Archive of SID

تعیین نسب در اسب نژاد عرب با استفاده از چهارده مارکر ژنتیکی در استان چهارمحال و بختیاری

عباس دوستی[1*]، محمد جواهری کوپایی[1]، سعادت مشکلانی[1]

۱-مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

***نویسنده ی مسئول:** *adleishmania@yahoo.com*

چکیده

با پیشرفت تکنیک های ژنتیک مولکولی، امروزه تعیین نسب در موجودات و بررسی روند تکاملی آن ها از طریق ژنتیک مولکولی امکان پذیر است. توالی های تکراری کوتاه (STR) توالی های کوتاهی هستند که از چند شکلی بالایی برخوردارند و به همین جهت به عنوان ابزار قدرتمندی در تشخیص هویت کاربرد دارند. این توالی ها در مجموع ۲۰ درصد از توالی پستانداران را تشکیل می دهند. هدف از تحقیق حاضر بررسی چهارده مارکر ژنتیکی AHT4, AHT5, ASB23 ,ASB17 ,ASB2 ,VHL20, CA425, HMS7, HMS6, HMS3, HMS1, HTG4, HTG10, LEX3 در اسب نژاد عرب و کاربرد آن ها در تعیین نسب این حیوان در استان چهارمحال و بختیاری می باشد. به منظور انجام این تحقیق، نمونه خون از ۱۳ خانواده اسب نژاد عرب در سطح استان چهارمحال و بختیاری اخذ گردید و پس از استخراج DNA واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه (Multiplex PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای چهارده مارکر ژنتیکی، تنظیم و محصولات PCR به دست آمده ابتدا برروی ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز و مشاهده گردید، سپس باقی مانده محصولات PCR به دست آمده به وسیله ی کیت ABI PRISM 3100 طبق دستورالعمل کیت فورفامید و الکتروفورز گردید. قطعات به دست آمده توسط نرم افزار Ver.3.7 مورد آنالیز ژنتیکی قرار گرفتند. تعداد آلل های مورد بررسی در این مطالعه بین ۳ تا ۹ آلل در هر اسب عرب (میانگین ٦/٣٦) متفاوت است. میانگین پلی مورفیسم مشاهده شده در کل جمعیت مورد بررسی در حدود ۷/۰۱ و میانگین هموزیگوتی مورد انتظار در این مطالعه ۰/٦٩٧می باشد. همچنین میانگین هموزیگوتی مشاهده شده در این مطالعه ۰/٦٥٦ می باشد. از آنجا که مارکرهای ژنتیکی مذکور دارای چند شکلی ژنی در نژاد اسب های مختلف هستند، لذا به نظر می رسد، از این چهارده مارکر می توان در راستای شناخت و تعیین نسب اسب های نژاد عرب بهره برد.

واژه های کلیدی: اسب نژاد عرب، مارکرهای ژنتیکی، تعیین نسب، STR (Short Tendom Repeat)

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اسب نژاد عرب از زیباترین و پر سرعت ترین اسب ها در دنیا می باشد که از دیر باز برای سوارکاری مورد استفاده بشر قرار گرفته است (۱). اسبی که امروزه با نام نژاد عرب از آن یاد می شود تنها نژاد کاملا خالص است که برای بشر اهمیت فوق العاده ای یافته است. از تلاقی این نژاد با گونه های دیگر نژادهای جدیدی مانند تروبرد و لیپازان به وجود آمده است (۲). نشانگرهای میکروستلایت با استفاده از تکنیک آنالیز DNA کاربرد روز افزونی داشته اند (۳). تکنیک آزمایش DNA (DNA Testing) دارای چندین مزیت نسبت به روش های قدیمی تعیین نسب می باشد. برای انجام این روش نمونه ای از خون یا موی اسب تهیه نموده، سپس توسط شناساگرهای مولکولی اختصاصی (میکروستلایت) مورد استفاده قرار می گیرد. STR ها اندازه های مختلفی دارند که هر کدام از آن ها دارای واحدهای تکراری ویژه خود هستند و تقریبا در هر ۳-۵ کیلو جفت باز از ژنوم جانداران تکرار می شوند و براساس تعداد نوکلئوتید ها در واحد های تکراری آن، دی نوکلئوتیدی، تری نوکلئوتیدی، ترا، پنتا و هگزا نوکلئوتیدی نامیده می شوند. این تکرارها در ژنوم گیاهان، بی مهرگان، حشرات، خزندگان، دوزیستان و پستانداران وجود دارند (٤ و ٥). ریز ماهواره ها به سبب مزایای ویژه ای چون چند شکلی بسیار زیاد، گستردگی و توزیع تصادفی در سرتاسر ژنوم، هم بارز بودن، عدم تاثیر انتخاب طبیعی و مصنوعی بر آن ها، کم هزینه بودن و ژنوتیپ یابی آسان، برای مطالعات ژنتیک جمعیت مناسب تر می باشند (٦). یکی از مهم ترین کاربردهای میکروستلایت ها تعیین ابوت و نسب در موجودات مختلف می باشد. استفاده از این تکنیک ها از دقت بسیار بالائی برخوردار است به طوری که در مورد نژادهای مختلف اسب می توان با کمک گرفتن از این روش در شناخت نژاد های اصیل و برتر در زمینه پرش، کورس، درساژ و باروری، تحقیق و بررسی نمود. در گذشته از روش های مختلفی نظیر داغ زدن با فلزات گداخته، روش های سرولوژیکی و آنزیمولوژیکی، میکروچیپ، داغ سرد و غیره که به دلیل ناپایداری برخی از ویژگی ها و اختتصاصی نبودن این تکنیک ها، شناسایی و تعیین نسب و ابوت در موجودات از قبیل اسب به سختی صورت می گرفت (۷). هدف از تحقیق حاضر بررسی چهارده مارکر ژنتیکی AHT5 ,AHT4 ASB23, ,ASB17 ,ASB2 ,VHL20 ,CA425, HMS7, HMS6, HMS3 HMS1, HTG4, HTG10, LEX3 در اسب نژاد عرب و کاربرد آن ها در تعیین نسب این حیوانات در استان چهارمحال و بختیاری می باشد.

مواد و روش کار

به منظور انجام این تحقیق، نمونه ی خون از ۱۳ خانواده اسب نژاد عرب در سطح استان چهارمحال و بختیاری اخذ گردید. نمونه های خون از ورید وداجی به میزان ۱۰ میلی لیتر توسط لوله های ونوجکت حاوی ماده ی ضد انعقاد EDTA تهیه و سپس خون های استحصالی در دمای پایین بر روی یخ به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه ی سانتیگراد نگهداری شد. به منظور استخراج DNA، از کیت استخراج DNA ژنومی ساخت شرکت

www.SID.ir

Archive of SID

سیناژن ایران (DNP^{TM} KIT) استفاده شد و مراحل مطابق دستورالعمل کیت صورت پذیرفت. برای ارزیابی کیفیت DNA های استخراج شده از ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم برماید بهره گرفته شد. مقدار و غلظت بهینه مواد به کار رفته نسبت مواد به کار رفته در واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲۰ نانوگرم cDNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq و۲۰۰ میکرو مولار dNTP Mix بود. همچنین ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل برای جلوگیری از تبخیر شدن مخلوط PCR اضافه گردید. برنامه ی دمایی واکنش PCR برای چهارده جفت پرایمر مورد استفاده به ترتیب یک مرحله به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه، سپس۳۰ چرخه دمایی به ترتیب ۹۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۶۰ دقیقه تنظیم گردید (۸ و ۹). به منظور بررسی و تکثیر توالی های مورد نظر از چهارده جفت پرایمر جدول ۱ که از طرف ISAG (جامعه بین المللی ژنتیک دام) برای تعیین هویت اسب گزارش شده استفاده گردید. برای انجام واکنش Multiplex PCR از دستگاه Master Cycler Gradiant شرکت Eppendorf ساخت کشور آلمان استفاده گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر چهارده مارکر ژنتیکی

نام مارکر ژنتیکی	توالی مارکر ژنتیکی	جایگاه کروموزومی	سایز قطعات (bp)	منبع
AHT4	(F) 5′- AACCGCCTGAGCAAGGAAGT -3′	۵	۱۳۸-۱۷۰	(۱۰)
	(R) 5′- GCTCCCAGAGAGTTTACCCT -3′			
AHT5	(F) 5′- ACGGACACATCCCTGCCTGC -3′	۵	۱۲۸-۱۵۲	(۱۰)
	(R) 5′- GCAGGCTAAGGGGGCTCAGC -3′			
ASB2	(F) 5′- CCACTAAGTGTCGTTTCAGAAGG -3′	۸	۲۲۲-۲۵۶	(۱۱)
	(R) 5′- CACAACTGAGTTCTCTGATAGG -3			
ASB17	(F) 5′- GAGGGCGGTACCTTTGTACC -3	۹	۸۹-۱۳۱	(۱۱)
	(R) 5′- ACCAGTCAGGATCTCCACCG -3			
ASB23	(F) 5′- GCAAGGATGAAGAGGGCAGC -3′	۶	۱۷۶-۲۱۲	(۱۲)
	(R) 5′- CTGGTGGGTTAGATGAGAAGTC -3′			

www.SID.ir

Archive of SID

CA425	(F) 5′- AGCTGCCTCGTTAATTCA -3′	۷	۲۳۰-۲۵۰	(۱۳)
	(R) 5′ CTCATGTCCGCTTGTCTC -3′			
HMS1	(F) 5′- CATCACTCTTCATGTCTGCTTGG -3′	۳	۱٦٦-۱۷۸	(۱٤)
	(R) 5′- TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC -3′			
HMS3	(F) 5′- CCAACTCTTTGTCACATAACAAGA -3′	۷	۱۵۰-۱۷٤	(۱٤)
	(R) 5′- CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT -3′			
HMS6	(F) 5′- GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG -3′	٦	۱۵۳-۱۷۱	(۱٤)
	(R) 5′- CTCCATCTTGTGAAGTGTAACTCA -3′			
HMS7	(F) 5′- CAGGAAACTCATGTTGATACCATC -3′	٦	۱٦۷-۱۸۹	(۱٤)
	(R) 5′- TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT -3′			
HTG4	(F) 5′- CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC -3′	۵	۱۲۷-۱٤۱	(۱۵)
	(R) 5′- CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC -3′			
HTG10	(F) 5′- CAATTCCCGCCCCACCCCCGGCA -3′	۸	۸۹-۱۷۱	(۱٦)
	(R) 5′- TTTTTATTCTGATCTGTCACATTT -3′			
LEX3	(F) 5′- ACACTCTAACCAGTGCTGAGACT -3′	۸	۱۳۷-۱٦۰	(۱۷)
	(R) 5′- GAAGGAAAAAAAGGAGGAAGAC -3′			
VHL20	(F) 5′- CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG -3′	۵	۸۹-۱۰۷	(۱۸)
	(R) 5′- AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG -3′			

ابتدا محصولات حاصل از واکنش Multiplex PCR برروی ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز و مشاهده گردید، سپس باقی مانده محصولات به دست آمده به وسیله کیت ABI PRISM 3100 طبق دستورالعمل کیت فورفامید و الکتروفورز گردید. قطعات به دست آمده توسط نرم افزار Ver.3.7 (ساخت شرکت بیوسیستم آمریکا) مورد آنالیز ژنتیکی قرار گرفتند.

نتایج

کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده از خون ۱۳ خانواده اسب های نژاد عرب موجود در سطح استان چهارمحال و بختیاری با استفاده از ژل آگارز ۱درصد مورد بررسی قرار گرفت که نشان دهنده دارا بودن شرایط مطلوب برای انجام PCR بود. انجام واکنش Multiplex PCR با پرایمرهای اختصاصی برای چهارده مارکر ژنتیکی AHT5 ,AHT4 ASB23, ASB17 ,ASB2 ,VHL20 ,CA425, HMS7, HMS6, HMS3, HMS1, HTG4, HTG10,

www.SID.ir

Archive of SID

LEX3 بر روی DNA های استخراج شده از خون جمعیت مورد مطالعه انجام گرفت. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۲ آمده است.

تعداد آلل های مورد بررسی در این مطالعه بین ۳ تا ۹ آلل در هر اسب عرب (میانگین ٦/٣٦) متفاوت است.

میانگین پلی مورفیسم مشاهده شده در کل جمعیت مورد بررسی در حدود ۷/۰۱ و میانگین هموزیگوتی مشاهده شده در این مطالعه ۰/٦٥٦ است. همچنین میانگین هموزیگوتی مورد انتظار در این جمعیت ۰/٦٩٧ بود.

جدول ۲- هموزیگوتی (EHet: هموزیگوتی مورد انتظار، OHet: هموزیگوتی مشاهده شده) و PIC میکروستلایت مارکرها در اسب نژاد عرب

نام مارکر ژنتیکی	OHet	EHet	PIC
AHT4	۰/۷۳٦	۰/۷۳۰	۰/٦٨۰
AHT5	./۷٥٦	۰/۷۳۱	۰/٦٩۱
ASB2	۰/۸۰٤	۰/۸۱٤	۰/۷۸۸
ASB17	۰/۷۸۱	۰/۷٦٦	۰/۷۲۸
ASB23	۰/٦۸٥	۰/٦۱۳	۰/٦۰۸
CA425	۰/۸٥۲	۰/۸۳۱	۰/۸۰۹
HMS1	۰/۷۷۲	۰/۷٥۳	۰/۷٤۸
HMS3	۰/۷۷۹	۰/۷۷۰	۰/۷۸۸
HMS6	۰/٥٥۳	۰/٥٥۱	۰/٥٤۷
HMS7	۰/٦٦۲	۰/٦٤٤	۰/٦٥۹
HTG4	۰/٦٤٥	۰/٦۲٥	۰/٦۱۰
HTG10	۰/٦۱۸	۰/٦۲۲	۰/۷۰۹
LEX3	۰/۷٦۷	۰/۷٦٦	۰/۷٦٦
VHL20	۰/٥٥۹	۰/٥٤۸	۰/٦۹۰

*OHet: Observed heterozygosity, EHet: Expected heterozygosity, PIC: Polymorphic information contents.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

در سال ۱۹۸۲، Microsatellite DNA یا به عبارتی توالی های تکراری پشت سر هم کوتاه توسط آقای Hammada و همکاران کشف گردید (۱۰). در سال ۱۹۸۵، Jeffreys و همکارانش دریافتند که الگوهای Minisatellite DNA در موجودات منحصر به فردند و اصطلاح انگشت نگاری (DNA fingerprinting) را برای آن برگزیدند و از آن موقع به بعد به تدریج از این الگوها برای تعیین هویت استفاده شد(۱۱). همچنین برای اولین بار ریز ماهواره ها در اسب توسط Ellegrenو همکاران ، Markland و همکاران کشف گردید (۱۳ و ۱۲). در برخی از کشورهای صنعتی دنیا از میکروستلایت ها در تشخیص هویت، ابوت، بررسی و کنترل ابهامات در تشخیص نژاد و والدین اسب به صورت معمول استفاده می شود (۱٤). جامعه بین المللی ژنتیک دام با نام ISAG تعداد ۹ HMS7, HTG4, HMS6, ASB2, HTG10 ,VHL20, AHT4), (HMS3 and AHT5, میکروستلایت را در تشخیص هویت به عنوان حداقل تعداد مارکر ژنتیکی در تعیین ابوت بیان کرد که همچنین علاوه بر آن ها تعداد ۸ مارکر دیگر HMS1, ASB17, ASB23, CA425) (LEX3, LEX33 and TKY321 نیز برای اطمینان بیشتر به آن افزوده شد. همچنین ISAG توصیه کرده است برای جلوگیری از اختلالات در آزمایش ها دو یا تعداد بیشتری مارکر بررسی گردد (۱۵).

در این مطالعه نیز از مارکرهای مذکور جهت تکثیر جایگاه های مربوط به اسب استفاده گردید. بررسی های درون خانوادگی در جمعیت مورد مطالعه بیانگر آن بود که نشانگرهای میکروستلایت بر طبق قانون مندلی به ارث می رسند. از آنجا که مارکرهای ژنتیکی مذکور دارای تنوع اندازه در نژاد اسب های مختلف هستند، لذا با توجه به تداخل نژادی بسیار فراوان در صنعت تکثیر و پرورش اسب در ایران و به وجود آمدن تنوعات نژادی گسترده و وجود اسب هایی که علی رغم دارا بودن داغ و فنوتیپی شبیه نژاد عرب، اسب های خالصی نیستند و به عنوان سیلمی یا مادیان هایی به ظاهر با نژاد خالص و اصیل در روند تکثیر و تولید مثل اسب مورد استفاده قرار می گیرند به نظر می رسد، از این چهارده مارکر می توان در راستای شناخت و تعیین نسب دقیق در اسب های نژاد عرب بهره جست و اسب های ناخالص را از روند تولید مثلی کشور حذف کرد تا بتوانیم در آینده دارای ذخایر ژنتیکی خالص و همچنین اسب هایی با کیفیت در کشور باشیم تا بتوانیم روزی به عنوان یکی از صادر کنندگان اسب در میان کشورهای دنیا قرار گیریم.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای محمد علیرضایی، دکتر مهدی دیانی نیا و کلیه همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تقدیر و تشکر به عمل می آید.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Bowling, A.T., Ruvinsky, A., 2000. The genetic resources and their conservation, The Genetic of the Horse. CAB International, PP.205-261.

2. Bowling, A.T., Ruvinsky, A., 2000. Genetic aspects of domestication, The Genetic of the Horse. CAB International, PP. 321-232.

3. Caetano, R., Shiue, Y., Lyons, L., O'Brien, S., Laughlin, Bowling, T., Murray, J., 2003. A comparative gene map of the horse (Equus caballus), Genome Research. Dec b(12):3bp8b. Horse. CAB International, PP.365-387.

4. Kimpton, C., Fisher, D., Watson, S., Adams, M., Urquhart, A., 1994. Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci, International Journal Leg Medicine 106, PP.302-311.

5. Lins, A., Sprecher, C., 1996. Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci-silver stain and fluorescence detection, Bio Techniques 20, PP.882-889.

6. Puers, C., Hammond, H., Caskey, C., Lins, A., Sprecher, C., Brinkmann, B., 1994. Allelic ladder characterization of the short tandem repeat polymorphism located in the 5' flanking region to the human coagulation factor XIII A subunit gene, Genomics 23, PP.260-264.

7. Wimmers, K., Ponsuksili, S., Schmoll, F., Hardge, T., Hatzipanagiotou, A., Weber, J., Wostmann, S., Olik, K., Schellander, K., 1998. Efficiency of microsatellite markers of the international standard panel for parentage control in German horse population. Genetics and Molecular Biology. 30(1), PP. 1415-4757.

8. Bozzini, M., Fantin, D., Ziegle, J., van Haeringen, H., Jacobs, W., Ketcham, M., Spencer, M., Bates, S., 1996. Automated equine paternity testing Animal Genetic 27, PP.32-42.

9. Dimsoski, P., 2003. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses Croat Medicine Journal 44, PP.332-335.

10. Kayser, M., Roewer, L., Hedman, M., 2000. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs AM Journal of Human Molecular Genetics 66, PP.1580-1588.

11. Glowatzki-Mullis, L., Muntwyler, J., Pfister, W., Marti, E., Rieder, S., Poncet, P., Gaillard, C., 2006. Genetic diversity among horse populations with a special focus on the Franches-Montagnes breed Animal Genetics 33, PP.37-39.

12. Ellegren, H., Johansson, M., Sandberg, K., Andersson, L., 1992. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse Animal Genetics 23, PP.133-142.

13. Marklund, S., Ellegren, H., Eriksson, S., Sandberg, K., Andersson, L., 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites Animal Genetics 25, PP.19-23.

14. Binns, M., Uolmes, N., Holliman, A., 1995. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing British Veterinary Journal 151, PP.9-15.

15. Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L., Pemberton, J., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations Molecular Ecology 7, PP.639-655.

16. Binns, M., Uolmes, G., Holliman, A., 1995.The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing British Veterinary Journal 151, PP.9-15.

17. Breen, M., Lindgren, G., Binns, M., Norman. J., Irvin, Z., Bell, K., Sandberg, K., Ellegren, H., 1997. Genetical and physical assignments of equine microsatellites-first integration of anchored markers in horse genome mapping, Mammalian Genome 8, PP.267-273.

18. Irvin, Z., Giffard, J., Brandon, R., Breen, M., Bell, K., 1998. Equine dinucleotide repeat

www.SID.ir

Archive of SID

polymorphisms at loci ASB 21- 25 , 37-43. Animal Genetics PP.29- 67.

19. Eggleston-Stott, M., DelValle, A., Bautista, M., Dileanis, D., Wictum, E., Bowling, A., 1997. Nine equine dinucleotide repeats at microsatellite loci UCDEQ136, UCDEQ405, UCDEQ412, UCDEQ425, UCDEQ437, UCDEQ467, UCDEQ487, UCDEQ502 and UCDEQ505, Animal Genetics 28, PP.370-371.

20. Guerin, G., Bertaud, M., Amigues, Y., 1994. Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8, Animal Genetics 25, PP.62.

21. Coogle, L., Bailey, E., Reid, R., Russ, M., 1996. Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci LEX002, -003, -004, -005, - 007, -008, -009, -010,-011,-013 and -014. Animal Genetics 27, PP.126-127.

22. Van Haeringen, H., Bowling, A., Stott, M., Lenstra, J., Zwaagstra, K., 1994. A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20, Animal Genetics 25, PP.207.

www.SID.ir