شناسایی هاپلوگروه‌های مادری جمعیت اسب‌های استان اردبیل با استفاده از ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی

- **مصطفی عمری‌کولانکوه**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
- **نعمت هدایت‌ایوریق***: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
- **آزاده بوستان**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی، مغان، ایران
- **رضا سیدشریفی**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
- **وحید واحدی**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی، مغان، ایران
- **رضا خلخالی**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی، مغان، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷

چکیده

حفظ نژادهای بومی از اهداف مهم اصلاح نزادی محسوب می‌شود و جهت شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیت باقی‌مانده اساس حفظ نژادی است. لذا این پژوهش با هدف بررسی ساختار ژنتیکی اسب‌های استان اردبیل و مقایسه با دیگر نژادهای خارجی با استفاده از ناحیه کنترل (D- loop) ژنوم میتوکندریایی انجام گرفت. جهت انجام آزمایش DNA ژنومی استخراج و مستقیماً پس از تکثیر ۴۳۰ جفت بازی از ناحیه کنترل با استفاده از روش سنگر از ۱۰۰ رأس اسب بومی مربوط به استان اردبیل توالی‌یابی گردید. آنالیز توالی‌ها منجر به شناسایی ۴۳جایگاه چندشکلی شد که منجر به ایجاد ۴۰ هاپلوتیپ مختلف گردید که براساس هاپلوگروه‌های شناسایی شده در ۹ هاپلوگروه (A، B، C، G ، I، L، M، P وQ) قرار گرفتند. مقدار تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتیپ و D تاجیما در اسب‌های بومی استان اردبیل به‌ترتیب ۰/۰۲۴۱۲، ۰/۸۷۷ و۰/۵۷۱- به‌دست آمد. میزان Dتاجیما انحراف معنی‌داری را نشان نداد. نتایج این مطالعه نشان داد که خط مادری در اسب‌های اردبیل از تنوع بالایی برخوردار است.

کلمات کلیدی: اسب بومی، هاپلوتیپ، تنوع نوکلئوتیدی، تنوع ژنتیکی، ژنوم میتوکندریایی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Nhedayat@uma.ac.ir

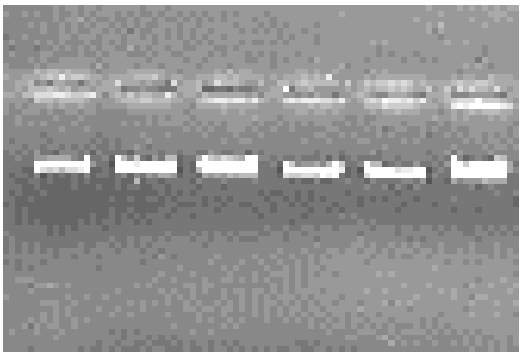
مقدمه

اسب نقش اساسی در پیشرفت جامعه بشری داشته است. منشأ و تاریخ اهلی‌شدن اسب چندین‌دهه در زیست‌شناسی و باستان‌شناسی مورد مطالعه قرار گرفته است. دانشمندان بر این عقیده هستند که اهلی‌شدن اسب به‌طور گسترده از چندین جمعیت وحشی ۴۰۰۰ الی ۶۰۰۰ سال پیش اتفاق افتاده است(Zhang و همکاران، ۲۰۱۲). بررسی ژنوم میتوکندریایی اسب اهلی و تعیین ۱۷ هاپلوگروه متفاوت، نشان داد که اهلی کردن اسب وحشی، در طی فرآیندی که چندین هزار سال (در طی دوره نوسنگی) به طول انجامید، در مناطق مختلف جهان و به مرکزیت اورآسیای غربی(Warmuth و همکاران،۲۰۱۲) صورت گرفته است. شواهد باستان‌شناسی (Outram و همکاران، ۲۰۰۹) نیز تا حدودی مؤید این یافته‌ها است. هرچند شواهدی نیز دال بر اهلی کردن اسب در غرب اروپا وجود دارد (Achilli و همکاران، ۲۰۱۲). سرزمین پهناور ایران مهد پرورش و مبدأ نژادهای گوناگون اسب است. از هزاران سال پیش تاکنون در نزد ایرانیان، اسب به‌عنوان موجودی مفیدمطرح بوده است. امروزه در ایران از اسب، معمولاً برای سوارکاری، سرگرمی، مسابقات شهرستانی و اسب درمانی استفاده می‌شود. اسب درمانی دو شاخهٔ اصلی دارد که یکی کمک به روان درمانی و دیگری کمک به توسعهٔ مهارت‌های ارتباطی شخصی است(صارمیانفر و همکاران، ۱۳۹۴) و حمل و نقل در مناطق روستایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. براساس آمار فائو (۲۰۱۴)، در ایران حدود ۱۴۰ هزار رأس اسب وجود دارد و جمعیت‌های مختلف اسب ایرانی برحسب مناطق پراکنش یا اقوام پرورش‌دهنده آن‌ها نام‌گذاری می‌شوند. بدین‌ترتیب که اسب‌های قره‌باغ در شمال‌غرب ایران و جمهوری آذربایجان، اسب‌های ترکمن در شمال‌شرق، اسب‌های کرد در غرب و مرکز، اسب‌های دره شوری یا قشقایی در مرکز و جنوب‌غرب، اسب‌های عرب ایران در غرب و جنوب غرب، اسب‌های سیستانی در شرق و جنوب‌شرق و اسب‌های کاسپین و تالشی در شمال کشور پراکند شده‌اند (Fotovati، ۲۰۰۰). مناطق مختلف استان اردبیل به‌دلیل تاریخی و کوهستانی‌بودن و وجود عشایر کوچ‌نشین دارای اسب‌های متنوع از لحاظ فنوتیپی است. متأسفانه در قرن حاضر جمعیت بسیاری از نژادهای اسب موجود در دنیا کاهش یافته و در این میان جمعیت اسب‌های قره‌باغ ایران به‌دلیل نگهداری غیراصولی‌ونادرست،بی‌توجهی به نحوه تولیدمثل و نبود مرکز پرورشی مناسب، سیر نزولی پیداکرده و در معرض انقراض قرارگرفته است. علی‌رغم‌وجود جمعیت‌های‌مختلف اسب‌بومی‌در‌ایران تاکنون مطالعات ژنتیکی محدودی در این جمعیت‌ها صورت گرفته است. ازجمله این مطالعات می‌توان به مطالعه Moridi و همکاران (۲۰۱۲) اشاره نمود که محققان در آن با استفاده از نشانگر میتوکندریایی D-loop تنوع ژنتیکی پنج جمعیت اسب بومی ایران شامل اسب عرب، اسب کرد، اسب ترکمن، اسب سیستانی و اسب کاسپین را مورد بررسی قرار دادند. ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی با توجه به نرخ جهش بالا، عدم نوترکیبی و ارث‌بری مادری یک نشانگر قدرتمند در مطالعات فیلوژنتیک و فیلوجئوگرافیک به‌حساب می‌آید (Cardinali و همکاران، ۲۰۱۶). DNA میتوکندریایی اسب به‌طول ۱۶,۶۶۰ جفت باز است و از یک منطقه کدکننده ۳۷ ژن و غیرکدکننده منطقه D-Loop حدود ۱۱۹۲ جفت باز است (Bowling و همکاران، ۲۰۰۰). مطالعات بر روی ژنوم میتوکندریایی‌اسب نشان می‌دهد که این ژنوم به‌ویژه همراه با اطلاعات تاریخی (Głażewska و همکاران، ۲۰۱۰)، یک ابزار قدرتمند برای شناسایی روابط خویشاوندی بین نژادی و درون‌نژادی می‌باشد(Hill و همکاران، ۲۰۰۲؛Khanshour و همکاران، ۲۰۱۳؛ Kefena و همکاران، ۲۰۱۴). Głażewska (۲۰۰۸) تنوع ژنتیکی اسب عرب لهستانی را با استفاده از اطلاعات شجره و نشانگر میتوکندریایی D- loop بررسی کردند. با آنالیز ۴۵۸جفت باز از ناحیه D- loop، ۳۲ جایگاه چندشکلی را شناسایی کردند که منجر به ایجاد ۱۴ هاپلوتیپ شد. مطالعات محدود در زمینه بررسی خط مادری اسب‌های ایرانی به‌خصوص در مورد جمعیت اسب‌های استان اردبیل ما را بر این داشت تا در این تحقیق، با مقایسه ناحیه کنترل(D-loop) ژنوم میتوکندریایی در جمعیت اسب‌های استان اردبیل، به بررسی جایگاه‌های نوکلئوتیدی متغیر، تنوع و ساختار ژنتیکی و ارتباط ژنتیکی اسب‌ها با برخی از جمعیت‌های دیگر جهان بپردازیم. با انجام این تحقیق و با استفاده از مقادیر شاخص تثبیت جمعیت‌های موجود، به‌میزان شباهت ژنتیکی و نحوه تلاقی‌های صورت گرفته پی برده می‌شود که می‌توان با آگاهی از ساختار ژنتیکی این حیوانات برنامه‌های اصلاح نژادی مناسبی را در این جمعیت‌ها جهت حفظ تنوع‌ژنتیکی مطلوب در جمعیت و جلوگیری از افزایش هم‌خونی به‌کار برد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA: برای اجرای این تحقیق نمونه خون از ۱۰۰ رأس از اسب‌های مختلف استان (شامل ۵۶ نریان و ۴۴ مادیان) اردبیل شامل اسب‌های مناطق دهستان غربی استان اردبیل (۵۶ نمونه)، باشگاه‌های اسب سواری (۳۴ نمونه) و اسب‌های مناطق شهرستان بیله‌سوار (۱۰ نمونه) جمع‌آوری شدند. کلیه نمونه‌های خون از سیاهرگ گردنی اسب تهیه شده و تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. کل محتوای DNA با استفاده از روش کیت استخراج DNA از خون پستانداران شرکت Exgene استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به‌روش ژل اگارز ۰/۸درصد با استفاده از دستگاه الکترو فوز سنجیده شد (شکل۱). هم‌چنین جهت

تعیین هاپلوگروه برای جمعیت اسب‌های مورد مطالعه، ۸۰ توالی‌یابی متعلق به ۱۸ هاپلوگروه (A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N,O,P,Q,R) که در مطالعه Achili و همکاران (۲۰۱۲) برای جمعیت اسب‌های مختلف جهان مشخص شده بود با کد دسترسی JN398457الی N398377 از بانک ژن دریافت شد.



شکل۱: کیفیت DNA ژنومی استخراجی در جمعیت اسب‌های استان اردبیل

تکثیر جایگاه ناحیه کنترل (D-loop) ژنوم میتوکندریایی: در تحقیق حاضر و به‌منظور تکثیر قطعه ۴۳۰ جفت بازی ناحیه D-loop از آغازگرهای به‌کار برده شده در مطالعه Takasuو همکاران (۲۰۱۴) استفاده گردید. توالی آغازگرها به‌شرح زیر بود:

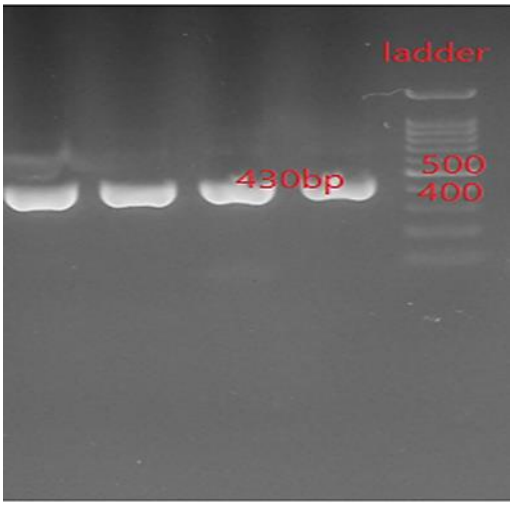
forward: 5′ CTAGCTCCACCATCAACACC-3′
reverse: 5′-ATGGCCCTGAAGAAAGAACC-3′

واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مواد master mix، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر رفت، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل شده و ۲/۵ میکرولیتر DNA انجام شدند. تمام واکنش‌های PCR با استفاده از برنامه استاندارد شامل ۱۰ دقیقه واسرشت‌سازی آغازین در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه در دمای اتصال ۶۳ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بسط اولی و در نهایت تکثیر نهایی به مدت ۱۰دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس محصولات PCR به‌دست آماده با استفاده از ژل اگارز ۱/۵درصد ارزیابی شد. کل نمونه‌های PCR از طریق شرکت زیست‌فناوری پیشگام خالص سازی و با استفاده از روش سنگر توالی‌یابی گردید.

آنالیز توالی‌های میتوکندریایی: کیفیت توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas موردبررسی قرار گرفت و نواحی دارای کیفیت پایین ویرایش گردید. سپس توالی‌های به‌دست آمده جهت اطمینان و بررسی دقت ابتدا از طریق ابزار Blast در وب‌سایت NCBI مورد تأیید قرار گرفت. بعداز تأیید تمام توالی‌ها جهت شناسایی چندشکلی‌های موجود از طریق الگوریتم Clustal W بااستفاده از نرم‌افزار MEGA ۶,۰ (Tamura و همکاران، ۲۰۱۱) هم‌تراز گردید. درخت فیلوژنتیکی با بیش‌ترین درست‌نمایی و مدل کیمورادو پارامتری و بوت استراپ ۱۰۰۰ با استفاده از نرم‌افزار MEGA۶,۰ ترسیم گردید. برای شناسایی هاپلوتیپ‌ها و آماره تاجیما D و هم‌چنین تعیین پارامترهای تمایز ژنتیکی و فاصله ژنتیکی از نرم‌افزار DNAsp ۶,۰ استفاده شد (Rozas و همکاران، ۲۰۰۹). جهت آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپ‌های به‌دست‌آمده از نرم‌افزار Network V ۴,۶,۱,۲ استفاده شد (Bandelt و همکاران، ۱۹۹۹).

نتایج

قطعه ۴۳۰ جفت بازی ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با کیفیت عالی تکثیر گردید (شکل۲). سپس تمامی نمونه‌ها مورد توالی‌یابی سنگر قرار گرفتند که همه توالی‌یابی‌ها کیفیت بالایی برخوردار بودند. پس از بررسی کیفیت توالی‌یابی‌ها، نوکلئوتیدهایی که دارای کیفیت پایینی بودند از دو انتهای توالی‌ها حذف شدند. میانگین فراوانی نوکلئوتیدی‌ها شامل ۲۹/۶۵٪ آدنین، ۲۶/۹۲٪ تیمین، ۲۸/۶۸٪ گوانین و ۱۴/۷۵٪ سیتوزین به‌دست آمد. میزان A+T بیش‌تر از G+C در ناحیه D- loop ژنوم میتوکندریایی بود.

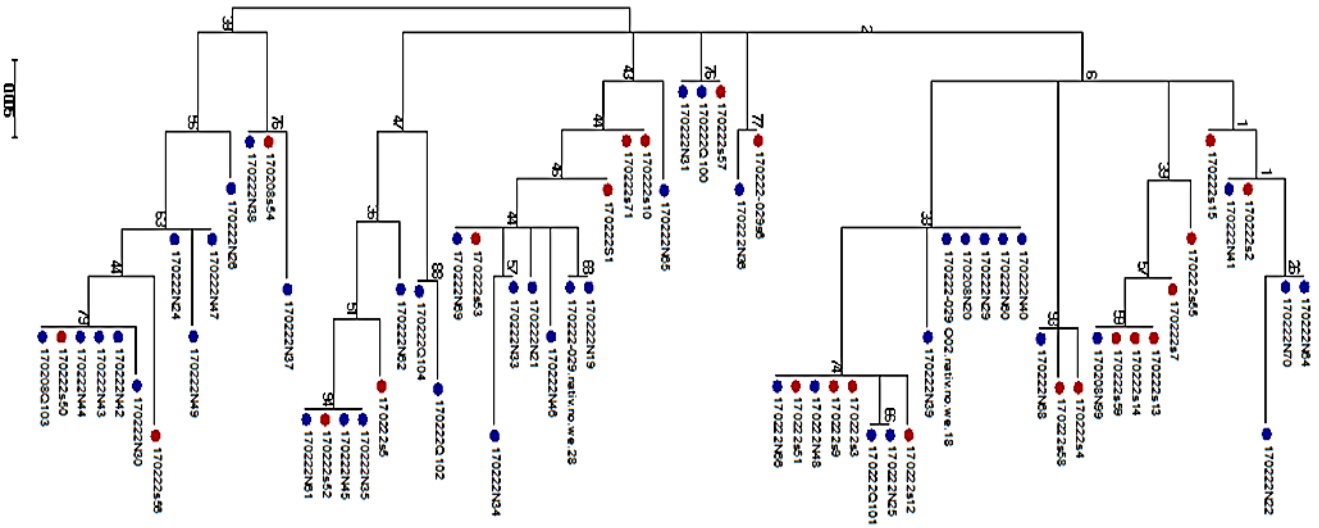


شکل۲: تکثیر ناحیه D-loop مربوط به جمعیت اسب‌های اردبیل

نتایج تغییرات نوکلئوتیدی منجر به شناسایی ۴۳ جایگاه چندشکلی شد که منجر به ایجاد ۴۰ هاپلوتیپ برای جمعیت اسب‌های اردبیل شد که میزان جایگزینی جهش‌ها از نوع transition و transversion به‌ترتیب با ۹۷/۴۲٪ و ۲/۵۸٪ به‌دست آمد. با توجه به این‌که در نمونه‌گیری‌ها تلاش بر این بود که از افراد غیرخویشاوند نمونه‌گیری‌ها به‌عمل آید و با توجه به این‌که ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی از میزان جهش

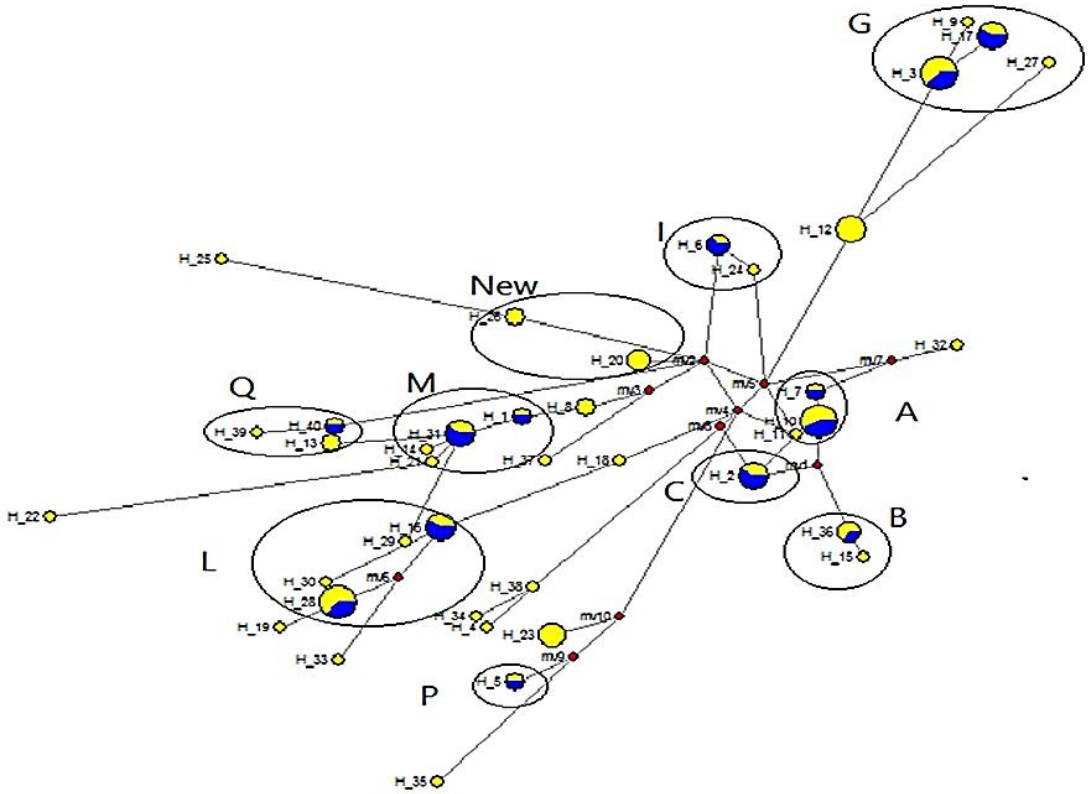
بالایی برخوردار است لذا به‌دست آوردن تنوع هاپلوتیپی بالا مورد انتظار بود. میزان D تاجیما برای کل نمونه‌ها ۰/۵۷۱۱۸- به‌دست آمد ولی از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۱). آزمونD تاجیما براساس جهش‌های خنثی در توالی‌های مورد نظر می‌باشد. در زمانی‌که D تاجیما برابر با صفر باشد (عدم معنی‌داری) نشان‌دهنده اندازه ثابت جمعیت و یا نبود انتخاب برای جایگاه به‌شمار می‌رود. ۴۳ جایگاه جهش شناسایی شده در این پژوهش منجر به ایجاد ۴۰ هاپلوتیپ مختلف با تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتیپی به‌ترتیب ۰/۰۲۴۱ و ۰/۸۷۷ گردید که نشان‌دهنده تنوع مادری بالا در جمعیت اسب‌های استان اردبیل می‌باشد.

ترسیم درخت فیلوژنتیکی برای جمعیت اسب‌های استان اردبیل: یکی از اهداف ایجاد درخت‌های فیلوژنتیکی براساس توالی‌های مولکولی، بازسازی تاریخچه تکاملی گونه‌های موردنظر است. طبق دندوگرام فاصله ژنتیکی رسم‌شده برای جمعیت اسب‌های موردمطالعه سه کلاستر تقسیم شد که هرکدام به زیر گروه‌های دیگری تقسیم شدند و با توجه به وجود تعداد بیش‌تر گروه‌ها و زیرگروه‌ها بیانگر تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت اسب‌های موردمطالعه است و هم‌چنین هم‌گروه شدن جمعیت‌های مورد بررسی با یکدیگر در هر کلاستر بیانگر منشأ مشترک و یا وجود جریان ژنی میان آن‌ها است (شکل۳).



شکل ۳: درخت فیلوژنتیکی جمعیت اسب‌های استان اردبیل شامل اسب‌های بومی اردبیل و باشگاه‌های اسب سواری

ترسیم شبکه‌ای هاپلوتیپ‌ها: جهت نشان دادن ارتباط میان هاپلوتیپ‌های مشخص‌شده و توالی‌های به‌دست آمده از بانک اطلاعات ژنوم ترسیم شد (شکل۴). ۲۴ هاپلوتیپ از ۴۰ هاپلوتیپ به‌دست‌آمده در ۹ هاپلوگروه (A، B، C، G ، I، L، M، P وQ) به‌دست آمده در مطالعه Achili و همکاران (۲۰۱۲) قرار گرفتند. بیش‌ترین تعداد هاپلوتیپ‌ها (۱۰درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) شامل هاپلوتیپ‌های H17, H9, H3 و H27 بودند که با نژادهای اسب Akhal teke، Unspecified Iran و Giara Horse در هاپلوگروهG هم‌کلاستر شدند. هاپلوتیپ‌های H16, H28, H29 و H30 (۱۰ درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) با نژادهای Akhal teke, Arabian, Amercan point و Unspecified Iran در هاپلوگروه L هم‌کلاستر شدند. هاپلوتیپ‌های H1, H14, H21 و H31 (۱۰ درصد از کل هاپلوتیپ) با نژادهای Caspian, Akhal teke, Fricsiah, pony و Clydesdale در هاپلوگروه M هم‌کلاستر شدند. H40, H39, H13 (۷/۵ درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) با نژاد Maremmeno در هاپلوگروه Q هم‌کلاستر شدند. H7, H10, H11 (۷/۵ درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) با نژادهای Maremmano و Caspian pony در هاپلوگروه A هم‌کلاستر شدند. هاپلوتیپ‌های H24 و H6 (۵٪ از کل هاپلوتیپ‌ها) با نژاد Unspecified Iran و Caspian pony در هاپلوگروهI هم‌کلاستر شدند. H36, H15 (۵٪ از کل هاپلوتیپ‌ها) با نژاد ItalyUnspecified در هاپلوگروه B هم‌کلاستر شدند. کم‌ترین تعداد هاپلوتیپ‌ها شامل H5 (۲/۵ درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) با نژادهای Unspecified Iran و Akhal teke در هاپلوگروه C هم‌کلاستر شدند. هاپلوتیپ H2 (۲/۵ درصد از کل هاپلوتیپ‌ها) با نژاد Arabian در هاپلوگروه P هم‌کلاستر شدند.



شکل۴: شبکه به‌هم‌پیوسته هاپلوتایپ مربوط به ژنوم میتوکندریایی جمعیت اسب‌های استان اردبیل (شامل اسب‌های اردبیل● و هاپلوگروه‌ها●)

بحث

در پژوهش حاضر ساختار ژنتیکی اسب‌های استان اردبیل با استفاده از اطلاعات ژنوم میتوکندریایی مشخص شده و نتایج به‌دست آمده با اطلاعات ژنوم میتوکندریایی اسب‌های خارجی مورد مقایسه قرار گرفت. درخت فیلوژنی برای این هاپلوتیپ‌ها و توالی‌های به‌دست آمده از بانک اطلاعات ژنوم مشخص نمود که ۲۴ هاپلوتیپ از ۴۰ هاپلوتیپ به‌دست آمده برای جمعیت اسب‌های استان اردبیل در ۹ هاپلوگروه (A، B، C، G ، I، L، M، P وQ) قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش با نتایج به‌دست آمده برای پنج نژاد اسب بومی ایران شامل نژاد عرب، نژاد کرد، نژاد ترکمن، نژاد سیستانی و نژاد کاسپین که تنوع ژنتیکی بالایی داشتند مطابقت دارد (Moridi و همکاران، ۲۰۱۲؛ Hedayat evrigh و همکاران، ۲۰۱۸). وجود هاپلوتیپ‌های موجود در آسیای مرکزی، امریکای شمالی و ایتالیا در اسب‌های استان اردبیل مؤید این مطلب است که به‌وجود آمدن اسب‌های استان اردبیل مادیان‌های متعددی دخیل بودند که بیانگر تنوع ژنتیکی بالا می‌باشد. بیش‌تر هاپلوتیپ جمعیت اسب‌های استان اردبیل در هاپلوگروه‌های که اسب ترکمن وجود دارد هم‌کلاستر شدند. اسب قره‌باغ قرابت زیادی به اسب آخال تکه ترکمنستان و اسب ترکمن ایران دارد (Alakbarl، ۲۰۱۶) در واقع می‌توان این‌جور استنباط کرد جمعیت اسب‌هایی که در استان اردبیل نگه‌داری می‌شوند احتمالاً بیش‌ترشان اسب قره‌باغ هستند ولی از لحاظ ژنتیکی مشخص نشده و به‌عنوان اسب‌های بومی نگه‌داری می‌شوند. Takasu و همکاران (۲۰۱۴) یک مطالعه بر روی اسب‌های بومی نژاد Kisoژاپن با استفاده از ژنوم میتوکندریایی D-Loop انجام دادند. ۷ هاپلوتیپ شناسایی شده در هاپلوگروه‌هایB، C، E و F قرار گرفتند. درحالی‌که در این پژوهش ۲۴ هاپلوتیپ از ۴۰ هاپلوتیپ شناسایی شده برای جمعیت اسب‌های استان اردبیل در ۹ هاپلوگروه (A، B، C، G ، I، L، M، P و Q) دسته‌بندی شدند. Xiao و همکاران (۲۰۱۶) برای مشخص کردن تنوع و ارتباط ژنتیکی نژاد jianchang با برخی نژادهای دیگر ناحیه کنترل ژنوم میتوکندریایی را مورد بررسی قرار دادند و با ترسیم درخت فیلوژنی با توالی نژادهای متعدد، مشخص شد نژاد Jianchang به‌طور قابل‌توجهی با نژاد Debao و نژاد Yunnan هم‌خوشه شد. با توجه به این‌که یافته‌های باستان‌شناسی گواه آن است که نژادهای خاصی از اسب‌های عرب امروزی در ۲۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح وجود داشته است (شرقی و همکاران، ۱۳۸۷) و هم کلاستر شدن جمعیت اسب‌های استان اردبیل نشان می‌دهد که اسب

نژاد عرب در خط مادری جمعیت اسب‌های استان اردبیل سهم داشته است. نتایج بررسی حاضر نشان داد که ژنوم میتوکندریایی D- loop از توان بالایی در تعیین روابط فیلوژنتیک جمعیت اسب‌های استان اردبیل برخوردار است. هم‌چنین هم‌کلاستر شدن جمعیت اسب‌های مورد بررسی با اسب‌های دیگر نقاط جهان مؤید این مطلب است که به‌وجود آمدن اسب‌های استان اردبیل مادران متعددی دخیل بودند. آنالیز توالی ناحیه ژنوم میتوکندریایی D-loop اسب‌های استان اردبیل و مقایسه با توالی‌های به‌دست آمده از بانک اطلاعات ژنوم نشان‌دهنده ارتباط ژنتیکی و پیوستگی ناحیه کنترل با نژادهای متعدد می‌باشد. اسب یک ثروت ملی به‌شمار می‌رود و فعالیت آن توجیه اقتصادی دارد و در رقابت اقتصادی به‌دلیل داشتن پتانسیل‌های ژنتیکی پایان‌ناپذیر حضور پایدار و مستمر دارد. ذخیره ژنتیکی اسب به‌راحتی می‌تواند از دست برود و بایستی با شناخت تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌ها به حفظ آن توجه بیش‌تری کرد.

منابع

۱. **صارمیان‌فر، م.؛ موحدی، ا.؛ رافعی‌بروجنی، م. و نجفی، م.، ۱۳۹۳.** تأثیر آموزش مهارت‌های اسب سواری بر تعاملات اجتماعی کودکان دارای اختلالات طیف اوتیسم. نشریه رفتارحرکتی. شماره ۲۱، صفحات ۲۳ تا ۴۶.

۲. **شرقی، ق. و نوروزیان، م.ع.، ۱۳۸۹.** اصول پرورش اسب. انتشارات نوربخش تهران.

۳. **Achilli, A.; Olivieri, A.; Soares, P.; Lancioni, H.; Kashani, B.H.; Perego, U.A. and Felicetti, M., 2012.** Mitochondrial genomes from modern horses reveal the mhaplogroups that underwent domestication. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 109, pp: 2449-2454.

۴. **Alakbarl, F., 2016.** Horses of Azerbaijan a Historical Survey Baku. AAMH41 P.

۵. **Bandelt, H.J.; Forster, P. and Rohl, A., 1999.** Median joining networksfor inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution. Vol. 16, pp: 37-48.

۶. **Bowling, A.T.; Del Valle, A. and Bowling, M., 2000.** A pedigree-based study of mitochondrial d-loop DNA sequence variation among Arabian horses. Animal Genetics. Vol. 31, pp: 1-7.

۷. **Cardinali, I.; Lancioni, H.; Giontella, A.; Capodiferro, M.; Capomaccio, S.; Buttazzoni, L.; Biggio, G.; Cherchi, R.; Albertini, E.; Olivieri, A.; Cappelli, K.; Achilli, A. and Silvestrelli, M., 2016.** An Over view of ten Italian horse breeds through mitochondrial DNA. PLoSONE. Vol. 11, pp: e0153004

۸. **Fotovati, A., 2000.** Persian horse breeds from ancient time to present and their rules in development of world horse breeds. Asian Australasian Journal of Animal Science. Vol. 13, pp: 401-401.

۹. **Gaur, U.; Tantia, M.S.; Mishra, B.; Bharani Kumar, S.T.; Vijh, R.K. and Chaudhury, A., 2018.** Mitochondrial D-loop analysis for uncovering the population structure and genetic diversity among the indigenous duck (*Anas platyrhynchos*) populations of India. Mitochondrial DNA Part A. Vol. 29, No. 2, pp: 212-219.

۱۰. **Głażewska, I., 2010.** Speculations on the origin of the Arabian horse breed. Livestock Science. Vol. 129, pp: 49-55.

۱۱. **Głażewska, I.; Wysocka, A.; Gralak, B.; Prus, R. and Sell, J., 2007.** A new view on dam lines in Polish Arabian horsesbased on mtDNA analysis. Genetics Selection Evolution. Vol. 39, No. 5, 609 p.

۱۲. **Hedayat Evrigh, N.; Omri, M.; Boustan, A.; Seyedsharifi, R. and Vahedi, V., 2018.** Genetic Diversity and Structure of Iranian Horses' Population Based on Mitochondrial Markers. Journal of Equine Veterinary Science. Vol. 64, pp: 107-111.

۱۳. **Hill, E.W.; Bradley, D.G.; Al-Barody, M.; Ertugrul, O.; Splan, R.K.; Zakharov, I. and Cunningham, E.P., 2002.** History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. Animal genetics, Vol. 33, No. 4, pp: 287-294.

۱۴. **Kefena, E.; Dessie, T.; Tegegne, A.; Beja-Pereira, A.; Kurtu, M.Y.; Rosenbom, S. and Han, J.L., 2014.** Genetic diversity and matrilineal genetic signature of native Ethiopian donkeys inferred from mitochondrial DNA sequence polymorphism. Livestock Science. Vol.167, pp: 73-79.

۱۵. **Khanshour, A.M. and Cothran, E.G., 2013.** Maternal phylogenetic relationships and genetic variation among Arabian horse populations using whole mitochondrial DNA D-loop sequencing. BMC Genetics. Vol. 14, 83 p.

۱۶. **Lai, S.J.; Liu, Y.P.; Liu, Y.X.; Li, X.W. and Yao, Y.G., 2006.** Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. Molecular phylogenetics and evolution. Vol. 38, No. 1, pp: 146-154.

۱۷. **Moridi, M.; Masoudi, A.; Vaez Torshizi, R. and Hill, E., 2013.** Mitochondrial DNA D-loop sequence variation in maternal lineages of Iranian native horses. Animal Genetics. Vol. 44, No. 2, pp: 209-213.

۱۸. **Outram, A.K.; Stear, N.A.; Bendrey, R.; Olsen, S.; Kasparov, A.; Zaibert, V.; Thorpe, N. and Evershed, R.P., 2009.** The earliest horse harnessing and milking. Science. Vol. 323, pp: 1332-1335.

۱۹. **Rozas, J.; Librado, P.; Sanchez-Delbarrio, J.; Messeguer, X. and Rozas, R., 2009.** DnaSP 5.10. 00. Universitat de Barcelona, Spain.

۲۰. **Takasu, M.; Ishihara, N.; Tozaki, T.; Kakoi, H.; Maeda, M. and Mukoyama, H., 2014.** Genetic diversity of maternal lineage in the endangered Kiso horse based on polymorphism of the mitochondrial DNA D-loop region. Journal of Veterinary Medical Science. Vol. 76, pp: 1451-1456.

۲۱. **Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S., 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. Vol. 28, pp: 2731-2739.

۲۲. **Warmuth, V.; Eriksson, A.; Bower, M.A.; Barker, G.; Barrett, E.; Hanks, B.K. and Soyonov, K., 2012.** Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 109, pp: 8202-8206.

۲۳. **Xiao, X.; Yang, S.; Lin, D.; Wang, Y. and Hua, Y., 2016.** The complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of Chinese Jianchang horse (*Equus caballus*). Clon Transgen. Vol. 5, No. 149, 2 p.

۲۴. **Zhang, T.; Lu, H.; Chen, C.; Jiang, H. and Wu, S., 2012.** Genetic Diversity of mtDNA d-loop and maternal origin of three Chinese native horse breeds. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. Vol. 25, 921 p.