Archive of SID

نقش شاخصه‌های ژنتیکی در تعیین نژاد اسب‌های عرب

سروین جباری[۱]، محمدرضا مشایخی[۲*]، علی حسن‌پور[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۳- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: m.mashayekhi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۷/۸/۲۲ پذیرش نهایی: ۹۸/۳/۲۲)

چکیده

با توجه به این‌که صنعت پرورش اسب به‌عنوان چهارمین صنعت از لحاظ درآمدزایی در جهان مطرح است و نیز با عنایت به تنوع گونه‌های اسب‌های اصیل در جهان و ضرورت تعیین خلوص و نسب نزد صاحبان و پرورش‌دهندگان اسب، اهمیت تحقیقات آزمایشگاهی در این مورد مشخص می‌گردد. با توجه به تحقیقات گذشته در داخل و خارج کشور که به صورت موردی انجام شده، خلأ موجود در بررسی اسب‌های ایران از لحاظ تنوع مارکرهای ژنتیکی مثل توالی تکراری کوتاه (short tandem repeats; STR) ضرورت پیدا می‌کند. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی ۵۰ رأس اسب نژاد عرب مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از نشانگرهای ریزماهواره پیشنهادی ISAG (International Society for Animal Genetics) استفاده شد. این نشانگرها شامل ریزماهواره‌های VHL20، HTG4، HMS7 و AHT4 می‌باشند. برای این منظور DNA ژنومی از نمونه خونی اسب‌ها توسط روش مایلر استخراج گردید و به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه توسط پرایمر فلورسنت تکثیر شد. داده‌ها نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در جمعیت اسب‌های عرب وجود دارد. تعداد آلل‌های مشاهده‌شده برای هر جایگاه از ٦ تا ۹ آلل متغیر بود و مارکرهای AHT4 و VHL20 با ۹ آلل دارای بیشترین تعداد آلل و همچنین HTG4 بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی را دارا بود. همچنین جایگاه HMS7 دارای ۷ آلل بود که کمترین تعداد آلل در میان جایگاه‌های بررسی‌شده را داشت و جایگاه VHL20 دارای پایین‌ترین مقدار هتروزیگوسیتی بود. نتایج حاصله از مطالعه حاضر نشان‌دهنده فراوانی بالای تنوع ژنتیکی جمعیت اسب‌های عرب بود.

کلیدواژه‌ها: تنوع ژنتیکی، توالی تکراری کوتاه، اسب عرب، ریزماهواره.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بر اساس رده‌بندی سیستماتیک، اسب در سلسله جانوران، زیرسلسله پرسلولی، دسته طنابداران، شاخه مهره‌داران (vertebrate)، رده پستانداران (mammalia)، راسته سم‌داران (perrissodaylae)، زیرراسته تک‌سمی‌ها (perisodacty)، تیره اکوییده (equadea)، جنس اکویوس (equus) و گونه کابالوس (caballus) قرار دارد (Grubb, 2005). مطابق نوشته‌های بولینگ تیره اکوییده در اوایل زمین‌شناسی ایوسن (eocene) شناسایی شده است و همچنین زیرتیره هیراکوسریم (hyracotherium) در سال ۱۸٤۱ توسط ریچارد اون توصیف گردید (Vilà *et al*., 2001). از لحاظ تکاملی طبق یافته‌های فسیلی، منشأ اسب‌های امروزی از پستاندار کوچکی تحت عنوان ایوهیپوس (eohippus) می‌باشد که شباهت زیادی به روباه داشته و حدود ۱۳ نوع از این جاندار در بخش‌های مختلف آمریکای شمالی و انگلستان، سوئیس، فرانسه و بلژیک یافت شده است (Evans and Janis, 2014). اسب از جانورانی است که از آغاز در میان آریایی‌ها و در فرهنگ اقتصادی و اعتقادی ایرانیان جایگاه ویژه‌ای داشته و در نبردها اساسی‌ترین نقش را به سواره نظام داده بودند. همچنین این حیوان در فعالیت‌های بازرگانی اشکانیان بسیار مهم بوده است (Luís *et al*., 2006).

امروزه حدود ۱۰۰ نوع نژاد اسب در دنیا وجود دارد که از جمله مهم‌ترین آن‌ها به اسب‌های انگلیسی نژاد تروبرد، اسب‌های هانوورین اروپایی، کوارتر آمریکایی، اسب سرخپوستی، فالابلا و سایر نژادهایی از شمال انگلستان و نژاد فریزین اروپا، می‌توان اشاره نمود (Solis *et al*., 2005; Seyedabadi *et al*., 2006). دانشمندان اسب‌شناس دنیا به‌طور عمده اسب اصیل یا همان اسب عرب (شکل ۱) را مهم‌ترین عامل در اصلاح انواع نژادهای اسب دنیا ذکر می‌کنند، به‌طوری‌که این نژاد پایه و اساس نژاد تروبرد می‌باشد و برای این موضوع اهمیت زیادی قائل هستند. این اسب با شرایط اقلیمی متفاوت به راحتی سازگاری پیدا می‌کند و در حال حاضر در اغلب کشورهای دنیا، از مناطق سردسیر تا مناطق استوایی، منتشر گردیده و توسط سازمان بین المللی اسب عرب (world arabian horse organization; WAHO) مورد تایید می باشد (Chowdhary and Raudsepp, 2000).

مطالعات از این دست در جهت تعیین تنوع ژنتیکی برای شناسایی، حفظ، مدیریت و برنامه‌ریزی برای گونه‌های در معرض خطر و نیز پرورش نژادهای اصیل اسب بسیار ضروری می‌باشد (Fornal *et al*., 2013; Bowling, 2001) امروزه استفاده از مارکرهای ژنتیکی برای تعیین نژاد و خلوص اسب‌ها به‌کار می‌رود. همچنین در بین مارکرهای مولکولی، مارکر میکروساتلایت به‌طور وسیع استفاده می‌شود و به دلیل سهولت تعیین سایز آلل‌ها، جایگاه ویژه‌ای را در تعیین هویت و نژاد گونه‌های مختلف پیدا کرده است (Kimpton *et al*., 1994; Micka *et al*., 1996; Weinstock *et al*., 2005). این ساختارهای ژنتیکی و روش‌های مولکولی از دقت بسیار بالایی برخوردار هستند، به‌طوری‌که در مورد نژادهای مختلف اسب می‌توان از آن‌ها برای شناخت نژادهای اصیل و برتر استفاده کرد (Wimmers *et al*., 1998).

هدف از انجام مطالعه حاضر، استفاده از مارکرهای VHL20، HTG4، AHT4 و HMS7

www.SID.ir

Archive of SID

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت اسب‌های عرب منطقه تبریز بود.

شکل ۱- تصویری از یک اسب عرب نمونه

مواد و روش‌ها

خونگیری از ۵۰ رأس اسب نژاد عرب منطقه تبریز، از اول دی ماه سال ۱۳۹۵ به مدت یک ماه انجام و نمونه‌ها در لوله‌های ونوجکت حاوی EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) ٦ درصد جمع‌آوری شده، سپس درون یخ خشک به آزمایشگاه ژنومیکس مرکز تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز منتقل و توسط روش salting out یا نمک اشباع، DNA ژنومی نمونه‌های خون استخراج گردید (Ghaheri *et al.*, 2016). برای این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه خون توسط سمپلر برداشته شده و به میکروتیوب منتقل گردید. به منظور حذف گلبول‌های قرمز ۱ میلی‌لیتر از محلول لیزکننده گلبول‌های قرمز به خون اضافه شد و چند ثانیه ورتکس (vortex) شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۲ دقیقه با شتاب ٦۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و محلول رویی دور ریخته شد. جهت حذف گلبول‌های قرمز باقی‌مانده، دوباره به رسوب موجود در میکروتیوب ۱ میلی‌لیتر محلول لیزکننده گلبول قرمز اضافه گردید و مرحله فوق تکرار شد. سپس به رسوب باقی‌مانده که شامل گلبول‌های سفید بود، NLB (lysis buffer nuclei) جهت حذف نمودن هیستون‌ها به میکروتیوب اضافه گردید و پس از به‌هم زدن محلول به مدت ۱۵ دقیقه، به حمام خشک انتقال داده شد. سپس به آن کلروفرم و نمک اشباع اضافه گردید و محلول به‌دست آمده سانتریفیوژ (به‌مدت ۲۰ دقیقه با شتاب ۷۰۰۰ دور در دقیقه) گردید، محلول رویی که حاوی DNA است به آرامی برداشته شد و به میکروتیوب جدید انتقال داده شد و جهت رسوب DNA، اتانول مطلق به آن اضافه شد و دوباره سانتریفیوژ (به‌مدت ۱ دقیقه با شتاب ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه) گردید. در این مرحله محلول رویی دور ریخته شد. به منظور شست و شو جهت حذف آلودگی های

www.SID.ir

Archive of SID

احتمالی DNA، اتانول به رسوب DNA اضافه گردیده مجدداً سانتریفیوژ (به‌مدت ۳۰ ثانیه و با شتاب ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه) گردید و محلول رویی دور ریخته شد. جهت اطمینان ۲ بار DNA موجود با روش فوق شست‌وشو داده شد. برای تبخیر شدن کامل الکل و جلوگیری از تداخل آن در PCR درب میکروتیوب‌ها باز گردید و در حمام خشک قرار داده شد. پس از تبخیر کامل الکل بر روی DNA، آب دیونیزه اضافه گردید و DNA به صورت کامل حل گردید و میکروتیوب‌ها به فریزر ۲۰- منتقل و نگه‌داری شدند. پس از بررسی اولیه در ژل الکتروفورز ۰/۸ درصد و سپس برای اطمینان از خلوص و غلظت مناسب DNA استخراجی، با استفاده از دستگاه نانودرآپ (با اسم تجاری ترمو، ساخت کشور آلمان) در آزمایشگاه ژنومیکس مرکز تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز مورد آزمایش قرار گرفت و جهت انجام PCR گزینش شد. همچنین ٤ جفت پرایمر مربوط به جایگاه‌های ژنتیکی VHL20، HTG4، AHT4 و HMS7 مورد توافق انجمن ژنتیک حیوانات که در انتهای ´۵ توسط رنگ فلورسنت FAM نشاندار می‌شود، به شرکت کانادائی BIONEER سفارش داده شد (جدول ۱). سپس PCR چندگانه با استفاده از مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (با نام امپلیکون ساخت کشور دانمارک)، ٤ میکرولیتر مجموع پرایمرها (هر پرایمر به مقدار نیم میکرولیتر)، یک میکرولیتر از DNA استخراجی و در نهایت با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه دمائی مورد استفاده هم در دستگاه ترمال‌سایکلر (با نام پک لب ساخت کشور انگلستان) به ترتیب شامل مرحله واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه (شامل ۳۰ چرخه)، واسرشتگی اصلی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ٦۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن اولیه در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل‌شدن نهائی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از اتمام واکنش PCR برای اطمینان از تکثیرشدن جایگاه‌ها و صحت انجام PCR، محصولات واکنش به مقدار چهار میکرولیتر داخل چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد لود گردید. سپس زیر نور ماوراء بنفش، چهار باند مطابق انتظار و همچنین به صورت چندگانه دیده شد (شکل ۲).

محصولات PCR در دمای۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری و طول قطعات حاصله در محصولات مذکور، توسط دستگاه الکتروفورز موئینه واقع در آزمایشگاه زیست فناوری کوثر و هتروزیگوتی اندازه‌گیری شده، سپس توسط نرم‌افزار GENEMAPPER مورد آنالیز ژنتیکی قرار گرفت. در نهایت با استفاده از اعداد به‌دست آمده تعداد آلل‌ها و نیز شاخصPIC (polymorphism information content)، شاخص شانون (نشان‌دهنده میزان تنوع در جایگاه)، تعداد آلل‌ها و نیز هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار و همچنین اختلاف هتروزیگوتی مشاهده‌شده و مورد انتظار توسط فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Ala-Amjadi *et al.*, 2017).

$$Pi = \frac{\sum Ni + (Nij)\frac{1}{2}}{N} \quad (۱)$$

$$Ho = \Sigma Nij/N \quad (۲)$$

$$H_e = 1 - \Sigma P_i^2 \quad (۳)$$

www.SID.ir

Archive of SID

در فرمول‌های بالا N_i تعداد آلل‌های هموزیگوت، N_{ij} تعداد آلل‌های هتروزیگوت و همچنین N تعداد کل آلل‌ها را نشان می‌دهد. P_i نشان‌دهنده فراوانی جمعیت بوده، H_O هتروزیگوتی مشاهده‌شده و H_e هتروزیگوتی مورد انتظار می‌باشد. N_{ij} نیز تعداد هتروزیگوت‌ها و N تعداد جامعه آماری می‌باشد.

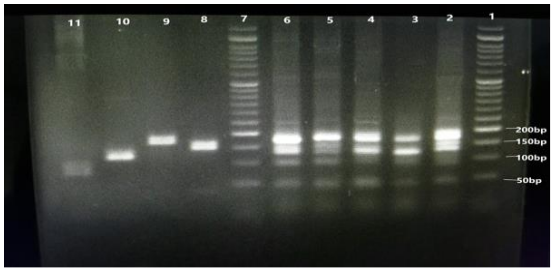
همچنین برای شاخص شانون که نشان‌دهنده میزان تنوع در یک جایگاه می‌باشد و شاخص PIC (polymorphism index content) که نشان‌دهنده میزان ارزش یک منطقه پلی‌مورف است، فراوانی آلل‌ها و هتروزیگوتی مشاهده‌شده و مورد انتظار با استفاده از فرمول‌های زیر به دست آمد که که در آن P_i فراوانی‌های آللی،و P_j فراوانی آللی و j می‌باشد (Botstein *et al.*, 1980).

$$H'=-\sum Pi\ LnPi \quad (٤)$$

$$IC=1-\sum_i^n pi-\sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^{n} 2p_i^2\ 2p_j^2 \quad (٥)$$

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

ژن هدف	موقعیت کروموزومی	رنگ فلوروسنت استفاده‌شده	توالی پرایمرها	اندازه آللی (جفت باز)	منبع
AHT4	24q14	FAM	F: AACCGCCTGAGCAAGGAAGT R: GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	144-164	Binns *et al.*, (1995)
HMS7	1q25	FAM	F: CAGGAAACTCATGTTGATACCATC R: TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	165-185	Guerin *et al.*, (1994)
HTG4	9	FAM	F: CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R: CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	127-139	Ellegren *et al.*, (1992)
VHL20	30	FAM	F: CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R: AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	87-105	Haeringen *et al.*, (1994)



شکل ۲- نتایج ژل الکتروفورز به صورت جداگانه و همچنین به صورت ٤ جفت در PCR گرادیانت

- **تحلیل آماری داده‌ها:** داده‌های جمع‌آوری‌شده به‌وسیله فرمول‌های ذکرشده در قسمت روش کار به‌طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند.

یافته‌ها

نتایج آماری قطعات تکثیرشده با استفاده از دستگاه الکتروفورز کاپیلاری حاکی از آن است که در جایگاه VHL20 کوچکترین آلل مشاهده‌شده برای جمعیت

www.SID.ir

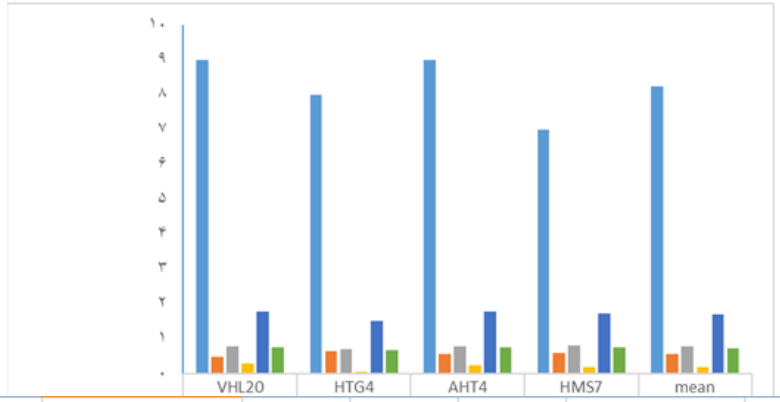
Archive of SID

اسب‌های عرب به‌اندازه ۸۵ جفت باز می‌باشد که کوچک‌تر از محدوده آللی می‌باشد و فقط در یک اسب دیده شد. همچنین بزرگ‌ترین آلل مشاهده‌شده در این جمعیت به‌اندازه ۱۰۷ جفت باز می‌باشد که بزرگ‌تر از محدوده آللی مورد انتظار می‌باشد. همچنین برای جایگاه HTG4، ۸ آلل مشاهده شد. اندازه کوچک‌ترین آلل مشاهده‌شده برای این جایگاه هم ۱۲٤ جفت باز می‌باشد که کوچک‌تر از محدوده آلل مورد انتظار بوده و فقط در یک مورد از اسب‌ها مشاهده گردیده است. اندازه بزرگ‌ترین آلل مشاهده‌شده برای این جایگاه نیز ۱٤۰ جفت باز می‌باشد که اندازه آن خارج از حالت طبیعی بود. فراوان‌ترین آلل مشاهده‌شده در جمعیت مورد مطالعه هم مربوط به آلل ۱۳۲ جفت بازی است. همچنین برای جایگاه AHT4 کوچک‌ترین اندازه آللی مشاهده‌شده، ۱٤۱ جفت باز می‌باشد که کوچک‌تر از اندازه آللی مورد انتظار است (نمودار ۱). همچنین بزرگ‌ترین اندازه آللی مشاهده شده در این جایگاه هم ۱۵۷ جفت باز می‌باشد که در محدوده آللی مورد انتظار (محدوده طبیعی) قرار گرفته است. از طرف دیگر فراوان‌ترین آلل مشاهده‌شده در این جایگاه در جمعیت مورد مطالعه، آللی به اندازه ۱٤۵ جفت باز می‌باشد که فراوانی آن ۰/۳۳ می‌باشد (نمودار ۱). در جایگاه HMS7 کوچک‌ترین آلل مشاهده شده در جمعیت مورد مطالعه به‌اندازه ۱٦۵جفت باز می‌باشد که مطابق محدوده آللی مورد انتظار می‌باشد (نمودار ۱). بزرگ‌ترین آلل مشاهده‌شده هم در این جایگاه آللی به‌اندازه ۱۷۹ جفت باز می‌باشد که در محدوده آللی مورد انتظار می‌باشد. همچنین فراوان‌ترین آلل مشاهده‌شده در این جایگاه هم مربوط به آلل ۱۷۳ جفت‌بازی است که فراوانی آن ۰/۲۹ می‌باشد که فراوانی بالایی در سایر نژادها هم دارد (نمودار ۱). همچنین آلل ۱٦۵ جفت بازی کم‌ترین فراوانی را داشته و فقط در یک مورد از نمونه‌های خون اسب‌های عرب مورد مطالعه مشاهده شد. همچنین بیشترین آلل برای جایگاه‌های AHT4 و VHL20 به اندازه ۹ و کمترین آلل مربوط به جایگاه HMS7 به‌اندازه ۷ بود. همچنین در جایگاه HTG4 هتروزیگوتی مشاهده‌شده دارای بیشترین مقدار بود و جایگاه VHL20 دارای کمترین مقدار هتروزیگوتی مشاهده‌شده بود. در صورتی‌که با محاسبات انجام‌شده جایگاه HMS7 دارای بیشترین هتروزیگوتی مورد انتظار و جایگاه HTG4 دارای کمترین مقدار هتروزیگوتی مورد انتظار بود. بیشترین مقدار برای شاخص شانون مربوط به جایگاه های AHT4 و VHL20 و همچنین کوجکترین مقدار آن مربوط به جایگاه HTG4 بود. متوسط شاخص PIC نیز برابر با ۰/۷٤ بود که نشان‌دهنده اهمیت این جایگاه‌ها برای مطالعه تنوع ژنتیکی است (نمودار ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

نمودار ۱- فرکانس آللی جایگاه‌های VHL20، HTG4، AHT4 و HMS7 در نمونه خون اسب‌های مورد آزمایش



	number of allele	Ho	He	He-Ho	shanon index	PIC
VHL20	۹	۰/٤۸	۰/۷۹۳۸	۰/۳۱۳۸	۱/۸۰۱	۰/۷٦۸٤
HTG4	۸	۰/٦٦	۰/۷۱٤	۰/۰٥٤	۱/٥۰۷٥۹	۰/٦۷٦۳
AHT4	۹	۰/٥٦	۰/۷۹٦٤	۰/۲۳٦٤	۱/۸۰۱۸۹	۰/۷۷
HMS7	۷	۰/٦	۰/۸۰۳۲	۰/۲۰۲۳	۱/۷۲٤٦٦	۰/۷۷٥۱
mean	۸/۲٥	۰/٥۷٥	۰/۷۷٦۸	۰/۲۰۱۸	۱/۷۰۸۷۷	۰/۷٤۷٤

نمودار ۲- تعداد آلل، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و نیز هتروزیگوزیستی مورد انتظار و همچنین مقادیر PIC و Shanon در خون اسب‌های مورد آزمایش

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه‌ای که روی اسب‌های کاسپین توسط سیدآبادی و همکاران انجام گرفته است در جایگاه VHL20، ٤ آلل مشاهده گردیده و هتروزیگوتی هم ۰/۹٤ محاسبه شده است (Seyedabadi *et al*., 2006). همچنین در مطالعه‌ای که روی ۱۲۸۵ رأس از اسب‌های تروبرد کره جنوبی توسط لی و همکاران انجام پذیرفته، برای جایگاه VHL20، ۵ آلل مشاهده شده که هتروزگوتی هم ۰/٦۸۰ گزارش شده است (Lee and Cho 2006). همچنین در مطالعه انجام شده توسط گروه ژنتیک دانشگاه آزاد تبریز بناآبادی و همکاران ٤ نژاد از اسب‌های کاسپین، عرب، تروبرد و ترکمن مورد مطالعه قرارگرفته و برای جایگاه VHL20 در نژادهای ذکر شده به ترتیب ۷، ۷، ۵ و ۳ آلل مشاهده شده است که به‌ترتیب دارای هتروزیگوتی ۰/۸٦٦، ۰/۷۲۷، ۱ و ۰/۵ بوده‌اند (Banaabadi *et al*., 2017). در تحقیقی دیگر که توسط وحدانی و همکاران در رابطه با اسب کرد در همین جایگاه صورت گرفت، ۹ آلل و هتروزیگوتی ۰/۷۵ گزارش شد (Vahdani *et al*., 2016). در مقایسه کلی می‌توان گفت که ۹ آلل برای این جایگاه در جمعیت اسب‌های عرب مشاهده گردید، در صورتی که در اسب‌های کاسپین بررسی‌شده در مطالعه بناآبادی و همکاران، ۷ آلل برای این جایگاه شناسائی شده‌است. همچنین آلل ۱۰۷ جفت بازی که فراوانی مناسبی را در میان جمعیت اسب‌های عرب دارد در جمعیت اسب‌های کاسپین و تروبرد مشاهده نشده است و در این جایگاه این آلل‌ها نقطه تمایز بین دو نژاد کاسپین و تروبرد با نژاد عرب می‌باشند (Banaabadi *et al*., 2017).

در مطالعه انجام‌شده توسط لی و همکاران روی اسب‌های تروبرد کره جنوبی مشخص گردیده که جایگاه HTG4 در این جمعیت دارای ۵ آلل و هتروزیگوتی ۰/۵۵۹ می‌باشد (Lee and Cho, 2006). در مطالعه‌ای دیگر در تنوع ژنتیکی اسب‌های تروبرد اوکراین ۵ آلل مشاهده شده است (Мельник *et al*., 2013).

در مطالعه انجام شده توسط بناآبادی و همکاران، برای این جایگاه در میان نژادهای کاسپین ٦ آلل مشاهده شده که دارای هتروزیگوتی ۰/۸٦۳ می‌باشند. همچنین برای این جایگاه در نژادهای ترکمن و تروبرد به ترتیب ۲ و ۵ آلل مشاهده شده که هتروزگوتی هم به ترتیب ۱ و ۱ بوده است (Banaabadi *et al*., 2017). همچنین در مقایسه این جایگاه میان اسب‌های عرب و کرد مشاهده گردید که آلل ۱۳۱ جفت بازی در جمعیت اسب‌های کرد فراوانی بالایی داشت، در حالی که در جمعیت اسب‌های عرب این آلل مشاهده نشده است. این جایگاه در نژاد اسب عرب نسبت به بقیه اسب‌های ایرانی تنوع بیشتری را دارا می‌باشد (Vahdani *et al*., 2017).

همچنین برای جایگاه AHT4 در اسب‌های تروبرد اوکراین ۹ آلل و هتروزیگوتی ۰/۸۵۸ مشاهده گردیده (Мельник *et al*., 2013)، در صورتی که در اسب‌های تروبرد روسیه ٤ آلل برای این جایگاه و هتروزیگوتی ۰/۸٦۰ گزارش شده است (Shelyov *et al*., 2014).

در مطالعه انجام‌شده توسط سیدآبادی و همکاران هم برای اسب‌های کاسپین در این جایگاه ۳ آلل مشاهده و هتروزیگوتی این جایگاه ۰/۷۵٦ محاسبه گردیده بود (Seyedabadi *et al*., 2006). همچنین در مطالعه لی و همکاران که روی اسب تروبرد انجام گرفته است ۵ آلل

www.SID.ir

Archive of SID

با هتروزیگوتی ۰/۷۸۱ برای این جایگاه مشاهده شده است (Lee and Cho, 2006). در مطالعه انجام‌شده توسط بناآبادی و همکاران در مورد جایگاه مذکور در نژادهای کاسپین، ترکمن و تروبرد، به ترتیب ۸ ، ۵ و ٤ آلل مشاهده و همچنین هتروزیگوتی این جایگاه در نژادهای مورد بررسی به ترتیب ۰/۷۲۳، ۱ و ۰/۵ محاسبه شده است (Banaabadi *et al.*, 2017).

در مطالعه انجام‌گرفته در مورد جایگاه HMS7 روی اسب‌های تروبرد اوکراین توسط ملنیک و همکاران ۸ آلل مشخص گردیده است (Мельник *et al.*, 2013). همچنین اسب‌های تروبرد روسیه هم که توسط شلو و همکاران دارای ٦ آلل برای این جایگاه بوده‌اند (Shelyov *et al.*, 2014). در اسب‌های تروبرد مورد مطالعه توسط لی و همکاران نیز برای این جایگاه ٦ آلل مشاهده گردیده است (Lee and Cho, 2006). در مطالعه انجام شده توسط بنا آبادی و همکاران نژادهای کاسپین، ترکمن و تروبرد هم به ترتیب ۷، ٤، ۳ آلل مشاهده گردیده است (Banaabadi *et al.*, 2017).

نتایج مطالعه حاضر، مشابه سایر مطالعات گذشته، موید کارآمدی ژنوتایپینگ میکروساتلیت DNA در تشخیص نژادهای اسب و تست‌های تشخیص والدی (paternity) می باشد تعداد آلل‌ها و میزان هتروزیگوسیته در چهار جایگاه مور بررسی در این مطالعه نشان‌دهنده پلی‌مورفیسم و تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت مورد بررسی می‌باشد.

همانطور که اشاره شد، مطالعات تنوع ژنتیکی و تست‌های والدی که بر اساس ریزماهواره‌ها صورت می‌گیرد، بسیار دقیق و اختصاصی می‌باشند و برخلاف روش‌های سنتی دارای خطای کمتری هستند. STRهای معرفی شده از سوی ISAG جایگاه‌هایی پلی‌مورف می‌باشند که برای بررسی گونه‌ها از جمله اسب معرفی گردیده‌اند. با تکثیر و مطالعه این جایگاه‌ها می‌توان به‌طور دقیق نژاد اسب‌ها را تشخیص داد. در جایگاه‌های مطالعه‌شده از مقایسه فراوانی برخی از آلل‌ها می‌توان شاخصی را برای تفکیک نژادها جدا نمود. برخی از آلل‌ها با فراوانی بالایی در جمعیت اسب‌های عرب وجود دارد، در حالی‌که در سایر نژاد اسب‌ها مشاهده نمی‌شود. به‌طور کلی چندین آلل در جمعیت اسب‌های عرب ایران نیز با فراوانی‌های متفاوت مشاهده شده است که در بقیه نژادها وجود ندارد و نقطه تمایز این نژاد از اسب از سایر نژادها می‌باشد (Kavar *et al.*, 1999). اگرچه این مطالعه فقط بر روی ٤ جفت از ۱۷ جفت آلل انجام گرفته است، لکن نتیجه‌گیری قطعی را زمانی می‌توان ارائه داد که همه نتایج بررسی شود. در هر صورت، اسب‌های عرب در مناطقی از شمال‌غرب کشور یافت می‌گردند و در مطالعه کنونی اسب‌های موجود در استان آذربایجان‌شرقی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد که اسب‌های عرب مناطق دیگر ایران نیز مورد مطالعه و بررسی قرار گیرند.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

- Ala-Amjadi, M., Yeganeh, H. and Sadeghi, M. (2017). Study of genetic variation in Iranian Kurdish horse using microsatellite marker. Iranian Journal of Animal Science, 48(3): 335-342. [In Persian]
- Banaabadi, H., Mashayekhi, M.R., Hasanpour, A. and Ayubi, M.R. (2017). The study of genetic variability of Arabian and Caspian horses using microsatellite. Journal of Animal Science Researches, 27(3): 175-183. [In Persian]
- Binns, M. and Holmes, N. (1995). The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. British Veterinary Journal, 151(1): 9-15.
- Botstein, D. and White, R.L. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32(3): 314-331.
- Bowling, A. (2001). Historical development and application of molecular genetic tests for horse identification and parentage control. Livestock Production Science, 72(1-2): 111-116.
- Chowdhary B.P. and Raudsepp, T. (2000). Cytogenetics and physical gene maps. In: The Genetics of The Horse. Bowling A.T. and Ruvinsky A. editors., New York: CABI Publishing, pp:171-242.
- Ellegren, H., Johansson, M., Sandberg, K. and Andersson, L. (1992). Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. Animal Genetics, 23(2): 133-142.
- Evans, A.R. and Janis, C.M. (2014). The evolution of high dental complexity in the horse lineage. Annales Zoologici Fennici, BioOne, 51(1): 73-79.
- Fornal, A., Radko, A. and Piestrzyńska-Kajtoch, A. (2013). Genetic polymorphism of Hucul horse population based on 17 microsatellite loci. Acta Biochimica Polonica, 60(4): 761-765.
- Ghaheri, M., Kahrizi, D., Yari, K., Babaie, A., Suthar, R.S. and Kazemi, E. (2016). A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. Cellular and Molecular Biology, 62(3): 120-124.
- Grubb, P. (2005). Order Perissodactyla, Mammals Species of the World, A Taxonomic and Geographic Reference. 3rd ed., The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp: 629-636.
- Guekin, G., Bertaud, M. and Amigues, Y. (1994). Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. Animal Genetics, 25(1): 62-62.
- Kavar, T., Habe, F., Brem, G. and Dovč, P. (1999). Mitochondrial D-loop sequence variation among the 16 maternal lines of the Lipizzan horse breed. Animal Genetics, 30(6): 423-430.
- Kimpton, C., Fisher, D., Watson, S., Adams, M. Urquhart, A., Lygo, J., *et al*. (1994). Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. International Journal of Legal Medicine, 106(6): 302-311.
- Lee, S.Y. and Cho, G.J. (2006). Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. Journal of Veterinary Science, 7(1): 63-67.
- Luís, C., Bastos-Silveira, C., Gus Cothran, E. and Do Mar Oom, M. (2006). Iberian origins of New World horse breeds. Journal of Heredity, 97(2): 107-113.
- Melnyk, O.V., Spyrydonov, V.G., Dzitsiuk, V.V. and Osadchyj, S.A. (2013). Molecular-Genetic CHaracterization of Shetland pony using microsatellite loci of DNA. The Animal Biology, 15(4): 73-79.
- Micka, K.A., Sprecher, C., Lins, A., Comey, C., Koons, B., Crouse, C., *et al*. (1996). Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications, Journal of Forensic Science, 41(4): 582-590.
- Miller, S., Dykes, D. and Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16(3): 1215-1216.
- Seyedabadi, H., Amirinia, C., Banabazi, M.H. and Emrani, H. (2006). Parentage verification of Iranian Caspian horse using microsatellites markers. Iranian Journal of Biotechnology, 4(4): 260-264.

www.SID.ir

Archive of SID

- Shelyov, A., Melnyk, O., Suprun, I., Spyrydonov, V., Melnychvk, S., Dzitsiuk, V., *et al*. (2014). The comparative analysis of the allele pool of Thoroughbred horses in different countries. Iranian Journal of Applied Animal Science, 4(3): 637-641.
- Solis, A., Jugo, B., Mériaux, J., Iriondo, M., Mazón, L., Aguirre, A., *et al*. (2005). Genetic diversity within and among four South European native horse breeds based on microsatellite DNA analysis: implications for conservation. Journal of Heredity, 96(6): 670-678.
- Vahdani, M.A., Mashayekhi, M.R., Hasan pour, A. and Ayubi, M.R. (2016). Evaluation of the genetic diversity of Iranian Kurdish horses. Animal Science Research (Agricultural Knowledge), 27(1): 95-102. [In Persian]
- Van Haeringen, H., Bowling, A., Stott, M., Lenstra, J. and Zwaagstra, K. (1994). A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. Animal Genetics, 25(3): 207-207.
- Vilà, C., Leonard, J.A., Götherström, A., Marklund, S., Sandberg, K., Lidén, K., *et al*. (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. Science, 291(5503): 474-477.
- Weinstock, J., Willerslev, E., Sher, A., Tong, W., Y.W Ho, S., Rubenstein, D., *et al*. (2005). Evolution, systematics, and phylogeography of Pleistocene horses in the New World: a molecular perspective. PLoS Biology, 3(8): 241-248.
- Wimmers, K., Ponsuksili, S., Schmoll, F., Hardge, T., Hatzipanagiotou, A., Weber, J., *et al*. (1998). Efficiency of microsatellite markers of the international standard panel for parentage control in German horse populations. Zuechtungskunde (Germany), 70(4): 233-241.

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Clinical Pathology, Vol.13, No. 50, Summer 2019

The role of genetic indices in determining the race of the Arabian horses

Jabbari, S.[1], Mashayekhi, M.R.[2]*, Hasanpour, A.[3]

1- MSc Graduate, Department of Genetic, Faculty of Basic Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Genetic, Faculty of Basic Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's email: m.mashayekhi@iaut.ac.ir
(Received: 2018/11/13 Accepted: 2019/6/12)

Abstract

Considering that the horse breeding industry is the fourth largest source of income generation in the world, and due to the diversity of species of horses in the world and the necessity of purity determination amongst breeders and horse owners, the importance of laboratory research in this regard is justified. According to past research, carried out sporadically in the country and abroad, there is a vacuum in the study of Iranian horses in terms of the diversity of genetic markers such as STR. The present study investigated short tandem repeat (STR) and allele frequency of 50 Arab horses using four loci (VHL20, AHT4, HTG4 and HMS7) recommended by the International Society for Animal Genetics (ISAG). For this purpose, genomic DNA was extracted from whole blood using the Miller procedure and amplified by Multiplex PCR with fluorescent primers. The results indicated the presence of high genetic variability among the population of Arab horses. The number of alleles observed for each locus ranged from 6 to 9 with tAHT4 and VHL20 markers having the highest number of alleles with 9 alleles, and HTG4, with the highest heterozygosity. The HMS7 site had the lowest number of alleles among the sites examined with 7 alleles, and the VHL20 site had the lowest heterozygosity. The results of this study indicate a high frequency of genetic variation among the population of Arab horses.
Conflict of interest: None declared.
Keywords: Genetic variability, Short tandem repeat, Arabian horse, Microsatellite.

www.SID.ir