

تخمین نرخ هم‌خونی با استفاده از رشته‌های هموزیگوت ژنومی و بررسی روند تکاملی اندازه مؤثر جمعیت در برخی از نژادهای اسب آسیایی

امیرحسین خلت‌آبادی فراهانی^۱ و محمدحسین مرادی^{۱*}

۱. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۳)

چکیده

هدف از این تحقیق محاسبه هم‌خونی با استفاده از رشته‌های هموزیگوت ژنومی و بررسی روند تکاملی اندازه مؤثر جمعیت (Ne) در برخی از نژادهای اسب آسیایی بود. به این منظور از اطلاعات ژنومی مجموع ۹۹ نمونه حیوان شامل ۱۹، ۲۴، ۱۸، ۱۹ و ۱۹ نمونه به ترتیب از نژادهای آخال‌تکه، عرب، کاسپین، مغولی و تروبرد استفاده شد که با به‌کارگیری آرایه‌های Illumina SNP50K Beadchip تعیین ژنوتیپ شده‌اند. این تحقیق با همکاری کنسرسیوم تنوع ژنتیکی اسب (EGDC) انجام شد. ضریب هم‌خونی با استفاده از روش FROH بر پایه رشته‌های هموزیگوت ژنومی (ROH) و اندازه مؤثر با به‌کارگیری اطلاعات عدم تعادل پیوستگی در طی ۵ تا ۱۰۰۰ نسل قبل محاسبه شد. نتایج آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) نشان داد که تمام نژادها با استفاده از دو مؤلفه اول از همدیگر مجزا می‌شوند. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده‌شده در نژادهای مختلف به ترتیب در دامنه ۰/۲۹۴-۰/۲۷۸ و ۰/۳۰۸-۰/۲۷۸ بود. محاسبه ضریب هم‌خونی بر پایه اطلاعات ژنومی نشان داد که مقادیر محاسبه شده بین ۰/۰۰۳ (نژاد مغولی) و ۰/۱۶۶ (نژاد تروبرد آمریکایی) در نوسان می‌باشد. نتایج حاصل از محاسبه اندازه مؤثر در نژادهای مختلف، نشان‌دهنده روند کاهش تدریجی Ne در طی ۱۰۰۰ سال گذشته تاکنون با یک شیب کاهشی زیاد در حدود ۱۰۰ نسل قبل برای تمام نژادها بود. بیشترین Ne در نسل‌های حاضر (۵ نسل قبل) در نژاد عرب (۵۳ رأس) و کمترین در نژادهای کاسپین و تروبرد (۳۳-۳۴ رأس) مشاهده شد. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که در بین نژادهای آسیایی، نژاد اسب کاسپین با وجود تنوع ژنتیکی مناسب و ضریب هم‌خونی پایین، اندازه مؤثر آن نسبت به سایر نژادهای مورد مطالعه در این تحقیق کمتر می‌باشد که طراحی برنامه‌های مناسب برای حفاظت از حیوانات خالص باقیمانده این نژاد بومی کشور ضروری است.

واژه‌های کلیدی: اندازه مؤثر، رشته‌های هموزیگوت ژنومی، نرخ هم‌خونی، نژادهای اسب آسیایی.

Estimation of inbreeding values using genomic run of homozygosity and study of evolutionary trend for effective population size in some Asian horse breeds

Amir Hossein Khalt-Abadi Farahani¹ and Mohammad Hossein Moradi^{1*}

1. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran

(Received: Jun. 27, 2018 - Accepted: Aug. 14, 2018)

ABSTRACT

The objective of the present study was to estimate the inbreeding values using run of homozygosity and study the evolutionary trend of the effective population size (Ne) in some Asian horse breeds. A total of 99 animal samples consisting 19, 24, 18, 19 and 19 samples from AkhalTake, Arrabian, Caspian, Mongolian and Thoroughbred breeds, genotyped by Illumina SNP50K Beadchip assay were used in this study, respectively. This study has been performed in collaboration with the Equine Genetic Diversity Consortium (EGDC) project. The inbreeding values based on the run of homozygosity using FROH and next, Ne using linkage disequilibrium across 5 up to 1000 generations ago were estimated. The result of principal component analysis (PCA) indicated that all breeds will be separated from each other in the first two principal components. Average expected and observed heterozygosity for different breeds ranged 0.278-0.294 and 0.278-0.308 respectively. Estimation of inbreeding based on genomic information showed that the values are ranged between 0.003 in Mongolian up to 0.166 in Thoroughbreds. The Ne results showed a decreasing trend over the last 1000 generations for all breeds, with an increasing slope since about 100 generations ago. The highest historically effective population size in recent generations (5 generations ago) was found in the Arabian breed (53 heads) and the lowest for Caspian and Thoroughbred (33-34 heads) breeds. Generally, the results of this study indicated that despite a reasonable genetic variation and low inbreeding value, however, the Ne is the lowest in Caspian compared to other Asian horse breeds that designing of appropriate programs is necessary to conserve remaining purebred animals of this indigenous Iranian horse breed.

Keywords: Asian horse breeds, effective population size, inbreeding value, run of homozygosity,

* Corresponding author E-mail: Moradi.hosein@gmail.com, Hoseinmoradi@ut.ac.ir

مقدمه

اسب یکی از کهن‌ترین گونه‌هایی است که در دشت‌های اوراسیا در حدود ۶۰۰۰-۵۰۰۰ سال قبل اهلی شده است (Petersen *et al.*, 2013) و از نظر پراکنش جغرافیایی تقریباً در تمام سرزمین‌هایی که انسان در آن گام نهاده است این حیوان نیز در کنار او حضور داشته است. با توجه به آنچه در صنعت پرورش اسب امروز دنیا در جریان است، اسب یکی از گرانبهاترین دام‌ها محسوب می‌شود به طوری که در برخی از موارد قیمت یک رأس اسب سیلیمی یا مادپان ممتاز با بهای چندین ده رأس گاو ماده ممتاز برابری می‌کند (Rafeie, 2011). به این ترتیب واحدهایی که به پرورش اسب اصیل و خالص می‌پردازند از پرسودترین واحدهای دامداری محسوب می‌شوند. اسب دارای پراکنش جهانی است ولی با توجه به شرایط جغرافیایی خاص هر منطقه و کشور، نژادهای مقاوم به شرایط هر منطقه نیز شکل گرفته است. بر اساس آمارها جمعیتی بیش از حدود ۵۸ میلیون رأس (FAOstat, 2010) و بیش از ۵۰۰ نژاد (Petersen *et al.*, 2013) برای این گونه دامی در سراسر جهان گزارش شده است. البته امروزه واردات و صادرات اسب بسیار رایج بوده و می‌توان در هر کشور چندین نژاد وارداتی نیز مشاهده کرد که نمونه بارز آن اسب نژاد تروبرد است که تقریباً در سراسر دنیا پراکنده شده است. ورود حیوانات اصلاح شده خارجی و بعضاً استفاده گسترده از تلاقی‌های برنامه‌ریزی نشده باعث شده است تا هم‌اکنون فراوانی بسیاری از نژادهای بومی دنیا کاهش یابد و در نتیجه بسیاری از این نژادها در معرض خطر انقراض و فرسایش ژنتیکی قرار گیرند (Moradi *et al.*, 2013). لذا در این شرایط، تخمین هم‌خونی و اندازه مؤثر جمعیت نژادهای بومی به یکی از موضوعات مهم در طراحی برنامه‌های اصلاحی تبدیل شده است.

هم‌خونی با افزایش هموزیگوسیتی در کلیه جایگاه‌ها، باعث افت ناشی از هم‌خونی در جایگاه‌های دارای رابطه غیر افزایشی و افزایش بروز نقایص ژنتیکی می‌شود (Zhao *et al.*, 2014). اندازه مؤثر جمعیت (Ne) نیز یکی از مهمترین پارامترها در ژنتیک

جمعیت محسوب می‌شود که میزان تنوع ژنتیکی و رانش تصادفی را در جمعیت مشخص می‌کند (Frankham, 2005) و نه تنها اطلاعاتی از روند تکاملی گونه‌ها و نژادهای مختلف فراهم می‌کند، بلکه درک ما را در فهم و مدل‌سازی معماری ژنتیکی صفات پیچیده توسعه می‌دهند (Tenesa *et al.*, 2007). از طرفی قبل از انجام هر گونه اقدام در ارتباط با حفاظت از ذخایر ژنتیکی یک جمعیت دامی، بایستی از میزان هم‌خونی و اندازه مؤثر آن نژاد اطلاعات کسب کرد (Zhao *et al.*, 2014). شجره به صورت مرسوم برای تخمین هم‌خونی و اندازه مؤثر در جمعیت‌های دامی استفاده می‌شود. به عنوان نمونه (Gharahveysi *et al.*, 2009) میانگین هم‌خونی را در نژاد اسب عرب ایرانی با استفاده از اطلاعات ثبت اسناب فدراسیون سوارکاری ایران ۲/۱۲ درصد گزارش کردند. با این وجود تخمین حاصل از شجره تا حد زیادی به عمق شجره و کامل بودن آن بستگی دارد که این اطلاعات تنها برای برخی از جمعیت‌های دامی در دسترس است (Uimari & Tapio, 2011) و از طرفی، تخمین ضریب هم‌خونی با استفاده از اطلاعات شجره به دلیل عدم امکان در نظر گرفتن اثرات نمونه‌گیری مندلی، دارای صحت پایینی خواهد بود (Moradi *et al.*, 2017).

یک راه حل برای رفع این محدودیت استفاده از اطلاعات ژنومی است. پیشرفت‌های اخیر در زمینه تعیین ژنوتیپ و طراحی آرایه‌های SNP (SNP Chip) امکان جمع‌آوری مقادیر بالای اطلاعات نشانگری و عدم تعادل پیوستگی (LD: Linkage Disequilibrium) را برای محاسبه میزان هم‌خونی و اندازه مؤثر در جمعیت‌های مختلف انسانی و دامی فراهم آورده است (Corbin *et al.*, 2010; Kijas *et al.*, 2012). هم‌خونی با استفاده از رشته‌های هموزیگوت (FROH: Inbreeding based on run of homozygosity) به توالی‌های هموزیگوت به هم پیوسته از ژنوتیپ هر فرد گفته می‌شود که از طریق هاپلوتیپ‌های یکسانی از والدین به فرزند انتقال یافته باشند (Purfield *et al.*, 2012). به عنوان معیاری مناسب در برآورد هم‌خونی واقعی در سطح ژنوم استفاده می‌شود که امکان در نظر گرفتن اثر نمونه‌گیری مندلی و در

خاورمیانه، ایران و مغولستان منشأ می‌گیرند هرچند در سایر کشورهای همجوار نیز پراکنش یافته‌اند (جدول ۱). همچنین با توجه به پراکنش گسترده نژاد ترورد در سایر کشورهای آسیایی از اطلاعات ژنومی این نژاد نیز استفاده شده است. این تحقیق با همکاری پروژه کنسرسیون تنوع ژنتیکی اسب (Equine Genetic Diversity Consortium) انجام شده است. با توجه به پراکنش گسترده سه اسب آخال تکه (ترکمن)، عرب و کاسپین در ایران نتایج این تحقیق می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه درک بهتر و مدل کردن معماری ژنتیکی نژادهای اسب ایرانی نیز فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و تعیین ژنوتیپ

در این مطالعه جهت محاسبه ضریب همخونی و اندازه مؤثر جمعیت برخی از نژادهای اسب آسیایی از اطلاعات ژنومی مجموع ۹۹ حیوان مربوط به نژادهای آخال تکه (۱۹ رأس)، عرب (۲۴ رأس)، کاسپین (۱۸ رأس)، مغولی (۱۹ رأس) و ترورد (۱۹ رأس) استفاده شد. داده‌های این تحقیق از پروژه کنسرسیون تنوع ژنتیکی اسب (Equine Genetic Diversity Consortium) تهیه شد که نحوه جمع‌آوری و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها در مقاله Petersen *et al.* (2013) ارائه شده است، اما به‌طور خلاصه نمونه‌های مو یا بافت از حیواناتی که تا حد ممکن دارای حداقل رابطه خویشاوندی در هر جمعیت بودند جمع‌آوری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش بهینه‌یافته Puregene (Qiagen) از بافت انجام شد و حدود ۱ میکروگرم DNA برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد. تعیین ژنوتیپ نیز با استفاده از آرایه‌های Illumina SNP50K BeadChip که امکان تعیین ژنوتیپ ۵۲۶۰۳ جایگاه نشانگری SNP را فراهم می‌کند، بر اساس دستورالعمل استاندارد ایلومینا انجام شد.

ویرایش داده‌ها

در این تحقیق برای اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ در آنالیزهای نهایی مراحل مختلف کنترل کیفیت بر روی داده‌های اولیه اعمال شد (جدول ۲).

نتیجه محاسبه همخونی با صحت بالاتر از شجره را فراهم می‌آورد (Al-Mamun *et al.*, 2015). همچنین تحقیقات مختلفی نشان داده‌اند که امکان تخمین اندازه مؤثر از روی اطلاعات عدم تعادل پیوستگی (LD) در سطح ژنوم نیز وجود دارد (Sved, 1971; Hill, 1981). بیشتر تحقیقات در این زمینه در انسان (Park, 2011) و دام‌هایی همچون گاو شیری (Saatchi *et al.*, 2011) و گوسفند (Moradi *et al.*, 2012) متمرکز شده است.

بر اساس بررسی منابع، تحقیقات اندک انجام شده در نژادهای مختلف اسب در ایران نیز عمدتاً بر روی بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای مختلف و یا شناسایی نشانه‌های انتخاب در برخی از نژادهای اسب ایرانی متمرکز شده‌اند. به‌عنوان نمونه Rafeie (2011) ساختار و میزان تنوع ژنتیکی نژادهای مختلف اسب ایرانی و میزان قرابت آنها با اسب کاسپین را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای و میتوکندریایی مورد بررسی قرار داد و افت تنوع ژنتیکی و بالا رفتن همخونی را در تقریباً تمام نژادهای مورد مطالعه ایرانی گزارش کرد. همچنین بر اساس میزان قرابت ژنتیکی در این تحقیق، کلیه نژادهای ایرانی در دو دسته اسب‌های البرز (کاسپین و سایر نژادهای بومی شمال کشور) و اسب‌های زاگرس (ترکمن، عرب، کردی، قره‌باغ و دره‌شوری) تقسیم‌بندی شدند. Zandi (2014) نیز با مطالعه پویس ژنومی، ساختار ژنتیکی و نشانه‌های انتخاب را در سطح ژنوم دو نژاد ایرانی کاسپین و ترکمن مورد بررسی قرار داد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌دهنده میزان عدم تعادل پیوستگی (LD) بالاتر در نژاد کاسپین در مقایسه با نژاد ترکمن در اکثر فواصل ژنتیکی بود که بر اساس این یافته، وجود همخونی بالاتر و در نتیجه اندازه مؤثر پایین‌تر در نژاد کاسپین نسبت به ترکمن گزارش شده است.

هدف از این تحقیق تخمین نرخ هم‌خونی با استفاده از رشته‌های هموزیگوت ژنومی و همچنین بررسی ساختار عدم تعادل پیوستگی (LD) و روند تغییرات اندازه مؤثر جمعیت در چهار نژاد مهم اسب بومی آسیایی شامل آخال تکه، عرب، کاسپین و مغولی است. این نژادها به ترتیب از کشورهای ترکمنستان، کشورهای عربی

جدول ۱. نژادهای مورد بررسی در این تحقیق، منشأ جغرافیایی، اندازه تقریبی جمعیت، طبقه‌بندی بر اساس استفاده و توضیحاتی
پیرامون تاریخچه آن‌ها (Petersen *et al.*, 2013)

Table 1. Breeds included in this study, region of breed origin, approximate population size, breed classification based upon use and notes on population history (Petersen *et al.*, 2013)

Breed	Geographic origin	Population size (Approx)	Classification	Descriptions
Akhal Teke	Turkmenistan	3500	Riding horse, Endurance	Pedigree records began 1885; Stud book: 1941.
Arabian	Middle East	1 million	Riding horse, Endurance	Arabian Type bred for over 3500 years; Stud book: 1908.
Caspian	Persia	Rare	Riding and driving pony	Rediscovered in 1965 with N~50; Stud book: 1966.
Mongolian	Mongolia	2 million	Riding horse, landrace	Many types based upon purpose and geography.
Thoroughbred	United Kingdom	Common	Riding horse, Race horse	Closed population; Stud book: 1791.

جدول ۲. مراحل مختلف ویرایش اعمال شده بر روی داده‌های ژنوتیپی نژادهای مختلف اسب مورد مطالعه

Table 2. Summary of data mining steps performed on genotyping data of the studied Horse breeds

Step	AKTK [*]	ARR	CSP	MON	TB
Number of animals	19	24	18	19	19
Excluding animals with >5% genotyping failure and regarding to PCA results	0	0	1	1	0
Remaining animals	19	24	17	18	19
Number of SNPs	52603	52603	52603	52603	52603
Excluding the sexual chromosomes SNPs	1999	1999	1999	1999	1999
Excluding SNPs with MAF<2%	11830	13818	12608	10282	12545
Excluding SNPs with deviation from HWE (<10 ⁻⁶)	4	4	0	1	0
SNPs remaining	40773	38785	39995	42321	40058

* AKTK: AkhalTeke, ARR: Arrabian, CSP: Caspian, MON: Mongolian, TB: Thoroughbred horses breeds.

در نتیجه سطح احتمال معنی‌داری $\beta=10^{-6}$ خواهد شد. باید توجه کرد که هرچند عدم تعادل هاردی واینبرگ در جایگاه‌های مختلف الزاماً نشان‌دهنده خطای تعیین ژنوتیپ نیست و عوامل مختلفی همچون انتخاب، رانش و جهش نیز می‌توانند باعث انحراف از تعادل شوند، با این وجود همانطور که در مقاله Teo *et al.* (2007) به تفسیر بیان شده است انحراف‌های شدید از این تعادل به احتمال زیاد به دلیل خطای تعیین ژنوتیپ و اشتباه در مراحل اتصال پرایمرها در هنگام ژنوتیپ نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های SNP Chip اتفاق می‌افتد. در نهایت ژنوتیپ‌های از دست‌رفته با استفاده از بسته Beagle نرم‌افزار R ایمپوت شدند (Browning & Browning, 2009).

برآورد ضریب هم‌خونی بر اساس رشته‌های هموزیگوت

نشانگرهای ژنتیکی

میزان هم‌خونی با استفاده از رشته‌های هموزیگوت نشانگرهای ژنتیکی (ROH) به‌عنوان معیاری مناسب در برآورد هم‌خونی واقعی در سطح ژنوم محاسبه شد. رشته‌های هموزیگوت برای هر فرد در هر جمعیت با استفاده از نرم‌افزار PLINK v1.07 با تعریف یک sliding window به طول SNP ۵۰ در سطح ژنوم

ابتدا دو حیوان در نژادهای مختلف که بر اساس آنالیز مؤلفه اصلی (PCA: Principal Components Analysis) خارج از گروه نژادی خود قرار داشتند از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شدند. آنالیز PCA با استفاده از نرم‌افزار R و با به‌کارگیری تابع prcomp اجرا شد. از آنجاکه نحوه وراثت جایگاه‌های موجود در کروموزوم‌های X و Y بین دو جنس نر و ماده با هم متفاوت است (Karimi *et al.*, 2015) به منظور یکسان شدن نشانگرهای مورد استفاده در هر دو جنس، در این تحقیق از نشانگرهای اوتوزومی استفاده شد. به‌همین خاطر در این مرحله، تمام نشانگرهای SNP که بر روی کروموزوم‌های جنسی X و Y واقع شده بودند و سپس SNP‌هایی که در هر نژاد دارای فراوانی آلی نادر کمتر از ۰/۰۲ بودند، از مجموعه داده‌ها حذف شدند. برای SNP‌های باقیمانده آنهایی که در هر کدام از نژادهای مورد مطالعه دارای تعادل هاردی-واینبرگ نبودند به‌عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ (Teo *et al.*, 2007) کنار گذاشته شدند. برای به‌دست آوردن سطح معنی‌داری در این آزمون از تصحیح بنفرونی $(\beta=\alpha/n)$ استفاده شد. که در این فرمول n تعداد آزمون و همان تعداد نشانگرهای SNP ($n=50000$) و خطای آزمایش $\alpha=0/05$ در نظر گرفته شدند که

طی نسل‌های گذشته استفاده شد. Corbin *et al.* (2012) رابطه LD و اندازه مؤثر جمعیتی را با معادله زیر نشان دادند که امکان تصحیح برای اندازه جامعه و نامشخص بودن فاز گامتی را فراهم می‌کند:

$$N_{T(t)} = (4f(c_t))^{-1} (E[r_{adj}^2 | c_t]^{-1} - \alpha)$$

که در این معادله N_t اندازه مؤثر جمعیت در t نسل گذشته است که $t = (2f(c_t))^{-1}$ می‌باشد (Hayes *et al.*, 2003) و c_t نرخ نوترکیبی است که بر اساس فواصل فیزیکی بین نشانگرها به دست می‌آید، α فاکتور تصحیح برای جهش (Ohta & Kimura, 1971) و r_{adj}^2 ارزش LD تصحیح شده بر اساس اندازه نمونه و فاز گامتی است که به صورت زیر محاسبه می‌شود (Weir & Hill, 1980).

$$r_{adj}^2 = r^2 - (\beta n)^{-1}$$

که در این رابطه n اندازه نمونه و برای β مقدار ۲ در صورت مشخص بودن فاز گامتی و ۱ در صورت نامشخص بودن فاز گامتی در نظر گرفته می‌شود.

چندین تقریب برای استنباط نرخ نوترکیبی (c) با استفاده از فواصل فیزیکی (δ) بین دو جایگاه و تبدیل آن به فواصل پیوستگی (d) استفاده شده است که به صورت $1Mb(\delta) = 1cM(d)$ نمایش داده می‌شود. در ارزش‌های پایین d تقریب حاصل قابل اعتماد است اما برای ارزش‌های بالای d احتمال نوترکیبی‌های چندگانه افزایش می‌یابد و با توجه به این که رابطه بین فاصله فیزیکی و میزان نوترکیبی به صورت خطی نیست (چون حداکثر میزان نوترکیبی برابر ۰/۵ است) این تقریب قابل اعتماد نمی‌باشد. به همین خاطر در این تحقیق برای ارتباط بین d و c از روش Sved (1971) استفاده شد که بر اساس فرمول:

$$c = \frac{(1 - \frac{d}{2})}{(1 - d)^2}$$

در این تحقیق از سیستم تعیین Bin برای محاسبه ارزش‌های میانگین r^2 در فواصل ۰/۰۱ تا ۱۰ Mb استفاده شد (BarBato *et al.*, 2015) که LD را در فواصل مختلف و در نتیجه اندازه مؤثر جمعیت را در نسل‌های مختلف در گذشته از فواصل ۱۰۰۰ تا ۵ نسل قبل منعکس می‌کند. کلیه آنالیزهای انجام شده برای

محاسبه شد. حداکثر تعداد دو نشانگر SNP با ژنوتیپ از دست‌رفته (Missing genotypes) و حداکثر ۱ نشانگر هتروزیگوت در داخل هر پنجره در نظر گرفته شد. برای حداقل کردن تعداد نتایج مثبت کاذب (False positive) حداقل تعداد نشانگر SNP در یک رشته هموزیگوت (L) بر اساس فرمول ۱ محاسبه شد (Al-Mamun *et al.*, 2015):

$$L = \frac{\log_e \frac{\alpha}{n_s \cdot n_i}}{\log_e(1 - het)} \quad (1)$$

در این فرمول n_s تعداد SNP ژنوتیپ شده برای هر فرد، n_i تعداد افراد، α درصد خطای دروغین مثبت برای هر رشته هموزیگوت (۰/۰۵ در این تحقیق) و het میانگین هتروزیگوسیتی کل نشانگرها می‌باشند. سپس میزان همخونی بر اساس ROH (FROH) برای کل ژنوم اوتوزوم در هر فرد مطابق فرمول ۲ به دست آمد میانگین همخونی در هر جمعیت محاسبه گردید (Purfield *et al.*, 2012):

$$F_{ROH} = \frac{L_{ROH}}{L_{AUTO}} \quad (2)$$

که در این فرمول L_{ROH} مجموع ROH در هر حیوان بر اساس معیارهای گفته‌شده و L_{AUTO} کل طول ژنوم اوتوزومی پوشش داده توسط نشانگرهای SNP (~2234483Kb ژنوم اسب) است. FROH به عنوان نسبتی از ژنوم اوتوزوم است که در برگیرنده رشته‌های هموزیگوت نشانگرهای ژنتیکی می‌باشد (McQuillan *et al.*, 2008). در این حالت کروموزوم‌های جنسی به دلیل توزیع متفاوت الگوی (Identical by descent) IBD در نظر گرفته نمی‌شوند (Curik *et al.*, 2014)، بنابراین در این مطالعه کروموزوم‌های جنسی در تمام مراحل در برآورد ضرایب هم‌خونی حذف گردید.

برآورد اندازه مؤثر جمعیتی

در این تحقیق ابتدا عدم تعادل پیوستگی بین جایگاه‌های نشانگری با استفاده از معیار ضریب مربع همبستگی بین دو جایگاه (r^2) به روش Hill & Robertson (1968) محاسبه شد. ارزش‌های LD محاسبه‌شده (r^2) برای برآورد اندازه مؤثر جامعه در

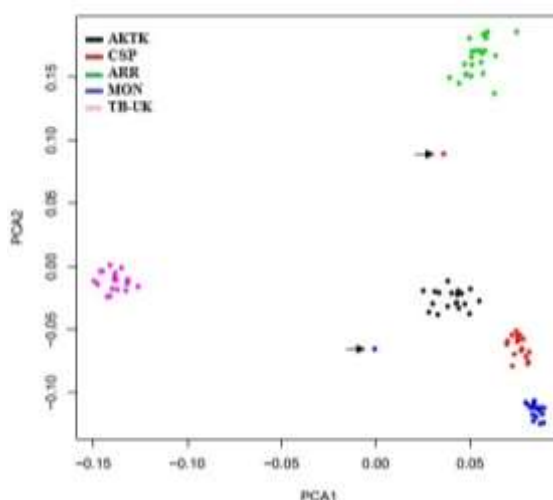
مدیریت نشده در این دو نمونه اتفاق افتاده باشد (Moradi *et al.*, 2012). در این آنالیز PC1 و PC2 به ترتیب در حدود ۲۰ و ۱۳ درصد کل واریانس را به خود اختصاص دادند.

هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده‌شده از پارامترهای مهم در بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای مختلف و محاسبه بسیاری از شاخص‌های ژنتیکی می‌باشند. میزان تنوع ژنتیکی مورد انتظار و مشاهده‌شده در تمام نژادهای مورد مطالعه در این تحقیق به ترتیب در دامنه ۰/۲۷۸-۰/۳۰۸ و ۰/۲۷۸-۰/۲۹۱ به دست آمد (جدول ۳). این پارامترها در گذشته با استفاده از نشانگرهای محدود در گونه‌های مختلف محاسبه می‌شدند. به‌عنوان نمونه در ایران Sohrabi *et al.* (2005) تنوع ژنتیکی را در اسبچه خزر با استفاده از نشانگرهای RAPD و Samoozad *et al.* (2012) و Ala-Amjadi *et al.* (2017) نیز تنوع ژنتیکی را به ترتیب در اسب اصیل ترکمن و اسب کردی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای مورد بررسی قرار دادند. مطالعات مختلفی دیگری نیز در این زمینه در نژادهای مختلف اسب در سایر کشورها با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای گزارش شده است (Behl *et al.*, 2007; Berber *et al.*, 2014; Vázquez-Armijo 2017; Senju *et al.*, *et al.*, 2017; Jemmali *et al.*, 2017).

محاسبه اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از نرم‌افزار SNeP v1.1 (BarBato *et al.*, 2015) و با به‌کارگیری فایل‌های ورودی برنامه PLINK v1.07 شامل ped و map (Purcell *et al.*, 2007) انجام شد.

نتایج و بحث

مراحل مختلف ویرایش داده‌ها بر روی ۵۲۶۰۳ جایگاه نشانگری SNP در ۹۹ نمونه از نژادهای مختلف اسب آسیایی اجرا شد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بیشترین و کمترین تعداد نشانگر باقیمانده به ترتیب در نژادهای مغولی و نژاد عرب مشاهده می‌شود. نتایج آنالیز PCA نشان داد که دو مؤلفه PC1 و PC2 باعث جدا شدن کامل نژادهای آسیایی و تروبرد از یکدیگر شده و سپس تمام نژادهای آسیایی نیز بر روی PC2 از گروه نژادی خود فاصله می‌گیرد (شکل ۱). این آنالیز به منظور بررسی نحوه قرار گرفتن حیوانات در گروه‌های نژادی خود و اطمینان از عدم وجود اختلاط جمعیتی بین نمونه‌ها استفاده شد که نتایج به خوبی نشان‌دهنده تمایز جمعیت‌ها از همدیگر بر اساس اطلاعات ژنومی آنها بود. همان‌طور که در شکل قابل مشاهده است دو حیوان از نژادهای کاسپین و مغولی خارج از گروه نژادی خود قرار گرفتند که از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شدند. این مشاهده می‌تواند به دلیل انجام آمیخته‌گری‌های ناخواسته و



شکل ۱. خوشه‌بندی حیوانات بر اساس آنالیز PCA با استفاده از اطلاعات ژنوتیپ نمونه‌ها

Figure 1. Animals clustered on the basis of principal components analysis using individual genotypes.
AKTK: AkhalTake, ARR: Arrabian, CSP: Caspian, MON: Mongolian, TB_UK: Thoroughbred horses breeds

هتروزیگوسیتی مشاهده شده شوند. از آماره FROH برای تعیین ضریب همخونی در این مطالعه استفاده شد که نتایج آن در جدول ۳ آمده است. در این تحقیق دامنه مقادیر ضریب همخونی محاسبه شده بین ۰/۰۰۳ (نژاد مغولی) و ۰/۱۶۶ (نژاد تروربرد آمریکایی) در نوسان بود. استراتژی‌های شدید انتخابی جمعیت را از تعادل هاردی وینبرگ خارج و باعث افزایش همخونی می‌شود که این حالت در مورد نژاد تروربرد بیشتر ملموس است. بیشتر تحقیقات در زمینه محاسبه همخونی بر پایه اطلاعات شجره انجام شده است. به هر حال اشتباهاتی که معمولاً در ثبت شجره‌ها اتفاق می‌افتد و همچنین عمق شجره بر روی میزان همخونی بدست‌آمده تأثیرگذار هستند (Al-Mamun *et al.*, 2015). به همین خاطر در این تحقیق از اطلاعات طول رشته‌های هموزیگوت (ROH) حاصل از آرایه‌های SNP در تخمین همخونی نژادهای مختلف اسب استفاده شده است. همخونی محاسبه شده به این روش می‌تواند به‌عنوان شاخصی در تعیین سهم هر فرد در تشکیل افراد نسل آینده مورد استفاده قرار گیرد تا از این طریق، همخونی را تا حد ممکن در هر جمعیت کاهش داد. لذا، به‌نظر می‌رسد ارزیابی ژنومیکی همخونی می‌تواند به‌عنوان یک ابزار کمکی در کنار همخونی محاسبه شده از طریق شجره باشد، به‌ویژه زمانی که اصلاح‌گر قصد آمیزش اسب‌هایی را داشته باشد که دارای رابطه خویشاوندی بالایی هستند (Al-Mamun *et al.*, 2015). لازم به ذکر است از آنجاکه تحقیقی در مورد محاسبه همخونی به این روش در نژادهای مورد بررسی در این مطالعه گزارش نشده است، بنابراین نتایج این مطالعه با نژادهای مختلف دیگر اسب مورد مقایسه قرار گرفت.

یکی از دلایل اصلی گسترش استفاده از نشانگرهای ریزماهوره در بررسی تنوع ژنتیکی بالا بودن میزان چندشکلی و هتروزیگوسیتی در این نشانگرها است (Molae *et al.*, 2009). با این وجود، این نوع نشانگرها قادر به پوشش کل ژنوم نیستند. با توسعه آرایه‌های ژنومی در گونه‌های مختلف محاسبه تنوع ژنتیکی در سطح ژنوم نیز مورد توجه قرار گرفته است. به عنوان نمونه Almarzook *et al.* (2017) تنوع ژنتیکی را در سه نژاد اسب عرب سوریه با استفاده از آرایه‌های ژنومی Equine SNP70K BeadChip مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق به ترتیب ۱۸، ۱۶ و ۱۴ نمونه از نژادهای ساگلاوی (Saglawi)، کاهلاوی (Kahlawi) و همدانی (Hamdani) به همراه ۲۴ نمونه اسب عربی از کشور آمریکا مورد ارزیابی قرار گرفتند و میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب در دامنه ۰/۳۰-۰/۳۲ و ۰/۳۱-۰/۳۰ گزارش شده است که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق همخوانی نزدیکی دارد. همچنین بررسی بیشتر مقادیر به‌دست آمده برای تنوع ژنتیکی در نژادهای مورد مطالعه در این تحقیق نشان می‌دهد که میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در نژادهای آخال‌تکه، عرب و کاسپین کمتر از میزان هتروزیگوستی مورد انتظار است (جدول ۳). Rafeie (2011) نیز در مطالعه میزان تنوع ژنتیکی نژادهای مختلف اسب ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره‌ای و میتوکندریایی نتایج مشابهی را در تقریباً تمام نژادهای مورد مطالعه گزارش کرد که علت آن تلاقی‌های نزدیک، کوچک بودن جمعیت، واریانس نمونه‌گیری و رانش تصادفی ژنتیکی بیان شده است که این عوامل می‌توانند باعث افزایش همخونی (هرچند ناچیز) و کاهش

جدول ۳. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، همخونی ROH، میانگین عدم تعادل پیوستگی (r^2) و اندازه مؤثر در

نژادهای مختلف اسب

Table 3. The mean of expected and observed heterozygosity, ROH inbreeding, average of r^2 and effective population size in different Horse breeds

Characteristic	AKTK	ARR	CSP	MON	TB
Expected Heterozygosity	0.287	0.284	0.285	0.278	0.294
Observed Heterozygosity	0.278	0.279	0.284	0.285	0.308
F-ROH	0.084	0.118	0.042	0.003	0.166
Average of r^2	0.0926	0.0721	0.0957	0.0596	0.1199
Ne (5 Generation ago)	38	53	33	49	34

AKTK: AkhalTake, ARR: Arrabian, CSP: Caspian, MON: Mongolian, TB: Thoroughbred horses breeds.

در فاصله کمتر از ۰/۱ Mb با شدت‌های مختلف در نژادهای مورد مطالعه مشاهده شد (شکل ۲). از دلایل مغایرت نتایج تحقیق حاضر با مطالعات گذشته میتوان به اندازه کوچک نمونه، تفاوت نژادی، نوع نشانگر مورد استفاده و ساختار ژنومی متفاوت به دلیل استراتژی متفاوت حاکم بر نژادهای مورد بررسی اشاره کرد (Kyoung-Tag *et al.*, 2014).

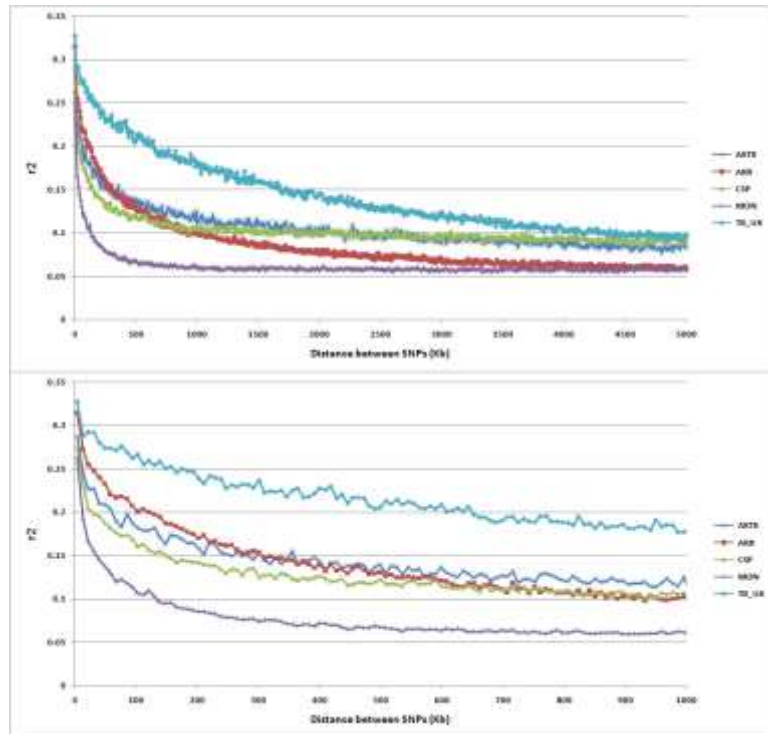
در این تحقیق الگوی کاهش اندازه مؤثر جمعیت (Ne) در تمام نژادهای مورد مطالعه در طی نسل‌های گذشته تاکنون بررسی شد (شکل ۳). نتایج حاصل نشان داد بیشترین Ne در پنج نسل گذشته در نژاد عرب (۵۳ رأس) و کمترین در نژادهای کاسپین و ترورد (۳۳-۳۴ رأس) وجود دارد (جدول ۳) که دامنه بدست آمده برای Ne در این تحقیق با نتایج برخی از تحقیقات گذشته در نژادهای مختلف همخوانی دارد (Kyoung-Tag *et al.*, 2014; Hayes *et al.*, 2003).

همچنین Zandi (2014) نیز با مطالعه پویش ژنومی دو نژاد ایرانی کاسپین و ترکمن گزارش کرد که میزان همخونی در نژاد کاسپین نسبت به ترکمن بالاتر و اندازه مؤثر جمعیت پایین‌تر است که چنانچه نژاد آخال تکه مورد مطالعه در این تحقیق به عنوان یکی از سویه‌های نژاد ترکمن در نظر گرفته شود، نتایج حاصل از دو تحقیق همخوانی بالایی با هم دارند.

تغییر در اندازه مؤثر در طی نسل‌های مختلف انعکاس‌دهنده وقایعی است که در طول تاریخ در جمعیت مورد نظر اتفاق افتاده است. بنابراین اندازه مؤثر قسمتی از تاریخچه تکاملی جمعیت مورد مطالعه را توصیف می‌کند و اطلاعات ارزشمندی را برای حفاظت به خصوص در نژادهای بومی ارائه می‌دهد (Moradi *et al.*, 2017). در بررسی حاضر مشخص شد که روند کاهش اندازه مؤثر جمعیت در طی نسل‌های گذشته تا کنون در نژادهای مورد بررسی تقریباً بصورت خطی بوده است. Corbin *et al.* (2010) با بررسی روند تکاملی تغییرات اندازه مؤثر در نژاد ترورد نیز روند خطی مشابهی را گزارش کرده است. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد، نژاد مغولی در طی نسل‌های پیش‌بینی شده دارای بیشترین اندازه مؤثر و نژاد ترورد دارای کمترین مقدار بودند (شکل ۳).

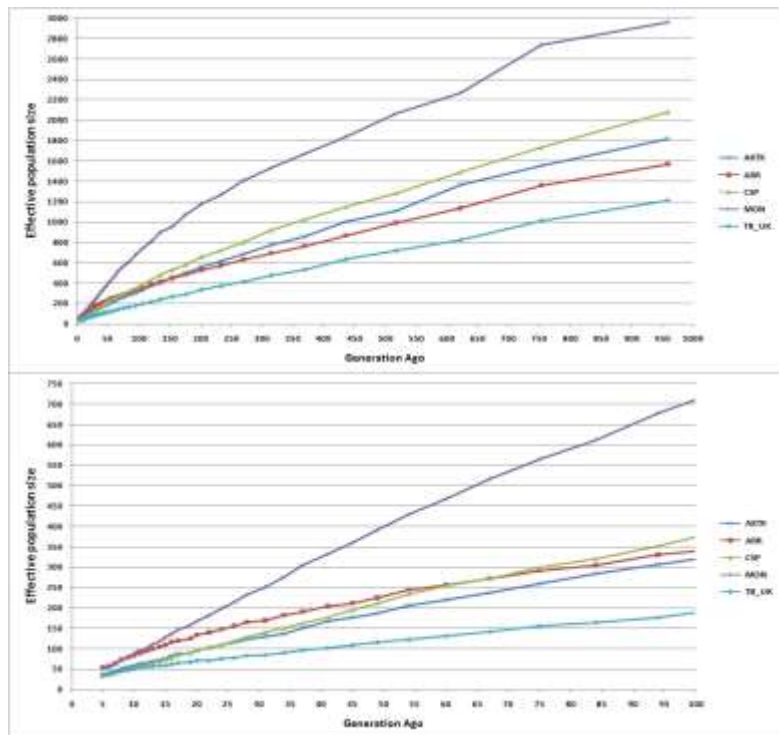
در گزارشی که توسط Kamiński *et al.* (2017) بر روی نژاد کونیک لهستانی انجام شد مقدار ضریب همخونی در دامنه ۰/۱۵۹-۰/۰۲۷ (بسته به طول پنجره‌های هموزیگوسیتی مورد استفاده) گزارش شده است، که تا حد زیادی با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. Druml *et al.* (2017) نیز میزان همخونی در هفت جمعیت مختلف نژاد اسب هافلینگر (Haflinger) را با استفاده از این روش مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد میزان همخونی بدست آمده در جمعیت‌های مختلف بین ۰/۱۷۷-۰/۱۰۱ متغیر است که همخونی بالا در این نژاد به برنامه‌های اصلاحی اجرا شده در طی سال‌های اخیر نسبت داده شده است که با نتایج به‌دست‌آمده برای نژاد ترورد در مطالعه حاضر همخوانی دارد.

بررسی عدم تعادل پیوستگی (LD) در پنج نژاد آخال تکه، عرب، کاسپین، مغولی و ترورد در پژوهش حاضر، نشان‌دهنده کاهش LD همراه با افزایش فاصله بین جفت SNPها بود (شکل ۲). بیشترین میزان کاهش در ۰/۱ مگا جفت‌بازی اول مشاهده شد و سپس مقدار r^2 با شدت کمتری با افزایش فاصله کاهش داشت، به طوری که بعد از ۱ مگا جفت‌باز مقدار r^2 تقریباً ثابت ماند. بیشترین کاهش مقدار LD مربوط به نژاد مغولی و کمترین مربوط به نژاد ترورد بود. جالب اینکه سه نژاد آخال تکه، عرب و کاسپین که دارای پراکنش بیشتری در ایران هستند همگی الگوی نسبتاً یکسانی از نظر پایداری در کاهش r^2 از خود نشان دادند. بر اساس گزارش Wade *et al.* (2009) و Corbin *et al.* (2010) با افزایش فاصله بین نشانگرها تا ۰/۵ مگا جفت‌باز در نژادهای مختلف اسب، مقدار r^2 از ۰/۶ به ۰/۲، کاهش یافت. در صورتیکه در تحقیقی دیگر که بر روی ۲۴۰ رأس اسب نژاد Jeju انجام شده است (Kyoung-Tag *et al.*, 2014)، کاهش شدیدی در ۱ مگا جفت‌باز اول گزارش شد که مقدار کاهش در این فاصله حدود ۰/۴۲ بود. نتایج این تحقیق از لحاظ الگوی کاهش عدم تعادل پیوستگی با نتایج مطالعات فوق همخوانی داشت ولی از لحاظ مقدار و شدت کاهش r^2 در فاصله کمتر از ۱ مگا جفت‌بازی در مغایرت بودند. در این تحقیق بیشترین شدت کاهش



شکل ۲. نقشه فرسایش LD محاسبه شده به روش r^2 بین جفت SNPهای مجاور در مقابل فاصله نشانگری در تمام کروموزوم‌ها. شکل بالا: فاصله نشانگری در دامنه ۵۰۰۰-۰، شکل پایین: فاصله نشانگری در دامنه ۱۰۰۰-۰.

Figure 2. LD decay map measured by r^2 between SNP pairs according to distance with all chromosomes. Upper: Distance range from 0 to 5000 Kb. Lower: Distance range from 0 upto 1000 kb.
AKTK: AkhalTake, ARR: Arrabian, CSP: Caspian, MON: Mongolian, TB_UK: Thoroughbered horses breeds.



شکل ۳. روند تغییر اندازه مؤثر جمعیت (N_e) در طی نسل‌های گذشته. شکل بالا: فاصله بین ۱۰۰۰-۵ نسل، شکل پایین: فاصله بین ۱۰۰-۵ نسل گذشته.

Figure 3. Effective population size (N_e) trend plotted against generations in the past, truncated at Upper: Distance range from 5 to 1000 generations. Lower: Distance range from 5 upto 100 generations ago.
AKTK: AkhalTake, ARR: Arrabian, CSP: Caspian, MON: Mongolian, TB_UK: Thoroughbered horses breeds.

اندازه مؤثر برخی از نژادهای اسب آسیایی با استفاده از آرایه ژنومی SNP Chip است. نتایج این تحقیق نشان داد که با وجود تنوع ژنتیکی مناسب در این جمعیت-ها، اندازه مؤثر آنها به خصوص در نژاد کاسپین ایرانی و نژاد اصلاح ژنتیکی شده ترابرد در طی نسل‌های اخیر به شدت کاهش یافته است. کاهش اندازه مؤثر این جمعیت‌ها باعث افزایش حساسیت آنها نسبت به تغییرات محیطی پیش‌رو و چالش‌های ژنتیکی مختلف در آینده خواهد شد. به همین خاطر پیشنهاد می‌شود در جهت حفاظت از این نژادها از راه‌کارهای ژنتیکی مختلفی همچون کنترل تلاقی‌گری‌ها و طراحی برنامه‌های آمیزشی مناسب استفاده شود.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه پروژه کنسرسيوم تنوع ژنتیکی اسب (Equine Genetic Diversity Consortium) و به خصوص خانم Dr. Petersen و همکاران ایشان به خاطر در اختیار قرار دادن اطلاعات ژنوتیپی نژادهای مورد مطالعه در این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

به نظر می‌رسد شدت انتخاب و اجرای برنامه‌های اصلاح‌نژادی منسجم در نژاد ترابرد در بدست آمدن این نتیجه و کاهش قابل توجه اندازه مؤثر این نژاد تأثیرگذار باشد. همچنین بررسی روند تغییرات Ne نشان می‌دهد که سه نژاد آخال‌تکه، کاسپین و عرب که در ایران نیز پرورش داده می‌شوند در طی نسل‌های مختلف از گذشته‌های بسیار دور تا کنون دارای روند نسبتاً یکسانی هستند که خود می‌تواند نشان‌دهنده شرایط تکاملی نسبتاً مشابه حاکم بر این نژاد در طی سالیان گذشته باشد. هرچند همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است نژاد کاسپین دارای کمترین اندازه مؤثر جمعیت در طی نسل‌های حاضر (۳۳ نمونه) است که بیانگر اولویت این نژاد بومی اسب در طراحی برنامه‌های اصلاح‌نژادی مناسب برای حفاظت از حیوانات خالص باقیمانده در کشور است.

نتیجه‌گیری کلی

این تحقیق یکی از اولین گام‌ها در ارزیابی نرخ هم‌خونی با استفاده از رشته‌های هموزیگوت و تخمین

REFERENCES

1. Ala-Amjadi, M., Mehrabani-Yeganeh, H. & Sadeghi, M. (2017). Study of Genetic variation in Iranian Kurdish horse using microsatellite marker. *Iranian Journal of Animal Science*, 48(3), 335-342. (in Farsi)
2. Al-Mamun, H. A., Clark, S. A., Kwan, P. & Gondro, C. (2015). Genome-wide linkage disequilibrium and genetic diversity in five populations of Australian domestic sheep. *Genetic Selection and Evolution*, 47(90), 1-14.
3. Almarzook, S., Reissmann, M., Arends D. & Brockmann, G. A. (2017). Genetic diversity of Syrian Arabian horses. *Animal Genetics*, 48(4), 486-489.
4. Barbato, M., Wengel, P. O., Tapio, M. & Bruford, M. W. (2015). SNeP: a tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data. *Frontier in Genetics*, 6(109), 1-11.
5. Behl, R., Behl, J., Gupta, N., & Gupta, S. C. (2007). Genetic relationships of five Indian horse breeds using microsatellite markers, *Animal*, 1, 483-488.
6. Berber, N., Gaouar, S., Leroy, G., Kdidi, S., Tabet, A. N. & SaidiMehtar, N. (2014). Molecular characterization and differentiation of five horse breeds raised in Algeria using polymorphic microsatellite markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 131, 387-394.
7. Binns, M. M., Boehler, D. A., Bailey, E., Lear, T. L., Cardwell, J. M. & Lambert, D. H. (2011). Inbreeding in the Thoroughbred horse. *Animal Genetics*, 43, 340-342.
8. Browning, B. L. & Browning, S. R. (2009). A unified approach to genotype imputation and haplotype-phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals. *American Journal of Human Genetics*, 84, 210-223.
9. Corbin, L., Blott, S., Swinburne, J., Vaudin, M., Bishop, S. & Woolliams, J. (2010). Linkage disequilibrium and historical effective population size in the Thoroughbred horse. *Animal Genetics*, 41, 8-15.
10. Corbin, L. J., Liu, A. Y. H., Bishop, S. C., & Woolliams, J. A. (2012). Estimation of historical effective population size using linkage disequilibria with marker data. *Journal of Animal Breeding Genetics*, 129, 257-270.

11. Cunningham, E. P., Dooley, J. J., Splan, R. K. & Bradley, D. G. (2001). Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. *Animal Genetics*, 32, 360-364.
12. Curik, F. M., Karapandza, N., Cubric, C. V. & Sölkner, J. (2014). Estimation of inbreeding and effective population size in Istrian cattle using molecular information. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 18(1), 30-34.
13. Druml, T., Neuditschko, M., Grilz-Seger, G., Horna, M., Ricard, A., Mesarič, M., Cotman, M., Pausch, H. & Brem, G. (2017). Population networks associated with runs of homozygosity reveal new insights into the breeding history of the Haflinger horse. *Journal of heredity*.109(4), 384-392.
14. FAOSTAT. (2010). Retrived June 5, 2012. From: <http://www.faostat.fao.org>.
15. Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126, 131-140.
16. Gharahveysi, S., Irani, M., Emam Jome Kashan, N. & Hajipur, M. (2009). Estimation of inbreeding and genetic parameters on conformation traits of the Iranian Arab horses. *Dynamic Agriculture*, 5(9), 383-392. (in Farsi)
17. Hayes, B. J., Visscher, P. M., McPartlan, H. C. & Goddard, M. E. (2003). Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome Research*, 13, 635-643.
18. Hayes, B. J., Visscher, P. M., McPartlan, H. C. & Goddard, M. E. (2003). Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome Research*, 13, 635-643.
19. Hill, W. G. & Robertson, A. (1968). Linkage Disequilibrium in Finite Populations. *Theoretical Applied Genetics*, 38, 226-231.
20. Hill, W. G. (1981). Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetic Resources*, 38, 209-216.
21. Jemmali, B., Haddad, M. M., Barhoumi, N., Tounsi, S., Trabelsi, A. & et al. (2017). Genetic diversity in Tunisian horse breeds. *Archives Animal Breeding*, 60, 153-160,
22. Kamiński, S., Hering, D. M., Jaworski, Z., Zabołewicz, T. & Ruś, A. (2017). Assessment of genomic inbreeding in Polish Konik horses. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 20(3), 603-605.
23. Karimi, K., Esmaeelzadeh, A. K. & Asadi Foz, M. (2015). Estimation of effective population size in Sarabi cattle based on single nucleotide polymorphism markers. *Iranian Journal of Animal Science*, 46(3), 335-343. (in Farsi)
24. Kijas, J. W., Lenstra, J. A., Hayes, B. J., Boitard, S., Porto Neto, L. R., San Cristobal, M. & et al. (2012). Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS Biology*, 10, e1001258.
25. Do, T., Lee, J. H., Lee, H. K., Kim, J. & Park, K. D. (2014). Estimation of effective population size using single-nucleotide polymorphism (SNP) data in Jeju horse. *Journal of Animal Science and Technology*, 56(28), 1-6.
26. McQuillan, R., Leutenegger, A. L., Abdel-Rahman, R., Franklin, C. S., Pericic, M. & et al. (2008). Runs of homozygosity in European populations. *American Journal of Human Genetics*, 83(3), 359-372.
27. Molaee, V., Osfoori, R., Eskandari Nasab, M. P. & Qanbari S. (2009). Genetic relationships among six Iranian indigenous sheep populations based on microsatellite analysis. *Small Ruminant Research*, 84(1), 121-124.
28. Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds, K. G. & McEwan, J. C. (2012). Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. *BMC Genetics*, 13, 10.
29. Moradi, M. H., Rostamzadeh, J., Rashidi, A., Vahabi, Kh. & H. Farahmand. (2013). Analysis of genetic diversity in Iranian mohair goat and its color types using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Journal of Agricultural Communications*, 2(1), 55-62.
30. Moradi, M. H., Farahani, A. H. & Nejati-Javaremi, A. (2017). Genome-wide evaluation of effective population size in some Iranian sheep breeds using linkage disequilibrium information. *Iranian Journal of Animal Science*, 48(1), 39-49.
31. Ohta, T. & Kimura, M. (1971). Linkage disequilibrium between two segregating nucleotide sites under the steady flux of mutations in a finite population. *Genetics*, 68, 571-580.
32. Park, L. (2011). Effective population size of current human population. *Genetic Research*. 93(2), 105-114.
33. Petersen, J. L., Mickelson, J. R., Cothran, E. G., Andersson, L. S., Axelsson, J. & et al. (2013). Genetic diversity in the modern horse illustrated from genome-wide SNP data. *PLOS ONE*, 8(1), e54997.
34. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., & et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81, 559-575.

35. Purfield, D. C., Berry, D. P., McParland, S. & Bradley, D. G. (2012). Runs of homozygosity and population history in cattle. *BMC Genetics*, 13, 70.
36. Rafeie, F. (2011). *Study of relationship between Iranian Caspian breed with other Iranian horse breeds*. PhD thesis, Islamic Azad University, Iran. (in Farsi)
37. Saatchi, M., McClure, M. C., McKay, S. D., Rolf, M. M., Kim, J. & et al. (2011). Accuracies of genomic breeding values in American Angus beef cattle using K-means clustering for cross-validation. *Genetic Selection and Evolution*, 43(40), 1-16.
38. Samoozad, M., Nassiri, M. R., Aslaminezhad, A. A., Tahmoorespour, M., Doosti, M., Ghiadi, A. & Ghovvati, SH. (2013). Study of genetic diversity in Iranian Torkman horse by four microsatellite markers. *Iranian Journal of Animal Science Research*. 4(4), 345-351.
39. Senju, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Shinjo, A., Matsuyama, R., Almunia, J. & Takasu, M. (2017). Genetic diversity of the Yonaguni horse based on polymorphisms in microsatellites and mitochondrial DNA. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 79(2), 425-431.
40. Sohrabi, A. R., Mirhosseini, S. Z., Afraz, F. & EsmaeilKhanian, S. (2005). Genetic polymorphism in a sample of Caspian horses of Iran using RAPD markers. *Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 69(18), 100-103. (in Farsi)
41. Sved, J. A. (1971). Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theoretical Population Biology*, 141, 125-141.
42. Szwaczkowski, T., Greguła-Kania, M., Stachurska, A., Borowska, A., Jaworski, Z. & Gruszecki, T. M. (2016). Inter- and intra-genetic diversity in the Polish Konik horse: implications for the conservation program. *Canadian Journal of Animal Science*, 96(4), 570-580.
43. Tenesa, A., Navarro, P., Hayes, B. J., Duffy, D. L., Clarke, G. M., Goddard, M. E. & Visscher P. M. (2007). Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. *Genome Research*, 17, 520-526.
44. Teo, Y. Y., Fry, A. E., Clark, T. G., Tai, E. S. & Seielstad, M. (2007). On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Human Genetics*, 71, 701-703.
45. Uimari, P. & Tapio, M. (2011). Extent of linkage disequilibrium and effective population size in Finnish Landrace and Finnish Yorkshire pig breeds. *Journal of Animal Science*, 89, 609-614.
46. Vázquez-Armijo, J. F., Parra-Bracamonte, G. M., Velazquez, M. A., Sifuentes-Rincón, A. M., Tinoco-Jaramillo, J. L. & et al. (2017). Diversity and effective population size of four horse breeds from microsatellite DNA markers in South-Central Mexico. *Archives Animal Breeding*, 60, 137-143.
47. Wade, C. M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S. & et al. (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 326(5954), 865-867.
48. Weir, B. S. & Hill, W. G. (1980). Effect of mating structure on variation in linkage disequilibrium. *Genetics*, 95, 477-488.
49. Zandi, M. B. (2014). *A study of patrilineal genetic diversity in Iranian indigenous horse breeds*. PhD Thesis, University of Tehran, Iran. (in Farsi)
50. Zhao, F., Wang, G., Zeng, T., Wei, C., Zhang, L., Wang, H., Zhang, S., Liu, R., Liu, Z., Du, L. (2014). Estimations of genomic linkage disequilibrium and effective population sizes in three sheep populations. *Livestock Science*, 170, 22-29.