

## مطالعه ساختار ژنتیکی اسب‌های بومی ایران با استفاده از توالی D-loop ژنوم میتوکندری

میثاق مریدی<sup>۱</sup>، علی‌اکبر مسعودی<sup>۲\*</sup> و رسول واعظ‌ترشیزی<sup>۳</sup>  
۱، ۲، ۳، دانشجوی کارشناس ارشد، استادیار و دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت  
مدرس، تهران، ایران  
(تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۲ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۱۰)

### چکیده

در این مطالعه، به منظور آگاهی از ساختار ژنتیکی اسب‌های بومی ایران در مقایسه با نمونه‌های خارجی، نمونه‌های خون از ۹۵ رأس اسب از جمعیت‌های متعدد نقاط مختلف کشور و ۱۱۴ توالی D-loop میتوکندری از بانک اطلاعات ژنوم بدست آمد. DNA کلیه نمونه‌های بومی با استفاده از روش شستشوی نمکی استخراج شده و بعنوان الگو برای تکثیر و تعیین توالی ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری بکار برده شدند. با آنالیز توالی قطعه ۲۴۷ جفت بازی ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری در نمونه‌های فوق، ۴۴ هاپلوتیپ به همراه ۳۹ جایگاه متغیر مشخص شد. در درخت فیلوژنی ترسیم شده برای این هاپلوتیپ‌ها به همراه توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم شش هاپلوگروه (A تا F) تشخیص داده شد. مقدار تنوع نوکلئوتیدی کل برای اسب‌های بومی ایران  $0.028 \pm 0.009$  بدست آمد. مقادیر شاخص تثبیت با استفاده از روش Kimura-2 parameter دارای دامنه‌ای بین  $0.001$  -  $0.172$  بودند. آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که برخی از این جمعیت‌ها، بخصوص نمونه‌های اسب سیستانی، با سایر جمعیت‌های مورد مطالعه و همچنین با توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم قرابت ژنتیکی دارند ( $P < 0.05$ ). بین دو جمعیت عرب و ترکمن بدلیل عدم کنترل تلاقی‌های این دو جمعیت تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). دو جمعیت اسب کرد و اسبچه خزر با سایر جمعیت‌های مورد مطالعه و با توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم تفاوت معنی‌دار نشان دادند ( $P < 0.05$ ). به طور کلی نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا و وجود شباهت ژنتیکی در برخی از جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشند. با توجه به این نتایج لزوم وجود کنترل تلاقی‌های جمعیت‌ها و کنترل تولید نتاج در جمعیت‌های اسب بومی کشور احساس می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسب بومی ایران، تنوع ژنتیکی، ساختار ژنتیکی و هاپلوتیپ

## مقدمه

ایران دارای حدود ۱۵۵ هزار رأس اسب می‌باشد. جمعیت‌های تشکیل دهندهٔ اسب‌های بومی ایران شامل اسب‌های عرب (اصیل)<sup>۱</sup>، ترکمن<sup>۲</sup>، کرد<sup>۳</sup>، اسبچهٔ خزر<sup>۴</sup> و سیستانی<sup>۵</sup> می‌باشند. اسب‌های عرب ایران یکی از مشهورترین نژادهای اسب موجود در جهان بوده و به زیرخانواده‌های کهیلان، هادیان، همدانی، سگلاوی و ابیان تقسیم می‌شوند. اسب‌های ترکمن شامل زیرخانواده‌های آخال-تکه، یموت، چناران و گوگلان هستند و امروزه در اکثر نقاط کشور مورد استفاده قرار می‌گیرند. اسبچه‌های خزر به عنوان یکی از قدیمی‌ترین اسب‌های موجود در خاورمیانه می‌باشند. این اسب‌ها از نظر شکل ظاهری مشابه پونی‌ها<sup>۶</sup> بوده اما با جثه‌ای کوچکتر عملکردی مانند اسب‌های خون‌گرم امروزی را دارا می‌باشند. اسب‌های کرد با داشتن سم‌ها و بدنی قدرتمند توانایی حرکت در جاده‌های سنگلاخی و کوهستانی را دارا بوده و زیرخانواده‌های جاف، افشاری و سنجایی را شامل می‌شوند. اسب‌های سیستانی در جنوب شرقی کشور پرورش داده می‌شوند و در این مناطق جهت حمل بار و سوارکاری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Iran's country report on farm animal, 2004; Khalili, 2009). علیرغم وجود جمعیت‌های مختلف اسب بومی در ایران تاکنون مطالعات ژنتیکی محدودی در این جمعیت‌های اسب صورت گرفته است. از جملهٔ این مطالعات می‌توان به مطالعهٔ Seyedabadi و همکاران (۲۰۰۶) و Shahsavarani و Rahimi-Mianji (۲۰۱۰) اشاره نمود که با استفاده از مارکرهای میکروساتلایت<sup>۷</sup> تنوع ژنتیکی<sup>۸</sup> اسبچه‌های خزر را مورد بررسی قرار داده‌اند. توالی D-loop ناحیهٔ ژنوم میتوکندری به علت دارا بودن ساختار خاص خود به عنوان ابزاری قدرتمند برای

مطالعهٔ ساختار ژنتیکی موجودات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (Larson et al., 2007; Amills et al., 2008). علاوه بر توالی D-loop از مارکرهای میکروساتلایت که دارای تنوع آلی بالایی می‌باشند نیز جهت بررسی ساختار ژنتیکی<sup>۹</sup> و در خطر انقراض<sup>۱۰</sup> قرار داشتن جمعیت‌های مختلف اسب استفاده می‌شود که از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعهٔ Amirinia و همکاران (۲۰۰۷) که در اسبچه‌های خزر انجام گرفته است و همچنین مطالعهٔ Chauhan و همکاران (۲۰۱۱) که در سه نژاد اسب بومی کشور هندوستان صورت گرفته است اشاره نمود. با استفاده از مجموعه مطالعات انجام شده که با نمونه‌برداری‌های وسیع در سطح کرهٔ زمین همراه بوده‌اند تا کنون هفت هاپلوگروه به همراه ۱۹ زیرشاخه برای اسب‌های موجود در نقاط مختلف جهان تعیین شده است (Vilà et al., 2001; Jansen et al., 2006; McGahern et al., 2002).

با مطالعهٔ ژنوم میتوکندریایی در اسب‌های جنوب شرقی قارهٔ آسیا مشخص شد که اسب‌های امروزی موجود در چین در درون هفت هاپلوگروه (A-G) قرار می‌گیرند، درحالی‌که، توالی‌های بدست آمده از اسب‌های باستانی چین در سه هاپلوگروه A، E و F قرار گرفتند. همچنین در این مطالعه مشخص شد که بیشترین مقدار واریانس (۹۷/۸۹ درصد،  $P=0/0001$ ) به واریانس بین جمعیت‌های مورد مطالعه تعلق دارد (Cai et al., 2009; Lei et al., 2009). Pérez-Gutiérrez و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از قطعهٔ ۳۴۷ جفت بازی ناحیهٔ D-loop ژنوم میتوکندری و ۱۳ مارکر میکروساتلایت ساختار ژنتیکی و نحوهٔ شکل‌گیری اسب‌های نژاد Hispano-Breton را مورد بررسی قرار دادند و جهت انجام مقایسات خود از نژاد اسب Pura Raza Espanola و تعداد دیگری از نژادهای اسب سنگین وزن اروپایی استفاده کردند. هر دو مارکر تنوع ژنتیکی بالا را در این اسب‌ها نشان دادند و مقادیر شاخص تثبیت<sup>۱۱</sup> مشخص نمودند که نژادهای اسب مورد مقایسه در شکل‌گیری

1. Arabian horse (Asil)
2. Turkmen horse
3. Kurdish horse
4. Caspian miniature horse
5. Sistani horse
6. Pony
7. Microsatellite
8. Genetic diversity

9. Genetic structure

10. Bottleneck study

11. Fixation index (FST or ΦST)

توالی متعلق به اسب‌های موجود در مناطق شرق و مرکز آسیا، خاورمیانه، اروپا، اسب‌های خون گرم و خون سرد و تعدادی از توالی‌های باستانی (متعلق به ۱۰۰۰ الی ۲۰۰۰ سال پیش) از بانک اطلاعات ژنوم<sup>۵</sup> دریافت شدند (شماره‌های شناسایی توالی‌ها در شکل ۱ مشخص شده‌اند).

### انجام واکنش PCR نمونه‌ها و خالص‌سازی محصولات PCR

با استفاده از توالی mtDNA موجود در اسب، پرایمر مستقیم<sup>۶</sup> 5'-  
 3'-ATACCACTCGCAAGCACCATC- و معکوس<sup>۷</sup>  
 5'-GGAAAGAATGGGCGAGGTTGG-3' توالی با طراحی شدند. سپس واکنش‌های PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری که حاوی ۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۴ mM MgCl<sub>2</sub>، ۰/۱۶ mM dNTPs، ۰/۲۴ mM از هر پرایمر، ۲ واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۰/۷ میکرولیتر DMSO و تقریباً ۵۰ ng DNA بودند انجام شدند. تمامی واکنش‌های PCR با استفاده از برنامه استاندارد واکنش PCR صورت گرفتند که شامل ۵ دقیقه جداسازی آغازین زنجیره‌های الگو<sup>۸</sup> در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۵ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه در ۶۵ درجه سانتیگراد و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت تکثیر نهایی زنجیره الگو<sup>۹</sup> به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بودند. سپس محصولات PCR بدست آمده پس از بررسی در ژل آگارز ۱ درصد، با استفاده از کیت QIAGEN (QIAquick Gel Extraction) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی شدند. نمونه‌های خالص‌سازی شده با استفاده از کیت BigDye v3.1 توسط دستگاه (ABI, USA) 3730XL DNA analyzer تعیین توالی شدند.

این نژاد اسب اروپایی دخالت داشته‌اند. مطالعات بسیاری در زمینه بررسی روابط فیلوژنتیک<sup>۱</sup> و ساختار ژنتیکی نژادهای مختلف اسب جهت مشخص شدن تاریخچه تکاملی و نحوه تفرق آنها صورت گرفته است (Luis et al., 2006; Ivancović et al., 2009; Głazewska et al., 2010). تمامی این مطالعات وجود خطوط مادری مختلف و در نتیجه وقایع متعدد که ضرورتاً از یکدیگر مجزا نمی‌باشند را در ایجاد اسب‌های اهلی امروزی دخیل می‌دانند.

در این مطالعه با مقایسه ناحیه متغیر<sup>۲</sup> D-loop ژنوم میتوکندری در پنج جمعیت اسب بومی ایران جایگاه‌های نوکلئوتیدی متغیر، تنوع و ساختار ژنتیکی و ارتباط ژنتیکی این اسب‌ها با برخی از جمعیت‌های دیگر کره زمین مورد مطالعه قرار گرفت تا با آگاهی از مقادیر شاخص تثبیت جمعیت‌های موجود به میزان قرابت ژنتیکی و نحوه تلاقی‌های صورت گرفته پی برده شود و بتوان با این آگاهی برنامه‌های اصلاح نژادی مناسبی را در این جمعیت‌ها جهت حفظ تنوع ژنتیکی مطلوب در جمعیت و جلوگیری از افزایش همخونی بکار برد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه برداری و بدست آوردن توالی‌های موجود از بانک اطلاعات ژنوم

نمونه خون ۹۵ حیوان از جمعیت‌های مختلف اسب‌های ترکمن، خزر، عرب، کرد و سیستانی به ترتیب ۲۳، ۱۶، ۲۳، ۱۳ و ۲۰ راس از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری شدند. کل محتوی DNA با استفاده از روش شستشوی نمکی<sup>۳</sup> (Miller et al., 1988) از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده استخراج شد و به عنوان الگو<sup>۴</sup> برای تکثیر ناحیه متغیر D-loop ژنوم میتوکندری مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین برای مقایسه با سایر جمعیت‌های اسب موجود در دیگر نقاط جهان ۱۱۴

5. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

6. Forward

7. Reverse

8. Initial denaturation

9. Final extension

1. Phylogenetic

2. Hypervariable region

3. Salting out

4. Template

et al., 2006) و به روش Kimura-2 Parameter بدست آمدند.

رابطه شماره (۱)

$$FST = \Phi ST = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

در رابطه فوق  $\sigma_a^2$  واریانس بین جمعیت‌ها و  $\sigma_T^2$  واریانس کل می‌باشند که از جدول آنالیز واریانس مولکولی بدست می‌آیند.

## نتایج

### تنوع موجود در توالی‌ها

با بررسی قطعه ۲۴۷ جفت بازی ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری اسب‌های بومی ایران ۳۹ جایگاه نوکلئوتیدی متغیر و ۴۴ هاپلوتیپ بدست آمد. از بین ۳۹ جایگاه متغیر در ۳۸ جایگاه جهش نوع جانیشینی<sup>۶</sup> و در یک جایگاه حذف نوکلئوتیدی<sup>۷</sup> بوقوع پیوسته بود، که این نوع تغییرات نوکلئوتیدی نشان دهنده وجود تنوع بسیار بالا در توالی‌ها و اریب بسیار قوی به سمت وقوع جانیشینی در نوکلئوتیدها می‌باشد (جدول ۱). مقدار تنوع نوکلئوتیدی کل برای تمامی توالی‌های اسب‌های بومی ایران  $0.028 \pm 0.009$  بدست آمد که نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در این اسب‌ها می‌باشد.

### آنالیزهای فیلوژنی

درخت فیلوژنی جهت نشان دادن ارتباط میان هاپلوتیپ‌های بدست آمده و توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم ترسیم شد.

از بین ۴۴ هاپلوتیپ بدست آمده ۳۵ هاپلوتیپ در شش هاپلوگروه بدست آمده توسط Vilà و همکاران (۲۰۰۱) قرار گرفتند. بیشترین تعداد هاپلوتیپ‌های (۲۹/۵۴ درصد) بدست آمده به همراه نژادهای اسب Cheju، Mongolian، Shetland، Akhal-Teke، Tuva، Noriker، Lipizzan، Cukorova و یکی از توالی‌های باستانی در درون هاپلوگروه F قرار گرفتند. کمترین تعداد هاپلوتیپ‌ها (۴/۵۴ درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) شامل هاپلوتیپ‌های H25 و H36 بودند که به همراه

## بررسی تنوع موجود در توالی‌های بدست آمده از جمعیت‌های بومی

تمامی توالی‌های ناحیه متغیر D-loop ژنوم میتوکندری بدست آمده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999) ویرایش شده و به طول ۲۴۷ جفت باز درآمدند. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) توسط توالی مرجع زیر یکدیگر مرتب شده و بنابراین جایگاه‌های حذف و اضافه<sup>۱</sup> و انواع جهش‌های بوقوع پیوسته تشخیص داده شدند. توالی‌های مشابه به عنوان یک هاپلوتیپ<sup>۲</sup> در نظر گرفته شدند.

## ترسیم درخت فیلوژنی و بدست آوردن هاپلوگروه‌ها

درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار 4 MEGA (Tamura et al., 2007) و به روش Neighbour-joining با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد برای هاپلوتیپ‌های تشخیص داده شده و ۱۱۴ توالی بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم ترسیم شد. برای محاسبه فواصل ژنتیکی از روش Kimura-2 Parameter استفاده شد. از توالی D-loop ژنوم میتوکندری الاغ<sup>۳</sup> (X97337) Xu & Arnason, 1996) به عنوان گروه شاهد<sup>۴</sup> استفاده شد. تقسیم‌بندی ارائه شده توسط Vilà و همکاران (۲۰۰۱) که ۶ هاپلوگروه (A تا F) را برای کلیه اسب‌های موجود در جهان تعیین نموده‌اند، جهت ترسیم درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفت.

## بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه

جهت بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه و مقایسه آنها با توالی‌های دریافت شده از بانک اطلاعات ژنوم، جدول تجزیه واریانس مولکولی<sup>۵</sup> و همچنین مقادیر شاخص تثبیت با استفاده از رابطه شماره ۱، توسط نرم‌افزار ARLEQUIN 3.1 (Excoffier

1. Insertions/Deletions
2. Haplotype
3. *Equus asinus* (Donkey)
4. Outgroup
5. Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

6. Transition

7. Deletion



مورد مطالعه با استفاده از روش Kimura-2 parameter برآورد شدند (جدول ۳). مقادیر  $\Phi ST$  با استفاده از این روش در دامنه‌ای بین  $-۰/۰۱۲۶$  - الی  $۰/۱۷۱۸۸$  بدست آمدند. مقادیر  $\Phi ST$  با سطوح معنی‌دار مختلف نشان دادند که از جمعیت‌های مورد مطالعه جمعیت‌های عرب و اسبچه خزر، عرب و کرد، ترکمن و اسبچه خزر، ترکمن و کرد، اسبچه خزر و کرد با یکدیگر از نظر ژنتیکی متفاوت بوده و همچنین جمعیت‌های اسبچه خزر و کرد با توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم تفاوت معنی‌دار نشان دادند ( $P < ۰/۰۵$ ). تمامی جمعیت‌های مورد مطالعه با جمعیت اسب‌های سیستانی شباهت ژنتیکی نشان دادند ( $P < ۰/۰۵$ ). دو جمعیت عرب و ترکمن نیز از نظر ژنتیکی تفاوتی را نشان ندادند ( $P < ۰/۰۵$ ). جمعیت‌های اسب عرب و ترکمن با توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم تفاوت معنی‌دار نشان ندادند ( $P < ۰/۰۵$ ).

### بحث

درخت فیلوژنی ترسیم شده برای هاپلوتیپ‌ها و توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم مشخص نمود که ۳۵ هاپلوتیپ از ۴۴ هاپلوتیپ بدست آمده برای اسب‌های بومی ایران در تمامی هاپلوگروه‌های بدست آمده توسط Vilà و همکاران (۲۰۰۱) قرار گرفتند و ۹ هاپلوتیپ باقیمانده در این هاپلوگروه‌ها جای نگرفتند. نتایج بدست آمده در این مطالعه با نتایج بدست آمده برای اسب‌های بومی ایران و همچنین با نتایج بدست آمده برای اسب‌های موجود در آسیا که تنوع ژنتیکی بالا (۰/۰۲۵) را برای این اسب‌ها گزارش کرده‌اند مطابقت دارند (Seyedabadi et al., 2006; Amirinia et al., 2007; Lei et al., 2009; Cai et al., 2009; Cai et al., 2007).

وجود تنوع ژنتیکی بالا و خطوط مادری متعدد در اسب‌های بومی ایران مؤید این مطلب است که وقایع متعددی در اهلی شدن اسب‌های بومی ایران صورت گرفته‌اند که ناشی از ایجاد و شکل‌گیری مجدد جمعیت‌های وحشی اسب ایجاد کننده اسب‌های اهلی امروزی در هزاران سال قبل می‌باشد. تمامی جمعیت‌های اسب بومی کشور هاپلوگروه F را نشان دادند که با یافته‌های

(Yunnan و Shire, Lippizan, Arabian, Asturcon شاخه‌بندی شدند. هاپلوتیپ‌های H12, H28, H39 و H40 (۹/۰۹ درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) به همراه نژادهای اسب Throughbred, Arabian, Mongolian, Cheju, Lipizzan, Caspian, Mallorquina, Connemara, Fell و Exmoor در درون هاپلوگروه B و در زیرشاخه‌های مختلف آن قرار گرفتند. هاپلوتیپ‌های H6, H7, H22 و H37 (۹/۰۹ درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) در هاپلوگروه C که نژادهای اسب Argentinian-Creole, Exmoor, Lipizzan, Shetland, Peruvian Paso در آن وجود دارند شاخه‌بندی شدند. هاپلوتیپ‌های H2, H3, H4, H13, H14, H18 و H29 (۱۵/۹ درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) در هاپلوگروه A که شامل نژادهای اسب Lipizzan, Anatolian, Cheju, Sorraia, Garrano, Peruvian Paso, Lusitano, Danish, Thoroughbred, Potoka, Przewalskii, Arabian, Exmoor و یکی از توالی‌های باستانی نیز می‌باشد قرار گرفتند. کمترین و بیشترین تعداد هاپلوگروه‌ها را به ترتیب جمعیت‌های اسب کرد (C, E و F) و سیستانی (A تا F) دارا بودند و اسب‌های عرب، ترکمن و اسبچه خزر به ترتیب دارای ۴ (A, C, D و F)، ۴ (A, B, D و F) و ۵ (A, B, C, D و F) هاپلوگروه بودند. ۹ هاپلوتیپ باقیمانده از ۴۴ هاپلوتیپ در هیچیک از هاپلوگروه‌های ارائه شده بوسیله Vilà و همکاران (۲۰۰۱) قرار نگرفتند و بنظر می‌رسد که با استفاده از تقسیم‌بندی انجام گرفته توسط Jansen و همکاران (۲۰۰۲) و توسط زیرشاخه A6 دسته‌بندی شوند.

### مقایسه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه و توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم

همانطوریکه در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود بیشترین مقدار واریانس برآورد شده به واریانس درون جمعیت‌های مورد مطالعه (۹۶/۶۴ درصد) تعلق دارد. آنالیز واریانس صورت گرفته مقدار اندک (۳/۳۶ درصد) اما معنی‌داری را برای واریانس بین جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد ( $\Phi ST = ۰/۰۳۳۶۰$ ,  $P = ۰/۰۰۰۱$ ), که نشان دهنده وجود تفاوت بین همه یا تعدادی از این جمعیت‌ها می‌باشد. با توجه به معنی‌دار بودن این تفاوت، مقادیر شاخص تثبیت ( $\Phi ST$ ) بین جفت جمعیت‌های

E, A, و F را در اسب‌های موجود در آسیا بین ۲ الی ۴ هزار سال قبل از میلاد مسیح تشخیص داده‌اند (Cai et al., 2009; Lei et al., 2009; Cai et al., 2009). با توجه به وجود این هاپلوگروه‌ها در اسب‌های بومی ایران (بخصوص هاپلوگروه F) به نظر می‌رسد که قدمت اجداد اسب‌های موجود در ایران به پیش‌تر از ۲۰۰۰ هزار سال قبل بر می‌گردد.

در این مطالعه، آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از روش Kimura-2 parameter مقدار اندک اما معنی‌داری را از تفاوت‌های بین جمعیت‌ها مشخص نمود (جدول ۲).

بدست آمده در مورد نحوه ایجاد این هاپلوگروه در مناطق شرقی کره زمین مطابقت دارد (McGahern et al., 2006; Lei et al., 2009; Cai et al., 2009). با توجه به این یافته‌ها این هاپلوگروه مختص اسب‌های موجود در مناطق شرقی کره زمین می‌باشد. در بین توالی‌های بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم توالی‌های اسب‌های باستانی (AF326671، AF326672 و AF326668) وجود دارند که متعلق به ۱۰۰۰ الی ۲۰۰۰ سال قبل می‌باشند، هاپلوتیپ‌های بدست آمده برای اسب‌های بومی ایران در کنار این توالی‌ها در هاپلوگروه‌های E, A, و F قرار گرفته‌اند. مطالعات قبلی وجود هاپلوگروه‌های

جدول ۲- تقسیم‌بندی واریانس ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های مورد مطالعه و توالی‌های بانک اطلاعات ژنوم با استفاده از آنالیز

واریانس مولکولی (AMOVA) به روش Kimura-2 parameter.

منبع واریانس	آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) جمعیت‌ها	درون جمعیت‌ها
درجه آزادی	۵	۲۰۳
درصد واریانس	۳/۳۶	۹۶/۶۴
<b>P-value</b>	۰/۰۰۰۰۰	

کلیه جمعیت‌ها را مورد مقایسه قرار داد (جدول ۳).

بدلیل وجود تفاوت معنی‌دار بین جمعیت‌های مورد بررسی، می‌توان با استفاده از مقادیر شاخص تثبیت،

جدول ۳- مقادیر شاخص تثبیت ( $\Phi_{ST}$ ) جفت جمعیت‌های مورد بررسی بین توالی‌های میتوکندریایی جمعیت‌های مورد مطالعه و

توالی‌های بانک اطلاعات ژنوم با استفاده از روش Kimura-2 parameter.

جمعیت	عرب	ترکمن	خزر	کرد	سیستانی
ترکمن	-۰/۰۰۱۲۶				
خزر	<sup>a</sup> ۰/۱۰۷۰۶	<sup>c</sup> ۰/۱۴۸۴۷			
کرد	<sup>b</sup> ۰/۱۳۰۶۶	<sup>d</sup> ۰/۱۷۱۸۸	<sup>e</sup> ۰/۱۰۴۳۴		
سیستانی	۰/۰۱۷۰۷	۰/۰۲۷۱۳	۰/۰۴۶۵۳	۰/۰۱۹۰۶	
توالی‌های بانک ژن	۰/۰۰۸۷۶	۰/۰۰۸۵۶	<sup>f</sup> ۰/۰۵۴۴۳	<sup>g</sup> ۰/۰۷۴۹۶	-۰/۰۰۹۰۴

<sup>a</sup> P-value = ۰/۰۱۴۶۵ = P-value <sup>b</sup> = ۰/۰۰۳۹۱ = P-value <sup>c</sup> = ۰/۰۰۰۹۸ = P-value <sup>d</sup> = ۰/۰۰۱۹۵ = P-value <sup>e</sup> = ۰/۰۲۳۴۴ = P-value <sup>f</sup> = ۰/۰۰۳۹۱ = P-value <sup>g</sup> = ۰/۰۱۲۷۰ =

بدست آمده از بانک اطلاعات ژنوم) نشان از عدم کنترل تلاقی‌های بین جمعیتی در اسب‌های سیستانی و ورود

تفاوت نبودن جمعیت اسب‌های سیستانی با سایر جمعیت‌ها (عرب، اسپچه خزر، ترکمن، کرد و توالی‌های





از سویی باید خاطرنشان کرد که در حال حاضر قوانین نظارتی و حمایتی پرورش اسب بسیار محدود بوده و همچنین مراکز نگهداری استاندارد همراه با ثبت مشخصات و پرورش عملی جهت حفظ و حراست از جمعیت‌های موجود اسب در ایران وجود ندارد. در راستای حفظ ذخایر ژنتیکی بومی کشور و برای احیاء و اصلاح نژاد این جمعیت‌ها که در شکل‌گیری نژادهای اسب خارجی تأثیر بسزایی داشته‌اند و در آینده نیز به خاطر خصوصیات ژنتیکی مختص خود می‌توانند تأثیرگذار بوده و بازار جهانی را به سمت اینگونه جمعیت‌ها سوق دهد، باید قوانین حفاظتی، مراکز اصلاح نژادی و آزمون‌های ژنتیکی ویژه‌ای در نظر گرفته شود. ورود و خروج اسب‌های خارجی باید محدود شده و قوانین سخت‌گیرانه‌ای در جهت ورود این جمعیت‌ها به داخل کشور ارائه گردد، چراکه توانایی‌های لازم برای جوابگویی به درخواست‌های فعلی جامعه اسب‌داری و سوارکاری در جمعیت‌های اسب موجود کشور وجود دارد.

اولیة متفاوتی را نشان می‌دهند، می‌باشد. هرچند که با توجه به سوابق تاریخی کشورمان و اهمیت و جایگاه اسب برای حفظ قلمرو حاکمان گذشته و دستیابی به نواحی دور دست، اختلاط اسب‌های بومی با دیگر جمعیت‌ها جهت بدست آوردن اسب‌هایی با قدرت، شجاعت و یا سرعت بیشتر به نظر بعید نمی‌باشد و می‌تواند بخشی از تنوع موجود را توجیه نماید از طرفی این اختلاط، خلوص نژادی هرکدام از جمعیت‌ها را تحت تأثیر قرار داده است. همچنین در این مطالعه مشخص شد که اکثر جمعیت‌ها با هم تفاوت نسبی را دارا می‌باشند، اما در مواردی نیز به نظر می‌رسد شکل‌گیری برخی از جمعیت‌ها تلفیقی از آمیزش جمعیت‌های داخلی و خارجی بوده است. این اولین مطالعه‌ای می‌باشد که خطوط ژنتیکی مادری و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های اسب بومی کشور را با استفاده از توالی‌های نواحی متغیر ژنوم میتوکندری مورد آنالیز قرار داده است و نتایج بدست آمده اختلاط حاصل از جمعیت‌های مختلف را در شکل‌گیری جمعیت فوق بسیار محتمل می‌داند.

## REFERENCES

1. Amills, M., Ramirez, O., Tomàs, A., Badaoui, B., Marmi, J., Acosta, J., Sánchez, A. & Capote, J. (2008). Mitochondrial DNA diversity and origins of South and Central American goats. *Animal Genetics*, 40, 315-322.
2. Amirinia, C., Seyedabadi, H. R., Banabazi, M. H. & Kamali, M. A. (2007). Bottleneck Study and Genetic Structure of Iranian Caspian Horse Population Using Microsatellites. *Pakistan Journal of Biological Science*, 10, 1540-1543.
3. Bower, M. A., Campana, M., Whitten, M., Edwards, C. J., Jones, H., Barrett, E., Cassidy, R., Nisbet, R. E. R., Hill, E. W., Howe, C. J. & Binns, M. (2011). The cosmopolitan maternal heritage of the Thoroughbred racehorse breed shows a significant contribution from British and Irish native mares. *Biology Letters*, 7, 316-320.
4. Cai, D. W., Tang, Z., Han, L., Speller, C. F., Yang, D. Y., Ma, X., Cao, J., Zhu, H. & Zhou, H. (2009). Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse. *Journal of Archaeological Science*, 36, 835-842.
5. Cai, D. W., Han, L., Xie, C. Z., Li, S. N., Zhou, H. & Zhu, H. (2007). Mitochondrial DNA analysis of Bronze age horses recovered from Chifeng region, Inner Mongolia, China. *Progress in Natural Science*, 17, 544-550.
6. Chauhan, M., Gupta, A. K. & Dhillon, S. (2011). Genetic diversity and population structure of three Indian horse breeds. *Molecular Biology Reports*, 38, 3505-3511.
7. Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2006). ARLEQUIN: An integrated Software package for Population Genetic (Version 3.1). Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne, Baltzerstrasse, Switzerland.
8. Głazewska, I. (2010). Speculations on the origin of the Arabian horse breed. *Livestock Science*, 129, 49-55.
9. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
10. Hill, E. W., Bradley, D. G., Al-Barody, M., Ertugrul, O., Splan, R. K., Zakharov, I. & Cunningham, E. P. (2002). History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Animal Genetics*, 33, 287-294.

11. Iran's Country Report on Farm Animal Genetic Resources, (2004). Animal Science Research Institute of Iran. Draft Iran's Country Report on Farm Animal Genetic Resources, Tehran, Iran.
12. Ivancović, A., Ramljak, J., Konjacic, M., Kelava, N., Dovč, P. & Mijic, P. (2009). Mitochondrial D-loop sequence variation among autochthonous horse breeds in Croatia. *Animal Science*, 54, 101-111.
13. Jansen, T., Forster, P., Levine, M. A., Oelke, H., Hurler, M., Renfrew, C., Weber, J. & Olek, K. (2002). Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10905-10910.
14. Khalili, M. (2009). Horses and my expertise. (ed. by M. Khalili), pp. 694 Nashr-e Zare Publication, Iran.
15. Larson, G., Albarella, U., Dobney, K., Rowley-Conwy, P., Schibler, J., Tresset, A., Vigne, J. D., Edwards, C. J., Schlumbaum, A., Dinu, A., Balaşescu, A., Dolman, G., Tagliacozzo, A., Manaseryan, N., Miracle, P., Wijngaarden-Bakker, L. V., Masseti, M., Bradley, D. G. & Cooper, A. (2007). Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 15276-15281.
16. Lei, C. Z., Su, R., Bower, M. A., Edwards, C. J., Wang, X. B., Weining, S., Liu, L., Xie, W. M., Li, F., Liu, R. Y., Zhang, Y. S., Zhang, C. M. & Chen, H. (2009). Multiple maternal origins of native modern and ancient horse populations in China. *Animal Genetics*, 37, 494-497.
17. Luis, C., Bastos-Silveira, C., Cothran, E. G. & do Mar Oom, M. (2006). Iberian origins of New World horse breeds. *Journal of Heredity*, 97, 107-113.
18. McGahern, A., Bower, M. A. M., Edwards, C. J., Brophy, P. O., Sulimova, J., Zakharov, I., Vizueté-Forster, M., Levine, M., Li, S., MacHugh, D. E. & Hill, E. W. (2006). Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA sequences in Eastern horse populations. *Animal Genetics*, 37, 494-497.
19. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.
20. Pérez-Gutiérrez, L. M., De La Pena, A. & Arana, P. (2008). Genetic analysis of the Hispano-Breton heavy horse. *Animal Genetics*, 39, 506-514.
21. Seyedabadi, H. R., Amirinia, C., Banabazi, M. H. & Emrani, H. (2006). Parentage verification of Iranian Caspian horse using microsatellites markers. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4, 260-264.
22. Shahsavarani, H. & 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, 293-299.
23. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
24. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
25. Vilà, C., Leonard, J. A., Götherström, A., Marklund, S., Sandberg, K., Lidén, K., Wayne, R. K. & Ellegren, H. (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. *Science*, 291: 474-477.
26. Xu, X. & Arnason, U. (1996). The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparison among four closely related mammalian species-pairs. *Journal of Molecular Evolution*, 43, 438-446.