

ژنومیکس مقایسه‌ای اسب‌های پونی و هانوواریان در برابر نژادهای مختلف اسب برای شناسایی ژن‌های کاندید اندازه بدن و عملکرد

ورزشی

Comparative genomics of Pony and Hanoverian horses versus different breeds of horses for identifying candidate genes associated with body size and athletic performance

حجت اسدالله پورنعنایی^۱، علی اسمعیلی‌زاده^{۱*}، حامد خراتی کوپایی^۲

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

کرمان، ایران

۲- دانش‌آموخته دکتری، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

Asadollahpour Nanaei H¹, Esmailizadeh A^{*1}, Kharrati-Koopae H²

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

2- PhD Graduated, Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aliesmaili@uk.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳)

چکیده

در طول فرآیندهای انتخاب طبیعی و مصنوعی، نژادهای اسب نیروی انتخاب را برای توسعه ویژگی‌های مطلوب تجربه کرده‌اند. این امر منجر به تنوع زیادی در بین نژادهای مختلف شده است که در بسیاری از صفات فنوتیپی مانند اندازه بدن، ترکیب عضله، سرعت رشد، تولید مثل و رفتار با یکدیگر متفاوت هستند. هدف از انجام این پژوهش بررسی نشانه‌های انتخاب مرتبط با صفات کنترل‌کننده اندازه بدن و نیز عملکرد ورزشی در نژادهای اسب می‌باشد. در این مطالعه، از داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم ۸۶ راس اسب استفاده شد. برای بررسی نشانه‌های انتخاب از روش شاخص تثبیت (Fst) و نسبت درست‌نمایی مرکب بین جمعیتی (XP-CLR) استفاده شد. برای صفت اندازه بدن، مطالعه ژنتیکی بر مبنای اندازه کوچک بدن نژاد پونی دباؤ انجام گرفت. بررسی ژنتیکی نشان داد که مهم‌ترین نشانه انتخاب مربوط به ژن *FGFR1* برای قد کوتاه در این جمعیت می‌باشد که طی سالیان متمادی تحت انتخاب بوده‌اند. علاوه بر این، چهار جایگاه ژنومی دیگر در کروموزوم‌های ۲، ۳ و ۴ شناسایی شد، که در ارتباط با توسعه اندازه بدن بودند. بررسی نشانه‌های انتخاب در ارتباط با شناسایی ژن‌های کاندید مؤثر بر عملکرد ورزشی بر مبنای نژاد اسب هانوواریان انجام گرفت. واکاوی ژنتیکی نشان داد که ژن *ACTA1* در عملکرد ورزشی این نژاد دارای اهمیت است، که با نقش آن در جمعیت انسانی همخوانی دارد. علاوه بر این، سه جایگاه ژنومی دیگر نیز در کروموزوم‌های ۱ و ۲۰ گزارش شد، که می‌توانند در عملکرد فیزیکی اسب مؤثر باشند. ژن‌های کاندید گزارش شده در این پژوهش می‌توانند درک روشنی از پایه ملکولی مربوط به صفات اندازه بدن و عملکرد ورزشی در اسب را ایجاد نمایند. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند دیدگاه جدیدی در رابطه با معماری ژنتیکی صفات در برنامه‌های اصلاح نژادی اسب ایجاد نماید.

واژه‌های کلیدی

اندازه بدن
ژنومیکس اسب
عملکرد ورزشی

اسب یکی از کهن‌ترین گونه‌هایی است که در دشت‌های اوراسیا در حدود ۶۰۰۰-۵۰۰۰ سال قبل اهلی شده است و از نظر پراکنش جغرافیایی تقریباً در تمام سرزمین‌ها وجود دارد (Petersen et al. 2013). شواهد باستان‌شناسی نشان داده است که اهلی کردن اسب به‌وسیله آریایی‌ها (اجداد ایرانیان امروزی) شروع شده است (Mostafavi et al. 2020). آن‌ها از اسب برای مقاصد مختلفی از قبیل کشاورزی، حمل و نقل و منبع غذایی استفاده می‌کردند. آریایی‌ها با استفاده از انتخاب و اصلاح نژاد نژادهای گوناگونی از اسب با خصوصیات متمایز را ایجاد کرده‌اند (Moazemi et al. 2020). نژادهای ایرانی امروزی و مدرن اسب به پنج گروه اسب‌های Persian Plateau، ترکمن، قره‌باغ و قره‌داغ، Persian Arab و پونی کاسپین تقسیم‌بندی می‌شوند (Mostafavi et al. 2020). اعتقاد بر این است که نژادهای اسب مدرن دنیا از چهار تیپ اصلی (پونی تیپ ۱ یا پونی Celtic؛ پونی تیپ ۲ یا پونی Tundra؛ اسب تیپ ۱ یا اسب Plain؛ اسب تیپ ۲) که از آمریکای شمالی به آسیا مهاجرت کرده‌اند مشتق شده‌اند (Mostafavi et al. 2020). به‌علاوه، فرض بر این است که اسب سبک مدرن باید از اسب تیپ ۱ یا تیپ ۲ یا از هر دو تیپ منشأ گرفته باشد. در بین نژادهای اسب مدرن گوناگون در جهان، گروه ترکمن (قره‌باغ) و پونی کاسپین هم از نظر آناتومیکی (استخوانی) و هم از نظر ساختاری به‌ترتیب خیلی مشابه با اسب تیپ ۱ و ۲ هستند (Moazemi et al. 2020). فرضیه پیشنهادی دیگر این است که پونی کاسپین جد پیش تیپ (proto-type) عرب است. بنابراین، بر اساس این فرضیه می‌توان این اسب را به‌عنوان منشأ بیشتر اسب‌های مدرن در نظر گرفت (Mostafavi et al. 2020). در صنعت دامپروری، اسب یکی از ارزشمندترین دام‌ها محسوب می‌شود به‌طوری‌که در برخی از موارد قیمت یک رأس اسب اصیل با قیمت چند ده راس گاو ممتاز برابری می‌کند. انتخاب مصنوعی نقش مهمی را در بهبود عملکرد این حیوانات ایفا کرده است. برای مثال با اعمال انتخاب‌های شدید در نژاد هانواریان، امروزه اسب‌های این نژاد به‌عنوان یکی از بهترین نژادهای اسب موجود در دنیا جهت حضور در مسابقات ورزشی و انجام حرکات نمایشی می‌باشند (Hamann and Distl 2008; Schröder).

(et al. 2012). همچنین پرورش دهندگان اسب تروبرد سعی کرده‌اند که از بهترین نریان که قابلیت بالایی در مسابقات ورزشی داشته‌اند جهت جفت‌گیری با مادریان این نژاد استفاده کنند. البته نژادهایی از اسب نیز وجود دارد که به‌طور طبیعی در شرایط مختلف جغرافیایی سازگاری پیدا کرده‌اند و امروزه خصوصیات منحصر به فردی را نشان می‌دهند. برای مثال پونی‌های دبائو در طی قرن‌های متمادی در قسمت‌های کوهستانی مربوط به جنوب این کشور (گوآنچی) رشد و تکامل پیدا کرده‌اند. نواحی سنگلاخی و صعب‌العبور مربوط به این مناطق سبب ایجاد تغییراتی در اندام‌های حرکتی، اندازه و وزن بدن این نژاد شده است. به‌طوری‌که امروزه پونی‌های دبائو دارای وزن کم، دست و پاهای کوتاه و ضخیم بوده که این حیوان را قادر به زندگی در مناطق کوهستانی کرده است (Jiang et al. 2011).

از سویی دیگر، استفاده از تکنیک‌های مولکولی در سال‌های اخیر جهت مطالعه جانوران بومی و حفاظت‌شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است (Mahmoodi et al. 2018). میزان اطلاعات به‌دست آمده از این تکنیک‌های ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Mohammadabadi 2017; Esfandiari et al. 2020). همچنین، مطالعه نژادهای بومی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی بسیار مهم و برای طبقه‌بندی آن‌ها مفید است (Alinaghizadeh et al. 2007; Moazeni et al. 2016a). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Askari et al. 2010; Moazeni et al. 2016a). تنوع ژنتیکی یک عنصر اساسی برای پیشرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سازگاری به شرایط محیطی متغییر و مختلف می‌باشد (Mohammadabadi et al. 2017; Ghasemi et al. 2010). یکی از این تکنیک‌ها پویش کل ژنوم است. این تکنیک با هدف یافتن مکان‌های ژنومی کنترل‌کننده صفات کمی یکی از راهبردهای کارآمد برای تحلیل مولکولی صفات دارای مکانیسم توارثی پیچیده است. و در این میان ظهور تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی انقلابی شگرف را برای مطالعات صفات در سطح ژنوم را به‌وجود آورده است (Kharrati-

با تنوع موجود در اندازه بدن ندارد علاوه بر این مشخص شد که ژن کاندید *2HMG*A همراه *3TBX* نقش مهمی را در ایجاد تنوع در صفات مربوط به اندازه بدن دارند (Kader et al. 2015). اخیراً نیز پژوهشگران نشان دادند که ژن *ANKRD11* می‌تواند به‌عنوان یک ژن کاندید جدید در اسب‌های مینیاتور آمریکایی و در رابطه با تنوع اندازه بدن مطرح باشد (Al-Abri et al. 2018). با توجه به پژوهش‌های انجام شده هنوز پرسش‌های مختلفی پیش روی پژوهشگران و پرورش‌دهندگان این حوزه مطرح می‌باشد. بنابراین نتایج این مطالعه در ارتباط با بررسی نشانه‌های انتخاب در نژادهای مختلف اسب برای شناسایی ژن‌های کاندید مرتبط با اندازه بدن و عملکرد ورزشی می‌تواند راهگشای مفیدی برای این زمینه به‌حساب آید (Asadollahpour Nanaei et al. 2020).

مواد و روش‌ها

در این پژوهش داده‌های توالی کل ژنوم تعداد ۸۶ راس اسب مربوط به ۱۶ نژاد از طریق پایگاه NCBI دانلود و مورد استفاده قرار گرفت (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). جدول ۱ جزئیات بیشتری از داده‌های مورد استفاده در این پژوهش را نشان می‌دهد. کیفیت داده‌های توالی‌یابی شده توسط برنامه FastQC بررسی شد. در این مرحله پارامترهایی مانند، امتیاز هر باز و محتوای GC در هر باز پایه، محتوای GC در هر خوانش، محتوای N در باز، توزیع اندازه قطعات خوانده شده در هر خوانش، سطوح تکرار هر توالی مورد بررسی قرار گرفت.

دانلود ژنوم مرجع، نقشه‌گذاری خوانش‌ها با ژنوم مرجع پس از انجام مرحله کنترل کیفی، فرآیند نقشه‌یابی برای ۳۱ جفت کروموزوم اتوزوم و نیز کروموزوم‌های جنسی (X و Y) انجام شد. برای هم‌ردیفی توالی‌های کوتاه با ژنوم مرجع ابتدا آخرین نسخه ژنوم مرجع اسب (Ensembl 95) از سایت Ensembl دانلود شد. شاخص‌بندی ژنوم مرجع با استفاده از الگوریتم bwts و نقشه‌گذاری نمونه‌های توالی‌یابی شده با ژنوم مرجع با استفاده از الگوریتم MEM در محیط برنامه BWA^۱ انجام شد.

(Koopae et al. 2019). صفت اندازه بدن در اسب که یکی از معیارهای اصلی برای تعیین کارکرد و ارزشیابی حیوان به‌شمار می‌رود، که به‌عنوان یک صفت چند ژنی مطرح می‌باشد. مطالعه ژنوتیپ‌های چند شکلی نوکلئوتیدی مربوط به ۱۷ نژاد اسب مختلف نشان دادند که تنها چندشکلی‌های موجود در چهار ژن *LCORL*، *2HMG*A، *ZFAT* و نیز *LCORL/NCAPG* حدود ۸۳ درصد از کل واریانس مربوط به تنوع در اندازه بدن اسب را کنترل می‌کنند (Makvandi-Nejad et al. 2012). مطالعه پوشش ژنومی روی ۱۰۷۷ راس اسب متعلق به نژاد فرانسوی نشان داد که دو QTL روی کروموزوم‌های شماره ۳ و ۹ وجود دارند که بخش قابل توجهی (حدود ۱۸ درصد) از تنوع در اندازه بدن را توجیه می‌کند (Signer-Hasler et al. 2012). در مطالعه دیگری که بر روی ۲۱۴ راس اسب از نژاد هانووریان و نیز ۴۲ نژاد متفاوت دیگر انجام شد، مشخص شد که ژن *LCORL* به‌عنوان مهم‌ترین ژن کاندید جهت کنترل اندازه بدن در نژادهای مختلف اسب مطرح می‌باشد (Metzger et al. 2013). نتایج پژوهش بر روی ۳۲ صفت مرتبط با اندازه بدن در اسب‌های تانزانایی نشان داد که وجود جهش تک نوکلئوتیدی موجود در ناحیه تنظیمی ژن *LCORL* سبب بروز تنوع در بیان این ژن می‌شود که در ارتباط با چگونگی رشد استخوان‌ها در دوران رشد حیوان می‌باشد (Staiger et al. 2016). ده ژن کاندید مهم در ارتباط با صفات اندازه بدن و حرکت در اسب‌های نژاد خالص اسپانیایی (آندالوسین) گزارش شده است که شامل ژن‌های *1A24COL*، *MECR*، *31USP*، *2HMG*A، *LCORL/NCAPG*، *B184FAM*، *MGP*، *R1PTH*، *K3KLF* و *1SGK* می‌باشد (Sevane et al. 2016).

اگرچه در پژوهش‌ها چند شکلی‌های موجود در ژن *LCORL* و *DMRT3* نقش مهمی در ایجاد تنوع در صفات مرتبط با اندازه بدن در نژادهای متعددی از اسب‌های موجود در جهان داشته است (Moazemi et al. 2020; Mostafavi et al. 2020)، اما در این میان نتایج متفاوتی نیز در رابطه با بعضی از نژادهای کوچک جثه وجود دارد. با استفاده از اطلاعات حاصل از نشانگرهای تک نوکلئوتیدی مربوط به ۸۲۵ راس اسب متعلق به ۳۵ نژاد مشخص شد که چند شکلی‌های موجود در ژن *LCORL* ارتباط معنی‌داری

¹ Burrows-Wheeler Aligner

جدول ۱- اطلاعات نمونه‌های ژنوم دانلوده شده از پایگاه NCBI

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

Mega استفاده شد. به منظور رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار فوق، ۱۰۰۰۰ تکرار بوت استراپ جهت ارزیابی درخت تشکیل شده به کار گرفته شد. تحلیل مؤلفه‌های اصلی جهت شناسایی ارتباط بین جمعیت‌ها به کمک PLINK و نیز نرم‌افزار GCTA انجام شد (Price et al. 2010).

مدل Admixture یکی از روش‌های دستیابی به ساختار جمعیت با استفاده از داده‌های کل ژنوم ارائه می‌باشد. در این مطالعه از این مدل و فراوانی‌های آللی تصحیح شده جهت آنالیز ساختار داده‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. فایل ورودی نرم‌افزار Admixture به فرمت PLINK (file.bed) تهیه شد و مقادیر مختلف K (تعداد جمعیت‌های فرض شده^۳) به تعداد ۷ مرتبه ($K=2, K=3, K=4, \dots, K=8$) و همراه با ۱۰۰۰۰ تکرار بوت استراپ (در هر مرتبه) انجام شد. میزان همخونی با استفاده از برآورد هموزیگوت ژنومی (ROH^4) به عنوان معیاری مناسب در برآورد همخونی واقعی در سطح ژنوم محاسبه شد. به منظور مطالعه سطح همخونی در جمعیت‌های مورد بررسی از نرم‌افزار PLINK و دو دامنه بالاتر از ۱۰۰ کیلو باز و بالاتر از ۱۰۰۰ کیلو باز، برای هر نژاد اسب استفاده شد. نمودار تغییرات تعداد و

در نهایت فایل‌های نقشه‌گذاری شده با پسوند SAM^۱ با استفاده از نرم‌افزار Samtools به فایل باینری با پسوند BAM^۲ تبدیل شدند (Li and Durbin 2009). در این فرآیند، با استفاده از فایل‌های BAM، شناسایی چندریختی‌های تک نوکلئوتیدی طی مراحل زیر انجام پذیرفت ۱. حذف PCR duplicates با کمک برنامه Picard (<https://github.com/broadinstitute/picard>) انجام شد. ۲. نقشه‌گذاری مجدد موضعی اطراف حذف و اضافه‌های کوچک ژنوم به منظور بهینه کردن نقشه‌گذاری خوانش‌ها، این مرحله با استفاده از ابزار RealignerTargetCreator در برنامه GATK v3.8 (Genome analysis toolkit) انجام شد. ۳. کالیبره کردن مجدد نمره‌های کیفیت بازها با استفاده از ابزارهای BaseRecalibrator و PrintReads شده در برنامه (Genome analysis toolkit) GATK v3.8. در نهایت، چندریختی‌های تک-نوکلئوتیدی با استفاده از ابزار UnifiedGenotyper در برنامه GATK به دست آمدند.

به منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه از روش اتصال مجاورین (NJ) استفاده شد. در روش اتصال مجاورین، برای رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار (version 7)

³ Number of populations (K) that was assumed⁴ Runs of homozygosity (ROH)¹ Sequence Alignment/Map² Binary Alignment Map

برای تمامی نمونه‌های مورد بررسی بین ۸۳ تا ۹۵ بود که نشان دهنده دقت بالای مرحله نقشه‌یابی می‌باشد.

نتایج بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت

در این مطالعه تعداد ۱۸/۷۵ میلیون چندریختی تک نوکلئوتیدی از ۸۶ ژنوم اسب متعلق به ۱۶ نژاد به‌دست آمد. جهت بررسی ساختار ژنتیکی مربوط به نژادهای مختلف اسب، آنالیزهای مختلفی از جمله رسم درخت فیلوژنی، تعیین مؤلفه‌های اصلی و نیز آنالیزهای ساختاری مختلفی انجام شد. نتایج آنالیز درخت فیلوژنتیکی بر اساس روش اتصال مجاورین نشان داد که تمام ۱۷ راس پونی نژاد دبائو در یک خوشه ژنتیکی قرار گرفته‌اند و با سایر نژادها متفاوت هستند. نژادهای هانوواریان و آلمانی-خونگرم بیشترین شباهت را در بین نژادها داشتند، که البته منطقی به‌نظر می‌رسد. زیرا منشاء این دو نژاد از کشور آلمان بوده و تشابهات ژنتیکی فراوانی دارند. شکل ۱ نشان می‌دهد که تمام اسب‌های مربوط به نژادهای تروبرد، استانداردبرد، فریبرگر، آخال-تکه و نیز نژاد عرب به‌طور مجزا در خوشه‌های ژنتیکی متفاوتی قرار گرفته‌اند. نتایج حاصل از آنالیز مؤلفه‌های اصلی به‌خوبی تمایز بین نژادها را نشان می‌دهد. به‌طوری‌که بیشترین فاصله ژنتیکی بین نژادهای دبائو، استانداردبرد و تروبرد وجود دارد. نتایج حاصل از این روش نیز همانند درخت‌های فیلوژنتیکی، همپوشانی دو نژاد هانوواریان و آلمانی-خونگرم را تایید می‌کند. در این روش نیز دو نژاد مونگلیا و یاکوتیان ارتباط ژنتیکی نزدیکی را نسبت به یکدیگر نشان دادند. نژادهای آخال-تکه و عرب نیز با فاصله بسیار کم از یکدیگر قرار گرفتند که با توجه به منشاء آسیایی این دو نژاد (خاورمیانه) قابل توجیه می‌باشد.

نتایج بررسی سطوح هم‌خونی بین نژادهای مختلف

از نرم‌افزار Admixture به‌منظور شناسایی ساختار ژنتیکی و آمیخته‌گری در مجموع داده‌های حاصل از توالی‌یابی کل ژنوم استفاده شد. همان‌گونه که در شکل ۲ مشخص است پونی‌های دبائو در تمام Kهای فرضی به‌صورت یک رنگ می‌باشند که نشان‌دهنده خلوص نژادی می‌باشد. این نژاد در طی سالیان متمادی به‌صورت خالص باقی مانده است. همچنین در ارتباط با نژاد مونگلیا نشان داده شد که این نژاد به‌صورت خالص بوده و آمیخته‌گری صورت نگرفته است.

متوسط طول ROHها در بین نژادهای مختلف با استفاده از نرم‌افزار (<https://www.r-project.org/>) R رسم شد.

برای بررسی سطح تمایز بین جمعیت‌ها و شناسایی نشانه‌های انتخاب، از روش شاخص تثبیت F_{st} استفاده شد. در این روش، ارزیابی تفرق جمعیتی بر پایه داده‌های چندشکلی ژنتیکی صورت می‌گیرد. ارزش‌های حاصل می‌توانند بین صفر (بدون تفاوت) تا یک (تفاوت کامل)، که هر جمعیت برای آلل متفاوتی فیکس شده‌اند) متغیر باشد.

در این مطالعه از آماره F_{st} و نرم‌افزار Vcftools جهت شناسایی نشانه‌های تحت انتخاب مورد استفاده قرار گرفت (Weir and Cockerham 1984). همچنین به‌دلیل اینکه انتخاب علاوه بر جهش‌های سودمند، نشانگرهای مجاور را نیز تحت تاثیر خود قرار می‌دهد و نیز برای نمایش بهتر نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم، محاسبه ارزش‌های F_{st} بر اساس میانگین ارزش مربوط به هر دامنه ۵۰ کیلو جفت‌بازی در نظر گرفته شد.

این روش بر اساس عدم تعادل پیوستگی و تفاوت فراوانی آللی بین جایگاه‌های دو جمعیت متفاوت می‌باشد. در این آزمون فرض بر این است که فراوانی آللی دو جمعیت که از یک جمعیت اجدادی مشتق شده‌اند از توزیع نرمال پیروی می‌کنند. قابل ذکر است که روش XP-CLR قدرتمندتر از روش‌هایی مانند CLR (Nielsen et al. 2009) و Tajima's D (Tajima 1989) جهت پیدا کردن نشانه‌های انتخاب بر اساس فراوانی آللی بین دو جمعیت می‌باشد. در این مطالعه جهت شناسایی نشانه‌های انتخاب از نرم‌افزار XP-CLR v1 تحت لینوکس استفاده شد (Chen et al. 2010).

نتایج

نتایج کنترل کیفیت داده‌های ژنومی و نقشه‌گذاری در برابر ژنوم مرجع

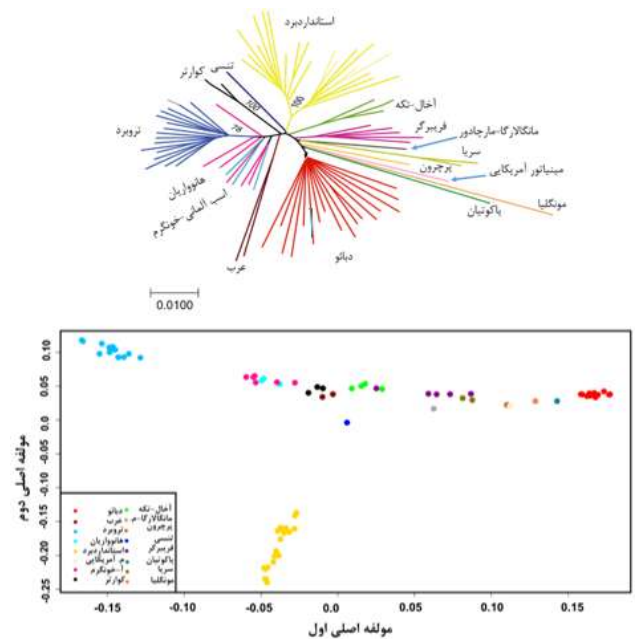
نتایج کنترل کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastQC نشان داد که پارامترهای ارزیابی کیفیت داده‌ها دارای شرایط مطلوبی می‌باشند بنابراین ویرایش قابل توجهی بر روی داده‌ها انجام نشد. نتایج نقشه‌گذاری نشان داد که درصد هم‌ردیفی با ژنوم مرجع

در نژادهای تجاری اسب بسیار بالاتر از نژادهای دیگر می‌باشد. یافته‌های حاصل از این آنالیز نشان داد که نژاد سریا و پس از آن ترورد بالاترین تعداد ROH را در بین جمعیت‌ها دارند. راهبردهای شدید انتخابی، جمعیت را از تعادل هاردی وینبرگ خارج و باعث افزایش همخوانی شده است که این حالت در مورد این دو نژاد بیشتر ملموس است. همچنین این نتایج نشان داد که کمترین تعداد ROH مربوط به هر دو سطح، متعلق به نژاد پونی دبائو می‌باشد، که نشان‌دهنده آن است که این نژاد تحت انتخاب مصنوعی برای اهداف خاص اصلاح نژادی نبوده است.

شناسایی جایگاه‌های تحت انتخاب مرتبط با اندازه بدن در این روش افراد موجود به دو گروه تقسیم شدند، پونی‌های دبائو در گروه اول و سایر نژادها (۱۵ نژاد) در گروه دوم قرار گرفتند. برای شناسایی بهتر نشانه‌های تحت انتخاب در سطح ژنوم به جای در نظر گرفتن ارزش عددی هر SNP، میانگین گیری ارزش‌های عددی SNP‌های مجاور (به طول ۵۰ کیلو باز که در هر ۲۵ کیلوباز تکرار می‌شد) انجام گرفت. در این مطالعه، تنها آن ارزش‌های F_{st} که دارای بالاترین سطح تفاوت بین گروهی بودند (سطح ۰/۰۱) به عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند. پس از انجام آنالیزهای مرتبط با ژن آنتولوژی و همچنین تصحیحات مربوطه (False discovery rate)، تعداد ۳۵۴ ژن کاندید مورد شناسایی قرار گرفت (شکل ۳).

در این ارتباط ژن‌های مهمی شامل *IGF2BP3*، *FGFR1*، *SCG5* و *BMPRI1* مرتبط با اندازه بدن گزارش شدند. این ژن‌ها عمدتاً در رشد و تکامل سیستم اسکلت بدن، رشد و نمو بافت‌های عضلانی و نیز تکامل سیستم عصبی بدن دخالت دارند.

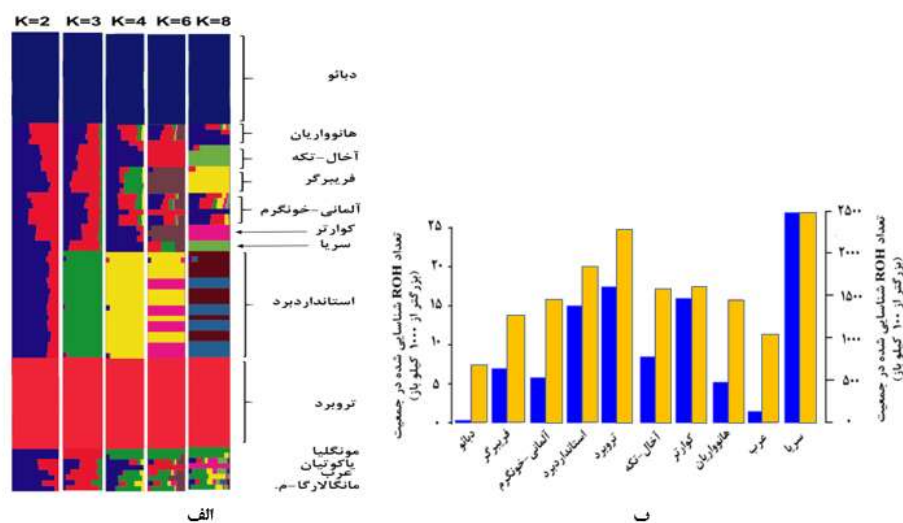
نتایج آنالیز XP-CLR نشان داد که تعداد ۶۴۳ ژن کاندید، تفاوت معنی‌داری (سطح ۰/۰۱) را در بین دو گروه مورد آزمایش نشان می‌دهند. در این روش نیز همانند روش F_{st} ژن‌های *FGFR1*، *SCG5* و *BMPRI1* حاوی سیگنال‌های قوی در ارتباط با تفاوت‌های بین گروهی بودند. همچنین ژن‌های *HMGA1*، *FBN2* و *CABLES1* نیز که در ارتباط با صفات مختلف رشد مؤثر هستند نیز مورد شناسایی قرار گرفته شد.



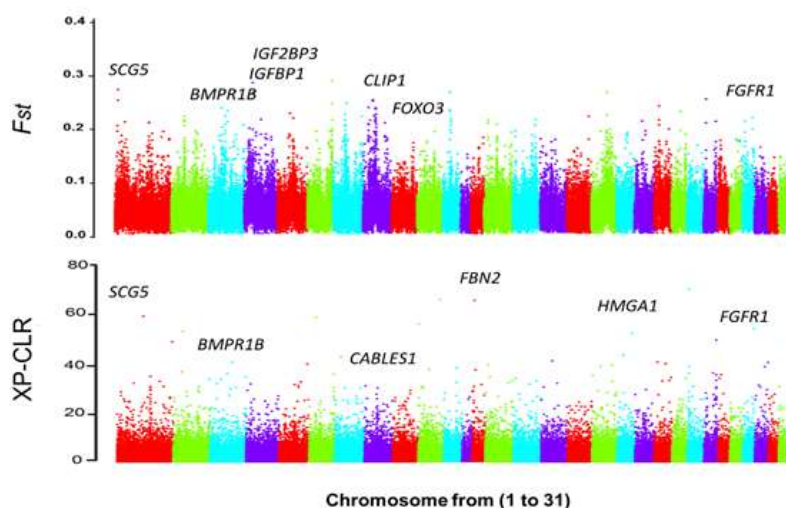
شکل ۱- نمایش ارتباط ژنتیکی میان نژادهای اسب مورد بررسی با استفاده از روش اتصال مجاورین (NJ) و تحلیل مؤلفه‌های اصلی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی مربوط به نژادهای مختلف اسب

از $K=2$ تا $K=4$ ، تمام افراد مربوط به نژاد استانداردبرد رنگ‌های یکسانی را نشان دادند، اما زمانی که جمعیت فرضی $K=6$ اعمال شد، افراد به دو رنگ متفاوت ظاهر شدند و این روند در $K=8$ نیز ادامه داشت. بررسی ساختار ژنتیکی دو اسب عرب مورد استفاده در این مطالعه نیز نشان داد که به صورت خالص نبوده‌اند و حاصل از آمیخته‌گری چندین نژاد می‌باشد ($K=2$ تا $K=8$). نتایج حاصل از خوشه بندی نژادهای هانوواریان و آلمانی-خونگرم نشان می‌دهد که این دو نژاد به صورت آمیخته از چند نژاد ($K=6$) تشکیل شده‌اند و نیز شباهت زیادی بین این دو نژاد وجود دارد. اما در ارتباط با اسب‌های ترورد، ساختار ژنتیکی استنتاج شده نشان می‌دهد که این نژاد به صورت خالص در تمام K های فرضی بوده است. در این مطالعه جمعیت فرضی $K=2$ کمترین خطا^۱ (۰/۵۲۳) را نشان داد. در این مطالعه، ROH‌ها به عنوان قطعاتی از ژنوتیپ‌های هموزیگوس تعریف شدند که طول آن‌ها به ترتیب بلند تر از ۱۰۰ و ۱۰۰۰ کیلوباز بوده است (شکل ۲- ب). همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود تعداد قطعات ROH که بیانگر سطح هم‌خونی در یک جمعیت می‌باشد

¹ Cross-validation error



شکل ۲- الف) ساختار ژنتیکی به دست آمده از نرم‌افزار Admixture (ب) روند تغییرات مقادیر ROH در جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه



شکل ۳- توزیع ارزش‌های F_{st} و XP-CLR برای صفات مرتبط با اندازه بدن

هدف انتخاب شد (Schröder et al. 2012). در این مطالعه ابتدا با استفاده از روش F_{st} تعداد ۴۸۳ SNP (سطح معنی‌دار ۰/۰۱) متعلق به ۲۹۹ ژن کاندید مورد شناسایی قرار گرفت. سپس با بررسی ژن‌های شناسایی شده مشخص شد که ژن کاندید *ACTA1* که در کروموزوم شماره یک قرار دارد دارای نشانه انتخاب معنی‌داری بین دو گروه می‌باشد (شکل ۴).

نتایج روش XP-CLR نشان داد که تعداد ۴۵۸ ژن کاندید با سطح معنی‌داری یک درصد برای نواحی تحت انتخاب صفات حرکات نمایشی در اسب وجود دارد. نتایج ژن آنتولوژی نشان داد که

نتایج شناسایی جایگاه‌های تحت انتخاب مرتبط با خصوصیات پرش و حرکات نمایشی در اسب

جهت مشخص کردن جایگاه‌های تحت انتخاب مربوط به این صفات از نژاد هانواریان به عنوان نژاد هدف و از نژادهای فریرگر، آخال-تکه و استانداردبرد به عنوان گروه کنترل (۴ فرد به ازای هر نژاد) استفاده شد. نژاد هانواریان یکی از بهترین نژادهای اسب موجود در دنیا می‌باشد که در مسابقات بین المللی همیشه رکورد دار حرکات پرش، درساژ^۱ و نیز حرکات نمایشی می‌باشد. لذا جهت پی بردن به پتانسیل ژنتیکی این نژاد به عنوان گروه مورد

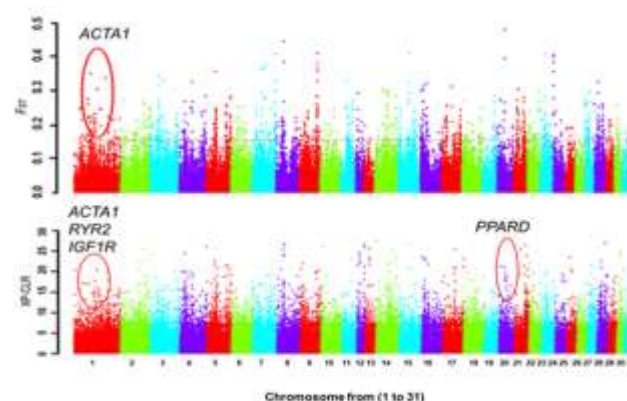
¹ Dressage

نویسندگان از نژادهایی استفاده کرده‌اند که (مانند نژادهای یونان^۵ (استانی در جنوب کشور چین)، مونگلیا، ژینی^۶ و ژنگدیان^۷) فاصله جغرافیایی بسیار کمی با منشاء اهلی‌سازی نژاد دبائو دارد. در مطالعه دیگری که Kader et al. (2015) با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگرهای ملکولی با تراکم بالا (SNP 65 Bead Chip) و نیز دامنه جغرافیایی وسیع‌تری انجام دادند، مشخص شد که نژاد پونی دبائو به‌همراه دو نژاد چینی دیگر (بیلی و مونگلیا) به‌خوبی نسبت به سایر نژادهای اسب تفکیک شده است.

آنالیزهای فیلوژنتیک همچنین نشان داد که نزدیک‌ترین نژادها به پونی دبائو، اسب‌های یاکوتیان و مونگلیا می‌باشد. امروزه نژاد یاکوتیان متعلق به مناطق سیبری در کشور روسیه (مناطق جنوبی کشور روسیه) می‌باشد. اسب یاکوتیان یک نژاد مقاوم نسبت به مناطق سردسیر است. مطالعات انجام شده تایید می‌کند که قوم مونگلیان که در زمان‌های گذشته در مناطق شمالی کشور چین ساکن بوده‌اند این نژاد را پرورش می‌دادند. این قبیله در طی قرن‌های ۱۳ و ۱۵ به ناحیه سیبری روسیه مهاجرت کرده‌اند. این شواهد تاریخی نشان می‌دهد که دو نژاد دبائو و یاکوتیان از یک کشور مبدا منشاء گرفته‌اند و نیز از نظر ژنتیکی شباهت‌های بسیاری با یکدیگر دارند (Librado et al. 2015).

درخت فیلوژنتیکی ایجاد شده از نژادهای مختلف اسب نشان داد که دو نژاد عرب و آخال-تکه، که هر دو در منطقه خاورمیانه ایجاد شده‌اند، فاصله ژنتیکی نزدیکی با یکدیگر دارند. نتیجه مشابهی در خصوص این تقسیم‌بندی نیز توسط Petersen et al. (2013) گزارش شده است. به‌طوری‌که این محققین با استفاده از ۳۸ نژاد مختلف اسب در آنالیزهای فیلوژنتیکی مربوطه نشان دادند که این دو نژاد در یک خوشه ژنتیکی قرار دارند. در تحقیق حاضر نشان داده شد که اسب مونگلیا که به‌عنوان اسب وحشی^۸ نیز شناخته می‌شود فاصله ژنتیکی بسیار نزدیکی نسبت به سایر نژادهای اهلی دارد. اگرچه اسب وحشی نسبت به سایر نژادهای اسب در تعداد کروموزوم متفاوت است (یک جفت کروموزوم بیشتر دارد 2n=66) اما مطالعات انجام شده نشان داده است که

ژن‌های کاندید شناسایی شده در گروه‌های ژنی حرکت^۱، تکامل سلولی^۲، پروسه‌های تکاملی^۳ و توسعه ساختار آناتومیک^۴ قرار می‌گیرند که دارای ارتباط زیادی با توسعه و تکامل اندام‌های بدن برای حرکات نمایشی می‌باشد. در این روش نیز سیگنال‌های قوی از ژن کاندید *ACTA1* مورد شناسایی قرار گرفت (مانند روش *Fst*). علاوه بر این ژن‌های مهم دیگری شامل *IGF1R*، *RYR2* و نیز *PPARD* که نقش مؤثری در توانایی بدن جهت حرکات ویژه ورزشی دارد نیز مورد شناسایی قرار گرفت.



شکل ۴- توزیع ارزش‌های محاسبه شده برای F_{st} و XP-CLR برای صفات مرتبط با خصوصیات پرش و حرکات نمایشی در اسب

بحث

نتایج حاصل از آنالیزهای مربوط به رسم درخت فیلوژنی و PCA نشان داد که نژاد پونی دبائو به‌طور کامل از سایر نژادهای مورد بررسی تفکیک شده است. در نخستین مطالعه‌ای که با استفاده از توالی‌های مربوط به قسمت میتوکندری پونی‌های دبائو جهت تعیین روابط فیلوژنتیکی با سایر نژادهای اسب انجام شد، مشخص شد که این نژاد به‌صورت مخلوط با سایر نژادهای اسب می‌باشد (Jiang et al. 2011). اما با نگاه دقیق به نژادهای مورد استفاده در این مطالعه به‌نظر می‌رسد که شباهت موجود بیشتر به‌دلیل توزیع محدود دامنه جغرافیایی نمونه‌هایی است که جهت آنالیزهای خوشه‌بندی به‌کار گرفته شده است. در این مطالعه

¹ Locomotion

² Cell development

³ Developmental process

⁴ Anatomical structure development

⁵ Yunan

⁶ Xinihe

⁷ Zhongdian

⁸ Przewalski's

جفت‌گیری میان اسب‌های وحشی و نژادهای اهلی منجر به تولید کره اسب‌هایی می‌شود که توان تولید مثلی برای نسل آینده را دارند (Benirschke et al. 1965; Sarkissian et al. 2015).

در بررسی سطح هم‌خونی در جمعیت مورد مطالعه مشخص شد که در فرض $K=2$ ، یک تقسیم‌بندی واضح میان دو نژاد تروبرد و پونی‌های دبائو مشاهده شد. در این فرض مشخص شد که سایر نژادها به‌صورت مخلوطی از دو رنگ می‌باشند. زمانی که فرض $K=3$ مورد بررسی قرار گرفت، سومین خوشه ژنتیکی که تمام افراد نژاد استاندارد برد را شامل می‌شد، به‌صورت مستقل از سایر نژادها نمایان شد. با اعمال فرض‌های $K=4$ تا $K=8$ ، نیز مشخص شد که دو نژاد پونی دبائو و تروبرد به‌صورت خالص و در خوشه‌های ژنتیکی مستقل قرار دارند. اگرچه در مطالعه‌ای که توسط Kader et al. (2015) انجام گرفته است تمام اسب‌های مربوط به نژاد تروبرد به‌صورت خالص در جمعیت‌های فرضی ($K=2$ تا $K=12$) قرار گرفته‌اند، اما این محققین نشان دادند که پونی‌های دبائو در فرض $K=2$ به‌صورت مخلوطی از دو رنگ می‌باشند. همچنین زمانی که جمعیت $K=4$ و $K=12$ فرض شده است، به‌ترتیب با ۴ و ۶ رنگ مختلف نشان داده شده است. نتیجه حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که جمعیت مورد بررسی توسط این محققین، از یک نژاد خالص نبوده و ممکن است پونی‌های مورد مطالعه به‌صورت یک جمعیت آمیخته از چند نژاد مختلف شکل گرفته باشد. در مطالعه‌ای که Petersen et al. (2013) انجام دادند نیز مشخص شد که اسب‌های تروبرد در تمام جمعیت‌های فرضی ($K=2$ تا $K=36$) به‌صورت خالص و در یک خوشه ژنتیکی قرار داشته‌اند و تاییدکننده نتایج پژوهش حاضر در ارتباط با آمیخته بودن اسب‌های عرب می‌باشد.

در این پژوهش، نتایج مشابهی توسط روش‌های F_{st} و XP-CLR برای بررسی نشانه‌های انتخاب گزارش شد. با بررسی مناطق ژنومی تحت انتخاب توسط آماره F_{st} ، ژن‌های کاندید *IGFBP1* و *IGF2BP3* در ارتباط با اندازه بدن در موقعیت ژنتیکی کروموزوم شماره ۴ گزارش شد. مسیرهای متابولیکی *IGF* شامل لیگاند‌های مختلف (*IGFI* و *IGFII*)، گیرنده‌ها (*IGF-IR* و *IGF-IIR*) و نیز پروتئین‌های باند کننده‌ای (*IGFBP-1* تا *IGFBP-6*) می‌باشد. این مسیرهای متابولیکی دارای نقش کلیدی در تنظیم متابولیسم بدن،

توسعه اندام‌ها و نیز اندازه بدن دارد (Doan et al. 2012). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ژن‌های کاندید ذکر شده ارتباط مستقیمی با رشد سیستم اسکلتی و نیز صفات مربوط به اندازه بدن دارند. همچنین ژن کاندید *IGFBP1* در ناحیه کروموزومی شماره ۲ جوجه‌های گوشتی، هبستگی زیادی با یک QTL بزرگ اثر مرتبط با صفات مربوط به رشد دارد (Zhao et al. 2012). علاوه بر این، با بررسی نتایج حاصل از شناسایی نواحی تحت انتخاب توسط روش F_{st} و XP-CLR مشخص شد که دو ژن کاندید *SCG5* و *BMPR1B* دارای سیگنال‌های معنی‌داری می‌باشند. ژن *SCG5* مسئول ساخت پروتئین‌هایی می‌باشد که به‌صورت بالقوه نقش مهمی در صفات مربوط به رشد در موش دارد. مطالعات در خصوص این پستاندار نشان داده است که ژن *SCG5* در ارتباط با یک QTL بزرگ اثر می‌باشد که در ناحیه کروموزومی شماره ۲ قرار گرفته است و نقش مهمی در صفات مربوط به وزن بدن و توده بدنی^۱ دارد (Farber et al. 2008). در پژوهش حاضر، ژن *BMPR1B* به‌عنوان یک ژن کاندید در موقعیت ژنومی کروموزوم شماره ۳ پونی‌های دبائو مورد شناسایی قرار گرفته شد. لیگاند‌هایی که به این پروتئین متصل شده و آن را در سیستم بیولوژیک بدن فعال نگه می‌دارند از خانواده BMPs بوده، که خود این پروتئین‌ها نیز عضوی از خانواده انتقال فاکتورهای رشد بتا ($TGF-\beta^2$) می‌باشند. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که BMPs نقش مهمی در ارتباط با شکل‌گیری استخوان‌های بدن داشته و نقش‌های بیولوژیکی متعددی نیز در مراحل رشد ابتدایی جنین دارد (Wang et al. 2010; Chen et al. 2016). سیگنال‌های شناسایی شده مربوط به جایگاه ژنومی که در موقعیت کروموزومی شماره ۲۷ قرار داشت، این جایگاه ژنومی که متعلق به ژن *FGFR1* می‌باشد به‌عنوان یک ژن کاندید جدید در اسب به‌وسیله هر دو روش F_{st} و XP-CLR مورد شناسایی قرار گرفت. مطالعات گذشته نشان داده است که این ژن نقش مهمی در تشکیل بافت ماهیچه و نیز استخوان‌های صورت، جمجمه^۳، استخوان‌های بلند دست و پا و نیز استخوان‌های مربوط

¹ Body mass

² Transforming growth factor beta

³ Skull

اندازه‌گیری میزان ژن در بافت‌های مختلف نشان داده است که سطح بیان ژن *ACTA1* در بافت‌های عضلانی اسکلتی اسب بالا می‌باشد (McGivney et al. 2010). در مطالعه‌ای که توسط Gu et al. (2009) انجام شد، نشان داده شد که جهش‌های تک نوکلئوتیدی موجود در این ژن ارتباط معنی‌داری با میزان عملکرد ورزشی^۳ اسب‌های نژاد ترورید دارد. علاوه بر این، در مطالعه‌ای که اخیراً محققین روی اسب‌های ورزشی نژاد فرانسوی انجام داده اند نیز مشخص شده است که این ژن در ارتباط با یک QTL بزرگ اثر در موقعیت ژنومی کروموزوم شماره ۱ (BIEC2_31196) و در ارتباط با صفت پرش^۴ می‌باشد (Brard and Ricard 2014).

در تایید نتایج پژوهش حاضر، در مطالعه‌ای که برای شناسایی نشانه‌های انتخاب بین دو جمعیت اسب‌های ورزشی و غیر ورزشی انجام شد، تعداد ۴۹ ژن کاندید گزارش شد که مهم ترین فعالیت آن‌ها در ارتباط با توسعه ماهیچه‌های اسکلتی و رشد اندام‌ها بود. این نتایج می‌تواند نشان دهنده اهمیت توسعه مناسب توده بدنی در اسب‌های ورزشی برای حرکات نمایشی می‌باشد (Salek Ardetani et al. 2020).

در مطالعه حاضر، همچنین سه ژن کاندید دیگر *RYR2*^۵ (کروموزوم شماره ۱)، *PPAR*^۶ (کروموزوم شماره ۲۰) و *IGF-1R*^۷ (کروموزوم شماره ۱)، گزارش شد. ژن کدکننده *RYR2* در بدن پروتئین گیرنده ریانودین^۸ شماره ۲ را تولید می‌کند. این پروتئین بخشی از خانواده گیرنده ریانودین می‌باشد که نقش فیزیولوژیکی آن در بدن، انتقال یون‌های حاوی بار مثبت کلسیم در کانال‌های بین سلولی ماهیچه‌های قلب می‌باشد (et al. 2010; Lanner Priori et al. 2001). مطالعات انجام شده روی اسب‌های فرانسوی نشان داده است که این ژن ارتباط بسیار نزدیکی (0.55 Mb) با یک QTL بزرگ اثر مربوط به عملکرد پرش دارد (Brard and Ricard 2014). *IGF-1* به‌عنوان یک فاکتور رشد پلیوتروپیک، نقش مهمی در تنظیم و تکثیر، تفرق و نیز زنده ماندن

مربوط به انگشتان دارد (Bruck et al. 1994; Yamaguchi et al. 1993; Wang et al. 2001). در آزمایشی که با استفاده از تکنیک‌های ملکولی اقدام به حذف قسمتی از ژن *FGFR1* در جنین موش شد، مشاهده شد که موش‌های مورد مطالعه مرده متولد می‌شوند و با بررسی قسمت‌های مختلف لاشه آن‌ها مشخص شد که استخوان‌های مربوط به اندام حرکتی نسبت به گروه کنترل کوتاه بوده و نیز تغییر شکل پیدا کرده است (Verheyden et al. 2005). در مطالعه مشابهی که بر روی اسب‌های دیبائو پونی چینی برای شناسایی نشانه‌های انتخاب برای اندازه بدن انجام گرفت گزارش شد که ژن *NELL1* به‌عنوان مهم‌ترین ژن کاندید برای اندازه بدن مطرح می‌باشد. این ژن به‌عنوان یک پروتئین کیناز در استخوان‌بندی بدن دارای اهمیت است (Asadollahpour Nanaei et al. 2020).

شناسایی ژن‌های کاندید جدید مرتبط با صفت اندازه بدن می‌تواند اطلاعات ما را در خصوص چگونگی تکامل این صفت، که به‌عنوان یکی از مهم‌ترین صفات در بحث‌های تکاملی می‌باشد، ارتقاء دهد. به‌دنبال این هدف مهم، در این مطالعه ژن‌های کاندید مرتبط با اندازه بدن در نژاد پونی دبائو را شناسایی شد. یافته‌های این مطالعه موجب کشف چند ژن جدید مرتبط با اندازه وزن بدن در اسب‌های پونی‌های دبائو شد که پیش از این در مطالعات مرتبط با نژادهای مختلف اسب شناسایی نشده بود.

در این پژوهش از نژاد هانوواریان (گروه هدف) به‌عنوان یکی از شناخته شده‌ترین نژادهای اسب دنیا که پتانسل ژنتیکی بالایی در رابطه با حرکات نمایشی دارد و نیز به‌میزان زیادی در مسابقات بین‌المللی مورد استفاده قرار می‌گیرد، استفاده شد. یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که ژن کدکننده پروتئین *ACTA1*^۱ که در ناحیه کروموزومی شماره ۱ قرار دارد. پروتئین کدشده توسط این ژن در بدن رشته‌های ماهیچه‌ای آلفا اکتین^۲ را می‌سازد. رشته‌های اکتین یکی از اجزای اصلی تولید سارکومر (سارکومرها از رشته‌های نازک به نام فیلامنت‌های اکتین و نیز رشته‌های ضخیم به نام میوزین تشکیل شده است) در بافت‌های عضلانی حیوان بالغ می‌باشد (Laing et al. 2009). آزمایشات مرتبط با

³ Athletic-performance

⁴ Show-jumping performance

⁵ Ryanodine receptor type 2

⁶ Peroxisome proliferator activated receptor delta

⁷ Insulin-like growth factor 1 receptor

⁸ Ryanodine receptor 2

¹ Actin alpha 1 gene

² Skeletal muscle α -actin

در این پژوهش، برای مطالعه صفت اندازه بدن، نژاد پونی دبائو به دلیل اندازه کوچک بدن به عنوان گروه هدف مورد استفاده گرفت. واکاوی ژنتیکی نشان داد که مهم‌ترین ژن تحت انتخاب مربوط به ژن *FGFR1* برای قد کوتاه در این جمعیت می‌باشد علاوه بر این، چهار جایگاه ژنومی دیگر در کروموزوم‌های ۲، ۳ و ۴ برای صفت اندازه بدن گزارش شد. بررسی نشانه‌های انتخاب در ارتباط با شناسایی ژن‌های کاندید مؤثر بر عملکرد ورزشی بر مبنای نژاد اسب هانوواریان انجام گرفت. بررسی‌های ژنتیکی نشان داد که ژن *ACTA1* در عملکرد ورزشی این نژاد دارای اهمیت است، علاوه بر این، جایگاه‌های ژنومی دیگری نیز در کروموزوم‌های ۱ و ۲۰ گزارش شد، که می‌توانند در عملکرد فیزیکی اسب مؤثر باشند. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند یافته‌های جدیدی از پایه ملکولی مربوط به صفات اندازه بدن و عملکرد ورزشی در اسب را آرایه نمایند و از این اطلاعات در تدوین برنامه‌های اصلاح نژادی سود جست.

سلول‌های بدن دارد. همچنین به عنوان یک فاکتور رشد ضروری در تکامل بافت‌های ماهیچه‌های اسکلتی دخالت می‌کند. عملکرد بیولوژیکی *IGF-1* توسط گیرنده‌های آن^۱ (*IGF-1R*) در بدن تنظیم می‌شود (Yakar et al. 2010; Delafontaine et al. 2004). در مطالعه‌ای از بافت کندروسیت^۲ موجود در استخوان‌های بلند بدن، ژن *IGF-1R* حذف شده بود، نشان داده شد که این عمل باعث اختلال در رشد و نیز آسیب رسیدن به بافت مربوطه شده است (Yakar et al. 2010). ژن کاندید *PPAR* در تنظیم بیان مجموعه‌ای از ژن‌های دخیل در فرآیند سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها در بدن دخالت دارد (Barbier et al. 2002). به طوری که مشاهده شده است که سطح بیان این ژن در زمان‌های گرسنگی و ورزش کردن، در جهت تحریک سایر فرآیندهای سوخت و ساز بدن افزایش پیدا می‌کند (De Lange et al. 2008).

¹ IGF-1 receptor² Chondrocyte

منابع

- Asadollahpour Nanaei H, Esmailzadeh A, Ayatollahi Mehrgardi A (2020) Comparative population genomic analysis uncovers novel genomic footprints and genes associated with small body size in Chinese pony. *BMC Genomics* 21:496.
- Al-Abri MA, Posbergh C, Palermo K, Sutter NB, Eberth J, Hoffman GE, Brooks SA (2018) Genome-wide scans reveal a quantitative trait locus for withers height in horses near the *ANKRD1* gene. *Journal of Equine Veterinary Science* 60:67-73.
- Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S (2007) Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (*Bos indicus*) using PCR-RFLP. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10:4291-4294.
- Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. *Modern Genetics Journal* 5:49-56.
- Barbier O, Torra JP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B (2002) Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22:716-726.
- Benirschke K, Malouf N, Low RJ, Heck H (1965) Chromosome complement: differences between *Equus*

- caballus* and *Equus przewalskii*. *Poliakoff Science* 148:382-383.
- Brard S and Ricard A (2014) Genome-wide association study for jumping performances in French sport horses. *Animal Genetics* 46:78-81.
- Bruck I, Anderson GA, Hyland JH (1993) Reproductive performance of Thoroughbred mares on six commercial stud farms. *Australian Veterinary Journal* 70, 299-303.
- Chen H, Patterson N, Reich D (2010) Population differentiation as a test for selective sweeps. *Genome Research* 20:393-402.
- Delafontaine P, Song YH, Li Y (2004) Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24:435-444.
- De Lange P, Lombardi A, Silvestri E, Goglia F, Antonia Lanni A and Moreno M (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor delta: a conserved director of lipid homeostasis through regulation of the oxidative capacity of muscle. *PPAR Research* 172676.
- Doan R, Cohen ND, Sawyer J, Ghaffari N, Johnson CD, and Dindot, SV (2012) Whole-genome sequencing and genetic variant analysis of a Quarter Horse mare *BMC genomics* 13:78.
- Esfandiari P, Dadpasand M, Kharrati-Koopae H, Atashi H, Gharghi A, Niazi A (2020) Bioinformatics, phylogenetic and variant association analysis of

- Ovocalyxin-32 gene reveals its contribution to egg production traits in native chickens. *Animal Gene* 1:200108.
- Farber CR, Chitwood J, Lee SN, Verdugo RA, Islas-Trejo A, Rincon G, Medrano JF (2008) Overexpression of Scg5 increases enzymatic activity of PCSK2 and is inversely correlated with body weight in congenic mice. *BMC Genetics* 9:34.
- Ghasemi M, Baghizadeh A, Abadi MRM (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4:5758-5760.
- Gu J, Orr N, Park SD, Katz LM, Sulimova G, MacHugh DE, Hill EW (2009) A genome scan for positive selection in Thoroughbred horses. *PLoS ONE* 4:e5767.
- Jiang Q, Wei Y, Huang Y, Jiang H, Guo Y, Lan G, Liao DJ (2011) The complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of the Debao pony (*Equus caballus*). *Molecular Biology Reports* 38:593-599.
- Hamann H, Distl O (2008) Genetic variability in Hanoverian warmblood horses using pedigree analysis. *Journal of Animal Science* 86:1503-1513.
- Kader A, Li Y, Dong K, Irwin DM, Zhao Q, He X, Liu J, Pu Y, Gorkhali NA, Liu X, Jiang L, Li X, Guan W, Zhang Y, Wu DD, Ma Y (2015) Population variation reveals independent selection toward small body size in Chinese Debao pony. *Genome Biology and Evolution* 8:42-50.
- Kharrazi-Koopae H, Ebrahimie E, Dadpasand M, Niazi A, Esmailzadeh A (2019) Genomic analysis reveals variant association with high altitude adaptation in native chickens. *Scientific reports* 9:1-22.
- Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL (2010) Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a003996.
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* 25:754-60.
- Laing NG, Dye DE, Wallgren-Pettersson C, Richard G, Monnier N, Lillis S, Winder TL, Lochmüller H, Graziano C, Mitrani-Rosenbaum S, Twomey D (2009) Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). *Human Mutation* 30:1267-1277.
- Librado P, Sarkissian CD, Ermini L, Schubert M, Jónsson H, Albrechtsen A, Fumagalli M, Yang MA, Gamba C, Seguin-Orlando A (2015) Tracking the origins of Yakutian horses and the genetic basis for their fast adaptation to subarctic environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 12:E6889-E6897.
- Mahmoodi M, Ayatollahi A, Mohammadabadi MR (2018) Studying exon 4 of kappa-casein gene in Kermani sheep using PCR-RFLP. *Agricultural Biotechnology Journal* 9:119-128.
- Makvandi-Nejad S, Hoffman GE, Allen JJ, Chu E, Gu E, Chandler AM, Loredó AI, Bellone RR, Mezey JG, Brooks SA, Sutter NB (2012) Four Loci Explain 83% of Size Variation in the Horse. *PLoS ONE* 7:e39929.
- McGivney BA, McGettigan PA, Browne JA, Evans AC, Fonseca RG, Loftus BJ et al. (2010) Characterization of the equine skeletal muscle transcriptome identifies novel functional responses to exercise training. *BMC Genomics* 11:398.
- Metzger J, Schrimpf R, Philipp U, Distl O (2013) Expression Levels of LCORL are Associated with Body Size in Horses. *PLoS ONE* 8:e56497.
- Moazemi I, Mohammadabadi MR, Mostafavi A, Esmailzadeh AK, Babenko OI, Bushtuk MV, Tkachenko SV, Stavetska RV, Klopenko NI (2020) Polymorphism of DMRT3 Gene and Its Association with Body Measurements in Horse Breeds. *Russian Journal of Genetics* 56:1232-40.
- Moazeni SM, Mohammadabadi MR, Sadeghi M, Moradi Shahrabak H, Esmailzadeh AK, Bordbar F (2016a) Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. *Open Journal of Animal Science* 6:1-8.
- Moazeni SM, Mohammadabadi MR, Sadeghi M, Moradi Shahrabak H, Esmailzadeh AK (2016b) Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *Journal of Livestock Science. Technology* 4:51-56.
- Mohammadabadi MR (2017) Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. *Journal of Advances in Agriculture* 7:1117-1121.
- Mohammadabadi MR, Esfandyarpour E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. *Journal of Research Development* 5:e154.
- Mostafavi A, Asadi Fozi M, Esmailzadeh A, Mohammadabadi MR, Babenko OI, Klopenko NI (2020) Effect of LCORL gene polymorphism on body size traits in horse populations. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 42:e45282.
- Nielsen R, Hubisz MJ, Hellmann I, Torgerson D, Andres AM, Albrechtsen A, Gutenkunst R, Adams MD, Cargill M, Boyko A, Indap A (2009) Darwinian and demographic forces affecting human protein coding genes. *Genome Research* 19:838-849.
- Petersen JL, Mickelson JR, Cothran EG, Andersson LS, Axelsson J, Bailey E, Bannasch D, Binns MM, Borges AS, Brama P, da Câmara Machado A (2013) Genetic diversity in the modern horse illustrated from genome-wide SNP data. *PLoS One* 8:e54997.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* 5:e9490.
- Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA (2001) Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 104:196-200.
- Sarkissian CD, Ermini L, Schubert M, Yang MA, Librado P, Fumagalli M, Jónsson H, Bar-Gal GK, Albrechtsen A, Vieira FG (2015) Evolutionary Genomics and

Conservation of the Endangered Przewalski's Horse. *Current Biology* 19:2577-2583.

Salek Ardestani S, Aminafshar M, Zandi Baghche Maryam MB, Banabazi MH, Sargolzaei M, Miari Y (2020) Whole-Genome Signatures of Selection in Sport Horses Revealed Selection Footprints Related to Musculoskeletal System Development Processes. *Animals* 10:53. <https://doi.org/10.3390/ani10010053>

Sevane N, Dunner S, Boado A, Cañon J (2016) Polymorphisms in ten candidate genes are associated with conformational and locomotive traits in Spanish Purebred Horses. *Journal of Applied Genetics* 58:355-361.

Schröder W, Klostermann A, Stock KF, Distl O (2012). A genome-wide association study for quantitative trait loci of show-jumping in Hanoverian warmblood horses. *Animal Genetics* 43:392-400.

Signer-Hasler H, Flury C, Haase B, Burger D, Simianer H, Leeb T, Rieder S (2012) A Genome-Wide Association Study Reveals Loci Influencing Height and Other Conformation Traits in Horses. *PLoS ONE* 7:e37282.

Staiger EA, Al Abri MA, Pflug KM, Kalla SE, Ainsworth DM, Miller D, Raudsepp T, Sutter NB, Brooks SA (2016) Skeletal variation in Tennessee Walking Horses maps to the LCORL/NCAPG gene region Physiological. *Genomics* 48:325-335.

Tajima F 1989. Statistical methods for testing the neutral mutations hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.

Verheyden JM, Lewandoski M, Deng C, Harfe BD, Sun X (2005) Conditional inactivation of *Fgfr1* in mouse defines

its role in limb bud establishment, outgrowth and digit patterning. *Development* 132:4235-4245.

Wang MS, Huo YX, Li Y, Otecko NO, Su LY, Xu HB, Irwin DM (2016) Comparative population genomics reveals genetic basis underlying body size of domestic chickens. *Journal of Molecular Cell Biology* 8:542-552.

Wang Q, Green RP, Zhao G, Ornitz DM (2001) Differential regulation of endochondral bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains. *Development* 128:3867-76.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistic for the analysis of population structure 38:1358-1370.

Yakar S, Courtland HW, Clemmons D (2010) IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models. *Journal of Bone Mineral Research* 25:2543-2552.

Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, Rossant J (1994) FGFR-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes and Development* 8:3032-44.

Zhao XH, Wang JY, Zhang GX, WEI Y, GU YP, YU YB, SHI HQ (2012) Genetic effects of IGF-I and IGFBP-1 genes on the growth traits in Jinghai yellow chicken Chinese. *Journal of Animal and Veterinary Sciences* 43:152-8.