Iranian Journal of Animal Science
Vol 48, No 3, Autumn 2017 (335-342)
DOI: 10.22059/ijas.2017.237799.653544

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶ (ص ۳۴۲-۳۳۵)

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت اسب کرد ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

مطهره علامجدی[۱]، حسن مهربانی یگانه[۲] و مصطفی صادقی[۲*]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/٥/١٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۷/۲)

چکیده

در این تحقیق با استفاده از شش نشانگر ریزماهواره (HMS07, HMS03, HMS02, HMS06, ASB02, ASB23) تنوع ژنتیکی درون جمعیت ۵۲ نمونه اسب کرد اصیل که از استان‌های کردستان، کرمانشاه، ایلام، آذربایجان غربی، اصفهان، کرمان و همدان به‌طور تصادفی نمونه‌گیری شده‌اند، بررسی شد. از نمونهٔ خون‌های گرفته‌شده DNA به روش نمکی بهینه یافته استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای افزونش قطعه‌های شش جایگاه ریزماهواره با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی به‌صورت استاندارد انجام شد. آنگاه محصولات PCR شش جایگاه روی ژل اکریل آمید ۸ درصد، الکتروفورز و رنگ‌آمیزی شد. جایگاه‌ها در جمعیت مورد بررسی، چندشکلی بالایی را نشان دادند. شمار آلل‌های مشاهده‌شده و آلل‌های مؤثر و میزان ناخالصی (هتروزیگوسیتی) مورد انتظار و مشاهده‌شده و شاخص شانون برای همهٔ جایگاه‌ها محاسبه شد. نتایج این تحقیق نشان داد، شمار آلل‌های شش جایگاه مورد بررسی، از ٤ تا ۱۰ آلل متغیر بودند. بیشترین آلل در جایگاه HMS07 (ده آلل) و کمترین آلل در جایگاه HMS02 (چهار آلل) مشاهده شد. با توجه به نتایج مشاهده‌شده، جایگاه‌های ریزماهوارهٔ مورد استفاده چندشکلی بالایی در جمعیت اسب کرد داشتند و می‌توان از چندشکلی بالای آن‌ها در بررسی‌های بعدی، به‌ویژه در بررسی‌های ژنتیک جمعیت استفاده کرد. آلل‌ها و دامنه‌های آللی جدید در اسب کرد، گویای تفاوت ساختاری جمعیتی آن‌ها با دیگر نژادهای اسب مورد بررسی در تحقیقات دیگر مانند اسب ترکمن و عرب است.

واژه‌های کلیدی: آلل، اسب کرد، چندشکلی، ریخت‌شناسی، ریزماهواره.

Study of Genetic variation in Iranian Kurdish horse using microsatellite marker

Motahareh Ala-Amjadi[1], Hassan Mehrabani Yeganeh[2] and Mostafa Sadeghi[2*]
1, 2. M. Sc. Student and Associat Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Aug. 5, 2017 - Accepted: Sep. 24, 2017)

ABSTRACT

In this research genetic variation using 6 microsatellite loci (HMS07, HMS03, HMS02, HMS06, ASB02, ASB23) was studied in Iranian Kurdish horse population .Whole blood samples were randomly collected from 52 horses in Kurdistan, Kermanshah, Elam, Western Azerbaijan, Esfahan, Kerman and Hamadan regions. DNA was extracted from blood samples. Polymerase chain reaction (PCR) was used for amplification of 6 microsatellite loci using pairs of standard specific primers. Then, the PCR products assessed with 8% silver-staining acrylamide gel and electrophoresed. All microsatellites loci were polymorphic. The number of alleles observed and expected hetrozygosities were calculated with Shannon Index. The largest and smallest number of alleles were observed in HMS07 locus (10 alleles) and HMS02 (4 alleles) respectively. Our results confirmed the high efficiency of microsatellite markers for assessing population structure in Iranian native horses.

Keywords: Kurdish horse, microsatellite markers, polymorphisms.

* Corresponding author E-mail: sadeghimos@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

نژادهای بومی در هر کشور به‌عنوان سرمایه‌های ملی و ذخایر ژنتیکی کلیدی بوده و حفظ و افزونش آن‌ها ارزش و اهمیت بسیاری دارد. امروزه نژادهای مختلفی از اسب در جهان وجود دارد که از نظر نوع فعالیت، ریخت ظاهری (تیپ)، رنگ، وزن، شکل و رفتار با یکدیگر تفاوت‌های زیادی دارند (Frankham, 1994).

اسب کرد ویژگی‌های ظاهری همچون: ریخت ظاهری منحصربه‌فرد و بسیار توانا درزمینهٔ راهپیمایی کوهستانی دارد. این نژاد خاص استان کردستان، از لحاظ رفتاری بسیار باهوش است، آن‌چنان‌که استعداد ذاتی شگرف آن در چوگان و درساژ در میان دیگر نژادهای بومی ایران به‌منزلهٔ ویژگی بارز این ذخیرهٔ ارزشمند ژنتیکی برشمرده می‌شود. آخرین آمار رسمی منتشرشده در رابطه با جمعیت اسب‌های ایران مربوط به سال ۲۰۰۴ است، برابر با این آمار، شمار کل جمعیت اسب موجود در کشور حدود ۱۵۵۰۰۰رأس اسب است که از این میان، اسب کرد جمعیتی در حدود ۲۷۰۰ رأس اسب را به خود اختصاص داده است. از گذشته‌های دور تابه‌حال، استفادهٔ خاص این نژاد در مناطق کوهستانی و مسابقه‌های درساژ بوده است (Report on farm animal genetic resources, 2004). اسب کرد شامل سه تیرهٔ افشاری، سنجابی و جاف است. زیستگاه اصلی این اسب به‌طور عمده در استان کردستان و در نواحی تپه‌ای است. اما امروزه پراکنش این اسب تا استان‌های آذربایجان، کرمان، همدان، اصفهان، کرمانشاه و ایلام و همچنین در بخش‌هایی از کشور عراق و ترکیه قابل‌مشاهده است. بر پایهٔ شواهد تاریخی پیشینهٔ این اسب به بیش از ۲۵۰۰ سال پیش برمی‌گردد (Mallowa *et al*., 1985).

استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) در شناخت نژادهای اسب دنیا قدمت زیادی دارد. در مورد اسب کرد، پیشانی برجسته، بدن عضلانی ، دست و پاهای کوتاه و محکم، شاخص‌های مورفولوژیکی خاص این نژاد هستند. اما ویژگی‌های ظاهری نمی‌تواند راهنمای به‌کلی دقیق و خوبی برای تشخیص تفاوت‌های ژنتیکی باشد. در طی دو دههٔ اخیر روش‌های مولکولی به کمک متخصصان مربوطه آمده که امکان بررسی ساختار ژنتیکی جانوران را به‌طور مستقیم فراهم کرده است. از بین نشانگرهای مولکولی نیز، ریزماهواره‌ها برای بررسی‌های ژنتیک جمعیت و تنوع ژنتیکی نسبت به دیگر نشانگرها برتری ویژه‌ای دارند. زیرا این جایگاه‌ها در سرتاسر ژنگان (ژنوم) پراکنده‌اند و چندشکلی بالایی را نشان می‌دهند که علت آن تفاوت شماری چند از توالی‌های سادهٔ تکراری است که یکی پس از دیگری پشت سرهم قرار گرفته‌اند. این نشانگرها سطح بالایی از ناخالصی (هتروزیگوسیتی) را نشان می‌دهند و همبارز هستند (Barker *et al*., 1997).

ارزان بودن، آسانی کار با ریزماهواره‌ها، دقت بالا در تشخیص نژادگان (ژنوتیپ)ها و تفسیر به نسبت سادهٔ نتایج، از برتری‌های مهم این نشانگرهاست. این ویژگی‌ها پایهٔ مناسبی برای کاربرد موفقیت‌آمیز ریزماهواره‌ها در طیف گسترده‌ای از بررسی‌های بنیادی و عملی شده است. تاکنون بررسی‌های چندی درزمینهٔ تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف اسب در جهان انجام شده اما تحقیقات کمی دربارهٔ تنوع ژنتیکی اسب‌های کرد در ایران صورت گرفته است. Javanmiri *et al*. (2010)، تنوع ژنتیکی را با استفاده از دو جایگاه ریزماهواره درون سه جمعیت اسب (کردی، کلهر و افشاری) بررسی و بیان کردند که جمعیت افشاری و کلهر در یک شاخه و جمعیت کردی در شاخهٔ جداگانه‌ای قرار گرفتند.

Shahsavarani & Rahimi-Mianji (2010)، در بررسی که روی تنوع ژنتیکی صد اسب کاسپین ایران، با استفاده از شانزده نشانگر ریزماهواره انجام دادند، گزارش کردند که ناخالصی مشاهده‌شده ۰/۵۲ است که از ناخالصی مورد انتظار ۰/۸۲ کمتر بود. Behara *et al*. (1998)، کارایی نشانگرهای ریزماهواره‌ای را برای پی بردن به ارتباط ژنتیکی بین نژادهای اسب آزمایش و این ارتباطات و اهمیت آن را با درستی ۹۹ درصد اثبات کردند.

در واقع آنان با به‌کار بردن یازده نشانگر ریزماهواره در میان ۹۰۳ اسب نشان دادند، در نژادهای به‌شدت در حال انقراض و نژادهای بسیار نزدیک به هم، شمار

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه بر الگوی خوشه‌بندی، تأثیر کمی می‌گذارد و نمونه‌هایی که تنها سی حیوان دارند در ۹۸ درصد موارد در خوشهٔ درست قرار می‌گیرند.

هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی و آماره‌های جمعیتی در نمونه‌ای از اسب‌های کرد استان‌های مختلف ایران بود.

مواد و روش‌ها

خون‌گیری و استخراج DNA

خون‌گیری از شمار ۵۲ رأس اسب اصیل کرد در مناطق اصلی پرورش آن‌ها در استان‌های کردستان، کرمانشاه، ایلام، آذربایجان غربی، اصفهان، کرمان و همدان صورت گرفت. در حدود ۵ میلی‌لیتر خون از ورید وداج هر حیوان گرفته شد. برای نمونه‌گیری و اطمینان از اخذ صحیح نمونه‌های اسب کرد به ویژگی‌های ریخت‌شناختی و داده‌های شجره‌ای در صورت وجود توجه شد.

استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم از نمونهٔ مو و خون انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده به روش طیف‌سنجی و الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ارزیابی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگرهای HMS07, HMS03, HMS02, HMS06 ASB23, ASB02 , که از راهنمایی ارائه‌شده توسط سازمان خواربار و کشاورزی (فائو) در سال ۲۰۱۱ با عنوان راهنمای پیشنهادی برای انجام کارهای مولکولی روی حیوانات ارائه‌شده بود (FAO,2011) و همچنین با بررسی دیگر منابع موجود در این زمینه انجام شد. از بین آغازگرهای پیشنهادی، شش آغازگر که در بیشتر منابع مورد بررسی تنوع آللی بیشتر داشتند انتخاب شدند و بهترین دمای اتصال هر آغازگر پس از انجام آزمون، تعیین شد. شرایط واکنش PCR در جدول ۱ آورده شده است. اجزای واکنش PCR و غلظت آن‌ها به شرح زیر بود:

نمونهٔ DNA، ۱۰۰ نانوگرم (۲/۵ میکرولیتر)، مسترمیکس شامل (یک واحد آنزیم، بافر 1X، میزان بازهای نوکلئوتید آزاد (dNTPs) ۰/۲ میلی‌مولار و $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار) (۱۲/۵ میکرولیتر)، آغازگر رفت ۰/۳ میلی‌مولار (۱ میکرولیتر) و آغازگر برگشت ۰/۳ میلی‌مولار (۱ میکرولیتر) و آب مقطر دیونیزه (۸ میکرولیتر).

فراورده‌های PCR توسط ژل اکریل آمید واسرشته ساز ۸ درصد الکتروفورز شد و آنگاه ژل‌ها با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد. سپس همهٔ نوار (باند)ها به کمک نشانگر اندازه (DNA ladder) ، اندازه‌گیری شد. تعیین آلل هریک از نمونه‌ها برای جایگاه‌های مختلف از روی ژل صورت گرفت.

تحلیل آماری

در این بررسی برای محاسبهٔ شمار آلل در هر جایگاه، اندازهٔ آلل مؤثر، ناخالصی و خالصی (هوموزیگوسیتی) مشاهده‌شده و مورد انتظار، شاخص داده‌های شانون، شاخص تثبیت رایت[1] و فراوانی‌های آللی و ناخالصی مورد انتظار نااریب[2] با استفاده از نرم‌افزار جین الکس[3] نسخهٔ ۶/۴ و برای محاسبهٔ محتوای داده‌های چندشکلی[4] از نرم‌افزار اف.استات[5] نسخهٔ ۱/۲ استفاده شد.

یکی از معیارهای مورد استفاده برای چندشکلی نشانگرها، اندازهٔ آلل مؤثر (N_e) است که برابر با شمار آلل‌های مشاهده‌شدهٔ یک جایگاه در یک جمعیت است. این آماره به‌شدت تحت تأثیر اندازهٔ نمونه است. اندازهٔ آلل مؤثر از (رابطهٔ ۱) قابل محاسبه است:

$$N_e=1/\sum p_i^2 \qquad (۱)$$

که در این رابطه p_i فراوانی i امین آلل و N شمار آلل مشاهده‌شده در یک نشانگر معین است. ناخالصی هر جایگاه با (رابطهٔ ۲) محاسبه شد.

$$H_o=\sum N_{ij}/N \qquad (۲)$$

N_{ij}، $i\neq j$ شمار افراد ناخالص، i و j نوع آلل‌ها در جایگاه ژنی بررسی شده.

میزان ناخالصی مورد انتظار برای یک جمعیت خاص که در تعادل هاردی- واینبرگ باشد برابر با (رابطهٔ ۳) است.

$$H_e=1-\Sigma p_i^2 \qquad (۳)$$

1. Wright fixation Index
2. Unbiased expected hetrozygosity
3. Gene Alex
4. Polymorphic information content
5. F- stat

Archive of SID

www.SID.ir

در این رابطه عبارت $\sum p_i^2$ انتظار خالص‌ها و p_i فراوانی آلل i در یک نشانگر معین است. عدد یک نیز نشان‌دهندهٔ کل نژادگان‌ها (مجموع فراوانی نسبی خالص‌ها و ناخالص‌ها) است. Nei (1978)، این رابطه را معیار اندازه‌گیری تنوع نامید و بیان کرد که این رابطه برای جانداران دیپلویید (برای جانداران با سامانهٔ تولیدمثلی خاص و متفاوت از پستانداران) می‌تواند معرف ناخالصی باشد.

جدول ۱. ویژگی‌های دمایی و زمانی جایگاه‌های افزونش‌شده در PCR

Table 1. Temperature and time features of different loci in PCR

Locus	Number of cycles	Primary Denaturation	Denaturation	Anneling	Elongation	Final Elongation
HMS03	37	95 ℃ - 5'	95 ℃-30"	60.8 ℃ -30"	72 ℃-45"	72 ℃- 7'
HMS07	37	95 ℃ - 5'	95℃-1'	62 ℃-30"	72 ℃-45"	72 ℃- 7'
HMS02	37	95 ℃ - 5'	95 ℃- 30"	60 ℃-30"	72 ℃-45"	72 ℃- 7'
HMS06	35	94 ℃ - 5'	94 ℃-45"	63 ℃-30"	72 ℃-45"	72 ℃- 7'
ASB02	38	95 ℃ - 5'	95 ℃-30"	58 ℃-45"	72 ℃-45"	72 ℃- 7'
ASB23	38	95 ℃ - 5'	95 ℃-30"	56 ℃-45"	72 ℃-45"	72 ℃- 7'

جدول ۲. داده‌های مربوط به آغازگرهای مرتبط با جایگاه‌های میکروستلایت مورد بررسی در این تحقیق

Table 2. Information of the primers associated with the studied microsatellite loci in this research

locus	Chromosome	Primer sequence (5' -> 3')	Genebank accession number	Allele range(bp)
HMS07	1	CAGGAAACTCATGTTGATACCATC TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	X74636	166-183
HMS06	4	GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAACTCA	X74635	153-169
HMS02	10	ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAATG	X74631	218-238
ASB02	15	CCTTCCGTAGTTTAAGCTTCTG CACAACTGAGTTCTCTGATAGG	X93516	222-254
HMS03	9	CCAACTCTTTGTCACATAACAAGA CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT	X74632	150-170
ASB23	3	GAGGTTTGTAATTGGAATG GAGAAGTCATTTTTAACACCT	X93537	128-154

جدول ۳. اندازهٔ آللی و فراوانی مربوط به جایگاه‌های میکروستلایت مورد بررسی

Table 3. The allele size and frequency of the microsatellite studied loci

Allels	HMS07	HMS06	HMS02	ASB02	HMS03	ASB23
A	149(0.07)	159(0.22)	234(0.32)	222(0.25)	146(0.16)	140(0.02)
B	160(0.10)	166(0.01)	249(0.20)	230(0.16)	154(0.08)	144(0.26)
C	167(0.03)	174(0.26)	272(0.26)	234(0.29)	162(0.22)	147(0.20)
D	170(0.05)	179(0.21)	286(0.20)	249(0.07)	164(0.14)	158(0.01)
E	177(0.30)	180(0.19)	-	260(0.08)	172(0.08)	160(0.25)
F	179(0.07)	184(0.09)	-	272(0.12)	174(0.20)	170(0.24)
G	183(0.12)	-	-	-	185(0.09)	-
H	200(0.04)	-	-	-	-	-
I	204(0.04)	-	-	-	-	-
J	209(0.11)	-	-	-	-	-

شاخص تنوع شانون به‌عنوان سنجه‌ای از تنوع گونه‌ای بنابر (رابطهٔ ۴) محاسبه شد.

$$I= \Sigma -p_i \ln p_i \qquad (۴)$$

p_i فراوانی آلل i در یک جایگاه معین است.

میزان شاخص تثبیت رایت یا ضریب کاهش ناخالصی که نشان‌دهندهٔ کاهش یا افزایش میزان ناخالصی مشاهده‌شده نسبت به ناخالصی مورد انتظار در هر نشانگر است، با استفاده از (رابطهٔ ۵) محاسبه شد:

$$\text{Wright fixation index}=H_e-H_o/H_e \qquad (۵)$$

تنوع درون جمعیتی یا تنوع ژنی به‌صورت ناخالصی مورد انتظار ناریب Nei یا همان UH_e در هر جایگاه قابل محاسبه است. در واقع با محاسبهٔ این آماره می‌توان روند افت ناخالصی در نسل‌های بعدی را پیش‌بینی کرد و در صورت وجود مقادیر با تفاوت زیاد، اصلاحاتی در روند انتخاب داشت (Nei, 1978).

این آماره با استفاده از (رابطهٔ ۶) قابل محاسبه است:

$$UH_e=(2N/2N-1)*H_e \qquad (۶)$$

N شمار افراد در جمعیت مورد بررسی است.

www.SID.ir

شاخص محتوای داده‌های چندشکلی (PIC) برای تعیین میزان چندشکلی یک نشانگر استفاده می‌شود. محتوای داده‌های چندشکلی نیز ناخالصی را نشان می‌دهد اما در محاسبهٔ آن از داده‌های مربوط به افراد ناخالصی که نژادگان متفاوت با نژادگان والدین خود دارند، استفاده می‌شود. بنابراین در جامعه‌های غیرخویشاوند نسبت به جامعه‌های خویشاوند PIC به‌طورمعمول اختلاف اندکی با میزان ناخالصی دارد. PIC با استفاده از رابطهٔ ۷ محاسبه شد (Nei,1998):

$$PIC= 2\sum_{i=1}^{k-1}\sum_{j=i+1}^{k} pi\ pj\ (1-pipj) \qquad (۷)$$

در این رابطه p_i بیانگر فراوانی آللی i ام، p_j بیانگر فراوانی آلل j و k بیانگر شمار آلل در جمعیت مورد بررسی است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود این معیار هم تحت تأثیر شمار آلل‌های یک جایگاه نشانگر و هم تحت تأثیر فراوانی این آلل‌ها قرار دارد.

نتایج و بحث

نتایج طیف‌سنجی نشان داد، DNAهای استخراج‌شده با غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر کیفیت مناسبی برای انجام PCR داشتند. با بهینه کردن شرایط PCR برای تک‌تک جایگاه‌های مورد بررسی، محصول PCR پیش از بررسی نوارهای ریزماهواره در ژل اکریل آمید واسرشته‌ساز، به‌صورت مقدماتی در ژل آگارز بررسی و با توجه به کیفیت محصول، ژل گذاری آکریل امید انجام شد.

داده‌های شش جایگاه ریزماهواره شامل شمار آلل‌ها، شمار آلل مؤثر، شاخص شانون و شاخص تثبیت رایت در جدول ۴ گزارش شده است. در این پژوهش، بیشترین شمار آلل در جایگاه HMS07 (ده آلل) و کمترین شمار آلل در جایگاه HMS02 (چهار آلل) مشاهده شد.

میانگین شمار آلل مشاهده‌شدهٔ شش جایگاه، ۶/۵ آلل بود که نشان داد جمعیت مورد بررسی تنوع آللی به نسبت بالایی دارد. همین دو جایگاه بیشترین و کمترین شمار آلل مؤثر نیز داشتند.

میانگین آلل مؤثر در جمعیت نیز ۵/۰۳ است. Azor *et al.* (2007)، با بررسی جمعیت اسب‌های اسپانیایی به کمک شانزده ریزماهواره، شمار ۱۲۱ آلل گزارش کردند و همچنین دامنهٔ آللی بین ۵ تا ۱۲ آلل با میانگین اندازهٔ مؤثر ۵/۸۹ بود.

Vahdani Manaf *et al.* (2017)، با بررسی چهار جایگاه میکروستلایت، دامنهٔ آللی مشاهده‌شده را از ۸ تا ۱۳ آلل با میانگین ۹/۵ آلل گزارش کردند. در این جمعیت میانگین ناخالصی مشاهده‌شده و مورد انتظار به ترتیب برابر با ۰/۷۵ و ۰/۷۸ بود. در این بررسی میانگین ناخالصی مشاهده‌شده و مورد انتظار به ترتیب برابر با ۰/۸۳ و ۰/۷۹ بود که بالاتر از نتایج vahdani Manaf *et al.* (2017) و Khanshour *et al.* (2013) با میانگین ۰/۷۱ و ۰/۷۵ بود.

Emil *et al.* (2005)، در بین هفده جایگاه مورد بررسی، گزارش کردند که بالاترین ناخالصی مورد انتظار مربوط به جایگاه ژنی بود که بالاترین شمار آلل مشاهده‌شده را داشت، که با نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش همخوانی دارد. در واقع میزان ناخالصی بستگی به فراوانی و توزیع آلل‌ها در جمعیت دارد. در این پژوهش، ناخالصی مورد انتظار جایگاه HMS02 نسبت به دیگر جایگاه‌ها پایین‌تر بود، با بررسی آلل‌های این جایگاه مشاهده شد که میزان خالصی آلل‌های این جایگاه نسبت به دیگر جایگاه‌های مورد بررسی بشدت کمتر بود و درصد آلل‌های ناخالص بالایی را پوشش می‌داد، پس پایین بودن میزان این شاخص را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد. در جایگاه HMS07 میزان ناخالصی مشاهده‌شده کمتر از میزان ناخالصی مورد انتظار است، که به‌احتمال علت آن تلاقی‌های نزدیک، کوچک بودن جمعیت، واریانس نمونه‌گیری و رانش تصادفی ژنتیکی باشد که این عامل‌ها باعث افزایش همخونی و کاهش ناخالصی مشاهده‌شده می‌شوند. همچنین با دقت در این جایگاه مشاهده شد که فراوانی نژادگان‌های خالصی مشاهده‌شده نسبت به جایگاه‌های دیگر مورد بررسی، بیشتر است. بیشترین میزان شاخص شانون مربوط به جایگاه HMS07 بود که با توجه به شمار آلل بیشتر این جایگاه منطقی به نظر می‌رسد و کمترین میزان این شاخص، متعلق به جایگاه HMS02 است که کمترین آلل نیز دارد. استفاده از شاخص شانون در این

Archive of SID

www.SID.ir

جمعیت می‌تواند آماره‌ای باشد که ارزیابی چندشکلی و میزان تغییرپذیری جایگاه‌های مورد بررسی را بهتر شناسایی کند. هرچه شاخص شانون به صفر نزدیک‌تر شود تنوع به طبع کمتر خواهد شد و هرچه یک جایگاه ژنی شاخص شانون بالاتری را نشان دهد گویای تنوع بالاتر آن جایگاه خواهد بود و استفاده از نشانگری که این معیار را بالاتر دارد برای بررسی تنوع موجود در جمعیت مورد بررسی تأثیرگذارتر خواهد بود (Orians, 1990). نتایج تحقیقات Silva *et al.* (2012) که با بررسی یازده جایگاه ریزماهواره در میان ۳۲۸ رأس اسب انجام شد، موافق با نتایج این پژوهش بود و بیشترین و کمترین آلل‌های مشاهده‌شده و شاخص شانون نیز به ترتیب در جایگاه HMS07 و HMS02 گزارش شدند.

Moravcicova *et al.* (2016)، نیز با به‌کارگیری ۱۷ میکروستلایت در سه جمعیت مختلف اسب و بررسی رابطه‌های بین نژادی آن‌ها، میانگین شاخص شانون را به ترتیب در دو نژاد نولیس و کلادروبر سیاه و خاکستری، ۱/۴۶، ۱/۴۰ و۱/۳۲ گزارش کردند. نتایج تحقیق آنان از میانگین شاخص شانون این تحقیق با میزان ۱/۶۸ کمتر است.

در این بررسی بالاترین میزان چندشکلی (PIC) مربوط به جایگاه HMS07 (۰/۸۲) و کمترین میزان آن مربوط به جایگاه HMS02 (۰/۷۱) بود. همچنین میانگینPIC در این جمعیت ۰/۷۶۳۳ برآورد شد. میزان بالای چندشکلی نشانگرهای ریزماهواره نشان‌دهندهٔ تنوع ژنتیکی به نسبت خوب در این جمعیت است.

Lee & Cho (2006)، با بررسی جمعیت اسب‌های خالص کره‌ای به کمک ۱۴ریزماهواره، دامنهٔ PIC به‌دست‌آمده در جمعیت را بین ۰/۴۵۱ تا ۰/۸۰۹ گزارش کردند و همچنین میانگین میزان آلل مؤثر مشاهده را ۶/۳۶ اعلام کردند. در واقع هرچه آلل‌های قابل‌شناسایی در جمعیت مورد بررسی بیشتر باشد، میزان PIC بالاتر خواهد بود. مقادیر جدول‌های ۴ و ۵ نشان می‌دهند که جایگاه‌های ریزماهواره با ناخالصی بالا، PIC بالایی نیز دارند و همین‌طور نتایج PIC از میزان ناخالصی‌های متناظرشان کمتر هستند. درنتیجه این دو فراسنجه باهم رابطهٔ مستقیم دارند. از این‌رو با دانستن مقادیر این دو فراسنجه می‌توان جایگاه‌هایی با توان تشخیص بالا را برای بررسی‌های بعدی انتخاب کرد.

جدول ۴. شمار آلل‌های مشاهده‌شده (N)، شمار آلل مؤثر (Ne)، شاخص شانون (Shannon Index)، شاخص تثبیت رایت (Wright fixation Index) برای هریک از جایگاه‌های میکروستلایت مورد بررسی

Table 4. Number of observed alleles (N), number of effective alleles (Ne), Shannon Index, Wright fixation Index for the studied microsatellite loci

Locus	N	Ne	Shannon Index	Wright Fixation Index
HMS07	10	6.40	2.08	0.15
HMS06	6	4.70	1.60	-0.02
HMS02	4	3.83	1.36	-0.27
ASB02	6	4.82	1.67	-0.01
HMS03	7	6.19	1.88	-0.03
ASB23	6	4.26	1.51	-0.15
Mean	6.5	5.03	1.68	-0.05

جدول ۵. میزان ناخالصی‌های مشاهده‌شده (H_o)، ناخالصی مورد انتظار (H_e)، ناخالصی مورد انتظار ناااریب (uH_e)، محتوای داده‌های چندشکلی (PIC) برای هریک از جایگاه‌های مورد بررسی

Table 5. The observed hertozygosity (H_o), Expected hetrozygosity (H_e), Unbiased expected hetrozygosity (UH_e), Polymorphic information content(PIC) for the studied microsatellite loci

Locus	Ho	He	UHe	PIC
HMS07	0.71	0.84	0.85	0.82
HMS06	0.80	0.78	0.79	0.75
HMS02	0.94	0.73	0.74	0.71
ASB02	0.80	0.79	0.80	0.76
HMS03	0.86	0.83	0.84	0.80
ASB23	0.88	0.76	0.77	0.74
Mean	0.83	0.79	0.80	0.76

Archive of SID

www.SID.ir

Khanshour *et al.* (2013)، در بررسی‌های انجام‌شدهٔ خود با استفاده از شانزده جایگاه ریزماهواره نیز، بیشترین میزان ناخالصی را متعلق به جایگاهی دانستند که بالاترین PIC را داشت.

پایین بودن میزان شاخص تثبیت رایت در کل جایگاه‌های مورد بررسی این تحقیق، نشان‌دهندهٔ پایین بودن سطح همخونی است. مقادیر این شاخص مخالف با تحقیقات (Shahsavarani & Rahimi-Mianji, 2010) بود، زیرا مقادیر برآوردشدهٔ این شاخص در جمعیت مورد بررسی، ۰/۳۶۷ گزارش شد که نشان‌دهندهٔ سطح مشخصی از کمبود ناخالصی بود. (Kusza *et al.* (2013، در بررسی، ۷۱ رأس اسب نژاد Hucul را با هفده ریزماهواره بررسی کردند. میانگین شاخص رایت به‌دست‌آمده برابر با ۰/۱۲۸- بود که نشان‌دهندهٔ سطح پایین همخونی، پایین بودن فشار انتخاب و بالا بودن شمار آلل‌ها است. مقادیر به‌دست‌آمدهٔ ناخالصی مورد انتظار نااریب برای کل شش جایگاه مورد بررسی، دامنه‌ای بین ۰/۷۴۶ تا۰/۸۵۲ را شامل شد. بالا بودن مقادیر به‌دست‌آمده، گویای سطح بالای تنوع درون جمعیتی است. نتایج این شاخص با بررسی‌های (Jemmali *et al.*, 2017) که دامنهٔ UHe بین ۰/۶۹۱ تا ۰/۸۵۲ را شامل می‌شد همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از این بررسی نشان داد، ریزماهواره‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگر مولکولی مناسبی در تحقیقات ژنتیکی و علوم زیستی گونه‌های جانوری مانند اسب استفاده شوند. همچنین مشخص شد شش جایگاه ریزماهواره استفاده‌شده در این تحقیق چندشکلی بالایی دارند و می‌توانند در اسب‌های نژاد کرد افزون بر تنوع ژنتیکی برای تشخیص انساب استفاده شوند.

سپاسگزاری

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. از استادان و کارکنان محترمی که در انجام این تحقیق یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Azor, P., Valera, M., Gómez, M. D., Goyache, F. & Molina, A. (2007).Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. *Journal of Genetics and Molecular Biology*, 30(1), 37-42.
2. Barker, J. S. F., Moore, S. S., Hetzel, D. J. S., Evans, D. & Byrne, K. (1997). Genetic diversity of Asian water buffalo *(Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Animal genetics*, 28(2), 103-115.
3. Behara, A. M. P., Colling, D. T., Cothran, E. G. & Gibson, J. P. (1998). Genetic relationships between horse breeds based on microsatellite data: applications for livestock conservation. In: Proceedings of *the 6th world congress on genetics applied to livestock production*, Armidale, Australia (28, 119-126).
4. Emil, G. S., Eduard, C., Mariana, R., Anca, D., Dumitru, T. C. & Marieta, C. (2005). Microsatellites Variations in Romanian Thoroughbred and Arabian horse Populations. In: *Proceedings of the Balkan scientific conference of biology*, 21st of May 2005, Bulgaria, pp. 202–209.
5. FAO. (2011). Molecular genetic characterization of animal genetic resources. *FAO Animal production and Health Guidelienes*. No.9.Rome.
6. Frankham, R. (1994). Conservation of genetic diversity for animals. *5th world congress on genetics Applied to livestock production*, University of Guelph, Ontario, Canada 21, 385-392.
7. Javanmiri, E., RostamZade, J. & Rashidi, A. (2010). *Evaluation of genetic variation of Kurdish horse using microsatellite markers*. M.Sc .thesis. Faculty of Agriculture of Kurdistan University, Iran. (in Farsi)
8. Jemmali, B., Haddad, M. M. , Barhoumi , N., Tounsi, S., Lasfer, F., Trabelsi , A., & Ezzaouia, M. H. (2017). Genetic diversity in Tunisian horse breeds. *Archiv fuer Tierzucht*, 60(2), 153.
9. Khanshour, A., Conant, E., Juras, R. & Cothran, E. G. (2013). Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Arabian horse populations. *Journal of Heredity*, 104(3), 386-398.
10. Kusza, S., Priskin, K., Ivankovic, A., Jedrzejewska, B., Podgorski, T., Jávor, A. & Mihók, S. (2013). Genetic characterization and population bottleneck in the Hucul horse based on microsatellite and mitochondrial data. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(1), 54-65.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Lee, S. Y. & Cho, G. J. (2006). Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. *Journal of veterinary science*, 7(1), 63-67.
12. Max Mallowan. (1985). Cyrus the Great. in Ilya Gershevitch , William Bayne Fisher, J. A. Boyle, The Cambridge History of Iran 2, *Cambridge University Press*, ISBN 0521200911 p. 417.
13. Ministry of jihad Agriculture, Agricultural research and education organization, Animal science research institute Iran's country: *Report on farm animal genetic resources*, Retrieved July, 2004. From: http://www.maj.ir/Portal/Home/Default.aspx?CategoryID=c5c8bb7b-ad9f-43dd-8502-cbb9e37fa2ce
14. Moravcikova, N., Kasarda, R., Kukuckova, V., Vostry, L. & Kadleclk, O. (2016). Genetic diversity of old Kladruber and Nonius horse populations through Microsatellite variation analysis. *Acta Agriculture Slovenia*, 5, 46.
15. 15. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.
16. Orians, G. H. (1990). The Preservation and valuation of biological resources. *University of Washington Press.*
17. Shahsavarani, H. & Rahimi-Mianji, G. (2010). Analysis of genetic diversity and estimation of inbreeding coefficient within Caspian horse population using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 9(3).
18. Silva, A. C. M., Paiva, S. R., Albuquerque, M. S. M., Egito, A. A., Santos, S. A., Lima, F. C., ... & McManus, C. M. (2012). Genetic variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*, 11(2), 881-890.
19. Vahdani Manaf, M. A., Mashayekhi, M. R., Hasanpour, A., Ayubi, M. R. (2017). Evaluation of the genetic diversity of Iranian Kurdish horses. *Journal of Animal science researches (Agricultural Science)*, 27(1), 95-102. (in Farsi)

Archive of SID

www.SID.ir