال انقراض (Meuwissen، ۲۰۰۹) و سایر پژوهشهای تکمیلی که در برنامه ریزی زمان بندی شده و دقیق حفاظت کاربرد دارند، بکار گرفته شوند.

ساختار ژنتیکی جمعیت، که به عنوان جامعه افراد دارای یک مخزن ژنی مشترک تعریف می شود، از طریق اعمال فرآیند انتخاب در گذشته بر روی ژن های کنترل کننده تنوع، تشکیل یافته است. استفاده از اطلاعات مولکولی مانند ریزماهوره (Microsatellite) و یا توالی های تکرار شونده کوتاه (Short tandem repeats (STR)) می تواند به درک بهتر این ساختار ژنتیکی کمک نماید. این نشانگرهای مولکولی به دلیل چندشکلی بسیار بالا، سهولت در انجام، دقت بالای ژنوتایپینگ، توارث ساده مندلی، توزیع گسترده آنها در ژنوم و هزینه پایین، جهت انجام آزمون انساب و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت بسیار رایج می باشند (Achmann و همکاران، ۲۰۰۴؛ Dimsoski، ۲۰۰۳؛ Jemmali و همکاران، ۲۰۱۷؛ A. Khanshour و همکاران، ۲۰۱۳؛ Seyedabadi و همکاران، ۲۰۰۶). وجود تنوع ژنتیکی گونه های جانوری برای حفظ و پیگیری اهداف اصلاح نژادی برای بهبود ژنتیکی ضروری است (Notter، ۱۹۹۹). تا کنون مطالعات زیادی در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی با کمک اطلاعات STR در اسب انجام شده است (Achmann و همکاران، ۲۰۰۴؛ A. Khanshour و همکاران، ۲۰۱۳؛ Machmoum و همکاران، ۲۰۲۰؛ Shamsavarani و Rahimi-Mianji، ۲۰۱۰). در مطالعه ای که به بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی از جمعیت های مختلف اسب عرب در سرتاسر دنیا شامل ۳ جمعیت از خاورمیانه (سوریه، ایران و عربستان سعودی) و مابقی شامل جمعیت عرب های کشورهای غربی در اروپا (عرب شگیا و عرب لهستانی) و در آمریکا (عرب آمریکایی) پرداخته شد، وجود سطح بالاتری

مواد و روش‌ها

اطلاعات مورد استفاده

در این مطالعه از اطلاعات STR موجود برای ۵۱۴ اسب کاسپین که از انجمن حفاظت از اسب کاسپین (caspian conservation society (CCS) بدست آمده بود استفاده گردید. برای انجام ژنوتایپینگ STR، تعداد حداقل ۵۰ نمونه مو یا اسب‌های کاسپین که دارای پیازچه مو بودند، جمع آوری شد. سپس این نمونه‌ها به آزمایشگاه بیولوژی مولکولی و ژنتیک در دانشگاه مادرید که مورد تایید انجمن بین‌المللی ژنتیک حیوانات^۱ نیز می‌باشند، جهت استخراج DNA و ژنوتایپینگ جایگاه‌های STR ارسال شدند. به طور کلی از اطلاعات ژنوتایپینگ برای تعداد ۱۷ جایگاه STR که طی سال‌های ۱۳۴۷ تا ۱۴۰۱ جمع آوری شده بود، استفاده گردید. این جایگاه‌های مورد مطالعه (و تعداد نمونه ژنوتایپ شده برای آن جایگاه) شامل: AHT4 (۵۱۲)، ASB2 (۳۷۱)، ASB17 (۴۹۹)، AHT5 (۳۷۹)، HMS3 (۲۷۹)، HMS2 (۲۶۰)، CA425 (۳۷۹)، ASB23 (۵۰۸)، HMS6 (۵۱۳)، HMS7 (۵۱۴)، HTG10 (۴۸۷)، HTG4 (۵۱۳)، HTG6 (۲۸۲)، HTG7 (۲۸۲)، LEX3 (۳۸۲)، LEX33 (۲۹۶) و VHL20 (۵۱۳) بودند.

آنالیزهای آماری

ابتدا فراوانی آللی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) این جایگاه‌ها محاسبه گردید. یکی از آماره‌های مفید برای بررسی اطلاعات ژنوتایپ غنای آللی (allelic richness (R_s)) بوده که نشان دهنده میزان تعداد آلل مستقل از تعداد نمونه می‌باشد. به طور کلی تعداد آلل مشاهده شده در یک نمونه به میزان بسیار زیادی به تعداد نمونه بستگی دارد (El Mousadik و Petit، ۱۹۹۶). برای محاسبه این آماره از فرمول زیر استفاده گردید:

$$R_s = \sum \left[1 - \frac{\binom{2N-N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

در این معادله، N_i تعداد آلل نوع i در میان $2N$ ژن، و n برابر کمترین تعداد افراد ژنوتایپ شده برای یک جایگاه می‌باشند. همچنین تنوع ژنی (gene diversity)، که نشان دهنده

¹ The International Society of Animal Genetics

هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_s) در جمعیت مورد مطالعه بر اساس فراوانی آللی مشاهده شده می‌باشد، محاسبه گردید (Nei، ۱۹۸۷). برای برآورد این آماره از برآوردگر ناریب:

$$H_s = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 - \frac{H_o}{2n} \right)$$

استفاده شد. در این معادله H_o هتروزیگوسیتی مشاهده شده، n تعداد نمونه و p_i فراوانی آلل i می‌باشد. برای هر جایگاه STR آماره F_{is} که نشان دهنده میزان کمبود هتروزیگوت در جمعیت می‌باشد، با کمک معادله $F_{is} = 1 - \frac{H_o}{H_s}$ محاسبه گردید. همچنین برای هر جایگاه آماره محتوای اطلاعات چند شکلی (Polymorphic Information Content (PIC)) برآورد گردید (Botstein و همکاران، ۱۹۸۰). فرمول مورد استفاده شامل:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

بود که p_i و p_j به ترتیب فراوانی آلل i و j می‌باشند. برای تمامی جایگاه‌های مورد مطالعه از آزمون مربع کای (Chi-square) جهت بررسی معنی داری انحراف ژنوتایپ مشاهده شده از مورد انتظار استفاده گردید. برای انجام آنالیزهای مورد نظر از نرم افزار FSTAT v. 2.9. 3.2 (Goudet، ۲۰۰۲) و زبان برنامه نویسی R استفاده گردید. در ادامه برای بررسی ارتباط بین جایگاه‌ها آزمون عدم تعادل پیوستگی (linkage disequilibrium (LD)) با کمک پکیج genepop در زبان برنامه نویسی R انجام شد (Rousset، ۲۰۰۸). برای انجام آزمون ابتدا جدول احتمالی (contingency table) بین دو جایگاه STR ایجاد شده و سپس آزمون G (آزمون احتمالات) برای هر جدول با کمک الگوریتم زنجیره مارکوف (Markov chain algorithm) انجام می‌شود (Raymond و Rousset، ۱۹۹۵).

اندازه‌ی موثر جمعیت برای نسل حال حاضر (Contemporary N_e) با استفاده از اطلاعات STR به وسیله نرم افزار NeEstimator V2.1 محاسبه شد (Do و همکاران، ۲۰۱۴). برای این منظور از یک برآوردگر تک جمعیتی بر پایه‌ی اطلاعات

روش LD عملکرد بهتری نشان می‌دهد (Do و Waples، ۲۰۰۸).

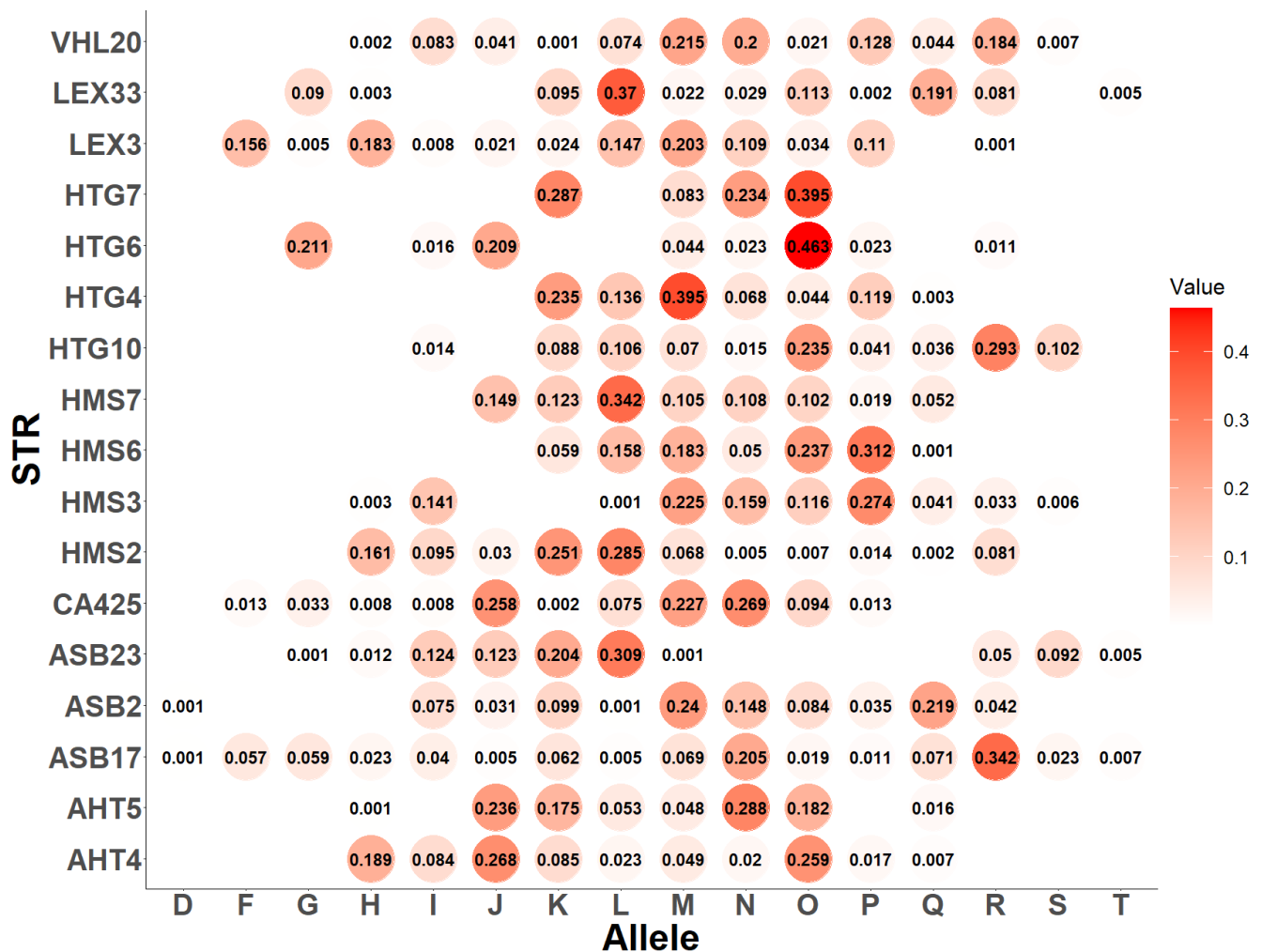
نتایج و بحث

فراوانی آللی برای ۱۷ جایگاه STR در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده به ترتیب مربوط به جایگاه‌های ASB17 و HTG7 با تعداد ۱۶ و ۴ آلل بودند. این تعداد آلل مشاهده شده نسبت به مطالعات قبلی که بر روی اسب کاسپین انجام شده (Amirinia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Seyedabadi و همکاران، ۲۰۰۶)، بیشتر بوده که به نشان دهنده این مطلب خواهد بود که در گذشته تعداد و نمونه گرفته شده برای این مطالعات کافی نبودند. نتایج نشان داد که تنوع آللی مشاهده شده برای جایگاه‌های STR در جمعیت کاسپین بسیار بیشتر از آن مقداری بوده که قبلاً تصور می‌شده و این تنوع می‌تواند برای انجام مطالعات ژنتیکی و همچنین تست انساب بسیار مفید باشند.

LD که قادر به تصحیح اریب ناشی از کوچکتر بودن نمونه‌ی مورد مطالعه از اندازه موثر جمعیت واقعی می‌باشد به کار گرفته شد (Do و Waples، ۲۰۰۸). تخمین نااریب از اندازه موثر جمعیت با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Do و Waples (۲۰۱۰) به صورت زیر محاسبه شد:

$$\hat{N}_e = \frac{1}{3(\hat{r}^2 - 1/S)},$$

در فرمول بالا، $\hat{r}^2$ توان دوم همبستگی فراوانی‌های آللی در جایگاه‌های جفت شده بوده که برای خطای نمونه‌گیری و رانش ژنتیکی تصحیح شده است. S تعداد نمونه‌ها می‌باشد. برای این آنالیز، جمعیت دارای جفت‌گیری تصادفی فرض شده است. STRهایی که دارای حداقل فراوانی برای آلل کوچک به ترتیب ۰.۱، ۰.۰۵، ۰.۰۲ و صفر بودند از معادله‌ی محاسبه‌ی اندازه موثر جمعیت حذف شدند. از هر دو روش پارامتری و ناپارامتری (jackknife) جهت برآورد دامنه اطمینان اندازه موثر محاسبه شده استفاده گردید. روش jackknife به منظور محاسبه‌ی فاصله‌ی اطمینان مورد استفاده قرار گرفت، زیرا این روش برای



شکل ۱. نمودار فراوانی آللی برای ۱۷ جایگاه توالی‌های تکرارشونده کوتاه (Short tandem repeats (STR)) بر اساس اطلاعات حاصل از انجمن حفاظت از اسب کاسپین (CCS).

ASB23 و HMS2 با مقدار 0.825 بود. همچنین کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده در اسب کاسپین مربوط به جایگاه LEX3 با 0.49 بوده که همین جایگاه بیشترین H_e با 0.853 را به خود اختصاص داده بود. این اختلاف بسیار زیاد در این جایگاه موجب شده تا مقدار F_{IS} برآورد شده برای این جایگاه بیشترین باشد. به طور کلی، میانگین کلی H_e برآورد شده در جمعیت اسب کاسپین در این مطالعه (0.796 ± 0.045)، با مقادیر گزارش شده برای H_e در سایر مطالعات برای نژادهای مختلف همخوانی داشت (Amjadi و همکاران، ۲۰۲۱؛ A. Khanshour و همکاران، ۲۰۱۳؛ Van de و همکاران، ۲۰۱۳).

برای درک بهتر تنوع ژنتیکی مشاهده شده در جمعیت اسب کاسپین با کمک اطلاعات STR، آماره‌های مختلف جهت بررسی برآورد گردید (جدول ۱). در مطالعه قبلی که بر روی پنج جمعیت اسب در ایران شامل کاسپین، اصیل ایرانی، ترکمن، تاروبرد و آمیخته ترکمن-تاروبرد صورت گرفت بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به جایگاه های AHT4 و LEX33 با 0.82 بود (Seyedsharifi و همکاران، ۲۰۱۹). در مقابل کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده در همان مطالعه مربوط به جایگاه ASB17 با 0.66 بود. در مطالعه حال حاضر، بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به دو جایگاه

از تعادل هاردی-واینبرگ نشان داد. در کل ۵ جایگاه از تعادل هاردی واینبرگ انحراف معنی داری نشان دادند ($p\text{-value} < 0.05$). تنوع ژنتیکی مشاهده شده برای جایگاه‌های STR در این مطالعه نسبت به مطالعات قبلی که بر روی اسب کاسپین انجام شده بود، بیشتر بودند. برای مثال PIC برآورد شده در این مطالعه بیشتر از مطالعات قبل بودند (Amirinia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Seyedabadi و همکاران، ۲۰۰۶). مهمترین دلیل مشاهده تنوع بیشتر به احتمال زیاد تعداد نمونه بیشتر مورد استفاده در این تحقیق بوده است.

Goor و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین بیشترین غنای آللی بدست آمده مربوط به جایگاهی بود که بیشترین تعداد آلل (ASB17) را داشت و برعکس (HTG7). به طور کلی دامنه غنای آللی بدست آمده در این مطالعه با مطالعات قبلی که بر روی جمعیت اسب‌های ایران انجام شده بود همخوانی داشت (Seyedsharifi و همکاران، ۲۰۱۹). یکی از مهمترین آماره‌های مورد بررسی PIC می باشد. هرچه این آماره برای STR بیشتر باشد، آن جایگاه جهت تمایز افراد و بررسی ارتباط بین افراد مفیدتر خواهد بود. از نظر PIC جایگاه LEX3 بیشترین اطلاعات را درخصوص تنوع جمعیتی در اختیار قرار داده، که همین جایگاه بیشترین انحراف را

جدول ۱. برآورد آماره‌های^۱ مرتبط با تنوع جایگاه‌های توالی‌های تکراری کوتاه (STR) برای اسب کاسپین بر اساس اطلاعات انجمن حفاظت از اسب کاسپین (CCS).

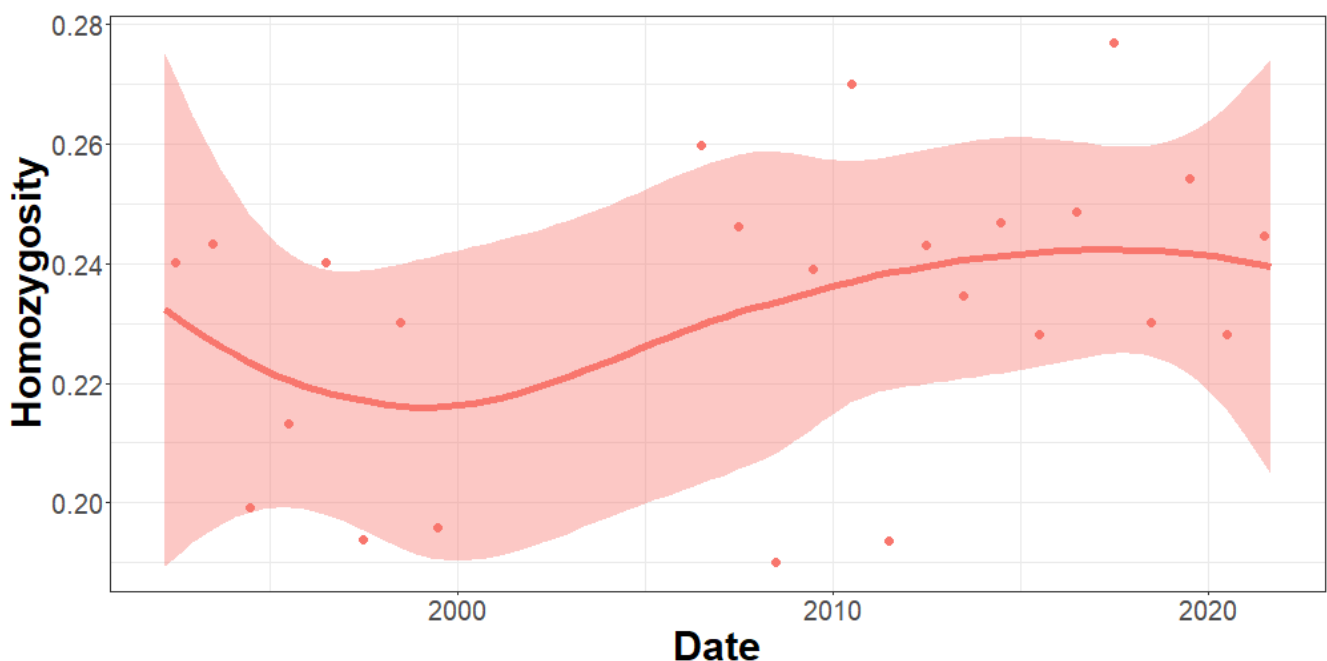
STR	H _o	H _e	غنای آللی	تنوع ژنی	F _{IS}	PIC	مقدار مربع کای برای آزمون HWE (p-value, df)
۰/۸۰۷	۰/۸۰۷	۰/۸۰۷	۹/۹۹۳	۰/۸۰۸	۰/۰۰۲	۰/۷۸۱	۳۰/۹ (۱، ۵۴)
۰/۷۹۶	۰/۷۹۲	۰/۷۹۲	۷/۵۲۱	۰/۷۹۳	-۰/۰۰۴	۰/۷۶۱	۲۵/۷ (۱، ۳۵)
۰/۷۹۸	۰/۸۱۷	۰/۸۱۷	۱۵/۶۸۳	۰/۸۱۸	۰/۰۲۵	۰/۸	۱۱۵/۱ (۱، ۱۳۵)
۰/۸۱۹	۰/۸۴۶	۰/۸۴۶	۱۲/۰۳	۰/۸۴۷	۰/۰۳۳	۰/۸۲۸	۲۱۷/۳ (۹۰، ۶۸-۱۱e)
۰/۸۲۸	۰/۸۱۷	۰/۸۱۷	۱۱/۳۶۲	۰/۸۱۸	-۰/۰۱۳	۰/۷۹۵	۸۳/۴ (۱، ۷۷)
۰/۷۹۲	۰/۷۹۴	۰/۷۹۴	۱۱	۰/۷۹۵	۰/۰۰۴	۰/۷۶۳	۶۶/۷ (۱، ۶۵)
۰/۸۲۸	۰/۸۰۸	۰/۸۰۸	۱۰/۹۳۲	۰/۸۱	-۰/۰۲۲	۰/۷۸۳	۳۸/۴ (۱، ۶۵)
۰/۷۷	۰/۸۱۳	۰/۸۱۳	۹/۳۸۲	۰/۸۱۴	۰/۰۵۴	۰/۷۸۷	۵۷/۲ (۱، ۵۴)
۰/۷۸۶	۰/۷۸۲	۰/۷۸۲	۶/۵۰۷	۰/۷۸۳	-۰/۰۰۳	۰/۷۴۹	۲۶/۴ (۱، ۲۷)
۰/۷۹۸	۰/۸۱	۰/۸۱	۸	۰/۸۱	۰/۰۱۵	۰/۷۸۸	۴۱/۸ (۱، ۳۵)
۰/۷۳۳	۰/۸۲۱	۰/۸۲۱	۱۰	۰/۸۲۲	۰/۰۰۹	۰/۸	۹۸/۹ (۰/۰۰۳، ۵۴)
۰/۷۴۷	۰/۷۵	۰/۷۵	۶/۸۸	۰/۷۵	۰/۰۰۵	۰/۷۱۵	۴۸/۹ (۰/۰۰۴، ۲۷)
۰/۶۶۳	۰/۶۹۴	۰/۶۹۴	۸	۰/۶۹۵	۰/۰۴۶	۰/۶۵	۴۰/۷ (۱، ۳۵)
۰/۷۰۹	۰/۷	۰/۷	۴	۰/۷۰۱	-۰/۰۱۲	۰/۶۴۴	۱/۹ (۱، ۹)
۰/۴۹	۰/۸۵۳	۰/۸۵۳	۱۱/۶۶۹	۰/۸۵۵	۰/۴۲۷	۰/۸۳۶	۷۷۲/۵ (۷۷، ۱۱۴-۳/۹۸e)
۰/۷۶	۰/۷۸۹	۰/۷۸۹	۱۰/۸۶۲	۰/۷۹	۰/۰۳۸	۰/۷۶۵	۳۳۷/۸ (۶۵، ۳۷-۲/۹۵e)
۰/۸۱۷	۰/۸۴۷	۰/۸۴۷	۱۱/۲۵۷	۰/۸۴۸	۰/۰۳۷	۰/۸۲۹	۵۵۵/۷ (۷۷، ۷۲-۲/۲۲e)

^۱ H_o، هتروزیگوسیتی مشاهده شده؛ H_e، هتروزیگوسیتی مورد انتظار؛ PIC، محتوای اطلاعاتی چند شکلی (Polymorphic Information Content)؛ HWE، آزمون هاردی-واینبرگ؛ df، درجه آزادی.

^۲ مقدار p-value براساس تصحیح Bonferroni برای ۱۷ آزمون نشان داده شده است.

برای بررسی تغییرات در میزان هموزیگوسیتی در جایگاه‌های مورد مطالعه در طی زمان، روند درصد جایگاه‌های هموزیگوت در سال‌های مختلف مطالعه گردید (شکل ۲). برای این منظور تنها اطلاعات سال‌هایی استفاده شدند که حداقل ۱۰ زایش در برای آن ثبت شده بود. نمودار روند تغییرات نشان می‌دهد که میزان هموزیگوسیتی در سال‌های اخیر افزایشی بوده و می‌تواند تاییدی بر افزایش میزان همخونی مشاهده شده بر اساس اطلاعات شجره در این تحقیق باشد. بنابراین می‌بایست برای اجرای آمیزش‌های کنترل شده جهت جلوگیری از افزایش میزان همخونی برنامه ریزی صورت گرفته تا تنوع موجود هر چه بیشتر حفظ گردد.

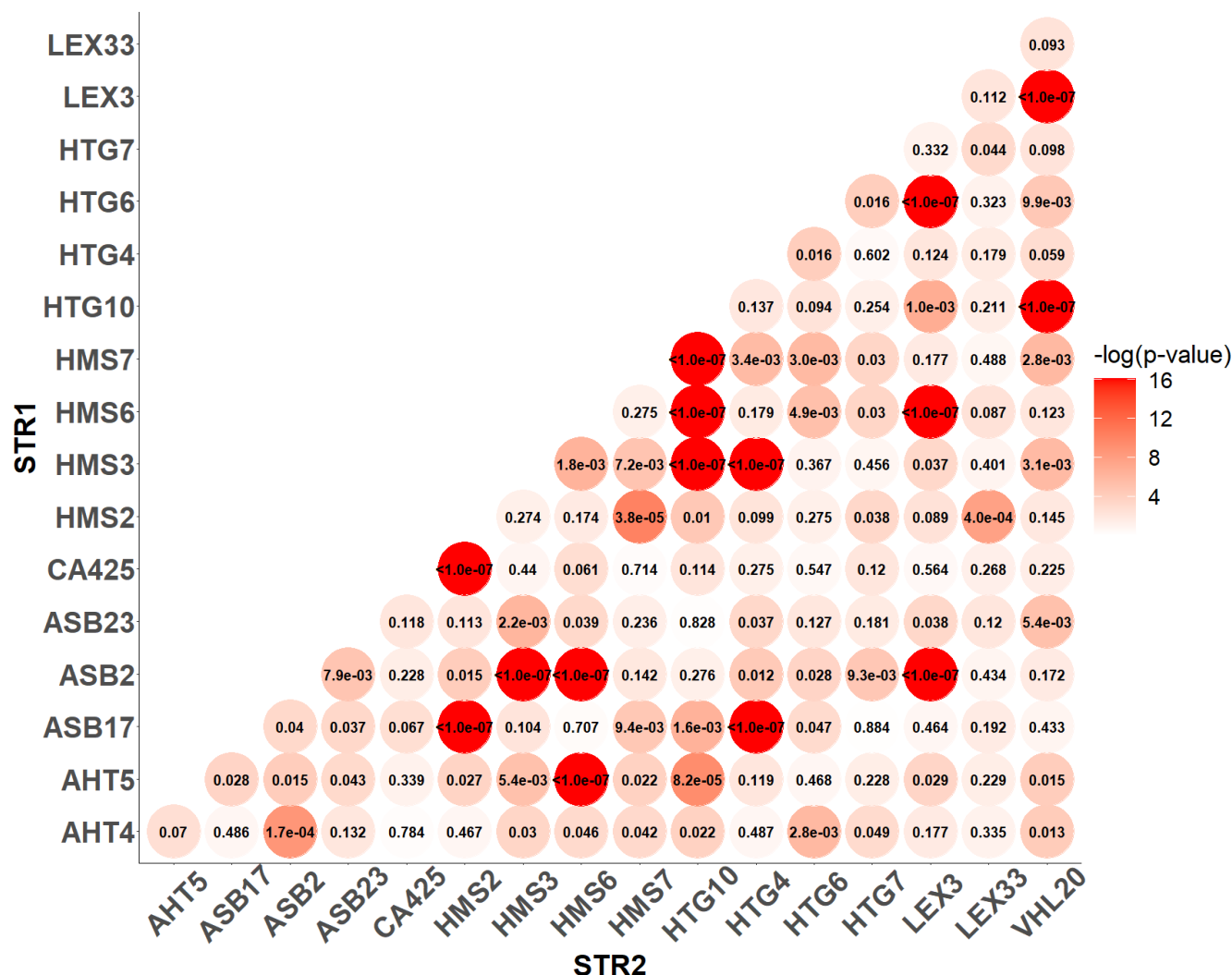
به طور کلی استفاده از اطلاعات STR جهت شناسایی فردی، تصحیح خطاهای احتمالی در شجره، و همچنین بررسی ساختار ژنتیکی اسب متداول می‌باشد (Brinsko و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج ارائه شده در این بخش می‌تواند برای مطالعات آینده جهت اهداف ذکر شده مورد استفاده قرار گرفته تا بهترین جایگاه یا ترکیب جایگاهی بر اساس هدف مطالعه انتخاب گردند. برای مثال جایگاه‌های که بیشترین غنای آللی را نشان دادند و تنوع آللی خوبی داشتند (مانند جایگاه ASB17) جهت انجام آزمون انسب PIC بسیار مناسب می‌باشند. همچنین جایگاه‌هایی با بیشترین PIC (مانند LEX3) می‌توانند برای مطالعات جمعیتی مفیدتر باشند.



شکل ۲. روند تغییرات هموزیگوسیتی برای ۱۷ جایگاه STR طی سال‌های مختلف. در این نمودار میانگین هموزیگوسیتی اسب‌های متولد شده در هر سال به صورت نقطه قرمز نشان داده شده است.

HMS2) به طور معنی داری در حالت LD قرار داشت. مشاهده این مقدار زیاد LD با وجودی که بر روی کروموزوم‌های مختلف قرار دارند، می‌تواند نشان دهنده وجود ساختار جمعیتی در اسب‌های کاسپین بوده که نتیجه فرآیندهایی مانند انتخاب و تنگنای ژنتیکی باشد که در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده بودند (Amirinia و همکاران، ۲۰۰۷).

نتایج P-value برای آزمون LD برای تمام جفت جایگاه‌های STR در شکل ۳ نشان داده شده است. این آزمون نشان داد که بین تعداد زیادی از جایگاه‌های STR به صورت معنی داری LD وجود دارد. بیشترین تعداد LD مشاهده شده مربوط به جایگاه HTG10 بود که با ۱۱ جایگاه STR به طور معنی داری LD نشان داد. در مقابل LEX33 تنها با دو جایگاه (HTG7 و



شکل ۳. نمودار P-value محاسبه شده برای آزمون عدم تعادل پیوستگی (LD) بین جفت جایگاه‌های STR.

شده برای Ne در این مطالعه که با کمک تنها ۱۷ جایگاه STR انجام شد، با برآورد های انجام شده با کمک بیش از ۴۰۰۰۰ جایگاه SNP در مطالعه قبلی که میزان Ne را ۹۸ برآورد نموده بود (Mousavi و همکاران، ۲۰۲۳)، بسیار نزدیک بود. این امر نشان می دهد که اطلاعات STR می توانند برآورد دقیق از Ne جمعیت در اسب ارائه دهند. با توجه به اینکه تنوع ژنتیکی با کاهش Ne به کمتر از ۱۰۰ با سرعت فزاینده ای کاهش می یابد (Henson، ۱۹۹۲)، به نظر می رسد که وضعیت جمعیت اسب کاسپین در شرایط مطلوبی نبوده و می بایست در خصوص حفظ ذخایر ژنتیکی این نژاد برنامه های حفاظتی اجرا گردد.

برآوردهای انجام شده برای Ne با استفاده از ۱۷ جایگاه STR برای اسب کاسپین در جدول ۲ نشان داده شده است. با استفاده از غربالگری آلل نادر با مقادیر بحرانی ۰ تا ۰/۰۵ میزان اثرات آلل های با فراوانی پایین بر تخمین Ne مشخص گردید. میزان Ne برآورد شده بین ۸۴/۵ (با حذف آلل هایی با فراوانی کمتر از ۰/۰۵ درصد) تا ۱۳۹/۶ (بدون حذف آلل ها با فراوانی کم) متغیر بود. این نتایج نشان می دهند که آلل های با فراوانی کم می توانند تاثیر زیادی بر میزان برآورد Ne با کمک اطلاعات STR داشته باشند. بنابراین، پیشنهاد می گردد تا برای برآورد واقعی تر از Ne جمعیت، حذف آلل های نادر قبل از برآورد انجام شود. برآوردهای انجام

جدول ۲. اندازه موثر محاسبه شده با کمک جایگاه های توالی های تکراری کوتاه (STR) اسب کاسپین حاصل از اطلاعات CCS.

کمترین فراوانی آلل استفاده شده	اندازه موثر	دامنه اطمینان با روش پارامتری	دامنه اطمینان با روش ناپارامتری
۰/۰۵	۸۴/۵	۹۱/۴ الی ۷۸/۳	۷۱/۸ الی ۹۹/۸
۰/۰۲	۹۶/۱	۱۰۲/۴ الی ۹۰/۳	۸۲/۸ الی ۱۱۲/۰
۰/۰۱	۱۰۵/۵	۱۱۲/۰ الی ۹۹/۵	۹۲/۱ الی ۱۲۱/۴
۰/۰۰	۱۳۹/۶	۱۳۱/۵ الی ۱۴۸/۴	۱۱۹/۱ الی ۱۶۴/۹

نتیجه گیری

دقیقی از Ne جمعیت داشته باشد. میزان Ne برآورد شده برای این نژاد که حدود ۱۰۰ راس بود، نشان داد که وضعیت تنوع ژنتیکی این جمعیت در شرایط بحرانی بوده و می بایست در خصوص حفظ این تنوع در نسل های بعد برنامه های حفظ نژادی اجرا گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از انجمن حفاظت از اسب کاسپین (Caspian Conservation Society) برای در اختیار قرار دادن اطلاعات جمعیت اسب کاسپین ایران تشکر و قدردانی می نماید.

نتایج این مطالعه نشان داد که جایگاه های STR در جمعیت کاسپین دارای تنوع آللی بسیار بیشتر از آن مقداری بوده که قبلاً تصور می شده، به طوری که غنای آللی تا بالای ۱۵ نیز مشاهده گردید. و این تنوع می تواند برای انجام مطالعات ژنتیکی و همچنین تست انساب بسیار مفید باشند. با این وجود این تنوع مشاهده شده رو به کاهش بوده به طوری که روند افزایشی در میزان هموزایگوستی تا حدود ۲ درصد طی ۲۰ سال اخیر مشاهده گردید. این افزایش در هموزایگوستی یک زنگ خطری است برای توجه بیشتر به ساختار جمعیتی این نژاد جهت اجرای آمیزش های کنترل شده برای جلوگیری از افزایش میزان همخونی تا تنوع موجود هر چه بیشتر حفظ گردد. مطالعه حال حاضر نشان داد که مقادیر Ne محاسبه شده با کمک STR می تواند برآورد

منابع

- Achmann, R. Curik, I. Dovc, P. Kavar, T. Bodo, I. Habe, F. Marti, E. Sölkner, J. and Brem, G. (2004). Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Animal genetics*. 35 (4): 285-292.
- Amirinia, C. Seyedabadi, H. Banabazi, M.H. and Kamali, M.A. (2007). Bottleneck study and genetic structure of Iranian Caspian horse population using microsatellites. *Pak. J. Biol. Sci.* 10 (9): 1540-1543.
- Amjadi, M.A. Yeganeh, H.M. Sadeghi, M. Raza, S.H.A. Yang, J. Najafabadi, H.A. Batool, U. Shoorei, H. Abdelnour, S.A. and Ahmed, J.Z. (2021). Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of the Iranian Kurdish Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*. 98: 103358.
- Botstein, D. White, R.L. Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*. 32 (3): 314.
- Brinsko, S.P. Blanchard, T.L. Varner, D.D. Schumacher, J. and Love, C.C. (2010). *Manual of equine reproduction*. Elsevier Health Sciences.
- Dimoski, P. (2003). Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for

- genotyping horses. *Croatian medical journal*. 44 (3): 332-335.
- Do, C. Waples, R.S. Peel, D. Macbeth, G.M. Tillett, B.J. and Ovenden, J.R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Mol Ecol Resour.* 14 (1): 209-214. doi.org/10.1111/1755-0998.12157
- El Mousadik, A. and Petit, R. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*. 92: 832-839.
- Falconer, D. and Mackay, F. (1996). Introduction to Quantitative Genetics (*Introduction to Quantitative Genetics* (pp. 464-464).
- Goudet, J. (2002). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3.2). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Henson, E.L. (1992). *In situ conservation of livestock and poultry*. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Keller, M.C. Visscher, P.M. and Goddard, M.E. (2011). Quantification of inbreeding due to distant ancestors and its detection using dense single nucleotide polymorphism data. *Genetics*. 189 (1): 237-249. doi.org/10.1534/genetics.111.130922
- Khanshour, A. Conant, E. Juras, R. and Cothran, E.G. (2013). Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Arabian horse populations. *Journal of Heredity*. 104 (3): 386-398.
- Khanshour, A.M. Juras, R. and Cothran, E.G. (2013). Microsatellite analysis of genetic variability in Waler horses from Australia. *Australian journal of zoology*. 61 (5): 357-365.
- Machmoum, M. Boujenane, I. Azelhak, R. Badaoui, B. Petit, D. and Piro, M. (2020). Genetic diversity and population structure of Arabian horse populations using microsatellite markers. *Journal of Equine Veterinary Science*. 93: 103200.
- Meuwissen, T. (2009). Genetic management of small populations: A review. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*. 59 (2): 71-79. doi.org/10.1080/09064700903118148
- Mousavi, S.F. Razmkabir, M. Rostamzadeh, J. Seyedabadi, H.-R. Naboulsi, R. Petersen, J.L. and Lindgren, G. (2023). Genetic diversity and signatures of selection in four indigenous horse breeds of Iran. *Heredity*. 131 (2): 96-108. doi.org/10.1038/s41437-023-00624-7
- Neaves, L.E. Eales, J. Whitlock, R. Hollingsworth, P.M. Burke, T. and Pullin, A.S. (2015). The fitness consequences of inbreeding in natural populations and their implications for species conservation – a systematic map. *Environmental Evidence*. 4 (1): 5. doi.org/10.1186/s13750-015-0031-x
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press.
- Nei, M. Maruyama, T. and Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*: 1-10.
- Notter, D.R. (1999). The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *Journal of Animal Science*. 77 (1): 61-69.
- Raymond, M. and Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*: 1280-1283.
- Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour.* 8 (1): 103-106.
- Scherf, B.D. (2000). *World watch list for domestic animal diversity*. Food and Agriculture Organization (FAO).
- Seyedabadi, H. Amirinia, S. BANA, B.M. and Emrani, H. (2006). Parentage verification of

- Iranian Caspian horse using microsatellites markers. *Iranian journal of biotechnology* 4 (4), 260-264.
- 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.
- Shahsavarani, H. and Rahimi-Mianji, G. (2010). Analysis of genetic diversity and estimation of inbreeding coefficient within Caspian horse population using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*. 9 (3)
- Van de Goor, L. Van Haeringen, W. and Lenstra, J. (2011). Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis. *Animal genetics*. 42 (6): 627-633.
- Waples, R.S. and Do, C. (2008). LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol Ecol Resour*. 8 (4): 753-756.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. 16 (2): 97.