دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

بررسی ساختار ژنتیکی و دقت انتساب افراد به پنج جمعیت اسب با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

رضا سید شریفی[۱]، سجاد بادبرین[۲]، حسن خمیس آبادی[۳]، نعمت هدایت ایوریق[۴] و جمال سیف دواتی[۵]

۱- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (نویسنده مسوول: reza_seyedsharifi@yahoo.com)
۲ و ۳- استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی؛ کرمانشاه، ایران
۴ و ۵- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲
صفحه: ۱۲۰ تا ۱۲۶

چکیده

در بعضی موارد به دلیل همپوشانی صفات ظاهری و عدم ثبت اطلاعات والدینی، تعیین نژاد یک اسب با مشکل مواجه می‌شود. استفاده از روش‌های مولکولی انتساب افراد به جمعیت اولیه می‌تواند کمک قابل توجهی در این زمینه باشد. تحقیق حاضر با هدف بررسی ساختار ژنتیکی و میزان دقت انتساب اسب‌ها به جمعیت‌های مبداء با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام گرفت. برای این منظور از ۱۶۵ راس اسب شامل نژادهای کاسپین (۳۵ نمونه)، عرب (۳۶ نمونه)، ترکمن (۳۰ نمونه) و تاروبرد (۲۸ نمونه) و یک جمعیت آمیخته ترکمن- تاروبرد (۳۶ نمونه) به‌صورت تصادفی نمونه خون تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از ۱۲ نشانگر ریزماهواره توصیه شده توسط انجمن جهانی ژنتیک حیوانی (ISAG) انجام و محصولات حاصله روی ژل اکریل آمید ۸ درصد تفکیک و با استفاده از رنگ آمیزی نیترات نقره نمایان شد. برآورد متغیرهای ژنتیکی مانند تعداد آلل مؤثر و میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل توجهی در نشانگرهای مورد استفاده بود. از میان نشانگرهای بررسی شده، نشانگر AHT4 با ۱۱/۲۰ آلل بیشترین و نشانگر AHT5 با ٤/۲۸ آلل کمترین تعداد آلل مؤثر و نشانگر AHT4 (۰/۸۲) بیشترین و نشانگر ASB17 (۰/٦۷) کمترین میزان تنوع ژنتیکی را نشان دادند. بیشترین و کمترین میزان فاصله ژنتیکی بین نژاد تاروبرد و نژادهای عرب و کاسپین (۰/۹۱) و نژاد تاروبرد با جمعیت آمیخته (۰/۱۰) محاسبه شد. در مجموع نشانگرهای مورد استفاده توانستند ۷۹ درصد از افراد را به‌درستی به جمعیت مبدأ منتسب نمایند. بنابراین نشانگرهای ریزماهواره در برخی موارد کمک خوبی جهت تعیین منشاء نژادی اسب‌های کشور هستند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، آزمون انتساب، اسب‌های خالص، نشانگرهای ریزماهواره

مقدمه

نژادهای بومی متناسب با طیف وسیعی از شرایط محیطی و نیازهای انسانی، حاصل فرآیندهای جهش، رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری مجزایی است که طی قرون متمادی حاصل شده است. بنابراین با توجه به‌وجود ژن‌های منحصر به فرد در آنها، از اهمیت زیادی برخوردار بوده و حفظ خلوص ژنتیکی آن‌ها بسیار مهم است (۱۱). آمیخته‌گری اسب‌های بومی کشور با نژادهای خارجی و بخصوص نژاد تاروبرد، به‌منظور افزایش سرعت دویدن و کسب مقام در مسابقات اسب دوانی منجر به کاهش خلوص ژنتیکی آن‌ها شده است. فدراسیون سوارکاری و انجمن‌های نژادی در سرتاسر جهان قوانینی وضع کرده‌اند تا از آمیخته‌گری اسب‌های خالص با دیگر نژادها جلوگیری شود. روش معمول و سنتی انتساب افراد به یک نژاد، استفاده از تفاوت‌های ظاهری آن‌ها می‌باشد اما این روش در برخی از موارد با اشکالاتی روبه‌رو است، زیرا در نژادهای با فنوتیپ نزدیک تعیین مرز قاطع برای صفات ظاهری دشوار است. پیشرفت‌های بیوتکنولوژی جدید می‌توانند تفاوت‌های ژنتیکی را در سطح DNA نشان دهند. یکی از کاربردهای نشانگرهای ژنتیکی دسته‌بندی و تعیین گروه افراد مختلف می‌باشد، بنابراین احتمالا بتوان از این قابلیت جهت دسته‌بندی افراد مختلف در درون نژاد خود بهره برد. از میان نشانگرهای در دسترس، نشانگرهای ریزماهواره به‌طور گسترده در بررسی تنوع ژنتیکی و تهیه نقشه‌های ژنومی دام‌های اهلی استفاده شده است. از مزایای نشانگرهای ریزماهواره می‌توان به همبارز بودن، روش آزمایشگاهی آسان، چندشکلی زیاد و پراکندگی یکنواخت در سرتاسر ژنوم نام برد. در حال حاضر قابلیت و کارایی استفاده از نشانگرهای ریزماهواره جهت انجام آزمون انتساب در گونه‌های مختلفی تأیید شده است (۹،۷،۲،۱).

تاکنون مطالعات زیادی به بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای مختلف اسب و انتساب آن‌ها به جمعیت مبدأ خود با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در سراسر دنیا صورت گرفته است. از جمله این تحقیقات می‌توان به انتساب افراد به جمعیت مبداء با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در دو نژاد اسب بومی هند اشاره کرد (۴،۳). همچنین در تحقیقی دیگر آزمون انتساب روی سه جمعیت اسب بومی دانمارک با استفاده از ۱۲ نشانگر ریزماهواره نشان داد که جمعیت‌های مورد بررسی از هم تفکیک شده و نژادهای مستقلی هستند (۲۰). در بعضی تحقیقات دقت آزمون انتساب با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره به نسبت بالا و حدود ۹۶ درصد گزارش شده است (۲۱،۵). در ایران تحقیقات انگشت‌شماری در زمینه آزمون انتساب دام‌های بومی کشور صورت گرفته است. در تحقیقی منتظری و همکاران (۱۴) با استفاده از ۱۳ نشانگر ریزماهواره دقت انتساب افراد به ۸ جمعیت سگ بومی کشور را مورد بررسی قرار داده و پیشنهاد کردند که از میان روش‌های بررسی‌شده، روش بیزی بیشترین صحت را نشان خواهد داد. همچنین قاسمی و همکاران (۱۰) میزان دقت انتساب افراد به پنج جمعیت از شترهای استان کرمان با استفاده از ۸

www.SID.ir

Archive of SID

نشانگر ریزماهواره با استفاده از هفت روش متفاوت بررسی نموده و نشان دادند که در بین روش‌های مبتنی بر درست نمایی روش بیزی بیشترین صحت را نشان خواهد داد. پیرانی و محمد هاشمی (۱۶) نیز انتساب افراد به جمعیت مبدأ خود با استفاده از روش بیزی را مناسب بیان کردند. لذا این تحقیق با هدف بررسی ساختار ژنتیکی و میزان دقت انتساب ۴ نژاد اسب خالص و یک نژاد آمیخته به مبدأ نژادی خود و تعیین میزان دوری و نزدیکی آن‌ها بر اساس نشانگرهای ریزماهواره انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ۱۶۵ نمونه خون از چهار نژاد اسب خالص شامل نژادهای کاسپین (۳۵ نمونه)، عرب (۳۶ نمونه)، ترکمن (۳۰ نمونه) و تاروبرد (۲۸ نمونه) و یک جمعیت آمیخته (۳۶ نمونه) که حاصل تلاقی اسب‌های ترکمن و تاروبرد، از استان‌های تهران، گلستان و البرز اخذ و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه بیوتکنولوژی منتقل شدند. استخراج DNA با استفاده از روش نمکی انجام گرفت (۱۳). کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اپندورف (ساخت کشور آلمان) در طول موج‌های ۲۶۰ و۲۸۰ نانومتر محاسبه شد. کلیه افراد مورد مطالعه برای ۱۲ نشانگر ریزماهواره پیشنهادشده توسط انجمن جهانی ژنتیک حیوانی (ISAG)، تعیین ژنوتیپ شدند (جدول ۱). مواد تشکیل دهنده واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل ۵۰ نانوگرم DNA، ۰/۵ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۴ پیکومول از آغازگرهای رفت و برگشت، دو میلی‌مولار $MgCl_2$، و یک واحد آنزیم Taq دی ان ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام گرفت. چرخه‌های حرارتی شامل واسرشته سازی اولیه به‌مدت ۱۰ دقیقه (۹۴ درجه)، ۳۰ مرحله تکثیر چرخه‌ای شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۴ تا ۶۰ درجه و ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه و در پایان یک مرحله بسط نهایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. پس از انجام واکنش PCR، آلل‌ها به کمک الکتروفورز ژل اکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره تعیین شدند. اندازه باندها به کمک سایزهای استاندارد نشانگر اندازه PUC8 ساخت شرکت فرمنتاز اندازه‌گیری شد. تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌هایی است که تشکیل باند داده‌اند و تعداد آلل‌های موثر، تعداد آلل‌هایی است که انتظار می‌رود در آن جمعیت مشاهده شوند. معمول‌ترین معیار محاسبه تنوع ژنتیکی در یک جمعیت، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) است که برآوردی از میزان تنوع ژنتیکی برای نشانگرهای مورد بررسی در درون آن جمعیت را فراهم می‌کند (فرمول ۱).

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^{n} P_i^2 \qquad \text{فرمول (۱)}$$

در این رابطه P_i نشان‌دهنده فراوانی آلل i برای هر جایگاه می‌باشد. یکی از شاخص‌های محاسبه تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها F_{st} است که با استفاده از فرمول ۲ محاسبه می‌شود.

$$F_{st} = \frac{H_T - H_S}{H_T} \qquad \text{فرمول (۲)}$$

در این رابطه H_T میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در میان تمام جمعیت‌ها و H_S هتروزیگوسیتی مورد انتظار در میان زیر جمعیت‌ها است. اطلاعات مربوط به تعداد آلل‌های مشاهده‌شده و مؤثر، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار، فاصله ژنتیکی و شاخص F_{st} با استفاده از نرم‌افزار PopGen1.31 (۲۲)، پراکنش افراد در دو بعد اول تجزیه به مختصات اصلی (PCA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx6.501 (۱۵) و انتساب افراد به جمعیت‌های مبداء با استفاده از روش بیزی و به کمک نرم‌افزار GeneClass2 (۱۷) محاسبه گردید. در روش بیزی با فرض چگالی احتمال اولیه یکسان برای فراوانی‌های آللی هر لوکوس، با استفاده از فراوانی‌های جمعیت نمونه چگالی احتمال فراوانی آللی جمعیت محاسبه‌شده و سپس احتمال انتساب هر فرد به جمعیت مبداء محاسبه می‌گردد (فرمول ۳).

$$A_{X.Y} = \frac{1}{n_X}\sum_X^1 \left[\log_{10}\left(\frac{Pr_X(g_i)}{Pr_Y(g_i)}\right)\right] \qquad \text{فرمول (۳)}$$

در این فرمول X و Y بیانگر جمعیت‌های مورد بررسی، n_X اندازه جمعیت X، g_i ژنوتیپ فرد i، Pr_X و Pr_Y احتمال ژنوتیپ در دو جمعیت X و Y می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمام نشانگرهای مورد استفاده، چندشکل هستند. برای جمعیت‌های مورد بررسی میانگین تعداد آلل‌های مشاهده‌شده و مورد انتظار به‌ترتیب برابر با ۱۵/۹۲ و ۸/۷۲ محاسبه شد. وقتی تعداد آلل‌های مؤثر از تعداد آلل‌های مشاهده‌شده بسیار کمتر باشد، نشان می‌دهد که تعداد زیادی از آلل‌های آن جایگاه فراوانی کمی داشته و تعداد کمی آلل دیگر فراوانی بیشتری در آن جایگاه دارند. بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده‌شده به‌ترتیب در جایگاه‌های LEX33 (۲۳ آلل) و AHT5 (۹ آلل) و بیشترین و کمترین تعداد آلل مؤثر به‌ترتیب در جایگاه‌های AHT4 (۱۱/۲۰ آلل) و AHT5 (۴/۲۸ آلل) محاسبه شد (جدول ۲). با توجه به اینکه تعداد آلل‌های مؤثر تحت تأثیر اندازه جمعیت قرار نمی‌گیرد، بنابراین می‌توان گفت نشانگر AHT4 بیشترین میزان اطلاعات برای بررسی چندشکلی ژنوم جمعیت‌های مورد بررسی را فراهم کرده است. در پژوهش صورت گرفته روی نژاد اسب ترکمن با چهار نشانگر ریزماهواره میانگین تعداد آلل مؤثر برابر با ۶/۰۸ گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی نسبی دارد (۱۸).

بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده مربوط به نشانگرهای AHT4 و LEX33 (۰/۸۲) و کمترین هتروزیگوت مشاهده‌شده مربوط به نشانگرهای ASB17 (۰/۶۶) بود (جدول ۲). از آنجا که نشانگرهای با چندشکلی بالا اطلاعات بیشتری برای بررسی تنوع ژنتیکی فراهم می‌کنند، بنابراین نشانگرهای AHT4 و LEX33 در این

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهش بیشترین میزان اطلاعات را فراهم کرده‌اند. هتروزیگوسیتی مورد انتظار یکی از مهم‌ترین شاخص‌های بررسی چندشکلی نشانگرها می‌باشد که مشخص می‌کند اگر در یک جایگاه ژنی و یک جمعیت دو آلل به‌صورت تصادفی انتخاب شوند، احتمال اینکه این دو آلل مثل هم نباشند، چقدر است. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار تمام نشانگرهای استفاده‌شده به نسبت بالا و برابر با ۰/۸۷ محاسبه شد. نزدیکی این عدد به ۱ نشان می‌دهد که میزان هتروزیگوسیتی در اکثر نشانگرهای استفاده‌شده بالا بوده و نشانگرهای خوبی برای بررسی تنوع در سطح DNA اسب‌های بومی کشور هستند.

بیشترین میزان فاصله ژنتیکی بین نژاد تاروبرد و نژادهای عرب و کاسپین (۰/۹۱) و کمترین میزان فاصله ژنتیکی بین نژاد تاروبرد و جمعیت آمیخته (۰/۱۰) برآورد شد (جدول ۳). با توجه به فاصله ژنتیکی کم میان دو نژاد کاسپین و عرب (۰/۲۰)، به‌نظر می‌رسد این دو نژاد منشاء یکسانی داشته باشند. همچنین بین نژادهای ترکمن – آمیخته (۰/۱۱) و آمیخته – تاروبرد (۰/۱۰) فاصله ژنتیکی بسیار کمی مشاهده شد. با توجه به اینکه اسب‌های آمیخته مورد بررسی از اختلاط نژادی اسب‌های ترکمن و تاروبرد به‌وجود آمده‌اند، بنابراین کم بودن فاصله‌های ژنتیکی فوق بین این جمعیت‌ها قابل توجیه است. همچنین فاصله ژنتیکی بین نژادهای ترکمن و تاروبرد تا حدودی کم (۰/۲۹) محاسبه شد. از دلایل آن می‌توان به تعداد نمونه کم مورد بررسی، تلاقی‌های کنترل نشده بین نژاد تاروبرد با ترکمن و منشاء نژادی مشترک آن‌ها اشاره کرد.

صحت آزمون انتساب با استفاده از روش‌های مختلف مبتنی بر درست‌نمایی و فاصله ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفته و بیان شد که در میان این روش‌ها، روش بیزی بیشترین میزان صحت را داشته است (۱۹،۹،۷). در این تحقیق با استفاده از روش بیزی از ۱۶۵ راس اسب انتخاب شده، ۳۵ راس جزء نژاد خود قرار نگرفت. بنابراین با استفاده از روش بیزی ۷۹ درصد اسب‌های مورد بررسی به‌درستی به منشاء نژادی خود منتسب شدند (جدول ۴). احتمالا اجداد این اسب‌ها در گذشته‌های دور با سایر نژادهای کشور تلاقی داده شده و خلوص ژنتیکی آن‌ها کاهش یافته است. همچنین هشت مورد از اسب‌های ترکمن مورد بررسی جزء نژاد خالص ترکمن قرار نگرفتند که می‌تواند به‌دلیل آمیخته‌گری‌های کنترل نشده در زمان‌های گذشته با نژاد تاروبرد باشد. در تحقیقی با استفاده از ۲۶ نشانگر ریزماهواره در هشت نژاد اسب (۵) مشخص شد که تعداد افراد جمعیت، تعداد نشانگرهای مورد بررسی و میزان چندشکلی نشانگرهای استفاده‌شده بر میزان دقت آزمون انتساب مؤثر هستند. اما علاوه بر اینها میزان دوری و نزدیکی ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی تأثیر بسیار بیشتری بر میزان دقت این آزمون خواهد داشت. به‌طوری که اگر جمعیت‌ها به اندازه کافی از هم دور باشند با تعداد کمتری نشانگر می‌توان دقت بیشتری به‌دست آورد (۶). به منظور دست‌یابی به صحت بیشتر آزمون انتساب، باید میزان تمایز بین زیرجمعیت‌ها (Fst) بیشتر از ۰/۱۰ باشد (۸). از آنجا که مقادیر Fst محاسبه‌شده بیشتر از این مقدار می‌باشد (جدول ۲)، بنابراین نشانگرهای مورد استفاده توانسته‌اند صحت خوبی در خود انتسابی افراد به جمعیت مبدا خود نشان دهند. از طرفی با توجه به اینکه دقت آزمون‌های انتساب به اندازه جمعیت مورد مطالعه، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار بستگی دارد (۱۹)، بنابراین توصیه می‌شود در نژادهایی که قرابت ژنتیکی بالایی دارند، دیگر خصوصیات نژادی مانند بیومتری صفات و فنوتیپ افراد در نظر گرفته شود. بر اساس موقعیت افراد روی نمودار دو بعدی اسب‌های ترکمن، تاروبرد و آمیخته گروه‌بندی مجزایی از اسب‌های کاسپین و عرب نشان دادند (شکل ۱). همچنین با توجه به نمودار رسم‌شده می‌توان گفت بعضی از اسب‌های آمیخته به‌وسیله نژاد تاروبرد ارتقایافته و احتمالا بتوان آن‌ها را جزء نژاد تاروبرد محسوب نمود.

همه نشانگرهای مورد بررسی چندشکلی (۹ الی ۲۳ آلل) و هتروزیگوسیتی (۰/۷۷ الی ۰/۹۱) بالایی را نشان دادند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت‌های مورد مطالعه در معرض خطر انقراض نیستند. از طرفی نشانگرهای بررسی شده دقت انتساب نسبتا خوبی (۷۹ درصد) را نشان دادند. با توجه به اینکه عوامل زیادی از جمله اندازه جمعیت، تفاوت‌های ژنتیکی افراد، تعداد جایگاه‌های مورد بررسی و ... بر انتساب صحیح یک فرد به یک نژاد مؤثر هستند، می‌توان گفت بیشترین موفقیت در انتساب صحیح افراد به جمعیت خود زمانی به‌دست خواهد آمد که جمعیت‌های مورد مطالعه، فاصله ژنتیکی زیادی از هم داشته باشند. بنابراین توصیه می‌شود در نژادهایی همچون ترکمن و تاروبرد که از نظر ژنتیکی به هم نزدیک هستند، جهت انتساب صحیح یک فرد به یک نژاد، علاوه بر روش‌های مولکولی، مشخصات فنوتیپی و بیومتری صفات نیز مورد توجه قرار گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- نشانگرهای مورد استفاده، توالی، مکان روی کروموزوم و محدوده آللی آن‌ها

Table 1. Markers and their sequence, location on the chromosome and allelic rang

نام نشانگر	کروموزوم	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	محدوده آللی[1]	توالی آغازگرهای رفت و برگشت
AHT4	۲۴	۵۸	۱۴۴-۱۶۴	F: AACCGCCTGAGCAAGGAAGT R: CCCAGAGAGTTTACCCT
AHT5	۸	۵۸	۱۲۶-۱۴۴	F: ACGGACACATCCCTGCCTGC R: GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC
ASB17	۱۵	۵۸	۸۷-۱۲۹	F: ACCATTCAGGATCTCCACCG R: GAGGGCGGTACCTTTGTACC
ASB2	۲	۵۴	۲۱۶-۱۵۰	F: CACTAAGTGTCGTTTCAGAAGG R: CACAACTGAGTTCTCTGATAGG
ASB23	۳	۵۸	۱۷۵-۲۱۱	F: GAGGGCAGCAGGTTGGGAAGG R:ACATCCTGGTCAAATCACAGTCC
HMS3	۹	۵۸	۱۴۸-۱۷۰	F: CATCCTCACTTTTTCACTTTGTT R: AACTCTTTGTCACATAACAAGA
HMS6	۴	۵۸	۱۵۱-۱۶۹	F: AGCTGCCAGTATTCAACCATTG R: CCATCTTGTGAAGTGTAACTCA
HMS7	۱	۵۸	۱۶۵-۱۸۵	F: TTGTTGAAACATACCTTGACTGT R: GGAAACTCATGTTGATACCATC
HTG10	۲۱	۵۴	۹۵-۱۱۵	F: TTTTATTCTGATCTGTCACATTT R: AATTCCCGCCCCACCCCCGGCA
HTG4	۹	۵۵	۱۲۷-۱۳۹	F: TATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R: CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC
LEX33	۴	۵۸	۲۰۳-۲۱۷	F: TTTAATCAAAGGATTCAGTTG R: GGGACACTTTCTTTACTTTC
VHL20	۳۰	۶۰	۸۷-۱۰۵	F: AGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R: ACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG

۱- محدوده آللی عبارت است از کمترین و بیشترین اندازه آللی که تاکنون برای این نشانگر مشاهده شده است

جدول ۲- ساختار ژنتیکی نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در جمعیت‌های مورد بررسی

Table2. Genetic structure of microsatellite markers used in the studied populations

نام نشانگر	تعداد آلل مشاهده شده	تعداد آلل مؤثر	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	F_{st}
AHT4	۱۷	۱۱/۲۰	۰/۸۲	۰/۹۱	۰/۱۲
AHT5	۹	۴/۲۸	۰/۶۷	۰/۷۷	۰/۱۵
ASB17	۱۹	۷/۳۹	۰/۶۶	۰/۸۷	۰/۱۶
ASB2	۱۶	۹/۶۵	۰/۷۵	۰/۹۰	۰/۱۶
ASB23	۱۶	۸/۴۷	۰/۶۷	۰/۸۸	۰/۱۹
HMS3	۱۰	۴/۳۰	۰/۷۲	۰/۷۷	۰/۱۱
HMS6	۱۵	۱۰/۱۱	۰/۷۷	۰/۹۰	۰/۱۲
HMS7	۱۹	۱۰/۷۷	۰/۷۹	۰/۹۰	۰/۱۴
HTG10	۱۳	۹/۳۲	۰/۷۵	۰/۹۰	۰/۱۳
HTG4	۱۴	۸/۰۹	۰/۷۱	۰/۸۸	۰/۱۹
LEX33	۲۳	۱۰/۲۲	۰/۸۲	۰/۹۰	۰/۱۴
VHL20	۲۰	۱۰/۸۸	۰/۷۸	۰/۹۱	۰/۱۳
میانگین	۱۵/۹۲	۸/۷۲	۰/۷۴	۰/۸۷	۰/۱۴
انحراف معیار	۴/۰۸	۲/۳۷	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۳

جدول ۳- فاصله ژنتیکی نااریب نئی بین نژادهای بررسی شده

Table 3. Unbiased genetic distance between investigated breeds

نژاد	کاسپین	عرب	ترکمن	آمیخته	تاروبرد
کاسپین	*****				
عرب	۰/۲۰	*****			
ترکمن	۰/۸۴	۰/۸۷	*****		
آمیخته	۰/۸۸	۰/۹۰	۰/۱۱	*****	
تاروبرد	۰/۹۱	۰/۹۱	۰/۲۹	۰/۱۰	*****

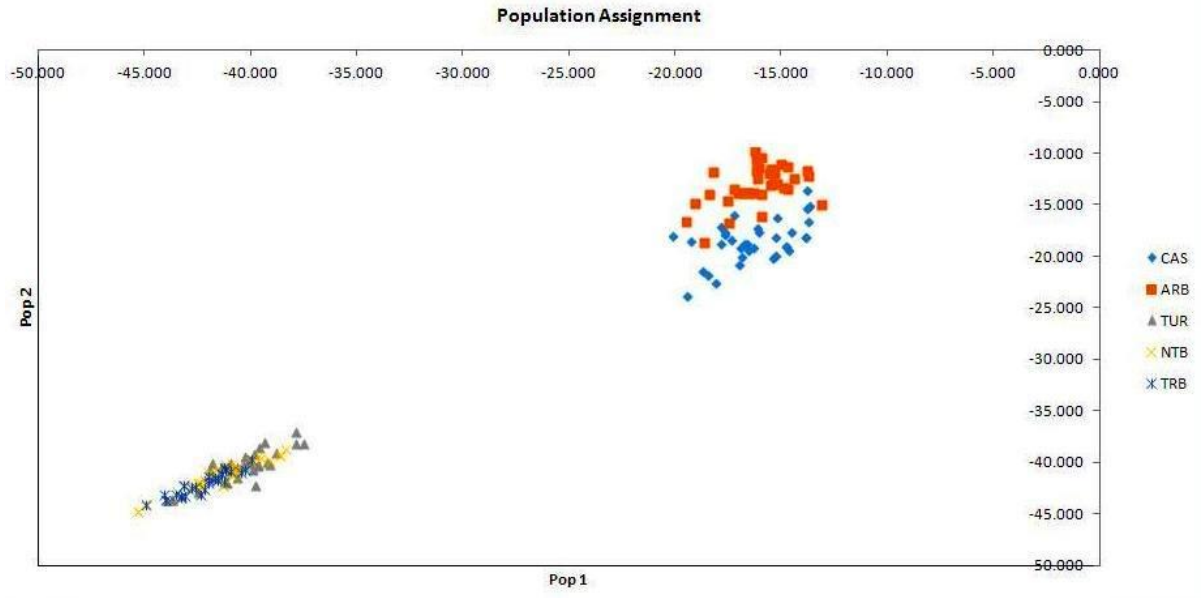
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- نتایج انتساب افراد به جمعیت خود یا دیگر جمعیت‌ها

Table 4. The results of assigning individuals to their own population or other populations

نژاد	تعداد انتساب افراد به جیت خود	تعداد انتساب افراد به دیگر جیت‌ها (نام جمعیت)
کاسپین	۳۰	۵ (عرب)
عرب	۳۴	۲ (کاسپین)
ترکمن	۲۲	۸ (آمیخته و تاروبرد)
آمیخته	۲۰	۱۶ (ترکمن و تاروبرد)
تاروبرد	۲۴	۴ (آمیخته)
جمع کل	۱۳۰	۳۵
درصد	٪ ۷۹	٪ ۲۱



شکل ۱- نمودار دو بعدی پراکنش افراد. در این شکل اسب‌های کاسپین و عرب در گروه مجزایی از اسب‌های ترکمن، تاروبرد و آمیخته ترکمن – تاروبرد قرار گرفته‌اند

Figure 1. Two-dimensional distribution chart. In this form, the Caspian and Arab horses were divided into separate groups of Turkmen Thoroughbred and crossbred horses.

منابع

1. Aljumaah, R.S., M.M. Alobre and R.M. Alatiyat. 2015. Use of microsatellite markers to assign goats to their breeds. Genetics and Molecular Research, 14(3): 9071-9080.
2. Baumung, R., V. Cubric-Curik, K. Schwend, R. Achmann and J. Solkner. 2006. Genetic characterization and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. Journal of Animal Breeding and Genetics, 123: 265-271.
3. Behl, R., J. Behl, A. Gupta, S.C. Gupta and S.P.S. Ahlawat. 2007. Individual identification and breed allocation with microsatellite markers: An evaluation in Indian horses. Asian-Australian Journal of Animal Science, 20(1): 25-30.
4. Behroozinia, Q., S.D. Mirhosseini, F. Afraz, A. Sohrabi A. Mohammadi, P. Shahbazi and B. Honey. 2011. Genetic description of two Iranian Turkmen horse populations of Turkmen Sahra and Turkmen Jergalan regions using microsatellite markers. Iranian Journal of Animal Science, 3(1): 63-66 (In Persian).
5. Bjornstad, G. and K.H. Roed. 2001. Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. Animal Genetics, 32: 59-65.
6. Bjornstad, G. and K.H. Roed. 2002. Evaluation of factors affecting individual assignment precision using microsatellite data from horse breeds and simulated breed crosses. Animal Genetics, 33: 264-270.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Ciampolini, R., V. Cetica, E. Ciani, E. Mozzanti, X. Fosella and F. Marroni. 2006. Statistical analysis of individual assignment tests among four cattle breeds using fifteen STR loci. Journal of Animal Science, 84: 11-19.
8. Cornuet, J.M., S. Piry, G. Luikart, A. Estoup and M. Solignac. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. Genetics, 153: 1989-2000.
9. Dalvit, C., M. De Marchi, R. Dal Zotto, M. Gervaso, T. Meuwissen and M. Cassandro. 2008. Breed assignment test in four Italian beef cattle breeds. Meat Science, 80: 389-395.
10. Ghasemi M., M.R. Mohammad Abadi, A.S. Esmaeilizadeh Kashkoyeh and M. Montazeri. 2016. Investigation of the attribution of individuals to camels in northern Kerman province using microsatellite markers. Modern Genetics Journal, 11(3): 329-335 (In Persian).
11. Hemati, B., M.H. Banabazi, S. Shahkarami, E. Mohandesan and P. Burger. 2017. Genetic diversity within Bactrian camel population of Ardebil province. Research on Animal Production, 8(16): 192-197.
12. Maudet, C., G. Luikart and P. Taberlet. 2002. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. Journal of Animal Science, 80: 942-950.
13. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16: 12-15.
14. Montazeri, M., A.S. Massoudi, R. Preacher and D. Khan Khorasani. 2014. Investigating the attribution of individuals to populations of Iranian native dogs using microsatellite markers. Animal Biotechnology Journal, 6(2): 177-188 (In Persian).
15. Peakall, R. and P.E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Bioinformatics, 28: 2537-2539.
16. Pirani, N. and A. Mohammad Hashemi. 2010. Individuals assignment to six domesticated chicken populations using microsatellite markers. Animal Science Research, 4(1): 55-65 (In Persian).
17. Piry, S., A. Alapetite, J. M. Cornuet, D. Paetkau, L. Baudouin and A. Estoup. 2004. GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First Generation Migrant Detection. Journal of Heredity, 95: 536-539.
18. Samozad, M., M. Nasiri, A.S. Aslami Nezhad, M. Tahmores Poor, M. Dosti and A.J. Ghiadi. 2011. Genetic Diversity Investigation in Iranian Turkman Horses using 4 microsatellite markers. Iranian Journal of Animal Science, 4(4): 345-351 (In Persian).
19. Talle, S.B., E. Fimland, O. Syrstad, T. Meuwissen and H. Klungland. 2005. Comparison of individual assignment methods and factors affecting assignment success in cattle breeds using microsatellites. Acta Agriculturae, 55: 74-79.
20. Thirstrup, J.P., C. Pertoldi and V. Loeschcke. 2008. Genetic analysis, breed assignment and conservation priorities of three native Danish horse breeds. Animal Genetics, 39: 496-505.
21. Van de Goor, L.H.P., W.A. Van Haeringen and J.A. Lenstra. 2011. Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis. Animal Genetics, 42: 627-633.
22. Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle. 2000. POPGENE VERSION 1.32: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta. Canada.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of Genetic Structure and Accuracy of Assignment of Individuals to Five Horse Populations using Microsatellite Markers

Reza Seyedsharifi[1], Sajad Badbarin[2], Hassan Khamisabadi[3], Nemat Hedayat Evrigh[4] and Jamal Seif Davati[5]

1- Associate Professor, Department of Animal Science. University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran (Corresponding author: reza_seyedsharifi@yahoo.com)
2 and 3- Assistant Professor, Animal Science Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kermanshah, Iran
4 and 5- Associate Professor, Department of Animal Science. University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Received: February 23, 2019 Accepted: April 22, 2019

Abstract

In some cases, due to overlapping of morphological traits and parents incomplete recording information, it is difficult to determine the breed origin of a horse. The use of molecular methods for assigning individuals to their breed can be a significant help in this regard. The present study was conducted to investigate the genetic structure and the accuracy of the assignment of horses to the origin populations using microsatellite markers. For this purpose, samples from 165 horses including Caspian (35), Arabian (36), Turkoman (30), Thoroughbred (28) and Turkoman-Thoroughbred crossbred population (36) were randomly collected. Polymerase chain reaction was performed using 12 microsatellite markers recommended by the International Society for Animal Genetics (ISAG), and the PCR products were separated by 8% acryl amide gel and stained using silver nitrate staining procedure. Estimation of genetic parameters such as the number of effective alleles and the expected heterozygosity level showed a high genetic variation in the used markers. Among them AHT4 marker showed the highest (11.20 alleles) and the AHT5 showed the lowest (4. 28) effective alleles and AHT4 (0.82) showed the highest and ASB17 (0.67) showed the lowest genetic variation. The highest and lowest genetic distances were observed between Thoroughbred with Arabian and Caspian (0.91) and Thoroughbred with crossbred population (10.0). In conclusion, the markers used in this study, could correctly assign 79% of the individuals to their source populations. Therefore, in some cases microsatellite markers can be a helpful tool for determining the breed origin of the horse.

Keywords: Assignment Tests, Genetic Diversity, Microsatellite Markers, Purebred Horses

www.SID.ir