



"مقاله پژوهشی"

بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی در یک جمعیت از گاو هلشتاین با استفاده از نشانگرهای متراکم اسنپ

رنوف شاکری^۱، آرش جوانمرد^۲، کریم حسن پور^۳، مختارعلی عباسی^۴، سید مصطفی مظلوم^۵،
مجید خان سفید^۶ و مهران رحیمی ورپشتی^۷

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، (نویسنده مسوول: a.javanmard@tabrizu.ac.ir)

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۴- دانشیار سازمان تات، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج

۵- دانشجوی دکترا گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد.

۶- محقق و پژوهشگر موسسه آگرو بیوساینس، دپارتمان کشاورزی و بیکنوریا، استرالیا

۷- کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، مدیر عامل شرکت آرین دلنا ژنتیک، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۲

صفحه: ۱۴۰ تا ۱۴۹

چکیده

کاهش میزان تنوع ژنتیکی و به تبع آن افزایش تجمعی میزان هم‌خونی از جمله عوامل تهدید کننده صنعت پرورش گاو شیری محسوب می‌شوند. هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی شاخص‌های تنوع ژنتیکی (توزیع عدم تعادل لینکاژی، آماره هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار، آماره F_{is} ، توزیع فراوانی آلل‌های نادر، میزان اتوزیگوتی و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی) در گاو هلشتاین با استفاده از نشانگرهای متراکم اسنپ بود. داده‌های ژنوتیپی متعلق به ۲۵ گاو ماده هلشتاین حاصل از تراشه اسنپ گاوی ۵۰ هزار تایی، اهدایی از شرکت تجاری آلتادلتا ژنتیک تجزیه و تحلیل شد. محاسبات آماری شاخص‌های مولکولی مذکور از طریق نرم‌افزار معروف پلینک، نسخه ۱/۹ تحت محیط R صورت گرفت. میانگین فراوانی آلل نادر (۰/۲۸)، میانگین فراوانی هتروزیگوتی مشاهده شده و هتروزیگوتی مورد انتظار به ترتیب (۰/۳۸، ۰/۳۷)، آماره شاخص تثبیت (F_{is}) (منفی ۰/۳۲)، آماره F_{hom} (۰/۳۲۸-) اندازه‌گیری شد. همچنین، نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تنوع و پراکنش معنی‌دار بالایی را نشان داد که تأییدی بر مطابقت و هم‌خوانی همه آماره‌های مولکولی اندازه‌گیری شده و بالا بودن میزان تنوع ژنتیکی اندازه‌گیری شده بود. از آنجایی که، شاخص ROH، از اطلاعات توالی نوکلئوتیدی یکسان انتقال یافته به دو فرد حاصل می‌شود لذا، در مقایسه با شاخص F_{is} ، معیار آماری مناسب‌تری برای مطالعه میزان هم‌خونی، می‌باشد. نتیجه‌گیری نهایی این که، بکارگیری نشانگرهای متراکم اسنپ می‌تواند، ابزاری مناسب برای ارزیابی وضعیت تنوع ژنتیکی و هم‌خونی جمعیت‌های دامی محسوب شود.

واژه‌های کلیدی: تراشه اسنپ، تنوع ژنتیکی، گاو هلشتاین، هم‌خونی

مقدمه

جهت اصلاح ژنتیکی یک جمعیت دامی به‌طور هم‌زمان دو ابزار تنوع ژنتیکی و انتخاب مور دنیا است (۸،۱۳،۳۷). تنوع ژنتیکی در واقع، وجود چند شکلی نوکلئوتیدی و به تبع آن فراوانی ترکیبی آلل‌های منحصر به‌فرد ایجاد کننده فاصله ژنتیکی در داخل و بین جمعیت‌ها می‌باشد (۳۰،۳۱،۳۴). در مباحث توسعه پایدار سیستم‌های تولیدی دام، تنوع ژنتیکی به‌عنوان ماده خام فعالیت‌های اصلاح‌نژادی محسوب می‌شود و وجود تنوع کافی برای رفع نیازهای آتی و تصمیمات اصلاح نژادی، ضروری است (۳۴).

اندازه‌گیری شاخص‌های تنوع ژنتیکی در یک جمعیت دامی می‌تواند، تأثیرات عواملی همچون اهلی شدن و انتخاب طبیعی، جهش، رانش ژنتیکی، نوترکیبی کروموزومی، مهاجرت، هم‌خونی و انتخاب مصنوعی بر روی ساختار ژنتیکی یک جمعیت، قابلیت سازگاری و صفات تولیدی و تولیدمثلی تحت معیارهای عددی نمایش دهد و موضع‌شناسی (توپولوژی) افراد نسبت به هم را به‌صورت گرافیکی نشان دهد (۱۳،۲۹،۳۵). لذا، برنامه‌ریزی مدیریت ژنتیکی یک دام در واقع محتاج تصمیماتی هستند که باید بر مبنای درک صحیحی از ساختار وضعیت تنوع ژنتیکی آن اتخاذ گردند (۳۴).

گاوهای هلشتاین، به‌عنوان یکی از نژادهای مشهور گاو شیرده در دنیا به بیشترین تولید شیر با کمترین درصد چربی شهرت یافته و منشأ پیدایش اصلی این نژاد، کشور هلند است (۴). اولین گاوهای هلشتاین در سال ۱۳۳۹ وارد کشور شده (آمار مرکز اصلاح‌نژاد دام) که اکنون با شرایط کشورمان وفق پیدا کرده‌است (۴).

اصلاح‌نژاد گاو نژاد هلشتاین در دنیا قدمت زیادی دارد. به نظر می‌رسد به‌دلیل افزایش استانداردهای تولیدی، باعث بروز یکنواختی ژنتیکی در نژاد هلشتاین شده و این مسئله باعث کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گاوهای هلشتاین امروزی، شده‌است. مدیریت ژنتیکی گاو هلشتاین ایران، نیازمند داشتن دانش کافی، درخصوص، شاخص‌های تنوع، منشأ ژنتیکی، اسپرم‌های توزیع‌شده در سطح جامعه این نژاد می‌باشد (۴،۹،۱۰).

باوجود آنکه نزدیک به ۵۰ سال از پرورش و اصلاح‌نژاد گاو هلشتاین در ایران می‌گذرد و بخش قابل توجهی از اسپرم‌های مصرفی صنعت گاو شیرده منشأ خارجی دارند. با این حال، هنوز در مسیر اصلاح‌نژاد هلشتاین ایرانی مشکلات عدیده‌ای وجود دارد (۴،۷). برخی از راهکارهای پیشنهادی موجود برای رهایی از این معضل می‌تواند افزایش هتروزیگوتی ژنومی با

همکاران در سال ۲۰۱۱ ضریب هم‌خونی در جمعیت گاو هلشتاین ایران بر پایه اطلاعات شجره را در حدود ۵ درصد گزارش نمودند (۴). میانگین ضریب هم‌خونی در سال ۲۰۱۱ در آمریکا و کانادا به ترتیب ۵/۷۵ و ۶/۲ درصد گزارش شده است (۱۲). دادار و همکاران (۲۰۱۱) روند افزایشی ضریب هم‌خونی در جمعیت گاو هلشتاین ایران در سال‌های ۲۰۰۰ الی ۲۰۱۰ را حدود ۰/۳۳ درصد در هر سال گزارش نمودند (۳، ۱۲). فروتن و همکاران (۱۲) میزان ROH در گاوهای هلشتاین آمریکای شمالی، در دامنه عددی حدود ۵۷ تا ۸۲ بین سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۶ تخمین زد. مارتین کنین و همکاران (۲۴) در گاوهای ایرشایر تاثیر جزایر ROH بر پسروری صفات تولید شیر و تولیدمندی را گزارش کردند. همچنین گورگوال و همکاران (۳۹) شاخص‌های آماری مختلف ROH و همبستگی جاکم بین آنها را در گاوهای هلشتاین لهستان را تحقیق کردند (۲۵).

ملکای و همکاران (۲۶) با استفاده از تراشه‌های متراکم اسنیپ شاخص‌های تنوع ژنتیکی در سه جمعیت گاوهای نژادی جرسی، براون سوئیس و هلشتاین کانادا بررسی کردند و میزان میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده را به ترتیب ۰/۲۶، ۰/۲۷ و ۰/۳۱ درصد گزارش کردند (۲۶).

در این راستا، هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی شاخص‌های تنوع ژنتیکی (توزیع عدم تعادل لینکاژی، آماره هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار، آماره Fis، توزیع فراوانی آلل نادر، میزان اتوزیگوتی و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی) در گاو هلشتاین با استفاده از نشانگرهای متراکم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، داده‌های خام از ۲۵ گاو ماده هلشتاین بر مبنای نسخه دوم اسنیپ چیپ (تراشه) K ۵۰ کاندید از مرکز اصلاح نژاد کشور اخذ و سپس تجزیه و تحلیل شد. این جمعیت تحت پوشش برنامه تلقیح شرکت التا ژنتیک بود.

گام اول کنترل کیفیت و فیلتراسیون

فایل نقشه اسنیپ چیپ از پایگاه داده SNPchiMp v.3 دانلود شد. کلیه جایگاه‌های واقع شده روی کروموزوم جنسی X (تنوع بر روی کروموزوم‌های اتوزومی ارزیابی می‌شود) و جایگاه‌ها با مکان کروموزومی نامشخص از مجموعه داده‌ها کنار گذاشته شدند. اسنیپ‌های با تعادل هاردی واینبرگ با مقدار P-value کمتر از ۰-۱۰، نرخ خوانش به‌زای هر اسنیپ کمتر از ۰/۹۵ و SNP‌های دارای فراوانی آللی مینور کمتر از ۰/۰۵، نرخ خوانش به‌زای هر حیوان کمتر از ۰/۹۰ فیلتر شدند (۱۰، ۸).

شاخص‌های تنوع درون جمعیتی

مجموع شاخص‌ها و آماره‌های ژنومی، همچون: هم‌خونی ژنومی، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، آماره شاخص تثبیت Fixation-index (F_{IS})، هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار، توزیع فراوانی آلل نادر و در نهایت LD با استفاده نرم‌افزار پلینک در پنجره‌های ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰ و ۵۰۰۰۰ تحت محیط R اجرا و اندازه‌گیری شد.

کنترل جفتگیری‌ها، حداقل نمودن فاصله نسلی (انجماد جنین)، حداکثر نمودن اندازه مؤثر جمعیت، نظارت مستمر شاخص‌های مولکولی تنوع و هم‌خونی باشد (۱۳، ۲۹، ۳۵).

در سال‌های اخیر استفاده از نشانگرهای چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) در مقایسه با سایر نشانگرها به‌میزان بیشتری گسترش یافته است. این نشانگرها دارای فراوانی بسیار زیادی در سطح ژنوم هستند و امکان استفاده همزمان از تعداد بسیار زیادی از آنها در قالب تراشه‌های SNP فراهم شده است (۱۲، ۱۳).

ریزآرایه یا تراشه (Chip) یک فناوری جهت بررسی همزمان تعداد زیادی SNP در سطح کل ژنوم می‌باشد (۴۰) که شرکت‌های افی‌متریکس ۱ و ایلومینا ۲ آن را طراحی می‌کنند (۵). با این حال، SNP-چیپ‌های گونه‌های اهلی نظیر خوک، گاو و گوسفند عمدتاً توسط شرکت ایلومینا عرضه شده‌اند (۱۸).

در نتیجه برنامه‌های انتخاب ژنتیکی در گاوهای شیرده، تعداد آلل‌ها و هتروزیگوتی کل ژنوم را به‌طور معنی‌داری کاهش داده است. جورج و همکاران (۱۵) میانگین هتروزیگوتی در کل ژنوم گاو را ۰/۵۶ تخمین زدند.

عدم تعادل پیوستگی در واقع ارتباط غیر تصادفی بین دو جایگاه ژنی در سطح ژنوم می‌باشد که بازده انتخاب ژنومی را به‌خود وابسته کرده است (۲). سرگلزایی و همکاران (۳۷) و همچنین کیم و همکاران (۲۳) در گاوهای هلشتاین آمریکای شمالی شاخص‌های آماری مرتبط با عدم تعادل پیوستگی را با تراشه اسنیپ ۱۰K بررسی کردند. همچنین ختکار و همکاران (۲۲) در گاوهای هلشتاین استرالیا، به بررسی این شاخص پرداختند. قنبری و همکاران (۳۴) در گاوهای هلشتاین آلمان، توانستند ۷۱۵ بلوک هاپلوتایپی را که ۴/۵ درصد کل ژنوم را پوشش می‌داد، شناسایی کنند و اندازه‌گیری اندازه مؤثر جمعیت را وابسته به این شاخص دانستند (۳) و عواملی همچون طول عمر جهش ایجاد شده (۱۴)، ساختار ژنتیکی نژاد (۶)، تاریخچه پیدایش، رانش ژنتیکی، لایه‌بندی جمعیتی و نرخ نوترکیبی را عوامل ایجاد واریانس در این شاخص در مطالعات مختلف دانستند (۳۴).

در برنامه‌های به‌نژادی گاوهای شیرده، همواره توصیه می‌شود که بهبود صفات و پیشرفت ژنتیکی در کنار ثابت نگهداشتن میزان هم‌خونی مورد توجه قرارگیرد. با توجه به اینکه محاسبه ضریب هم‌خونی براساس اطلاعات شجره اثرات نمونه‌گیری مندلی را در نظر نمی‌گیرد نتایج آن همیشه با اریبی همراه است بنابراین استفاده از دیدگاه جایگزین قطعات هموزیگوت دست نخورده در سطح ژنوم برای محاسبه هم‌خونی واقعی محسوب شود (۱۶، ۱۸، ۳۱).

براساس مقالات پیشین گزارش منتشر شده در سال ۲۰۱۷، در نژاد هلشتاین کانادا میانگین ضریب هم‌خونی در گاوهای ماده متولد شده در سال در حدود ۷/۳۴ درصد است (۳). بر اساس گزارش CDN، متوسط رشد سالیانه ضریب هم‌خونی در سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۶ چشم‌گیر و در حدود ۰/۲۲ درصد بوده (۱)، در حالی که متوسط افزایش هم‌خونی در سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۰ در حدود ۰/۰۸ درصد بوده است. دادار و

#Ohom و #Ehom به ترتیب تعداد ژنوتیپ‌های هموزیگوت مشاهده شده و مورد انتظار در نمونه است.

$$F_{UNI} = \frac{\sum (x_i^2 - (1+2p_i)x_i + 2p_i^2)}{n_i}$$

تجربه به مؤلفه‌های اصلی

تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) جهت شناسایی ساختار جمعیتی مورد استفاده قرار گرفت. PCA یک زیرمجموعه از روش‌های آمار چندمتغیره می‌باشد که قصد دارد از روش‌های آماری مختلف برای دسته‌بندی یا کلاستریک افراد براساس n متغیر استفاده کند (۳۶). (PCA) موجب انعکاس یافتن واریانس ناشی از ساختار جمعیتی نمونه‌ها به جمعیتی می‌شود که مؤلفه‌های اصلی بزرگتر بخش بیشتری از واریانس را توجیه می‌کنند. رسم این مؤلفه‌ها در محور مختصات در مقابل یکدیگر موجب ایجاد خوشه‌های مشخصی از افراد می‌شود که نمایانگر ساختار موجود در نمونه‌هاست نمودار این شاخص تحت نرم‌افزار R رسم گردید (۳۶).

آنالیز بیوانفورماتیکی و تحلیل انوتیشن نقشه

با توجه به اینکه توزیع اسنپ‌ها مناطق مختلفی از ژنوم و ترانسکریپتوم گاو را پوشش می‌دهند و همچنین ارزش واریانت‌های مورد بررسی برای تنوع به‌علت ماهیت متفاوت آن‌ها با یکدیگر فرق می‌کند (عدم تغییر یا تغییر کد اسید آمینه، داخل منطقه کدشونده یا اینترونیک، روی پروموتور یا خارج پروموتور) در نتیجه برای درک تنوع واقعی بررسی پلی‌مورفیسم مشاهده شده با حاشیه‌نویسی جهت پیش‌بینی تأثیر یا عملکرد یک SNP منحصربه‌فرد امری اجتناب ناپذیر است. به‌عنوان مثال، SNP‌های موجود در مناطق کدکننده ژنوم به دو دسته SNP‌های هم‌معنی (Synonymous) و ناهم‌معنی (Non-Synonymous) تقسیم می‌شوند. SNP‌های هم‌معنی اثری بر توالی‌های اسید آمینه پروتئین ندارند، درحالی‌که SNP‌های ناهم‌معنی موجب تغییر توالی اسیدهای آمینه پروتئین شده و عملکرد آن‌را تحت تأثیر قرار می‌دهند. SNP‌های واقع شده در نواحی غیر کدکننده ژنوم نیز ویرایش ژن‌ها، اتصال عوامل تنظیم کننده رونویسی، تجزیه mRNA و توالی RNAهای غیر کدکننده را تحت تأثیر قرار می‌دهند. به‌منظور بررسی پیش‌بینی تأثیر یا عملکرد یک SNP منحصربه‌فرد در داخل نقشه اسنپ چیپ ۵۰ کی، بر اساس هر کروموزم، در ابتدا فایل Map تبدیل به فایلی با فرمت vcf شد، و سپس از طریق نرم‌افزار VEP در پایگاه Ensembl اقدام به انجام آنالیزهای مربوطه شد.

نتایج و بحث

نتایج کنترل کیفیت و اعتبارسنجی و فیلتراسیون داده
درحالی که فایل خام ما دارای ۵۴۶۰۹ اسنپ بود در بخش کنترل کیفیت و فیلتراسیون داده‌های خام اولیه، تعداد ۵۷۱۶ اسنپ از MAF و ۱۵۸۹ اسنپ با کیفیت پایین ژنوتیپ فیلتر شدند.

برای برآورد LD در یک جمعیت، دو معیار D' و r^2 دو آماره‌ای هستند که به‌میزان زیادی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. r^2 به‌علت حساسیت کمتر نسبت به اندازه نمونه و اختلاف در فراوانی‌های آللی، به‌عنوان معیاری باثبات بیشتر شناخته شده‌است. r^2 به‌عنوان ضریب همبستگی بین جفت SNPها تعریف شده‌است و می‌توان به‌کمک رابطه زیر برآوردی از آن بدست آورد:

$$\frac{(freq_{AB} * freq_{ab} - freq_{Ab} * freq_{aB})^2}{(freq_A * freq_a * freq_B * freq_b)}$$

در رابطه بالا، $freq_A, freq_a, freq_B, freq_b$ به ترتیب فراوانی آلل‌های A، a، B، و b را در جمعیت نشان می‌دهند. از آنجایی که هتروزیگوت‌ها آلل‌های متفاوتی دارند، فراوانی آنها مهم بوده و نشان‌دهنده وجود تنوع می‌باشند. هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای یک جایگاه با فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$H_o = \frac{\sum N_{ij}}{N}$$

که در آن N_{ij} ($i \neq j$) تعداد افراد هتروزیگوت و N تعداد کل افراد در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای یک جایگاه نیز از فرمول زیر محاسبه شد:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

که در آن عبارت $\sum_{i=1}^n p_i^2$ نسبت مورد انتظار هموزیگوت‌ها می‌باشد و p_i فراوانی آمین آلل در یک جایگاه معین می‌باشد. شاخص هم‌خونی F_{IS} برای ارزیابی یک جمعیت منفرد بر اساس هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار استفاده می‌شود و جزئیات فرمول آن عبارت است از:

$$F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$$

که اجزای داخل فرمول همان هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار می‌باشد. همچنین ارزش‌های ضریب هم‌خونی براساس نشانگرها با سه روش F_{GRM} بر اساس روش (VanRaden2008) بر پایه واریانس ژنتیک افزایشی یا F_{HOM} (بر اساس روش Wright) و F_{UNI} طبق معادلات زیر برآورد شد:

$$F_{GRM} = \frac{\{x_i - E(x_i)\}^2 - 1}{n_i} = \frac{x_i - 2p_i}{n_i} - 1$$

که در اینجا p_i برابر با فراوانی مشاهده شده از آلل اول آمین لوکوس i ($n_i = 2p_i(1-p_i)$) و x_i تعداد کپی‌های آلل مرجع برای آمین SNP در فرانس است.

$$F_{HOM} = \frac{[0(\# hom) - E(\# hom)]}{[1 - E(\# hom)]} = 1 - \frac{x_i(2-x_i)}{n_i}$$

جدول ۱- آمار توصیفی فیلتراسیون بعد از انجام فرایند کنترل کیفیت داده‌های خام

Table 1. Descriptive statistics for filtering process after quality control (QC) of raw data

تعداد اسنپ	اتیم (تعداد)
۵۴۶۰۹	کل SNP در نقشه
۱۱۷۲۸	کل SNP حذف شده در فیلتر مشترک‌ها
۴۲۸۸۱	کل SNP باقی‌مانده
۵۷۱۶	حذف شده از MAF
.	حذف شده از MIND
۱۵۸۹	حذف شده از GENO
.	حذف شده از HWE
۷۳۰۵	مجموع حذف شده از QC
۳۵۵۷۱	مجموع باقیمانده بعد از QC

می‌کند. میزان هتروزیگوتی و هموزیگوتی، هردو می‌تواند به‌طور غیرمستقیم تنوع را نشان دهد. قنبری و همکاران (۳۴) میزان فراوانی آلل نادر و هتروزیگوتی مشاهده شده در گاوهای هلشتاین آلمان را به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۲۸ گزارش کردند که با مطالعه ما همخوانی نداشت.

در تحقیقی دیگر که بر روی گاوهای بومی کشور انجام شده است، کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۲۴۶) در نژاد سیستانی مشاهده شد. ازسوی دیگر بالاترین مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار در نژادهای کردی (۰/۳۳۹) و سرابی (۰/۳۳۸) بیان شده است (۲۱).

در تحقیقی دیگر که بر روی گاوهای بومی و هلشتاین پاکستان انجام شده است، متوسط فراوانی آلل کمیاب برای نژاد Red sindhi و هلشتاین به ترتیب ۰/۱۸ و ۰/۲۲ گزارش شده است (۳۰). در تحقیقی که بر روی گاوهای بومی ایران انجام شده است، ضریب خویشاوندی افراد (FIS) در داخل نژادهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. براین اساس بالاترین میزان خویشاوندی (۰/۰۹) در میان گاوهای نژاد کرمانی مشاهده شد. ضریب خویشاوندی افراد در داخل نژادهای سرابی، سیستانی و پارس به ترتیب ۰/۰۳-، ۰/۰۳- و ۰/۰۵- محاسبه گردید. در نهایت، کمترین میزان خویشاوندی در میان گاوهای کردی (۰/۰۷-) مشاهده شد (۲۱). در تحقیق دیگر که بر روی چهار جمعیت گاوهای آفریقای جنوبی انجام شده است، بیشترین مقدار فراوانی آلل کمیاب برای نژاد هلشتاین (۰/۲۲) و کمترین مقدار برای Nguni (۰/۱۷) گزارش شده است (۳۵).

اندازه‌گیری شاخص‌های تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)

نتایج PCA نشان داد که ۲۵ نمونه حاضر در این تحقیق تنوع ژنتیکی داخل نژادی بسیار بالایی دارند. ۸۵ درصد واریانس توسط مؤلفه اول توجیه شد. یعنی افراد ژنوتایپ شده در داخل جمعیت، ژنوتیپ متفاوت با هم را نشان می‌دهند. علت تفاوت در PCA به ساختار ژنتیکی و تاریخچه فعالیت اصلاح نژادی در آن نژاد برمی‌گردد.

آنالیز تکمیلی بیوانفورماتیکی و تحلیل انوتیشن نقشه

در بحث تنوع ژنتیکی ژنوم، ما براساس دانستن جایگاه اسنپ می‌توانیم از مفید بودن نتایج آگاه شویم. زیرا اسنپی برای ما می‌تواند سودمند باشد که در مناطقی از ژن قرار داشته باشد که در فرایند رونویسی و ترجمه حضور داشته باشد. نتایج حاصل از این بخش پژوهش حاضر اثبات کرد بر

اندازه‌گیری شاخص‌های تنوع درون جمعیتی شاخص عدم تعادل لینکاژی (LD)

میزان LD در پنجره‌های به طول ۵۰ و ۱۰۰ کیلو جفت باز محاسبه شده (مقالات رفرنس برای شناسایی‌ها هاپلوتایپ بلوک عمدتاً پنجره کمتر از ۱۰۰ kb را توصیه کرده‌اند که امکان وقوع کراسینگ‌اور کمتر است) که میانگین r^2 به ترتیب ۰/۰۸ و ۰/۰۷ به دست آمد (شکل ۱). نتایج این تحقیق، با مطالعات پیشین قابلیت مقایسه دارد، به عنوان مثال، قنبری و همکاران (۲۰۰۹) شاخص r^2 در بحث LD در گاوهای هلشتاین آلمان در پنجره ۲۵ Kb را به‌طور میانگین ۰/۳۰ و طول بلوک‌های هاپلوتایپی را ۱۶۶ و ۱۴۴ kb گزارش کردند (۳۴). به‌ر حال بازدهی برنامه‌های انتخاب ژنومی در دام‌های اهلی تحت تأثیر مستقیم میزان LD می‌باشد. زمی یانر و همکاران (۳۸) تحت تحقیقات گسترده‌ای ثابت کردند که در جمعیت‌های مختلف گاوسانان میزان این فراسنجه متغیر می‌باشد. همان‌طوری که، می‌دانیم، LD وابسته به عوامل مختلفی از فاصله نشانگرها، حجم نمونه ژنوتایپ، ساختار جمعیت مورد مطالعه و فراوانی داخل جایگاه می‌باشد. همچنین عدم تعادل پیوستگی در جمعیت‌های مختلف به دلیل تفاوت در اندازه مؤثر جمعیت، نسبت نوترکیبی، فشار انتخاب و دیگر عامل‌های دخیل در اندازه‌گیری LD متفاوت خواهد بود. داشتن اطلاعات در خصوص LD امکان محاسبه اندازه مؤثر جمعیت را میسر و دقت مناسبی را برای برآورد این آماره مهیا می‌کند.

اندازه‌گیری شاخص‌های FIS و MAF

FIS بیانگر متوسط تفاوت میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار هاردی-واینبرگ و هتروزیگوسیتی مشاهده بر اثر عدم آمیزش تصادفی در یک زیر جمعیت است که مقدار همبستگی بین موقعیت‌های دو آلل که به‌طور تصادفی از هریک از زیر جمعیت‌ها انتخاب شوند را بیان می‌دارد. فراوانی آلل نادر در جمعیت مورد مطالعه ۰/۲۸۴ برآورد شد. همچنین، میانگین فراوانی هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب ۰/۳۷۴ و ۰/۳۸۶ به دست آمد. همچنین ضریب خویشاوندی افراد (FIS) ۰/۰۳۲- برآورد شد. همچنین، میانگین فراوانی آلل کمیاب (۰/۲۸)، برای کل دیتاها برآورد گردید. تفاوت شاخص FIS با شاخص‌های محاسبه هم‌خونی ژنومی در نحوه محاسبه و فرم آن می‌باشد که شاخص‌های هم‌خونی از ماتریس هم‌خونی استفاده می‌کند ولی F-statistics از هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار و تفاضل آن‌ها به دست می‌آید. به‌هر حال، نتایج مجدداً وجود تنوع بالا را تأیید

ژنوم هست که به شکل هاپلوטיפ‌های مشابه هستند اما HOM میزانی از واریانت‌ها که هموزایگوت هستند را نشان می‌دهد و در نتیجه خروجی‌های به‌دست‌آمده می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را برای برنامه‌ریزی در خصوص انتخاب آتی اسپرم و کنترل جفتگیری‌ها و درک صحیحی از روابط خویشاوندی بین افراد را مشخص کند. جدول شماره ۲ مقادیر F_{GRM} را برای نمونه‌ها به‌صورت جداگانه نشان می‌دهد.

منفی‌بودن ضریب هم‌خونی در این تحقیق می‌تواند به‌دلیل کم‌بودن تعداد نمونه‌ها باشد. همچنین می‌تواند به‌دلیل بزرگ بودن هموزیگوسیتی مشاهده‌شده از هموزیگوسیتی موردانتظار باشد. فروتن و همکاران (۱۲) میزان ROH در گاوهای هلشتاین آمریکای شمالی در حدود ۵۷ تا ۸۲ بین سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۶ تخمین زد.

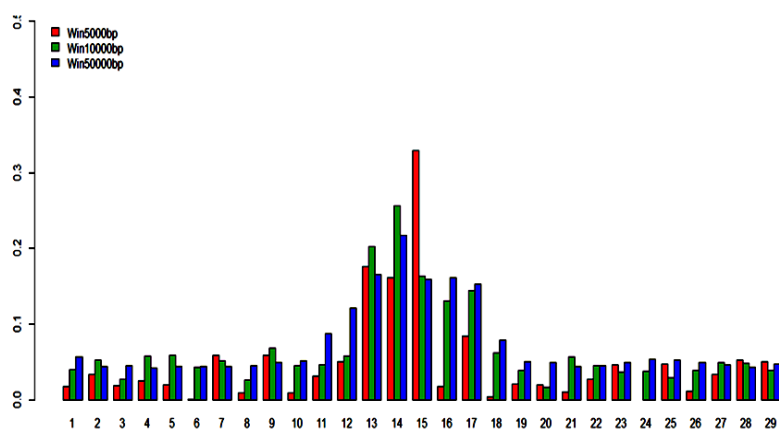
مسترانجلو و همکاران (۲۵) میزان هم‌خونی در نژاد گاو هلشتاین ایتالیایی F_{GRM} ، $0/074$ ، F_{HOM} را $0/014$ - و F_{ROH} را $0/042$ گزارش کردند که با نتایج ما همخوانی نداشت که توجیه احتمالی آن می‌تواند به‌دلیل عواملی همچون عمر جهش ایجاد شده، ساختار ژنتیکی نژاد، تاریخچه پیدایش، رانش ژنتیکی، لایه‌بندی جمعیتی و نرخ نوترکیبی متفاوت در جمعیت مورد مطالعه آنها باشد.

اساس اندازه کروموزومی و معماری خود چیب تجاری طراحی شده کروموزوم‌های مختلف حاوی توزیع و وزن متفاوتی از نقاط مختلف و واریانت‌های ژنومی هستند.

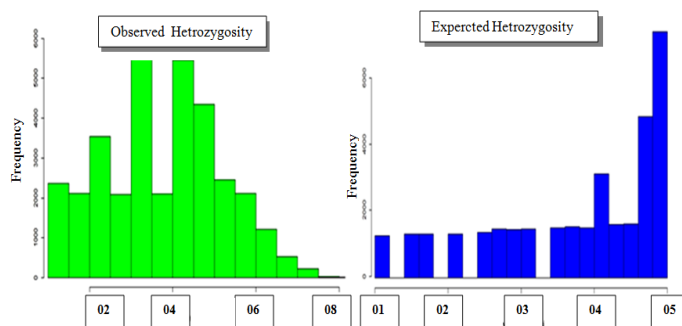
شاخص‌های معرف هم‌خونی ژنومی (ROH)

در پژوهش حاضر، از روش ماتریس برای اندازه‌گیری شاخص‌های جدید هم‌خونی (F_{HOM} ، F_{GRM}) استفاده شد. شاخص F_{HOM} که میزان هموزیگوسیتی افراد را نشان می‌دهد یکی از شاخص‌های میزان هم‌خونی است. شکل زیر F_{HOM} را نشان می‌دهد. همچنین، در تحقیق حاضر ROH یا همان طول‌های به‌هم پیوسته ژنوتیپ هموزیگوت انتقال یافته از والدین به فرزندان که منعکس‌کننده نواحی ژنومی هم‌تبار است (گومز رایا و همکاران (۱۸)) صفر به‌دست آمد. توجیهات علمی که برای به‌دست‌آوردن این ارزش می‌توان بیان کرد، با توجه به میزان پایین ال دی که گزارش کرده‌اند و این نتایج، به‌علت کوچک بودن تعداد نمونه، فیلترینگ به‌خوبی انجام نشده است.

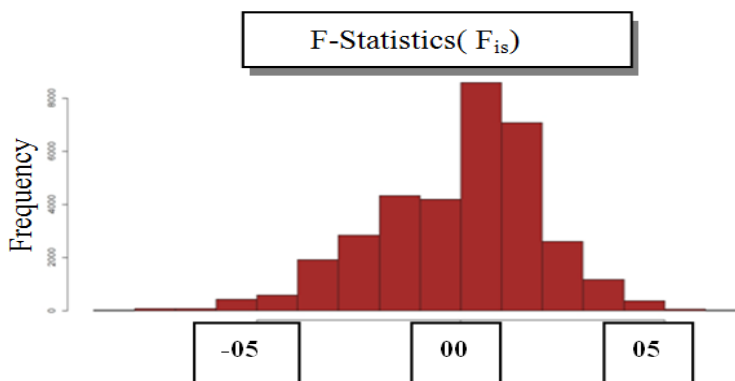
همچنین، در پژوهش حاضر، نتایج F_{GRM} مقادیر منفی را نشان داد، که دامنه آن از (۰/۱۲۱) تا (۰/۰۵۵) می‌باشد. میانگین F_{GRM} برای نمونه‌های مورد پژوهش $-0/0399$ به‌دست آمد مفهوم شاخص ROH در واقعه بیانگر میزانی از



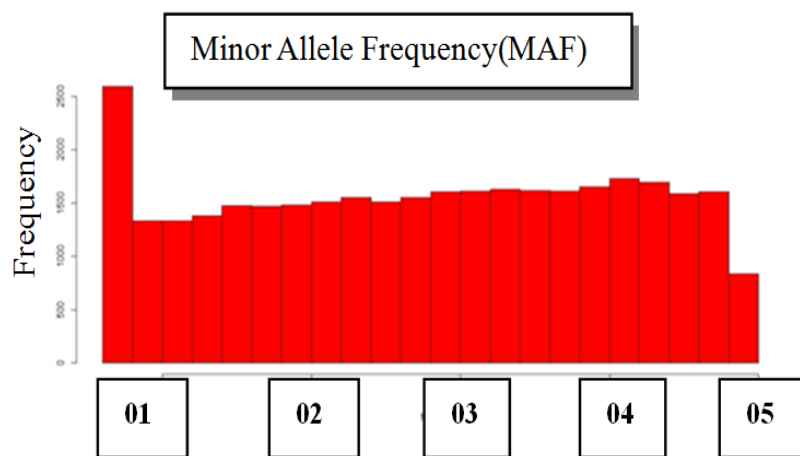
شکل ۱- توزیع عدم تعادل لینکازی در سطح کروموزوم‌های مختلف
Figure 1 Distribution of linkage disequilibrium (r^2) in different chromosomes level



شکل ۲- توزیع هتروزویگوتی مشاهده شده (سمت چپ) و هتروزویگوتی مورد انتظار (سمت راست)
Figure 2. Distribution of observed hetrozosity (left) and expected hetrozosity (right)



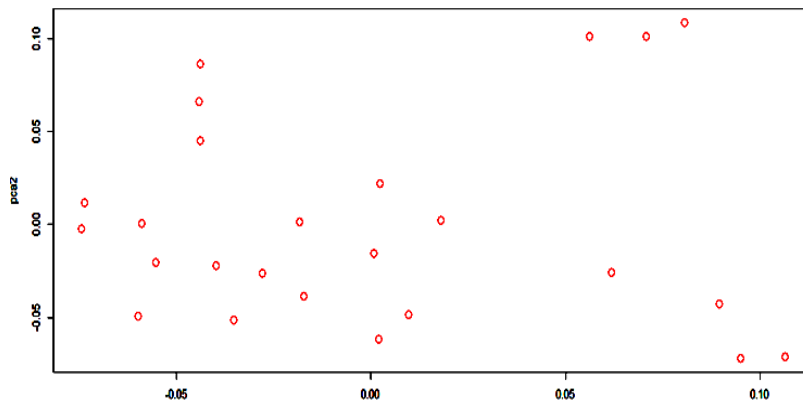
شکل ۳- توزیع شاخص تثبیت (F_{is}) در مطالعه حاضر
Figure 3. Distribution of observed F-statistics (F_{is}) values in this study



شکل ۴- توزیع فراوانی آلل نادر در مطالعه حاضر
Figure 4. Distribution of Minor allele frequency in the present study

جدول ۲- میانگین و دامنه هم‌خونی ژنومیکی تخمین زده شده براساس F_{GRM} , F_{ROH} , F_{HOM} indices
Table 2. Mean and range of estimated genomic inbreeding based on F_{HOM} , F_{ROH} , F_{GRM} indices

دامنه	میانگین	ضریب هم‌خونی
$(-0.096) - 0.062$	-0.0328	F_{HOM}
-	-	F_{ROH}
$(-0.121) - 0.055$	-0.0399	F_{GRM}



شکل ۵- گراف مقایسات درون جمعیتی بر اساس شاخص تجزیه به مؤلفه‌های اصلی
Figure 5. Comparison plot for intra genetic diversity based on PCA index

جدول ۳- خلاصه حاشیه نویسی و خروجی‌های واریانت‌های مختلف به تفکیک هر کروموزوم بر اساس اسنیپ چپ ۵۰ کیلوبازی
Table 3. Summary of annotation and output of different variants per chromosome of based on bovine 50K SNPs chip

	Chr .1	Chr .2	Chr .3	Chr .4	Chr .5	Chr .6	Chr .7	Chr .8	Chr .9	Chr. 10	Chr. 11	Chr. 12	Chr. 13	Chr. 14
3_prime_UTR_variant														
5_prime_UTR_variant	۲۳	۲۱	۵۸	۸	۲۱	۱۹	۲۹	۲۳	۱۷	۱۸	۳۱	۷	۲۶	۶
Downstream_gene_variant	۰	۱۰	۱۱	۱	۱۳	۱	۸	۸	۹	۷	۵	۲	۳	۶
Intergenic_variant	۲۰۷	۱۸۷	۲۴۴	۱۵۷	۲۵۹	۱۳۱	۲۱۸	۱۲۳	۱۲۲	۱۸۱	۲۱۸	۷۹	۱۶۳	۷۹
Intron_variant	۱۶۶	۱۳۰	۱۰۴	۱۰۳	۱۲۴	۱۲۴	۱۱۵	۱۰۴	۰	۸۳۱	۹۱۹	۹۰۰	۷۵۸	۸۸۵
Missense_variant	۲۰۰	۲۰۷	۱۸۴	۲۰۳	۱۷۴	۱۵۰	۱۴۳	۱۶۳	۱۲۴	۱۶۴۸	۱۶۰۰	۷۶۴	۱۲۵۹	۱۰۸۵
Non_coding_transcript_exon_variant	۰	۴	۱	۰	۸	۰	۲	۹	۸	۰	۰	۰	۰	۰
Synonymous_variant	۱۵	۳۰	۳۴	۷	۲۱	۹	۲۴	۳۳	۱۹	۱۴	۱۹	۷	۱۷	۱۲
Upstream_gene_variant	۴	۴	۱	۲	۳	۱	۲	۴	۴	۱۰	۷	۳	۲	۱
3_prime_UTR_variant	۴۲	۴۹	۴۴	۴۲	۴۵	۳۷	۶۵	۵۰	۱۵	۴۳	۴۳	۱۱	۲۵	۲۸
Intron_variant	۱۶۴	۱۴۶	۱۸۶	۱۵۸	۱۸۸	۱۰۵	۲۲۳	۱۰۵	۰	۱۶۸	۱۶۰	۶۴	۱۲۰	۶۸
Intron_variant,non_coding_transcript_variant	۵۲	۳۷	۲۹	۲۳	۳۹	۲۱	۳۹	۲۹	۳۴	۵۵	۵۶	۲۵	۲۴	۱۹
Missense_variant,splice_region_variant	۰	۱	۴	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۴	۰	۰	۱
Splice_region_variant,intron_variant	۵	۴	۳	۴	۱۱	۰	۵	۵	۰	۷	۶	۲	۹	۰
Sum	۵۷	۴۲	۳۶	۲۷	۵۱	۲۱	۴۵	۳۴	۳۴	۶۲	۶۶	۲۷	۳۳	۲۰

جدول ۳ (ادامه):

	Chr .15	Chr .16	Chr .17	Chr .18	Chr .19	Chr .20	Chr .21	Chr .22	Chr .23	Chr .24	Chr .25	Chr .26	Chr .27	Chr .28	Chr .29
3_prime_UTR_variant	۲۱	۱۸	۹	۱۶	۳۹	۸	۱۸	۱۵	۱۴	۵	۱۷	۱۲	۳	۱۴	۲۱
5_prime_UTR_variant	۴	۴	۸	۵	۹	۰	۷	۰	۹	۱	۳	۵	۲	۱	۴
Downstream_gene_variant	۱۳۸	۱۱۱	۱۴۲	۱۶۲	۲۲۳	۵۷	۱۰۳	۱۲۱	۱۳۹	۵۱	۱۴۰	۷۴	۴۴	۶۶	۹۴
Intergenic_variant	۶۷۹	۶۶۵	۶۸۰	۴۶۲	۳۷۶	۸۴۰	۶۱۴	۴۲۹	۴۱۷	۶۳۰	۳۵۸	۴۱۸	۴۸۶	۳۶۵	۴۳۰
Intron_variant	۱۲۳	۱۱۰	۱۳۱	۱۲۸	۱۲۸	۸۴۶	۸۵۸	۱۲۰	۷۲۴	۸۵۲	۶۶۶	۱۰۲	۵۵۰	۷۷۷	۸۱۴
Missense_variant	۸	۶	۰	۹۳۰	۱	۸۴۶	۸۵۸	۴	۷۲۴	۸۵۲	۶۶۶	۶	۵۵۰	۷۷۷	۸۱۴
Non_coding_transcript_exon_variant	۱۱	۲۴	۸	۲۹	۱۸	۷	۹	۲۳	۱۴	۸	۹	۱۰	۱۰	۲۳	۱۹
Synonymous_variant	۱	۰	۱	۳	۰	۱	۵	۲	۲	۰	۳	۱	۱	۰	۲
Upstream_gene_variant	۷۵	۱۸	۳۹	۴۷	۷۲	۱۷	۲۴	۲۳	۳۹	۴۳	۲۶	۱۸	۱۱	۱۱	۱۸
Intron_variant	۱۵۱	۱۱۶	۱۳۳	۱۹۶	۲۱۳	۵۷	۱۰۱	۸۹	۱۳۹	۵۷	۱۱۸	۷۶	۵۹	۷۲	۱۱۱
Intron_variant,non_coding_transcript_variant	۲۸	۲۱	۳۲	۲۷	۱۵	۱۰	۳۵	۲۵	۲۸	۲۳	۱۵	۲۱	۱۵	۶	۱۱
Missense_variant,splice_region_variant	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
Splice_region_variant,intron_variant	۱۳	۲	۲	۳	۱۸	۲	۲	۱	۵	۰	۲	۰	۳	۱	۳
Sum	۴۱	۲۳	۳۴	۳۰	۳۳	۱۲	۳۷	۲۶	۳۳	۲۳	۱۷	۲۱	۱۸	۷	۱۴

کدشونده و کد نشونده با نیم نگاهی بر ال دی در ساخت چپ رعایت شده و ال دی بسته به ژنوتیپ‌ها و ساختار هر جمعیت رفتار مختص آن جمعیت به‌خصوص را نشان می‌دهد. فناوری بزرگ ژنوتایپ قادر به پوشاندن کل ژنوم گاو برای ایجاد داده‌های خام درست و دقیق برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در داخل و بین جمعیت‌ها است.

تشکر و قدردانی

از مسئولین دلسوز و کارکنان زحمتکش محترم مرکز اصلاح و شرکت آلتادلتا ژنتیک که در اجرای این طرح یاری رساندند و همچنین، از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه تبریز به‌خاطر حمایت مالی و معنوی و همکاری مجموعه دانشگاه تبریز جهت انجام این طرح در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته اصلاح‌نژاد دام، صمیمانه قدردانی می‌کنیم.

نتایج مرحله آنالیز نشان داد که هر ۲۵ حیوان در آنالیز باقی ماندند. اما تعداد ۵۷۱۶ اسنیپ از MAF و ۱۵۸۹ اسنیپ با کیفیت پایین ژنوتیپ فیلتر شدند. نتایج ال دی در فاصله کمتر از ۵۰k جفت باز عدم تعادل همبستگی بالا را در مناطق اشباع شده از نقشه و فاصله کم SNP در ژنوم گاو نشان می‌دهد. رویکردهای مولکولی بر اساس برآورد ضریب هم‌خونی حاصل از F_{ROH} ROH و بر اساس ماتریس خوباشوندی ژنومی (F_{GRM}) و میزان هموزیگوسیتی افراد (F_{HOM}) ارزش منفی را نشان می‌دهد که به‌وضوح به‌معنی بیش از حد هتروزیگوسیتی در ساختار جمعیت هلشتاین بررسی شده‌است. تجزیه و تحلیل آماری PCA و F و محاسبه هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در یک راستا و در یک ردیف از خروجی‌های هم‌نژادی ژنومی بود که تمام آنالیزها یکدیگر را در راستای یک پیام تنوع بالا تأیید کردند. نتایج انوتیشین نشان داد که در طراحی معماری اسنیپ‌چپ تراکم وسیع و پوشش تمام ژنوم و ترانسکریپتوم و نواحی

منابع

1. Anonymous. 2017. Inbreeding Update- August 2017. Canadian Dairy Network.
2. Barani, S., S.M. Moradi, J.A. Nejati, M.H. Moradi, M. Gholizadeh and M. Khansefid. 2017. The pattern of linkage disequilibrium in three native Iranian sheep breeds. *Iranian Journal of Animal Science*, 48: 11-18.
3. Biegelmeyer, P., C.C. Gulias-Gomes, A.R. Caetano, J.P. Steibel and F. Cardoso. 2016. Linkage disequilibrium, persistence of phase and effective population size estimates in Hereford and Braford cattle. *BMC Genetics*, 17(1): 1.
4. Dadar, M., S.A. Mahyari, M. Rokouei and M.A. Edriss. 2014. Rates of inbreeding and genetic diversity in Iranian Holstein Cattle. *Animal Science Journal*, 85(10): 888-894.
5. Dash S, A. Singh, A.K. Bhatia, S. Jayakumar, A. Sharma, S. Singh, I. Ganguly and S.P. Dixit. 2017. Evaluation of bovine high-density SNP genotyping array in indigenous dairy cattle breeds. *Animal Biotechnology*, 29(2): 129-135.
6. Edea, Z., H. Dadi, T. Dessie, S.H. Lee and K.S. Kim. 2015. Genome-wide linkage disequilibrium analysis of indigenous cattle breeds of Ethiopia and Korea using different SNP genotyping Bead Chips. *Genes and Genomics*, 37(9): 759-765.
7. Eftekhari, M., A. Mahzoon and A. Aghashahi. 2020. Study of the Status and Causes of Culling in Dairy Cattle in Qazvin Province. *Research on Animal Production*, 11(29): 10.
8. Falconer, D.S. and T.F.C. Mackay. 1996. An introduction to quantitative genetics, 4th edition. Longman.
9. Food and Agriculture Organization (FAO). 2013. In vivo conservation of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines, FAO, Rome, Italy, 14.
10. Food and Agriculture Organization (FAO). 2015. The second report on the state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments, FAO, Rome, Italy.
11. Forogh Ameri, N. 2017. Exploring the genomes of Iranian native cows to identify selected areas. PhD. Thesis, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran, 123 (In Persian).
12. Forutan, M., S. Ansari Mahyari and C. Baes. 2018. Inbreeding and runs of homozygosity before and after genomic selection in North American Holstein cattle. *BMC Genomics*, 19(98): 2-12.
13. Gandini, G. and K. Oldenbroek. 2007. Strategies for moving from conservation to utilization. In: Oldenbroek, K. (ed.) Utilization and conservation of farm animal genetic resources. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
14. García-Gómez, E., G. Sahana, B. Gutiérrez-Gil and J.J. Arranz. 2012. Linkage disequilibrium and inbreeding estimation in Spanish Churra sheep. *BMC Genetics*, 13(1): 43.
15. Georges, M.D., M. Nielsen, A. Mackinnon, R. Mishra, A.T. Okimoto, L. S. Pasquino, L. S. Sargeant, A. Sorensen, M. R. Steele, X. Zhao, J.E. Womack and I. Hoeschele. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing *Genetics*, 139: 907-920.
16. Goddard, M.E. 2009. Genomic selection: Prediction of accuracy and maximization of long term response. *Genetica (The Hague)*, 136: 245-252.
17. Goddard, M.E. 1992. Optimal effective population size for the global population of black and white dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 75: 2902-2911.
18. Gomez-Raya, L., C. Rodríguez, C. Barragán and L. Silió. 2015. Genomic inbreeding coefficients based on the distribution of the length of runs of homozygosity in a closed line of Iberian pigs. *Genetics Selection Evolution*, 47(1): 81.
19. Gomez-Romano, F., B. Villanueva, M.A.R. De Cara and J. Fernández. 2013. Maintaining genetic diversity using molecular co-ancestry: the effect of marker density and effective population size. *Genetics Selection Evolution*, 45: 38-45.
20. Bowman, P.J., A.C. Chamberlain, K. Verbyla and M.E. Goddard. 2009. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. *Genetics Selection Evolution*, 41(1): 51.
21. Karimi, K., K.A. Esmailzadeh and M. Asadi Fuzi. 2015. Analysis of genetic structure of Iranian indigenous cattle populations using dense single nucleotide polymorphism markers. *Animal Production Research*, 3: 93-104.
22. Khatkar, M.S., K.R. Zenger, M. Hobbs, R.J. Hawken, J.A. Cavanagh, W. Barris, A.E. McClintock, S. McClintock, P.C. Thomson, B. Tier, F.W. Nicholas and H. W. Raadsma. 2007. A primary assembly of a bovine haplotype block map based on a 15,036 single nucleotide polymorphism panel genotyped in Holstein Friesian cattle. *Genetics*, 176: 763-772
23. Kim, K.S., J.S. Yeo and C.B. Choi. 2002. Genetic diversity of North-East Asian cattle based on microsatellite data. *Animal Genetics*, 33: 201-204.
24. Martikainen, K., M. Koivula and P. Uimari. 2020. Identification of runs of homozygosity affecting female fertility and milk production traits in Finnish Ayrshire cattle. *Science Reproduction*, 10: 3804. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60830-9>
25. Mastrangelo, S., M. Tolone, R. Di Gerlando, L. Fontanesi, M.T. Sardina and B. Portolano. 2016. Genomic inbreeding estimation in small populations: evaluation of runs of homozygosity in three local dairy cattle breeds. *Animal*, 10(5): 746-754.
26. Melka, M.G., F.S. Schenkel. 2012. Analysis of genetic diversity in Brown Swiss, Jersey and Holstein populations using genome-wide single nucleotide polymorphism markers. *BMC Research Notes*, 5: 161. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-161>.

27. Meuwissen, T.H.E. 2009. Towards consensus on how to measure neutral genetic diversity? *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126: 333-334.
28. Meuwissen, T.H.E. 1997. Maximizing the response of selection with a pre-defined rate of inbreeding. *Journal of Animal Science*, 75: 934-940.
29. Meuwissen, T.H.E. 2009. Towards consensus on how to measure neutral genetic diversity? *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126: 333-334.
30. Mustafa, H., H. Heather, J. EuiSoo, K. Ahmad, N. Ali, A. Khan, T. Naseer Pasha, M. Zahid Farooq, K. Javed, A. Ajmal and S. Sonstegard. 2014. Comparative analysis of genome wide difference in Red Sindhi and Holstein cattle breeds using dense SNP marker. *Intentional Journal Advance Research*, 2: 300-4.
31. Naghavian, S., S. Davoudali and A. Mobaraki. 2018. Estimation of Inbreeding and Survey of the Pedigree Structure of Iranian Turkmen Horses Population. *Research on Animal Production*, 9(22): 12.
32. Oldenbroek, J.K. 2007. Utilisation and conservation of farm animal genetic resources. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
33. Oldenbroek, K. 2007. Utilisation and conservation of farm animal genetic resources. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
34. Qanbari, S. 2009. Study of genomic structure and signatures of recent positive selection in cattle. Doctor of Philosophy (PhD) at the Faculty of Agricultural Sciences, Georg-August University, Göttingen, Germany.
35. Qwabe, S.O., E. VanMarle-Koster, A. Maiwashe and F.C. Muchadeyi. 2013. Evaluation of the Bovine SNP 50 genotyping array in four South African cattle populations. *South Africa Journal Animal Science*, 43: 64-67.
36. Rahmaninia, J., S.R. Miraei-Ashtiani and H. Moradi Shahrababak. 2015. Unsupervised clustering analysis of population and subpopulation structure using dense SNP markers. *Iranian Journal of Animal Science*, 46(3): 277-287.
37. Sargolzaei, M., F.S. Schenkel, G.B. Jansen and L.R. Schaeffer. 2008. Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America. *Journal of Dairy Science*, 91: 2106-2117.
38. Simianer, H. 2005. Decision making in livestock conservation. *Ecological Economics*, 54: 559-572.
39. Urgul, A., T. Szmatoła, P. Topolski, I. Jasielczuk, K. Żukowski and M. Bugno-Poniewierska. 2016. The use of runs of homozygosity for estimation of recent inbreeding in Holstein cattle. *Journal Applied Genetics*, 57: 527-530.
40. Yang, W., X. Kang, Q. Yang, Y. Lin and M. Fang. 2013. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1): 1-6.

