

مطالعه ساختار و اندازه مؤثر جمعیت گاونجی، هلشتاین و آمیخته‌های آن‌ها با استفاده از پویش کل ژنوم

محمد رضا زرگر^۱، محمد تقی بیگی نصیری^{۲*}، محمد باقر زندی باغچه مریم^۳

(۱) دانشجوی دکتری اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

(۲) استاد گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

(۳) استادیار گروه علوم دامی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران..

شماره صفحات

۵۰-۳۳

* ایمیل نویسنده مسئول: mt_nassiri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۴

چکیده:

برای محافظت از نژادهای بومی به منظور حفظ تنوع ژنتیکی، نگهداری حیوان در محل زندگی خود است چرا که هزینه محافظت از ذخایر ژنتیکی بالا بوده و امکان حفظ همه ذخایر ژنتیکی در آزمایشگاه‌ها و موسسات تحقیقاتی ممکن نیست. هدف از این تحقیق مشخص کردن ساختار جمعیتی و اندازه مؤثر جمعیت گاونجی، هلشتاین و آمیخته‌های آن‌ها در گله‌های استان خوزستان بود. به این منظور از اطلاعات ژنومی ۳۲۹ نمونه گاو شامل ۱۴۱، ۶۰ و ۱۲۸ نمونه به ترتیب از نژادهای هلشتاین و آمیخته و نجدی استفاده شد. نمونه‌ها با آرایه‌های ژنومی Illumina SNP30K تعیین ژنوتیپ شدند. آنالیز جمعیت با استفاده از PCA و plotNJ انجام شد که در هر دو روش جمعیت‌ها تا حدودی از هم تفکیک شدند. دامنه r^2 از $0/359 \pm 0/150$ تا $0/450 \pm 0/244$ در کروموزوم ۲۰ برای نژاد هلشتاین و $0/319 \pm 0/130$ تا $0/462 \pm 0/271$ در کروموزوم ۲۰ در دام‌های آمیخته بود، در حالیکه بالاترین مقدار r^2 در نژاد نجدی از دامنه $0/311 \pm 0/120$ تا $0/483 \pm 0/271$ در کروموزوم ۲۰ مشاهده شد. اندازه مؤثر جمعیت‌ها در نسل پنج برای جمعیت‌های این مطالعه، نجدی ۴۵ راس، آمیخته ۱۰۱ راس و هلشتاین ۱۱۰ راس به دست آمد. این اعداد برای گاونجی برای مقادیر پیشنهاد شده جهت حفاظت از جمعیت‌ها فاصله زیادی دارد و این امر نشان‌دهنده خطر جدی حذف گاونجی در آینده نزدیک است. کاهش اندازه مؤثر موجب افزایش حساسیت این جمعیت به تغییرات محیطی پیش رو خواهد شد. از این رو لازم است با بکارگیری راه‌کارهایی نظیر شناسایی و پرورش گاوهای خالص، اقتصادی کردن سیستم تولیدی، کنترل تلاقی‌گری‌ها و ایجاد بانک‌های ژنی برای حفاظت از این نژاد برنامه‌ریزی شود.

واژه‌های کلیدی: گاونجی، گاونجی، هلشتاین، ساختار جمعیت، اندازه مؤثر جمعیت و عدم تعادل لینکاژی.

مقدمه

نژادهای بومی هر کشور به عنوان سرمایه ملی و ذخایر ارزشمند ژنتیکی محسوب میشوند (Rohipoor *et al.*, 2019). شواهد حاکی از آن است که اهلی شدن گوسفند به ۱۱۰۰۰ سال قبل باز میگردد و گوسفند، بز و گاو از ناحیه آناتولی مرکزی تا شامل کوههای زاگرس، اهلی شده‌اند (Mohamadi ahvazi *et al.*, 2019; Nazari and Mohamadi ahvazi, 2022). اهلی شدن گاو (Bos indicus و Bos Taurue) حدود ۸۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سال پیش (Moradian, Esmailizadeh Koshkoiyeh *et al.*, 2020) در دو رویداد جداگانه انجام شد: یکی در منطقه هلال بارور (Fertile Crescent) (منشاء گاو تورین) و دیگری در دره سند (منشاء گاو ایندیسین یا زبو) (Barazandeh, Mohammadabadi *et al.*, 2016, Barazandeh, *et al.*, 2019). از آن زمان، طیف گسترده‌ای از رویدادهای انتخاب طبیعی و مصنوعی، ویژگی‌های مهم گاو مانند سازگاری با محیط‌های مختلف، تولید مثل، فرم بدن، رفتار، مقاومت در برابر بیماری‌ها و انگل‌ها و ویژگی‌های اقتصادی مطلوب را به شدت تغییر داده است (Barazandeh, Mohammadabadi *et al.*, 2016, Bordbar, Mohammadabadi *et al.*, 2022). از سویی، آگاهی از منشاء نژاد و تاریخچه تکامل جهت پیش‌بینی ترکیب ژنی حمل شده توسط هر نژاد ممکن است در آینده برای توصیف صفات مختلف مثل مقاومت به بیماری، استرس و آداپته شدن به محیط‌های مختلف مهم باشد (Aminafshar, Amirinia *et al.*, 2008). طی فرآیند اهلی شدن دام‌ها در اثر عوامل ژنتیکی مختلف مانند انتخاب مصنوعی، رانش ژنتیکی و جهش به خاطر تغییرات ایجاد شده بر اثر این عوامل و به‌علت استفاده از تعداد کمی از نژادها برای تولید بالاتر باعث کاهش تنوع ژنتیکی دام‌های اهلی شده که باعث بروز نگرانی جهانی شده است (Holsinger and Weir, 2009). به‌نظر می‌رسد بهترین راه برای محافظت از نژادهای بومی به منظور حفظ تنوع ژنتیکی، نگهداری حیوان در محل زندگی خود است چرا که هزینه محافظت از ذخایر ژنتیکی بالا بوده و امکان حفظ همه ذخایر ژنتیکی در آزمایشگاه‌ها و موسسات تحقیقاتی ممکن نیست (Holsinger and Weir, 2009). در سال‌های اخیر استفاده از فن آوری ژنومی از قبیل آرایه‌های چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) با تراکم بالا توسعه یافته است. کاربرد این آرایه‌ها پتانسیل بسیار بالایی برای افزایش درک معماری ژنتیکی صفات پیچیده، بهبود کارایی انتخاب در حیوانات اهلی از طریق انتخاب ژنومی (García-Gómez, Sahana *et al.*, 2012) و انجام مطالعات پویا کل ژنومی (Karlsson, Baranowska *et al.*, 2007) دارد. با این حال، آگاهی از میزان عدم تعادل پیوستگی^۱ (LD)، ارتباط غیرتصادفی آلل‌ها در موقعیت‌های مختلف در ژنوم، برای طراحی مطلوب مطالعات ارتباطی کل ژنوم بسیار مهم است. در واقع، میزان LD اغلب برای تعیین تعداد مطلوب نشانگرهای مورد نیاز برای نقشه‌یابی ژنتیکی از جایگاه صفات کمی^۲ (Meuwissen and Goddard, 2000)، انتخاب ژنومی (Meuwissen, Hayes *et al.*, 2001) و درک تاریخ

¹ Linkage disequilibrium

² Quantitative trait locus

تکاملی جمعیت‌ها (Hayes, Visscher *et al.*, 2003) استفاده می‌شود. با توجه این نکته، تعیین مقدار (LD) در بین نژادهای مختلف که احتمالاً بر موفقیت آزمایشات نقشه‌یابی ژن‌ها تأثیر دارد مهم باشد (Meadows, Chan *et al.*, 2008). آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی، همچنین سطح هم‌خونی، ساختار جمعیت برای هر یک از این برنامه‌ها حیاتی می‌باشد (Kijas, Lenstra *et al.*, 2012). میزان LD بین نژادها در مورد سطح تنوع ژنومی در گونه حاوی اطلاعات مفیدی است و می‌تواند به درک الگوهای انتخابی که نژادهای مختلف تحت آن قرار گرفته‌اند، کمک کند. با توجه به اهمیت موضوع، مطالعات مختلفی در انواع گونه‌های دامی به عنوان مثال گاو (Espigolan, Baldi *et al.*, 2013)، خوک (Uimari and Tapio, 2011)، اسب (Corbin, Blott *et al.*, 2010)، مرغ (Rao, Liang *et al.*, 2008) و گوسفند (Kijas, Porto-Neto *et al.*, 2014) و (García-Gómez, *et al.*, 2012) انجام شده است. میزان اندازه موثر جمعیت (Ne) در کنار نیروهای سیستماتیک از قبیل جهش، انتخاب، مهاجرت و نوترکیبی میزان تنوع ژنتیکی موجود در یک جمعیت را تعیین می‌کند. بنابراین، Ne برای توصیف میزان و الگوی تنوع ژنتیکی مشاهده شده یک جمعیت و تفسیر مکانیسم‌های تکاملی درگیر در شکل‌دهی تنوع در جمعیت‌های طبیعی و نیز درک تکامل جنسیت و نوترکیبی، کمک می‌کنند (Barton and Charlesworth, 1998). همچنین Ne به پیش‌بینی تنوع ژنتیکی جایگاه خنثی، احتمال تثبیت آلل‌های مفید یا حذف آلل‌ها (Robertson, 1961) و شایستگی و زنده‌مانی یک جمعیت کوچک کمک می‌کند (Lynch, Conery *et al.*, 1995). در واقع Ne، یک پارامتر مهم در اکولوژی، بیولوژی تکامل و بیولوژی محافظت می‌باشد (Wang, 2005). به هر حال دانستن Ne، طراحی برنامه‌های انتخاب مصنوعی در اصلاح گیاهان و حیوانات و مدیریت کارآمد جمعیت‌های مربوط به گونه‌های در معرض انقراض را تسهیل می‌کند (Caballero, 1994; Wang, 2005). بنابراین علاقه زیادی برای شناسایی Ne در جمعیت‌های طبیعی و مصنوعی در بین محققان حوزه‌های ژنتیک جمعیت، ژنتیک کمی، بیولوژی تکامل و محافظت وجود دارد (Barton and Charlesworth, 1998). روش‌های مختلفی برای تخمین Ne توسط محققان متفاوت ارائه شده است که می‌توان این روش‌ها را در سه دسته کلی قرار داد. این سه دسته شامل روش‌های مبتنی بر جمعیت شناختی (دموگرافی)، شجره و اطلاعات نشانگری هستند (Flury, Tapio *et al.*, 2010). داده‌های شجره به طور سنتی برای به‌دست آوردن Ne در حیوانات اهلی استفاده می‌شود. در هر حال در این روش، برای داشتن یک تخمین قابل اعتماد از Ne نیاز به کامل بودن شجره می‌باشد. در مورد روش‌های مبتنی بر دموگرافی بایستی در نظر داشت که اطلاعات دموگرافی فقط در مورد برخی از دام‌های اهلی موجود است و این درشرایطی امکان‌پذیر است که پارامترهای دموگرافیک به طور دقیقی برای نسل‌های زیادی تحت کنترل باشند. در هر صورت، در عمل کاربرد این روش‌ها برای موارد نادری شامل نژادهای با مدیریت بالا محدود است (Flury, Tapio *et al.*, 2010). یک راه‌حل برای غلبه بر محدودیت‌های یک شجره ناقص تخمین روند Ne با استفاده از داده‌های ژنومی است. محققان نشان داده‌اند که می‌توان Ne را طی نسل‌های گذشته و حال با استفاده از اطلاعات عدم لینکاژی (LD) تخمین زد (Sved 1971, Hayes; Visscher *et al.*, 2003). پیشرفت‌های اخیر در در تکنولوژی‌های تعیین

ژنوتیپ (استفاده از آرایه‌های ژنومی با هزاران پروب برای توالی‌یابی هزاران مارکر SNP) امکان به‌دست آوردن داده‌های عدم تعادل پیوستگی در سطح کل ژنوم را فراهم آورده است و این اطلاعات جهت تخمین N_e در جمعیت‌های انسانی و حیوانات اهلی ایده‌آل هستند (Kijas, Lenstra *et al.*, 2012). بنابراین هدف این تحقیق مطالعه ساختار و اندازه موثر جمعیت گاونجی، هلشتاین و آمیخته‌های آن‌ها با استفاده از پویش کل ژنوم است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و استخراج DNA

در این مطالعه نمونه‌گیری از ایستگاه پشتیبانی گاونجی استان خوزستان و گله‌های مردمی واقع در شهرستان‌های دشت‌آزادگان، بندرماهشهر و هندیجان به تعداد ۳۲۹ راس شامل ۱۲۸ راس گاو نجدی، ۱۴۱ راس گاو هلشتاین و ۶۰ راس آمیخته از سنین و جنس‌های مختلف بین دو نژاد فوق استفاده شده است. براساس داده‌های شجره‌ای و با پرسش از صاحبان دام‌ها نمونه‌هایی مورد انتخاب قرار گرفتند که دارای رابطه خویشاوندی نبوده و یا روابط خویشاوندی آن‌ها حداقل باشد. در مجموع ۳۲۹ راس گاو از گله‌های ایستگاه پشتیبانی گاو نجدی و اقماری گاو نجدی خوزستان خونگیری شدند (جدول ۱). پس از مراحل استخراج DNA که برای کلیه دام‌ها با استفاده روش نمکی در آزمایشگاه انجام شد، تعیین کمیت و کیفیت نمونه‌ها از دو روش ژل آگارز برای کمیت و دستگاه نانودراپ برای کیفیت نمونه‌ها استفاده شد. نمونه‌های DNA بعد از استخراج و گذراندن مرحله آماده‌سازی با استفاده از آرایه‌های Genotyping Array 40K در شرکت ایلومینا و با استفاده از پروتکل استاندارد ایلومینا ژنوتیپ شدند که در مجموع ۳۰۱۰۶ نشانگر SNP خوانش شد. سپس نشانگرهای SNP بدست آمده از نمونه برای داشتن نتایج صحت بالا با روش‌های مختلف ایمپوت شدند که با انجام فرایند ایمپوتیشن از تعداد ۳۰ هزار نشانگر SNP به تعداد ۶۶۲۴۲۶ نشانگر SNP بدست آمد.

جدول ۱- مکان و اندازه نمونه گاوهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Location and sample size of cows used in this study		
شهرستان محل نمونه‌گیری	تعداد	نام نژاد (گروه)
City Sampling location	Number	breed name (group)
شوشتر Shushtar	141	Holstein هلشتاین
شوشتر Shushtar	60	Cross آمیخته
شوشتر، هندیجان، ماهشهر و دشت آزادگان Shushtar, Hendijan, Mahshahr & Hendijan	128	Najdi نجدی

ویرایش داده‌ها

اولین گام در انتخاب ژنومی و همچنین مطالعات گسترده ژنوم ویرایش داده‌های ژنوتیپی است. ویرایش داده‌های ژنوتیپی اجازه می‌دهد داده‌های غیر اطلاع‌دهنده و خطاهای ماشین‌آلات مورد استفاده برای خواندن توالی DNA حذف شوند. این مرحله

بسیار مهم است زیرا با حذف SNPs که در افزایش صحت بر آوردها سهم نیستند هزینه‌های محاسباتی را کاهش می‌دهد و ثبات برآورد اثرات SNP‌های باقیمانده را افزایش می‌دهد (VanRaden, Van Tassel *et al.*, 2009). ویرایش داده‌ها با استفاده از نرم افزار Plink 1.07 انجام شد. (Purcell, Neale *et al.*, 2007). ابتدا حیوانات با بیش از ۵٪ ژنوتیپ ازدست رفته^۳ از مراحل بعدی کنار گذاشته شد و ژنوتیپ‌های مونومورف و ژنوتیپ‌های دارای حداقل فراوانی آلی^۴ کمتر از ۵٪ و نیز جایگاه‌های با بیش از ۵٪ ژنوتیپ ازدست رفته^۵ حذف شدند. تعادل هاردی وینبرگ^۶ در کلیه جایگاه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و جایگاه‌های با P-value کمتر از 10^{-6} از مجموعه داده‌های کنار گذاشته شدند.

آنالیز جمعیت

آنالیز مؤلفه‌های اصلی (تکنیک لایه‌بندی جمعیت)

هدف از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی آن است که واریانس موجود در داده‌های چند متغیره را به مؤلفه‌هایی تجزیه کند که اولین مؤلفه اصلی تا آنجا که ممکن است علت بیشترین واریانس موجود در داده‌ها را توجیه کند. دومین مؤلفه نیز به ترتیب بیشترین واریانس ممکن بعد از مؤلفه اول و الی آخر را توجیه نماید. به علاوه در این روش هر مؤلفه مستقل از مؤلفه‌های دیگر است، یعنی بین هر مؤلفه مستقل از مؤلفه‌های دیگر همبستگی وجود ندارد. آنالیز PCA روابط خویشاوندی ژنومی جهت تفکیک لایه‌بندی جمعیتی و شناسایی حیواناتی که خارج از گروه نژادی خود قرار گرفته‌اند با استفاده از نرم افزار Plink 1.07 و ترسیم گرافها در محیط R انجام شد.

(<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>)

در این مطالعه از روش‌های مختلف برای ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت استفاده شد. روش درخت اتصال همسایگی^۷ روش خوشه‌بندی بر پایه فاصله ژنتیکی است که توسط سایتوو نی (۱۹۸۷) ارائه شد. الگوریتم Nj با یک ساختار شبیه تنه درخت آغاز می‌شود و مجاورین درست (شاخه‌هایی که از لحاظ فاصله به هم نزدیک‌ترند) را با کمینه کردن مجموع طول شاخه‌ها بدست می‌آورند. از این الگوریتم برای رسم درختواره تبارزایی (فیلوژنیک) بر مبنای فاصله ژنتیکی برای هر جفت از افراد با استفاده از پکیج ape نرم افزار R استفاده شد (Paradis, Claude *et al.*, 2004). این نرم افزار فاصله بین دو نفر از افراد را بدست آورده و برای آنها جایگاه متفاوتی را تعریف می‌کند. نمودار فیلوژنتیکی بر اساس ماتریس فاصله‌ها و با استفاده از پکیج Phyclus نرم افزار R بدست آمده است (Chen and Dorman, 2013).

عدم تعادل پیوستگی (LD)

³ Animal Call Rate

⁴ Minor Allele Frequency

⁵ SNP Call Rate

⁶ Hardy-Weinberg tests

⁷ Neighbor-joining

آگاهی از میزان عدم تعادل پیوستگی^۸ (LD)، ارتباط غیر تصادفی آلل‌ها در موقعیت‌های مختلف در ژنوم، برای طراحی مطلوب مطالعات ارتباطی کل ژنوم بسیار مهم است. در واقع، میزان LD اغلب برای تعیین تعداد مطلوب نشانگرهای مورد نیاز برای نقشه‌یابی ژنتیکی از جایگاه صفات کمی^۹ (QTL) (Meuwissen and Goddard, 2000)، انتخاب ژنومی (Meuwissen, 2001) و درک تاریخ تکاملی جمعیت‌ها (Hayes, Visscher *et al.*, 2003) استفاده می‌شود. با توجه به این نکته، تعیین مقدار LD در بین نژادهای مختلف که احتمالاً بر موفقیت آزمایشات نقشه‌یابی ژن‌ها تاثیر دارد، مهم می‌باشد (Meadows, Chan *et al.*, 2008). آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی، همچنین سطح هم‌خونی و ساختار جمعیت برای هر یک از این برنامه‌ها، حیاتی می‌باشد (Kijas, Townley *et al.*, 2009). مقایسه میزان LD بین نژادها در مورد سطح ژنومی در گونه حاوی اطلاعات مفیدی است و می‌تواند به درک الگوهای انتخابی که نژادهای مختلف تحت آن قرار گرفته‌اند، کمک کند. با توجه به اهمیت موضوع، مطالعات مختلفی در انواع گونه‌های دامی به عنوان مثال گاو (Espigolan, Baldi *et al.*, 2013, Porto-Neto, 2014)، خوک (Neto, Kijas *et al.*, 2014)، اسب (Uimari and Tapio, 2011)، اسب (Corbin, Blott *et al.*, 2010)، گوسفند (Meadows, Chan *et al.*, 2008, Kijas, Porto-Neto *et al.*, 2014) انجام شده است.

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. در این مطالعه برای افزایش فهم خود در خصوص وضعیت تنوع ژنتیکی در سه جمعیت مورد مطالعه نشانه‌های ROH را در طول ژنوم بر پایه متد Sliding window با استفاده از پکیج detectRUNS نرم افزار R انجام شد (Biscarini, Cozzi *et al.*, 2018). برای تخمین ROH در هر سه جمعیت از ۵۸۹۴۳۶ SNP کنترل کیفیت شده برای هر جمعیت به طور مجزا استفاده کردیم. از پارامترهای $(\text{minDensity})=1/168$ ، $(\text{minLengthBbs})=500\text{Kbps}$ ، $(\text{maxGap})=106\text{bp}$ ، $(\text{Threshold})=0.05$ ، $(\text{minSNP})=20$ ، $(\text{windowSize})=15$ استفاده شد.

استفاده شد. ROH‌های بدست آمده به پنج گروه تقسیم می‌شوند که شامل از ۰ تا کمتر از ۶ Mb، ۶ تا کمتر از ۱۲ Mb، ۱۲ تا کمتر از ۲۴ Mb، ۲۴ تا کمتر از ۴۸ Mb و بیشتر از ۴۸ Mb. برای هر دسته از ROH‌ها تعداد اجراهای هر جمعیت بوسیله میانگین‌گیری مجموع همه ROH‌ها برحسب هر حیوان در هر جمعیت محاسبه می‌شود. ضریب هم‌خونی ژنومیکی با استفاده از اطلاعات ROH با فرمول زیر محاسبه شد: (Purfield, Berry *et al.*, 2012):

$$F_{\text{ROH}} = \frac{L_{\text{ROH}}}{L_{\text{AUTO}}} \quad \text{رابطه ۱:}$$

^۸ Linkage disequilibrium

^۹ Quantitative trait locus

که در این فرمول L_{ROH} مجموع ROH در هر حیوان براساس معیارهای گفته شده و L_{AUTO} کل طول ژنوم اتوزومی پوشش داده توسط نشانگرهای SNP است.

F_{ROH} به عنوان نسبتی از ژنوم اتوزوم است که در برگزیده رشته‌های هموزیگوت نشانگرهای ژنتیکی می‌باشد (McQuillan, Leutenegger *et al.*, 2008). در این حالت کروموزوم‌های جنسی به دلیل توزیع متفاوت الگوی IBD^{10} در نظر گرفته نمی‌شوند (Curik, Ferenčaković *et al.*, 2014). بنابراین در این مطالعه کروموزوم‌های جنسی در تمام مراحل برآورد ضرایب هم‌خونی حذف گردید.

اندازه مؤثر جمعیت (Ne)

در این تحقیق بعد از محاسبه عدم تعادل پیوستگی بین جایگاه‌های نشانگری ارزش‌های LD محاسبه شده (r^2) برای برآورد اندازه مؤثر جامعه در طی نسل‌های گذشته استفاده شد (Corbin, Blott *et al.*, 2010). 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, Visscher *et al.*, 2003). و c_t نرخ نوترکیبی است که بر اساس فواصل فیزیکی نشانگرها به دست می‌آید، α فاکتور تصحیح برای جهش (Ohta and 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 and Hill, 1980).

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

که در این رابطه n اندازه نمونه و 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) از فرمول زیر استفاده شد.

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

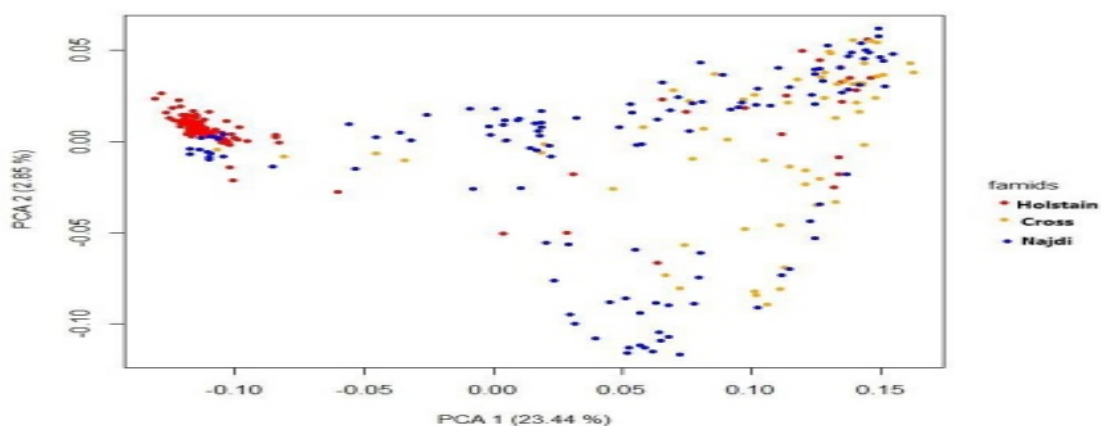
¹⁰ Identical by descent

در این تحقیق از سیستم تعیین Bin برای محاسبه ارزش r^2 در فواصل ۰/۰۱ تا ۱۰ Mb استفاده شد (Barbato, Orozco-terWengel *et al.*, 2015). که LD را در فواصل مختلف و در نتیجه اندازه مؤثر جمعیت را در نسل‌های گذشته از فواصل ۱۰۰۰ تا ۵ نسل قبل منعکس می‌کند. کلیه آنالیزهای انجام شده برای محاسبه اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از نرم‌افزار SNeP v1.1 (Barbato, Orozco-terWengel *et al.*, 2015) و بکارگیری فایل‌های ورودی برنامه Plink v1.07 شامل ped و map انجام شد (Purcell, Neale *et al.*, 2007).

نتایج و بحث

ویرایش داده‌ها

پس از ویرایش و ایمپوتیشن داده‌ها از تعداد ۶۶۲۴۲۸ SNP از ۳۲۹ راس گاو نجدی، هلشتاین و آمیخته‌های حاصل از آن‌ها و پس از حذف ۳۱۲۹ SNP با تست هاردی واینبرگ 10^{-6} و ۶۸۱۱۶ SNP با MAF 0.05 در نهایت ۵۹۱۱۸۱ SNP برای آنالیزهای بعدی باقی ماند.



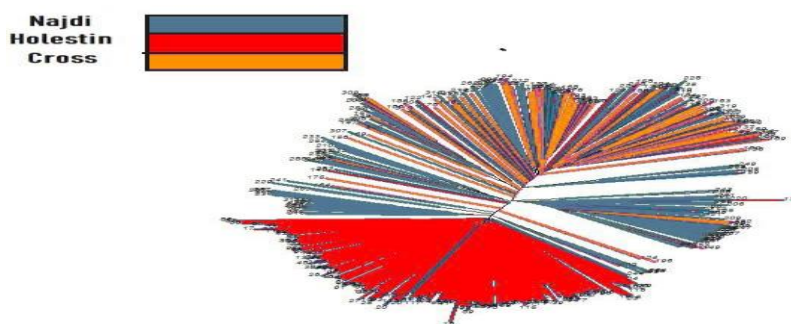
شکل ۱- آنالیز مؤلفه‌های اصلی جمعیت‌های مورد مطالعه هلشتاین، نجدی و آمیخته‌های آن‌ها

Fig 1. Analysis of the main components of the studied populations of Holstein, Najdi and their hybrids

آنالیز لایه‌بندی جمعیت

نتایج آنالیز PCA براساس PCA1 و PCA2 نشان داد که این جمعیت‌ها تا حدودی در گروه‌های نژادی خود از هم تفکیک شدند. این دو PCA در مجموع حدود ۲۱ درصد واریانس (۱۵/۶ درصد برای ویژه بردار یک و ۴/۸۹ درصد برای ویژه بردار دو) را توجیه می‌کنند (شکل ۱). در گونه‌های اهلی از قبیل گوسفند و خوک نیز، حیوانات فقط براساس ویژه بردارهای یک و دو بر اساس نژاد و منطقه جغرافیایی دسته‌بندی شده‌اند (Tellam, Lemay *et al.*, 2009, Kijas, Lenstra *et al.*, 2012).

مطالعه (Consortium, Gibbs *et al.*, 2009) واریانس توجیهی برای PCA1 و PCA2 به ترتیب برابر ۶/۱ و ۳/۷ درصد بود. با همین مقدار تفرق می‌توانیم امیدوار به یافتن نقاطی از ژنوم باشیم که به‌طور معنادار انتخاب شده‌اند. نتایج آنالیز PCA نشان داد که جمعیت‌های خالص نژاد گاو نجدی و گاو هلشتاین بر اساس PCA1 و PCA2 در گروه‌های تقریباً مجزا قرار دارند. در حالیکه آمیخته‌های حاصل از این دو نژاد به صورت پراکنده در بین هر دو گروه قرار دارند که نشان‌دهنده ترکیب ژنوم این دونژاد در آمیخته‌های این نژادها می‌باشد. دو ویژه بردار اول در مجموع ۲۰ درصد از کل واریانس را توجیه می‌کنند که ۱۵/۶٪ مربوط به PCA1 و ۴/۸٪ مربوط به PCA2 بود. در دیگر گونه‌های اهلی از قبیل گوسفند و خوک نیز، حیوانات فقط بر اساس ویژه‌بردارهای یک و دو براساس نژاد و منطقه جغرافیایی دسته‌بندی می‌گردند (Yang, Li *et al.*, 2014). قدم بعد یافتن میزان تعلق تک تک حیوانات مورد مطالعه نسبت به هم به صورت گرافیکی است. در واقع اگر بخواهیم نوعی خوشه‌بندی و قرابت تک تک افراد را بررسی کنیم روش گرافیکی مبتنی بر اتصال همسایه‌ها مناسب است. این روش توسط نمودار درخت همسایگی^{۱۱} با استفاده از اطلاعات ژنوتیپ استخراج شده که به صورت فرمت نوکلئوتیدی ذخیره شده بودند توسط نرم افزار R برای این جمعیت‌ها رسم گردید، که در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- نمودار درخت همسایگی (Plotnj) بین جمعیت‌های هلشتاین، نجدی و آمیخته‌های آن‌ها
Fig 2. Neighbor tree diagram (Plotnj) between Holstein, Najdi populations and their hybrids

در شکل ۲ که نمودار شعاعی (Plotnj) نیز گفته می‌شود هر شعاع نشان دهنده یکی از گاوهای هر جمعیت می‌باشد. گاوهای نجدی که در نمودار فوق به رنگ سبز می‌باشند، یک‌جا تجمع نداشته بلکه در بین شعاع‌های مربوط به آمیخته قرار گرفته‌اند. این امر نشان از اختلاط و تشابه ژنی گاوهای نجدی با آمیخته‌ها دارد که امری طبیعی است بخاطر اینکه نمونه‌های گاو نژاد هلشتاین از جمعیت خالص نژادی نبوده و به عبارت دیگر نمونه خالص نژادی بخاطر آمیخته‌گری‌های بی برنامه با نژادهای اصیل وارداتی عملاً گاو نژاد بومی در دسترس نمی‌باشد. ولی گاوهای هلشتاین که به رنگ آبی نشان داده شده اصیل بوده و خلوص بیشتری دارند. و در این نمودار تجمع بیشتر دارند و به مقدار کمتر با دو جمعیت دیگر اختلاط دارند. یکی از روش‌های بررسی تمایز

¹¹ plotnj

ژنتیکی در جوامع استفاده از فواصل مبتنی بر فراوانی‌های ژنی است. شاید بتوان بزرگترین ایراد این روش را همین وابستگی آن‌ها به فراوانی ژنی دانست (Zhang and Tier, 2009). هر خط نشان دهنده یکی از حیوانات مورد مطالعه می‌باشد. گاوهای هلشتاین که در شکل ۲ به رنگ آبی می‌باشند تجمع یک جایی نداشته بلکه در بین شعاع‌های مربوط به حیوانات آمیخته قرار گرفته‌اند. گاوهای نجدی نیز که به رنگ قرمز می‌باشند در طرف دیگر قرار گرفته‌اند، ولی باز هم با گاوهای آمیخته مخلوط هستند. یکی از دلایل این اختلاط به علت تلاقی‌هایی است که طی سالیان گذشته بین این نژادها اتفاق افتاده است. در کل نتایج این آنالیز نیز مؤید نتایج PCA می‌باشد. مقدار LD در ابتدا برای هر جفت SNP مجاور مورد بررسی قرار گرفت. مقدار LD در ابتدا برای هر جفت SNP مجاور مورد بررسی قرار گرفت. مقدار r^2 به عنوان معیاری از LD استفاده شد، زیرا مناسب‌ترین مقدار از LD برای نشانگرهای دو آللی می‌باشد (Zhao, Nettleton *et al.*, 2007) و نسبت به دیگر آماره‌ها به فراوانی آللی وابستگی کمی دارد (Khatkar, Nicholas *et al.*, 2008). میانگین فاصله فیزیکی بین جفت SNPهای مجاور برای کل ژنوم اتوزومی حدود ۳۶۴Kb برای نژاد هلشتاین، ۲۶۲ Kb برای نژاد نجدی و ۲۷۲ kb برای آمیخته‌ها بود. دامنه r^2 از $0/۳۵۹ \pm 0/۱۵۰$ در کروموزوم ۲۶ تا $0/۴۵۰ \pm 0/۲۴۴$ کروموزوم ۲۰ برای نژاد هلشتاین و $0/۳۱۹ \pm 0/۱۳۰$ کروموزوم ۲۸ تا $0/۴۶۲ \pm 0/۲۷۱$ در کروموزوم ۲۰ در دام‌های آمیخته بود، در حالیکه بالاترین مقدار r^2 در میان کروموزوم‌ها در نژاد نجدی r^2 دامنه $0/۳۱۱ \pm 0/۱۲۰$ کروموزوم ۲۸ تا $0/۴۸۳ \pm 0/۲۷۱$ در کروموزوم ۲۰ مشاهده شد (جدول ۲).

میانگین r^2 در نشانگرهای مجاور برای همه کروموزوم‌های اتوزوم محاسبه و به صورت پلات به عنوان تابعی از فاصله فیزیکی بین نشانگرها نشان داده شد (شکل ۳). سطوح LD جفتی با افزایش فاصله بین SNPها همانطور که در شکل ۳ نشان داده شد، کاهش می‌یابد چنانچه پیداست نرخ کاهش LD در نژاد هلشتاین نسبت به نجدی و آمیخته پایین‌تر است. این نتایج می‌تواند به دلیل نرخ نوترکیبی متغییر بین و درون کروموزوم‌ها، تفاوت در طول کروموزوم، هتروزیگوسیتی، رانش ژنتیکی و اثر انتخاب بین کروموزوم‌ها و نژادها باشد (Qanbari, Pimentel *et al.*, 2010). اثر انتخاب بر LD به جهت، شدت، مدت زمان و پایداری انتخاب در طول زمان بستگی دارد. بررسی عدم تعادل پیوستگی (LD) در بین نژادهای هلشتاین، نجدی و آمیخته‌های حاصل از آن‌ها در این مطالعه نشان دهنده کاهش LD همراه با افزایش فاصله بین جفت SNPها بود (شکل ۳). بیشترین کاهش LD مربوط به نجدی و آمیخته بود و کمترین کاهش مربوط به هلشتاین بود.

برآورد ضریب هم‌خونی بر اساس رشته‌های هموزیگوت نشانگرهای ژنتیکی (ROH)

مجموع ۲۱۷۵۶۸ ROH به دست آمده از جمعیت‌های این مطالعه در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین ROHهای بدست آمده در کوتاه‌ترین گروه با طول کمتر از ۶ Mb طبقه بندی شده است. مجموع نشانه‌ها ROH در جمعیت‌های هلشتاین، نجدی و آمیخته به ترتیب ۱۲۶۰۳۴، ۶۴۵۱۵ و ۲۷۰۱۹ برآورد شد.

جدول ۲- میانگین فاصله (bp)، عدم تعادل پیوستگی (r^2) و انحراف استاندارد (s.d.) بین چند شکلی های تک نوکلئوتیدی مجاور (SNPs) در هر کروموزوم در نژادهای گاو هلشتاین، نجدی و آمیخته های آنها

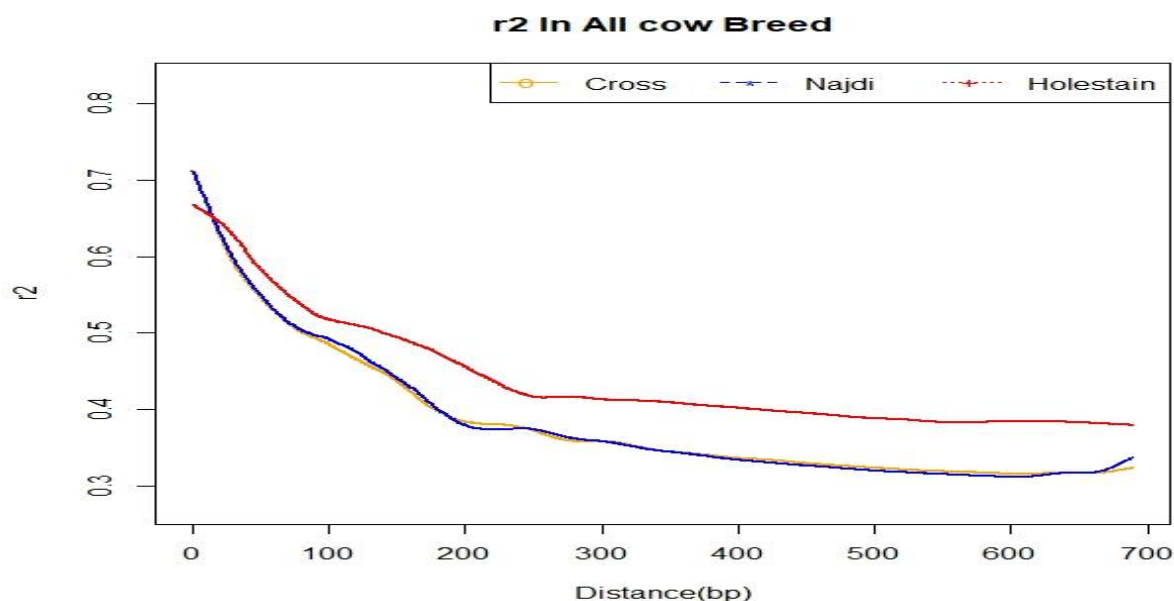
Table 2. Average distance (bp), linkage disequilibrium (r^2) and standard deviation (SD) between adjacent single nucleotide polymorphisms (SNPs) in each chromosome in Holstein, Najdi and their hybrids.

Cross آمیخته		Najdi نجدی		Holstein هلشتاین		کروموزوم
$r^2 \pm$ s.d.	میانگین فاصله (bp) Avg dist (bp)	$r^2 \pm$ s.d.	میانگین فاصله (bp) Avg dist (bp)	$r^2 \pm$ s.d.	میانگین فاصله (bp) Avg dist (bp)	Chromosome
0.398 ± 0.222	270613.97	0.387 ± 0.212	247706.79	0.407 ± 0.195	369125.3	1
0.390 ± 0.215	284262.63	0.398 ± 0.213	275828.08	0.406 ± 0.194	385516.08	2
0.412 ± 0.224	228453.49	0.411 ± 0.227	233188.84	0.410 ± 0.202	352511.09	3
0.333 ± 0.135	323505.15	0.327 ± 0.134	346674.63	0.375 ± 0.162	426693.8	4
0.400 ± 0.214	247139.25	0.409 ± 0.229	221699.38	0.410 ± 0.199	332810.94	5
0.360 ± 0.184	256987.82	0.365 ± 0.190	235169.58	0.379 ± 0.173	367454.33	6
0.340 ± 0.156	339343.47	0.356 ± 0.161	355234.6	0.390 ± 0.172	395189.3	7
0.340 ± 0.153	340603.99	0.341 ± 0.157	313005.75	0.374 ± 0.162	413848.68	8
0.411 ± 0.229	228269.29	0.398 ± 0.215	203417.75	0.407 ± 0.204	345652.69	9
0.324 ± 0.138	334301.12	0.314 ± 0.130	320882.88	0.360 ± 0.151	423095.97	10
0.331 ± 0.147	334715.17	0.330 ± 0.146	306931.49	0.379 ± 0.166	401719.78	11
0.332 ± 0.145	341781.46	0.330 ± 0.145	329409.28	0.380 ± 0.168	393548.3	12
0.347 ± 0.145	360581.73	0.335 ± 0.136	366402.03	0.400 ± 0.167	391818.05	13
0.338 ± 0.152	301692.89	0.339 ± 0.152	314497.85	0.376 ± 0.159	355586.37	14
0.380 ± 0.207	255538.51	0.390 ± 0.217	222566.85	0.394 ± 0.186	372363.68	15
0.440 ± 0.257	183288.75	0.420 ± 0.242	196036.64	0.426 ± 0.219	320306.23	16
0.335 ± 0.151	292029.76	0.353 ± 0.167	279710.19	0.382 ± 0.162	398745.46	17
0.367 ± 0.176	221345.49	0.359 ± 0.174	215687.45	0.394 ± 0.172	316046.78	18
0.391 ± 0.205	230873.33	0.382 ± 0.194	213834.69	0.418 ± 0.195	319230.45	19
0.462 ± 0.271	161547.3	0.483 ± 0.271	149011.81	0.450 ± 0.244	281812.37	20
0.384 ± 0.203	222604.03	0.402 ± 0.207	248472.47	0.395 ± 0.190	322762.05	21
0.321 ± 0.131	316386.27	0.318 ± 0.127	307752.62	0.373 ± 0.154	390667.71	22
0.434 ± 0.239	182624.69	0.448 ± 0.246	174578.92	0.427 ± 0.208	285235.55	23
0.340 ± 0.159	282076.36	0.342 ± 0.166	286405.33	0.376 ± 0.167	369848.03	24
0.342 ± 0.153	260390.23	0.337 ± 0.152	226134.78	0.377 ± 0.159	333984.69	25
0.328 ± 0.146	305545.37	0.330 ± 0.154	301584.07	0.359 ± 0.150	377453.94	26
0.326 ± 0.129	294061.29	0.323 ± 0.138	255515.62	0.369 ± 0.156	376919.13	27
0.319 ± 0.130	339748.76	0.311 ± 0.120	323960.45	0.365 ± 0.155	375221.68	28
0.353 ± 0.155	267195.94	0.345 ± 0.146	267663.36	0.382 ± 0.169	345984.46	29
0.373 ± 0.195	271318.93	0.375 ± 0.197	262489.84	0.394 ± 0.183	364429.6	Average میانگین

تعداد نشانه‌های ROH در گروه بیش از ۴۸ MB در جمعیت‌های هلشتاین، نجدی و آمیخته به ترتیب ۱۶، ۵۲ و ۲۵ بود. با استفاده از $\text{threshold}=0.7$ برای پخش کردن ROHها بین هر جمعیت‌ها، ۲۴ پیک در جمعیت هلشتاین پیدا شد، ۹ پیک در جمعیت آمیخته و ۹ پیک در جمعیت نجدی شناسایی شد. شکل (۴).

شکل ۳- نقشه فرسایش LD محاسبه شده به روش r^2 بین جفت SNPهای مجاور در مقابل فاصله نشانگری در تمام کروموزوم‌ها

Fig 3 Map of LD erosion calculated by r^2 method between pairs of adjacent SNPs versus marker distance in all chromosomes

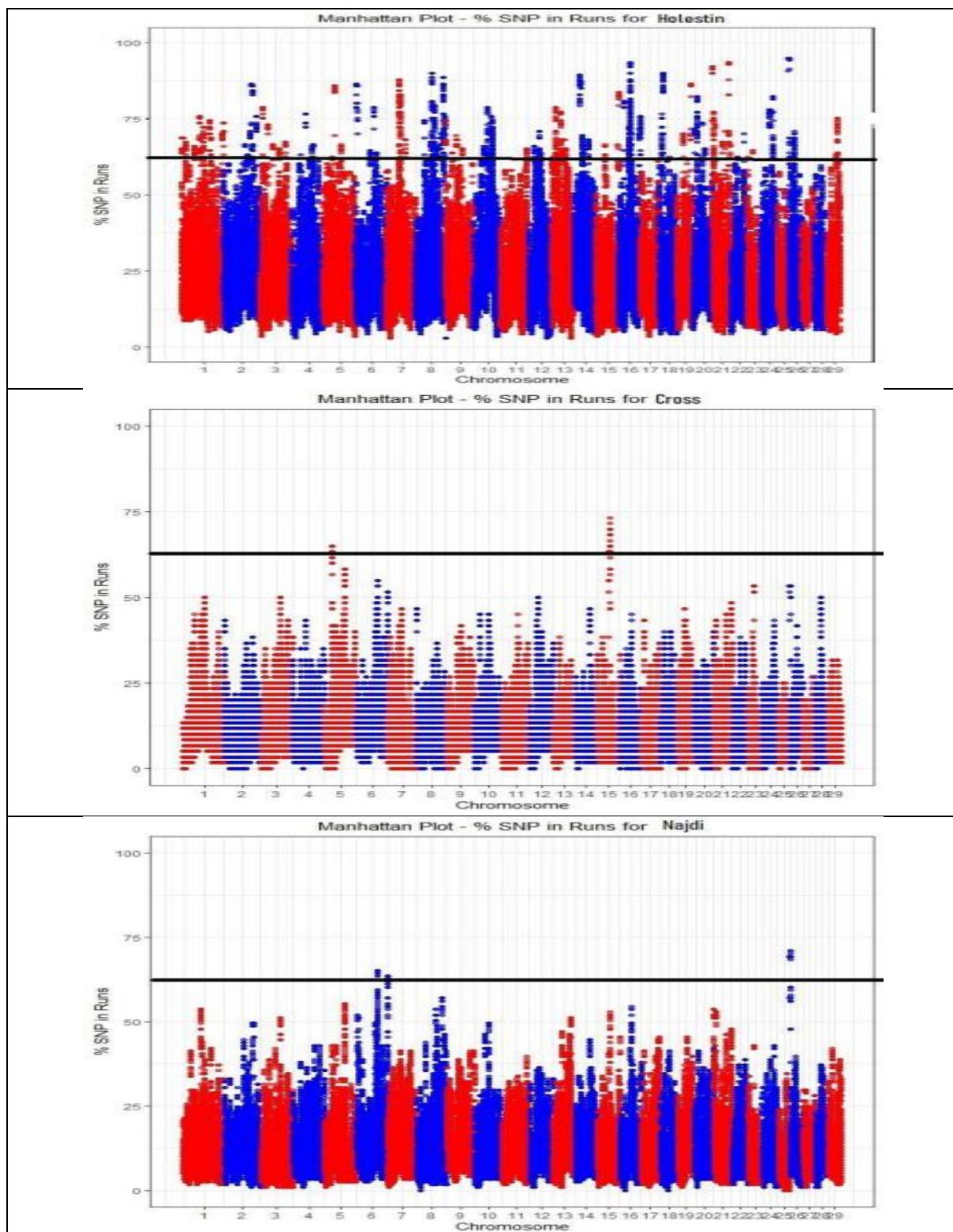


جدول (۳) میزان ROH های برآورد شده جمعیت‌های مورد مطالعه در فواصل مختلف ژنومی

Table 3. The amount of estimated ROHs of the studied populations in different genomic distances

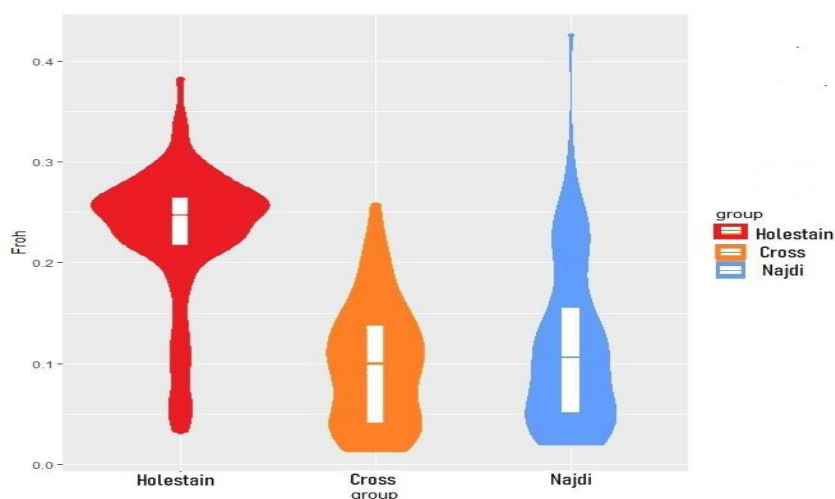
هلشتاین Holstien	نجدی Najdi	آمیخته Cross	طول هر گروه The length of each group
124650	64197	26926	0-6 Mb
858	163	35	6-12 Mb
387	68	15	12-24 Mb
123	35	15	24-48Mb
16	52	25	>48 Mb
1206034	54515	27019	جمع

هم‌خونی ژنومیکی بر اساس $ROH(F_{ROH})$ برای جمعیت‌های مورد مطالعه به طور جداگانه محاسبه شد. برآورد هم‌خونی ژنومیکی شبیه جمعیت‌های دیگر در حد ۲۵ درصد برای گاو هلشتاین، ۱۰ درصد برای گاو آمیخته و ۱۲ درصد برای گاو نجدی برآورد شد (شکل ۵).



شکل ۴- نمودار منتهن ROHهای برآورد شده به تفکیک در جمعیت های مختلف که $\text{threshold}=60$ در نظر گرفته شده
Fig 4. Manhattan diagram of estimated ROHs separately in different populations where $\text{threshold}=60$ is considered

مطالعات پیشین در ارتباط با ROH در انسان (Kirin, McQuillan *et al.*, 2010) و در جمعیت گاوها (Ferenčaković, Hamzić *et al.*, 2013) گزارش نموده‌اند که تعداد ROH‌های با طول بلند کمتر از ROH‌های با طول کوتاه هستند. قطعات کوتاه ROH در جمعیت هلشتاین ایران (۶M) بیانگر هم‌خونی است که طی ۱۲/۵ نسل پیش (حدود ۷۵ سال پیش) بوجود آمده است. یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که توده گاو نجدی نیز هر دو تجربه هم‌خونی در سال‌های اخیر و گذشته را داشته است.



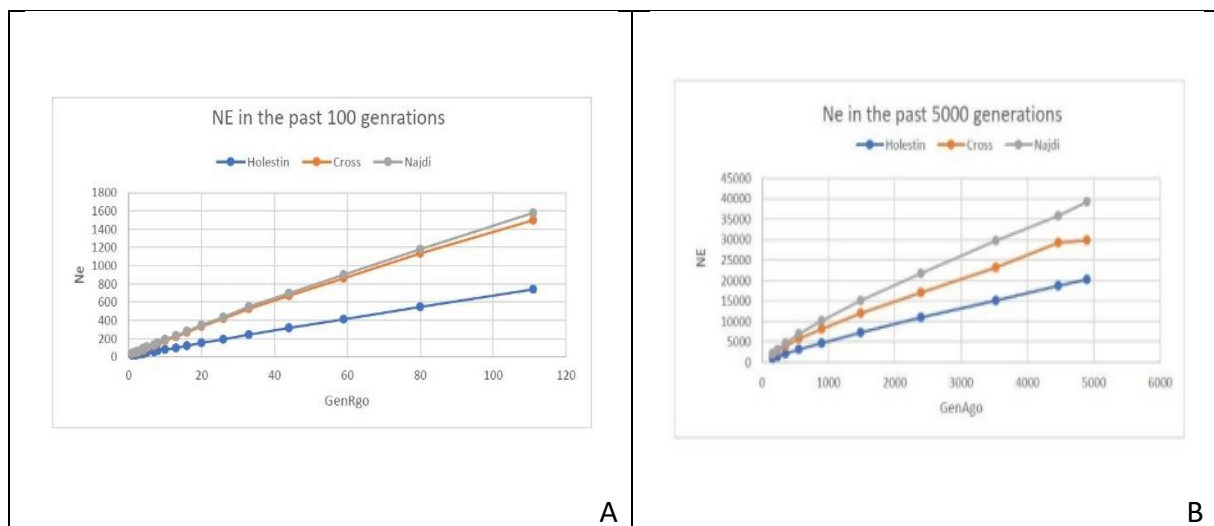
شکل ۵- نمودار F_{ROH} برآورد شده به تفکیک جمعیت‌های مورد مطالعه

Fig 5. F_{ROH} diagram estimated by the concentration of the studied populations

اندازه مؤثر جمعیت

جلوگیری از کاهش تنوع ژنتیکی و حفظ بقای یک جمعیت نیازمند برآورد صحیح اندازه مؤثر جمعیت است. براساس پیشنهاد Franklin (1980) به منظور جلوگیری از بروز ضعف ناشی از هم‌خونی در کوتاه مدت (حدود ۵ نسل) در یک جمعیت باید بیشتر از ۵۰ فرد باشد. همچنین در دراز مدت باید N_e بیشتر از ۵۰۰ فرد باشد تا تنوع ژنتیکی و بقای طولانی مدت جمعیت تضمین شود. این پیشنهاد در اصطلاح با عنوان قانون سرانگشتی (پنجاه به پانصد) شناخته شده است. اخیراً این قانون، بازبینی و پیشنهاد شده است که N_e کوتاه مدت حداقل ۱۰۰ فرد باشد تا نسبت هم‌خونی طی پنج نسل کمتر از ۱۰ درصد باشد و N_e دراز مدت باید حداقل برابر با ۱۰۰۰ فرد باشد تا بتوان پتانسیل تکاملی جمعیت را در دراز مدت حفظ کرد (Frankham, Bradshaw *et al.*, 2014). مقدار اندازه مؤثر جمعیت‌ها در نسل پنج برای جمعیت‌های این مطالعه، نجدی ۴۵ راس، آمیخته ۱۰۱ راس و هلشتاین ۱۱۰ راس به دست آمد. این اعداد برای گاو نجدی برای مقادیر پیشنهاد شده جهت حفاظت از جمعیت‌ها فاصله زیادی دارد و این امر نشان‌دهنده خطر جدی حذف گاو بومی نجدی در آینده نزدیک است. تمایل نداشتن روستاییان به پرورش گاوهای

بومی به دلیل اقتصادی نبودن سطح تولید آن‌ها در مقایسه با نژادهای خارجی موجب کاهش شدید جمعیت این گاوها در سال‌های اخیر شده است. از سوی دیگر تلاقی‌های کنترل نشده میان نژادهای وارداتی با گاوهای نجدی خلوص این نژاد را با چالش جدی روبه‌رو کرده است. از این رو تدوین برنامه‌هایی برای حفاظت از گاوهای خالص باقی‌مانده، ضروری به نظر می‌رسد. برای حفظ این نژاد در زیست بوم طبیعی آن، تعریف یک سیستم تولیدی اقتصادی جهت گاوهای بومی ضروری است. به عبارت دیگر پرورش گاوهای بومی تنها زمانی اقتصادی خواهد بود که در مکان‌هایی با شرایط مرتعی مناسب و بر اساس سیستم چرا یا مبتنی بر استفاده از پسماندهای برداشت غلات صورت پذیرد. همچنین سوق دادن اهداف پرورش به سمت تولید گوشت می‌تواند توجه اقتصادی بیشتری به همراه داشته باشد. کنترل تلاقی‌ها و شناسایی دام‌های خالص نیز باید مورد توجه جدی قرار گیرد. حفاظت در خارج از زیست بوم می‌تواند از طریق ایجاد بانک ژن مورد توجه قرار گیرد. در این زمینه استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌تواند در شناسایی دام‌های خالص موثر باشد. همچنین استفاده از نشانگرهای SNP جهت محاسبه روابط ژنتیکی میان حیوانات و حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها قابل توصیه است (Engelsma, Veerkamp *et al.*, 2014). از آنجا که در بیشتر دام‌های بومی کشور، داده‌های شجره‌ای و اطلاعات سرشماری شده صحیحی یافت نمی‌شود، استفاده از نشانگرهای متراکم SNP می‌تواند جایگزین مناسبی برای بررسی خصوصیات ژنتیکی این جمعیت‌ها باشد.



شکل ۶- روند تغییر اندازه مؤثر جمعیت (Ne) در طی نسل‌های گذشته (a) فاصله بین ۱۰۰-۰ نسل (b) فاصله بین ۵۰۰۰-۰ نسل

Fig 6. The trend of effective population size change (Ne) during the past generations a) distance between 0-100 generations b) distance between 0-5000 generations

نتیجه گیری کلی

اندازه مؤثر جمعیت در نژاد نجدی بسیار کم (۴۶ راس) برآورد شد. حفظ ماهیت ژنتیکی این نژاد ارزشمند در دوره‌های کوتاه

مدت و بلند مدت دچار مخاطره جدی شده است. کاهش اندازه موثر موجب افزایش حساسیت این جمعیت به تغییرات محیطی پیش رو خواهد شد. از این رو لازم است با بکارگیری راهکارهایی نظیر شناسایی و پرورش گاوهای خالص، اقتصادی کردن سیستم تولیدی، کنترل تلاقی‌گری‌ها و ایجاد بانک‌های ژنی برای حفاظت از این نژاد برنامه‌ریزی شود.

منابع

- Aminafshar, M., Amirinia, C. & Torshizi, R. V. (2008).** Genetic diversity in buffalo population of guilan using microsatellite markers. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7: 1499-1502.
- Barazandeh, A., Mohammadabadi, M., Ghaderi-Zefrehei, M. & Nezamabadi-Pour, H. (2016).** Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech Journal of Animal Science* 61(11): 487-495.
- Barazandeh, A., Mohammadabadi, M., Ghaderi-Zefrehei, M. & Nezamabadi-Pour, H. (2016).** Predicting CpG islands and their relationship with genomic feature in cattle by hidden markov model algorithm. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 6(3): 571-579.
- Barazandeh, A., Mohammadabadi, M., Ghaderi-Zefrehei, M., Rafeie, F., & Imumorin, I. G. (2019).** Whole genome comparative analysis of CpG islands in camelid and other mammalian genomes. *Mammalian Biology* 98: 73-79.
- Barbato, M., Orozco-terWengel, P., Tapio, M. & Bruford, M. W. (2015).** SNeP: a tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data. *Frontiers in genetics* 6: 109.
- Barton, N. H. & Charlesworth, B. (1998).** Why sex and recombination? *Science* 281(5385): 1986-1990.
- Biscarini, F., Cozzi, P., Gaspa, G. & Marras, G. (2018).** detectRUNS: Detect runs of homozygosity and runs of heterozygosity in diploid genomes. IBBA-CNR, PTP, Università degli Studi di Sassari, University of Guelph.
- Bordbar, F., Mohammadabadi, M., Jensen, J., Xu, L., Li, J. & Zhang, L. (2022).** Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing analyses. *Animals* 12(9): 1103.
- Caballero, A. (1994).** Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* 73(6): 657-679.
- Chen, W. & Dorman, K. (2013).** Phyclus: Phylogenetic Clustering (Phyloclustering).
- Consortium, B. H., Gibbs, R. A., Taylor, J. F., Van Tassell, C. P., Barendse, W., Eversole, K. A., Gill, C. A., Green, R. D., Hamernik, D. L. & Kappes, S. M. (2009).** Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science* 324(5926): 528-532.
- Corbin, L. J., 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.
- Curik, I., Ferenčaković, M., Karapandza, N., Cubric-Curik, V. & Sölkner, J. (2014).** "Estimation of inbreeding and effective population size in Istrian cattle using molecular information. *Acta Agraria Kaposváriensis* 18(1): 30-34.
- Engelsma, K., Veerkamp, R., Calus, M. & Windig, J. (2014).** Consequences for diversity when animals are prioritized for conservation of the whole genome or of one specific allele. *Journal of animal Breeding and genetics* 131(1): 61-70.
- Espigolan, R., Baldi, F., Boligon, A. A., Souza, F. R., Gordo, D. G., Tonussi, R. L., Cardoso, D. F., Oliveira, H. N., Tonhati, H. & Sargolzaei, M. (2013).** Study of whole genome linkage disequilibrium in Nelore cattle. *BMC genomics* 14: 1-8.
- Ferenčaković, M., Hamzić, E., Gredler, B., Solberg, T., Klemetsdal, G., Curik, I. & Sölkner, J. (2013).** Estimates of autozygosity derived from runs of homozygosity: empirical evidence from selected cattle populations. *Journal of animal Breeding and genetics* 130(4): 286-293.

- Flury, C., Tapio, M., Sonstegard, T., Drögemüller, C., Leeb, T., Simianer, H., Hanotte, O. & Rieder, S. (2010).** Effective population size of an indigenous Swiss cattle breed estimated from linkage disequilibrium. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 127(5): 339-347.
- Frankham, R., Bradshaw, C. J. & Brook, B. W. (2014).** Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* 170: 56-63.
- García-Gómez, E., Sahana, G., Gutiérrez-Gil, B. & Arranz, J. (2012).** Linkage disequilibrium and inbreeding estimation in Spanish Churra sheep. *BMC genetics* 13: 1-11.
- 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(4): 635-643.
- Holsinger, K. E. & Weir, B. S. (2009).** Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* 10(9): 639-650.
- Karlsson, E. K., Baranowska, I., Wade, C. M., Salmon Hillbertz, N. H., Zody, M. C., Anderson, N., Biagi, T. M., Patterson, N., Pielberg, G. R. & Kulbokas III, E. J. (2007).** Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nature genetics* 39(11): 1321-1328.
- Khatkar, M. S., Nicholas, F. W., Collins, A. R., Zenger, K. R., Cavanagh, J. A., Barris, W., Schnabel, R. D., Taylor, J. F. & Raadsma, H. W. (2008).** Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. *BMC genomics* 9(1): 1-18.
- Kijas, J. W., Lenstra, J. A., Hayes, B., Boitard, S., Porto Neto, L. R., San Cristobal, M., Servin, B., McCulloch, R., Whan, V. & Gietzen, K. (2012).** Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS biology* 10(2): e1001258.
- Kijas, J. W., Porto-Neto, L., Dominik, S., Reverter, A., Bunch, R., McCulloch, R., Hayes, B. J., Brauning, R., McEwan, J. & Consortium, I. S. G. (2014).** Linkage disequilibrium over short physical distances measured in sheep using a high-density SNP chip. *Animal Genetics* 45(5): 754-757.
- Kijas, J. W., Townley, D., Dalrymple, B. P., Heaton, M. P., Maddox, J. F., McGrath, A., Wilson, P., Ingersoll, R. G., McCulloch, R. & McWilliam, S. (2009).** A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. *PloS one* 4(3): e4668.
- Kirin, M., McQuillan, R., Franklin, C. S., Campbell, H., McKeigue, P. M. & Wilson, J. F. (2010).** Genomic runs of homozygosity record population history and consanguinity. *PloS one* 5(11): e. 13996.
- Lynch, M., Conery, J. & Burger, R. (1995).** Mutation accumulation and the extinction of small populations. *The American Naturalist* 146(4): 489-518.
- McQuillan, R., Leutenegger, A.-L., Abdel-Rahman, R., Franklin, C. S., Pericic, M., Barac-Lauc, L., Smolej-Narancic, N., Janicijevic, B., Polasek, O. & Tenesa, A. (2008).** Runs of homozygosity in European populations. *The American journal of human genetics* 83(3): 359-372.
- Meadows, J. R., Chan, E. K. & Kijas, J. W. (2008).** Linkage disequilibrium compared between five populations of domestic sheep. *BMC genetics* 9(1): 1-10.
- Meuwissen, T. and M. E. Goddard (2000).** Fine mapping of quantitative trait loci using linkage disequilibria with closely linked marker loci. *Genetics* 155(1): 421-430.
- Meuwissen, T. H., Hayes, B. J. & Goddard, M. (2001).** Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157(4): 1819-1829.
- Moradian, H., Esmailzadeh Koshkoiyeh, A., Mohammadabadi, M. & Asadi Fozzi, M. (2020).** Whole genome detection of recent selection signatures in Sarabi cattle: a unique Iranian taurine breed. *Genes & genomics* 42: 203-215.
- Mohamadi ahvazi, G., Nazari, M., Mohamadabadi, M. R. & Heidari, R. (2019).** Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial HVR1 region in three breeds of Iranian sheep. *Modern Genetic journal* 14 (3): 211-219
- Nazari, M. & Mohamadi Ahvazi, G. (2022).** Genetic and phylogenetic analysis of mitochondrial D-loop HVR I region in three breeds of native sheep Iran (Taleshi, Shal and Makui). *Veterinary Research & Biological Products* 35(1): 31-39.
- Ohta, T. & Kimura, M. (1971).** Linkage disequilibrium between two segregating nucleotide sites under the steady flux of mutations in a finite population. *Genetics* 68(4): 571.

- Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. (2004).** APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20(2): 289-290.
- Porto-Neto, L. R., Kijas, J. W. & Reverter, A. (2014).** The extent of linkage disequilibrium in beef cattle breeds using high-density SNP genotypes. *Genetics Selection Evolution* 46: 1-5.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P. I. & Daly, M. J. (2007).** PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American journal of human genetics* 81(3): 559-575.
- Purfield, D. C., Berry, D. P., McParland, S. & Bradley, D. G. (2012).** Runs of homozygosity and population history in cattle. *BMC genetics* 13: 1-11.
- Qanbari, S., Pimentel, E., Tetens, J., Thaller, G., Lichtner, P., Sharifi, A. & Simianer, H. (2010).** A genome-wide scan for signatures of recent selection in Holstein cattle. *Animal genetics* 41(4): 377-389.
- Rohipoor M, Nazari M, Beigi Nassiri M T. (2019).** Genetic and Phylogenetic Analysis of Adani Goat Population Based on Cytochrome B Gene. *Research on Animal Production* 10(26): 84-89.
- Rao, Y. S., Liang, Y., Na Xia, M., Shen, X., Jun Du, Y., Glong Luo, C., Hua Nie, Q., Zeng, H. & Quan Zhang, X. (2008).** Extent of linkage disequilibrium in wild and domestic chicken populations. *Hereditas* 145(5): 251-257.
- Robertson, A. (1961).** Inbreeding in artificial selection programmes. *Genetics Research* 2(2): 189-194.
- Sved, J. (1971).** Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theoretical population biology* 2(2): 125-141.
- Tellam, R. L., Lemay, D. G., Van Tassell, C. P., Lewin, H. A., Worley, K. C. & Elvik, C. G. (2009).** Unlocking the bovine genome. *BMC genomics* 10: 1-4.
- 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(3): 609-614.
- VanRaden, P., Van Tassell, C., Wiggans, G., Sonstegard, T., Schnabel, R., Taylor, J. & Schenkel, F. (2009).** Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *Journal of dairy science* 92(1): 16-24.
- Wang, J. (2005).** Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1459): 1395-1409.
- Weir, B. & Hill, W. G. (1980).** Effect of mating structure on variation in linkage disequilibrium. *Genetics* 95(2): 477-488.
- Yang, S., Li, X., Li, K., Fan, B. & Tang, Z. (2014).** A genome-wide scan for signatures of selection in Chinese indigenous and commercial pig breeds. *BMC genetics* 15: 1-9.
- Zhang, Y. & Tier, B. (2009).** Population stratification, not genotype error, causes some SNPs to depart from Hardy-Weinberg Equilibrium. *Proceedings of the 18th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics*. Barossa Valley, South Australia. September, Citeseer.
- Zhao, H., Nettleton, D. & Dekkers, J. C. (2007).** Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms. *Genetics Research* 89(1): 1-6.