

بررسی ساختار ژنتیکی و اصالت اسب گُرد با استفاده از دوازده نشانگر میکروستلایت

Investigation of genetic structure and assignment tests of Kurdish horse breeds based on Microsatellite markers

حسن خمیس آبادی^{۱*}، سجاد بادبرین^۱، رضا سید شریفی^۲

۱- استادیاران، پژوهشی بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی

کرمانشاه، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران

۲- عضو هیات علمی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

Khamisabadi H^{*1}, Badbarin S¹, S Sharifi R²

1. Assistant Professors, Animal Science Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermakshah, Iran
2. Associate Professor in Animal Breeding, University of Moheghegh Ardabili, Ardabil, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.khamisabadi@areeo.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۷)

چکیده

با پیشرفت تکنیک‌های ژنتیک مولکولی، امروزه تعیین نسب در موجودات و بررسی روند تکاملی آنها امکان‌پذیر است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی و انتساب اسب‌های نژاد گرد به جمعیت مبدا یا جمعیت‌هایی از اسب عرب و ترکمن با استفاده از ۱۲ نشانگر ریزماهواره توصیه شده توسط انجمن جهانی ژنتیک حیوانی (ISAG) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور از ۲۳۸ راس اسب گرد، ۳۶ راس اسب عرب و ۳۰ راس اسب ترکمن در مناطق پراکنش آنها خون‌گیری انجام شد. از نمونه‌های خون گرفته شده DNA به روش نمکی بهینه یافته استخراج شد. DNA به وسیله واکنش PCR چندگانه با استفاده از آغازگرهای نشان‌دار تکثیر و آلل‌های هر نشانگر توسط الکتروفورز موئین تعیین شد. میانگین تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر برای تمام نشانگرها به ترتیب برابر با ۹/۵۰ و ۴/۷۱ محاسبه شد. بیشترین و کمترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار به ترتیب در نشانگرهای ASB17 و HTG4 (۰/۸۳) و (۰/۷۱) به دست آمد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و ضریب Dice، افراد هر نژاد را به صورت کاملاً مجزا از هم تفکیک کرد. نتیجه آزمون انتساب بهوش بیزی نشان داد که نشانگرهای استفاده شده تمام افراد را به درستی به جمعیت مبدا منتسب نمود، بنابراین به نظر می‌رسد می‌توان از این نشانگرها با دقت بسیار زیاد در تفکیک افراد این نژادها از هم استفاده کرد. در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده تنوع ژنتیکی بالایی بین کلیه افراد مورد مطالعه دارند، از این رو استفاده از این نشانگرها برای آزمون‌های انتساب و انتساب اسب‌های گرد توصیه می‌شود، به طوری که می‌توان از این نشانگرها در راستای شتاخت و تعیین اصالت در اسب‌های نژادی کردی بهره جست و اسب‌های ناخالص را از روند تولید مثلی حذف نمود.

واژه‌های کلیدی

آزمون انتساب
اسب‌های گرد
تنوع ژنتیکی
نشانگرهای ریزماهواره

نژادهای بومی به دلیل دارا بودن آللهای منحصر به فرد تواناییهای ویژه‌ای همچون سازگاری با شرایط محیطی و مقاومت در برابر بیماری‌ها دارند، اما تلاقی آنها با دیگر نژادها موجب کاهش خلوص ژنتیکی و از دست رفتن این توانایی‌ها در دراز مدت خواهد شد (Thirstrup et al. 2008; Laliotis and Avdi 2017). همچنین، مطالعه نژادهای بومی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی بسیار مهم و برای طبقه‌بندی آنها مفید است (Soufy et al. 2009; Zamani et al. 2015). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Ruzina et al. 2010; Shamsalddini et al. 2016). تنوع ژنتیکی یک عنصر اساسی برای پیشرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سازگاری به شرایط محیطی متغیر و مختلف می‌باشد (Mousavizadeh et al. 2009; Vajed Ebrahimi et al. 2017). شواهد تاریخی و باستان‌شناسی نشان داده که اهلی کردن اسب به‌وسیله آریایی‌ها (اجداد ایرانیان امروز) شروع شده‌است (Mostafavi et al. 2019). آنها این حیوانات را برای اهداف مختلفی از قبیل کشاورزی، حمل و نقل و منبع غذایی استفاده می‌کرده‌اند. آریایی‌ها به کمک اصلاح نژاد و انتخاب، نژادهای مختلف با صفات متمایز را سنتز کرده‌اند (Mostafavi et al. 2019). نژادهای اسب ایرانی امروزی به دو گروه تقسیم می‌شوند. اسب‌های Persian Plateau که شامل ترکمن، قره باغ، قره داغ، عرب ایرانی و کاسپین هستند. اعتقاد بر این است که نژادهای اسب مدرن در دنیا از چهار تیپ (Pony Type 1 یا Celtic pony، pony type 2 یا Tundra pony، Horse type 1 یا Plain horse و Horse type 2) نشأت گرفته‌اند (Mostafavi et al. 2019). همچنین فرض می‌شود که اسب‌های سبک مدرن باید یا از Horse type 1 یا Horse type 2 و یا از هر دو منشأ گرفته باشند. در بین اسب‌های مدرن مختلف در جهان، گروه ترکمن (قره باغ) و کاسپین از نظر استخوان‌شناسی و ساختاری به‌ترتیب خیلی مشابه Horse type 1 و Horse type 2 هستند (Mostafavi et al. 2019). فرضیه پیشنهادی دیگر نشان می‌دهد که پونی کاسپین جد پیش تیپ عرب (proto-type of

Arab) است (Fotovati 2000). بنابراین، براساس این فرضیه این اسب می‌تواند به‌عنوان منشأ بیشتر اسب‌های سبک مورد توجه قرار گیرد (Mostafavi et al. 2019). اسب در طول تاریخ همراه و یاریگر صاحبان بومی آنها بوده و در تولید و اقتصاد آن جوامع نقش بسیار مهمی داشته است. با صنعتی شدن زندگی و استفاده از وسایل موتوری، به تدریج استفاده از اسب برای انجام امور روزمره کاهش یافته و کم کم جایگاه خود را در زندگی انسان‌ها از دست داده است. با این وجود هنوز هم جایگاه ویژه‌ای در ورزش، تفریح، ساخت واکسن و داروهای مختلف دارد (Thirstrup et al. 2008; Vahdani-Manaf et al. 2017). اسب کرد یکی از ذخایر ژنتیکی با ارزش است که بیشتر در مناطق غربی کشور (استان‌های کرمانشاه، آذربایجان غربی و کردستان) پرورش داده می‌شود. اسب‌های کرد دست و پایی محکم و قوی دارند و با توجه به هوش، فرمانبری و استقامت بالا در مسابقات استقامت و چوگان بی‌نظیر هستند (Vahdani-Manaf et al. 2017). با توجه به خصوصیات منحصر به فرد اسب‌های کرد و قابلیت‌های بسیار برجسته آنها در اصلاح صفات نامطلوب دیگر نژادها، حفظ، شناسایی و گسترش آنها اهمیت ویژه‌ای دارد. یکی از روش‌های متداول شناسایی و طبقه‌بندی اسب‌ها، استفاده از مشخصات ظاهری صفات است. اما معمولاً در نژادهای نزدیک، مرز قاطعی بین صفات ظاهری وجود ندارد و تفکیک نژادها از این نظر بسیار دشوار می‌باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی در سال‌های اخیر جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و حیوانات حفاظت شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است. میزان چند شکلی به‌دست‌آمده از این نشانگرهای ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Vajed Ebrahimi et al. 2017). در این میان، ریزماهواره‌ها به سبب برتری‌هایی که دارند، برای مطالعات ژنتیک جمعیت نسبت به سایر نشانگرها ارجح هستند. انجمن بین‌المللی ژنتیک حیوانی ریزماهواره‌ها را به‌عنوان بهترین نشانگر جهت تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های حیوانی معرفی کرده است (Mohammadifar and Mohammadabadi 2011). بر اساس بررسی‌های ثبت شده توسط FAO، ۶۶ درصد کل مطالعات تعیین

لذا این پژوهش با هدف بررسی ساختار ژنتیکی ۲۳۸ راس اسب کرد با استفاده از ۱۲ نشانگر ریزماهواره توصیه شده توسط ISAG و FAO و تعیین میزان صحت انتساب اسب‌های کرد به جمعیت مبدا یا نژادهای عرب و ترکمن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۲۳۸ راس اسب کرد (۱۰۴ راس ماده، ۱۳۴ راس نر)، ۳۶ راس اسب عرب (۲۲ راس ماده، ۱۴ راس نر) و ۳۰ راس اسب ترکمن (۱۷ راس ماده، ۱۳ راس نر) نمونه خون تهیه شد. اسب‌های عرب و ترکمن به دلیل مقایسه ساختار ژنتیکی آنها با اسب‌های کرد انتخاب شدند. نمونه‌های خون از سیاهرگ و داج به میزان ۱۵ میلی‌لیتر توسط لوله‌های ونوجکت حاوی ماده ضد انعقاد خون EDTA تهیه و بلافاصله به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه منتقل و DNA آنها به روش نمکی استخراج شد (Miller et al. 1988). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ ۱۰۰۰ تعیین شد. به منظور انجام واکنش PCR از ۱۲ نشانگر ریزماهواره توصیه شده توسط انجمن جهانی ژنتیک حیوانی (ISAG) و سازمان جهانی خوار و بار کشاورزی (FAO) استفاده شد (FAO 2011) (جدول ۱). به منظور شناسایی قطعات تکثیر شده DNA به کمک دستگاه ژنتیک آنالایزر، آغازگرهای پیشرو با استفاده از یک رنگ فلورسنتی نشان گذاری شدند. چرخه‌های واکنش PCR شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه (۹۵ درجه سانتی گراد)، مراحل چرخه‌ای در ۳۰ مرحله شامل واسرشته سازی به مدت ۳۰ ثانیه (۹۴ درجه سانتی گراد)، اتصال به مدت ۴۰ ثانیه در دمای اتصال مخصوص هر نشانگر و بسط به مدت ۶۰ ثانیه (۷۲ درجه سانتی گراد) و همچنین بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. الکتروفورز قطعات تکثیر شده DNA در دستگاه ژنتیک آنالایزر (Genetic analyzer 3130) و به کمک لوله‌های موئین انجام گرفت. با استفاده از مقیاس استاندارد GeneScan500LIZ در طول الکتروفورز و توسط نرم‌افزار GeneMapper V4.0 اندازه قطعات DNA تعیین شد. برای تبدیل

فاصله ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام گرفته است (Mohammadifar and Mohammadabadi 2011). از نشانگرهای ریزماهواره برای انجام تحقیقات در زمینه برآورد تنوع ژنتیکی اسب‌ها به وفور استفاده شده است (Mahrous et al. 2011; Laliotis and Avdi 2017; Cosenza et al. 2019, Fornal et al. 2019). در تحقیقی تنوع ژنتیکی درون هفت جمعیت اسب عرب از مناطق خاورمیانه، اروپا و آمریکا بررسی و بیان شد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت اسب‌های عرب خاورمیانه بیشتر از اسب‌های عرب اروپا و آمریکا است، بنابراین به نظر می‌رسد که منشاء اسب‌های عرب، خاورمیانه باشد (Khanshour et al. 2013). در تحقیق دیگر به کمک نشانگرهای ریزماهواره نشان داده شد که اسب‌های عرب و اسب‌های بومی مصر شباهت ژنتیکی بیشتری نسبت به اسب‌های تروبرد دارند (Mahrous et al. 2011).

(Samozad et al. 2011) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تنوع ژنتیکی اسب‌های اصیل ترکمن ایران را بررسی نموده و بیان کردند که نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده چند شکلی بالایی در اسب‌های ترکمن داشته و نشانگرهای مناسبی جهت مطالعات ژنتیکی هستند (Banaabadi et al. 2017). در تحقیقی با استفاده از چهار نشانگر ریزماهواره تنوع ژنتیکی اسب‌های عرب و کاسپین را بررسی کردند. نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده چندشکلی و کارآمدی بالایی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی اسب‌های کشور دارند. در مورد اسب‌های کرد، تحقیقات انگشت شماری صورت گرفته است، گرچه این تحقیقات نیز با تعداد نشانگر و جمعیت بسیار کمی صورت گرفته است. (Ala-Amjadi 2017) با استفاده از شش نشانگر ریزماهواره و (Vahdani-Manaf et al. 2017) با استفاده از چهار نشانگر ریزماهواره تنوع ژنتیکی ۵۲ نمونه اسب کرد را بررسی کرده و بیان کردند که چند شکلی و هتروزیگوسیتی بالایی در میان جمعیت اسب‌های کرد بررسی شده وجود دارد. با توجه به اهمیت اطلاع از ساختار ژنتیکی اسب‌های بومی کشور جهت طراحی برنامه های اصلاح نژادی متناسب، به منظور حفظ حداکثر تنوع ژنتیکی و همچنین با توجه به اینکه تاکنون تحقیقات محدودی در این زمینه روی نژاد اسب کرد صورت گرفته است،

در این رابطه X و Y جمعیت‌های مورد نظر، n_x اندازه جمعیت X ، g_i ژنوتیپ فرد i و Pr_X و Pr_Y احتمال ژنوتیپ در دو جمعیت X و Y می‌باشد. ضریب همخوانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بر اساس شاخص رایت (Fis) و با استفاده از رابطه زیر به‌دست آمد (Wright 1951):

$$F_{is} = \frac{\bar{H}_e - \bar{H}_o}{\bar{H}_e} \quad \text{رابطه ۴}$$

در این رابطه $\bar{H}_e$ میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و $\bar{H}_o$ میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده است. به‌منظور تعیین تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و شاخص شانون از نرم‌افزار POPGENE 1.31 (Yeh et al. 1999) استفاده شد. ضریب همخوانی و فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.501 (Peakall et al. 2012) محاسبه شد. به‌منظور گروه بندی افراد از روش تجزیه خوشه‌ای و به‌کمک نرم‌افزار NTSYS V2.02 (Rohlf 1999) و جهت انتساب افراد به جمعیت مبدا خود یا دیگر جمعیت‌های مورد مطالعه از نرم‌افزار GenClass2 (Piry et al. 2004) استفاده شد.

اندازه قطعات به حروف از دستورالعمل ISAG و پیشنهاد شده توسط Van de Goor et al. (2009) استفاده شد. حروف استفاده شده برای این نام‌گذاری استاندارد جهانی است و در تمام آزمایشگاه‌های ژنتیکی مفهوم یکسانی دارند. هتروزیگوسیتی مورد انتظار با استفاده از رابطه زیر به‌دست آمد:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad \text{رابطه ۱}$$

در این رابطه P_i نشان دهنده فراوانی آلل i برای هر جایگاه می‌باشد. علاوه بر هتروزیگوسیتی، شاخص شانون یکی دیگر از معیارهای بررسی تنوع ژنتیکی است. پیشنهاد شده است برای بررسی تنوع ژنتیکی در نشانگرهای با تنوع زیاد علاوه بر هتروزیگوسیتی از شاخص شانون نیز استفاده شود. شاخص شانون از رابطه زیر به دست می‌آید (Shannon and Weaver 1949):

$$H = - \sum_{i=1}^k P_i \ln P_i \quad \text{رابطه ۲}$$

در این رابطه P_i فراوانی آلل i ام و k تعداد کل آلل‌های مشاهده شده در آن جایگاه ژنی می‌باشد. آزمون انتساب به روش بیزی و با استفاده از رابطه زیر به‌دست آمد (Rannala and Mountain 1997):

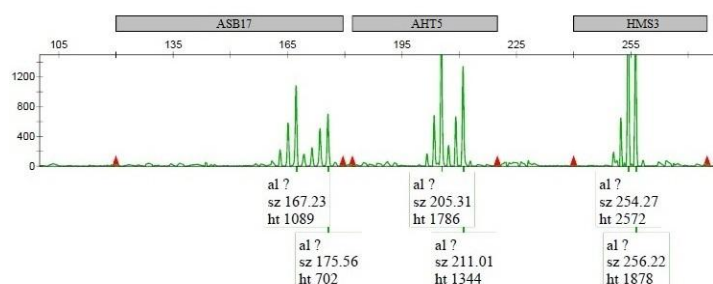
$$A_{XY} = \frac{1}{n_X} \sum_{i=1}^X \left[\log_{10} \left(\frac{Pr_X(g_i)}{Pr_Y(g_i)} \right) \right] \quad \text{رابطه ۳}$$

جدول ۱- مشخصات نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده

شماره ثبت	توالی آغازگر	دامنه آللی	کروموزوم	دمای اتصال	نشانگر
Y07733	F: AACCGCTGAGCAAGGAAGT R: CCCAGAGAGTTTACCCT	۱۴۴-۱۶۴	۲۴	۵۸	AHT4
Y07732	F: ACGGACACATCCCTGCCTGC R: GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC	۱۸۵-۲۱۵	۸	۵۸	AHT5
X93531	F: ACCATTGAGGATCTCCACCG R: GAGGGCGGTACCTTTGTACC	۱۲۵-۱۷۵	۲	۵۸	ASB17
X93516	F: CCACTAAGTGTCTTTTCAAGAG R: CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG	۲۱۶-۲۵۰	۱۵	۵۴	ASB2
X93537	F: GAGGGCAGCAGGTTGGGAAGG R: ACATCCTGGTCAAATCACAGTCC	۱۷۵-۲۱۱	۳	۵۸	ASB23
X74632	F: CCATCCTCACTTTTCACTTTGTT R: CCAACTCTTTGTACATAACAAGA	۲۴۰-۲۷۰	۹	۵۸	HMS3
X74635	F: GAAGCTGCCAGTATTCAACCATG R: CTCCATCTTGTGAAGGTAACTCA	۱۵۱-۱۶۹	۴	۵۸	HMS6
X74636	F: TGTGTGTGAACATACCTTGACTGT R: CAGGAACTCATGTTGATACCATC	۱۶۵-۱۸۵	۱	۵۸	HMS7
AF169294	F: TTTTATTCTGATCTGCACATTT R: CAATCCCCGCCCCACCCCGGCA	۹۵-۱۱۵	۲۱	۵۴	HTG10
AF169165	F: CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R: CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	۱۲۷-۱۳۹	۹	۵۵	HTG4
AF075635	F: TTTAATCAAAGGATTCAGTTG R: GGGACACTTTCTTTACTTTTC	۲۰۳-۲۱۷	۴	۵۸	LEX33
X75970	F: CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R: AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	۸۷-۱۰۵	۳۰	۶۰	VHL20

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که همه نشانگرهای مورد استفاده به خوبی تکثیر شده و درصد چند شکلی نشانگرها برابر با ۱۰۰ درصد بود. نمونه‌ای از الگوی آللی نشانگرهای ریزماهواره در تعدادی از جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. فراوانی آللی نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی در جمعیت اسب‌های کرد در جدول ۲ نشان داده شده است. در مجموع با استفاده از ۱۲ نشانگر ریزماهواره ۱۱۴ آلل تکثیر شد. دامنه آللی نشانگرهای بررسی شده در اسب‌های کرد، با دامنه آللی این نشانگرها در اسب‌های عرب و ترکمن تفاوت زیادی داشت. این تفاوت بیانگر تفاوت ساختاری اسب‌های کرد با این نژادها است. میانگین تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر در تمام جایگاه‌های مورد بررسی به ترتیب برابر با ۹/۵ و ۴/۷۱ آلل محاسبه شد. یکی از ویژگی‌های مهم هر نشانگر ژنتیکی، میزان چند شکلی است. میزان چند شکلی، فراوانی آلل‌ها و نحوه توزیع آلل‌ها در نهایت موجب می‌شوند که یک نشانگر سودمندی بیشتری داشته باشد. نشانگر ASB17 با ۱۷ آلل بیشترین و نشانگرهای HMS6 و HTG4 با ۷ آلل کمترین تعداد آلل را نشان دادند. بنابراین، نشانگر ASB17



شکل ۱- نمونه‌ای از الگوی آللی نشانگرهای ریزماهواره در جایگاه‌های ژنی ASB17, AHT5 و HMS2

جدول ۲- فراوانی آللی نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی در جمعیت اسب‌های کرد

آلل	AHT4	AHT5	ASB17	ASB2	ASB23	HMS3	HMS6	HMS7	HTG10	HTG4	LEX33	VHL20
B	-	-	-	۰/۰۱۹	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	۰/۰۰۶	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	۰/۰۲۹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	۰/۱۸۵	-	۰/۰۱۹	-	-	-	۰/۰۰۴	-	۰/۰۲۵	-
H	۰/۱۹۹	-	۰/۰۳۴	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	۰/۰۵۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۸	۰/۰۵۳	۰/۲۳۵	۰/۱۰۱	-	-	۰/۰۰۸	-	-	۰/۱۱۸
J	۰/۳۱۹	۰/۲۷۱	۰/۰۰۲	-	۰/۱۸۳	-	-	۰/۱۸۳	-	-	-	۰/۰۱۷
K	۰/۰۴۲	۰/۱۵۸	۰/۰۱۷	۰/۰۷۶	۰/۱۵۳	-	۰/۱۰۱	۰/۱۶۲	۰/۱۰۵	۰/۱۳۵	۰/۱۰۱	-
L	۰/۰۰۶	۰/۰۱۹	۰/۰۰۲	-	۰/۲۵۰	-	۰/۱۷۰	۰/۳۶۱	۰/۲۶۳	۰/۲۱۴	۰/۲۶۵	۰/۱۰۹
M	۰/۰۷۸	۰/۰۸۴	۰/۱۹۳	۰/۲۱۹	-	۰/۲۹۸	۰/۱۶۸	۰/۰۱۳	۰/۰۲۷	۰/۴۵۲	۰/۰۰۸	۰/۲۵۰
N	۰/۰۱۳	۰/۳۹۱	۰/۱۳۷	۰/۰۵۵	۰/۰۰۲	۰/۲۴۲	۰/۰۲۳	۰/۱۴۹	۰/۰۰۴	۰/۱۲۸	-	۰/۲۵۲
O	۰/۲۸۶	۰/۰۶۷	۰/۰۶۱	۰/۱۸۱	-	۰/۰۸۶	۰/۲۴۰	۰/۰۸۶	۰/۲۹۰	۰/۰۲۳	۰/۲۹۸	۰/۰۴۰
P	۰/۰۰۴	-	۰/۰۰۴	۰/۰۱۹	-	۰/۱۹۸	۰/۲۸۴	۰/۰۱۳	۰/۰۲۳	۰/۰۴۲	۰/۰۰۶	۰/۰۴۲
Q	-	۰/۰۰۸	۰/۰۴۸	۰/۳۶۱	۰/۰۱۱	۰/۰۳۶	۰/۰۱۵	۰/۰۳۴	۰/۰۱۱	۰/۰۰۶	۰/۱۲۸	۰/۰۲۹
R	-	-	۰/۲۵۸	۰/۰۱۳	۰/۰۰۴	۰/۰۳۶	-	-	۰/۲۳۵	-	۰/۱۶۶	۰/۱۴۱
S	-	-	۰/۰۰۸	-	۰/۰۵۹	۰/۰۰۴	-	-	۰/۰۲۹	-	-	۰/۰۰۲
T	-	-	۰/۰۰۶	-	-	-	-	-	-	-	۰/۰۰۲	-
U	-	-	۰/۰۰۴	-	۰/۰۸۴	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	۰/۰۰۲	-	-	-	-	-	-	-	-	-

محل پراکنش اسب‌های کرد و عرب کمتر است و بر این اساس تصور می‌شد که شباهت ژنتیکی بیشتری داشته باشند، اما نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اسب‌های کرد شباهت ژنتیکی بیشتری به اسب‌های ترکمن دارد (جدول ۳). عدم همبستگی بین فواصل جغرافیایی نژادهای مورد بررسی، ممکن است به دلیل آمیخته‌گری‌های کنترل نشده بین این نژادها و یا درصد خلوص نژادی پایین آن‌ها باشد. گروه‌بندی جمعیت‌ها در دسته‌های مجزا در این تحقیق و تحقیقات پیشین با استفاده از جمعیت‌های مختلف نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهوره توان بالایی در گروه‌بندی و تفکیک جمعیت‌های مختلف دارند (Bjornstad and Roed 2001; Fornal et al. 2013; Khanshour et al. 2013).

جدول ۳- تعداد آل مشاهده شده (N) و مورد انتظار (Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)، شاخص شانون (I) و ضریب همخوانی (Fis).

نام نشانگر	N	Ne	Ho	He*	I	Fis
AHT4	۹	۴/۲۷	۰/۷۴	۰/۷۷	۱/۶۴	۰/۰۲۹
AHT5	۸	۳/۸۰	۰/۷۲	۰/۷۴	۱/۵۳	۰/۰۲۰
ASB17	۱۷	۶/۰۴	۰/۸۲	۰/۸۳	۲/۰۵	۰/۰۲۳
ASB2	۱۰	۴/۴۸	۰/۷۷	۰/۷۸	۱/۷۶	۰/۰۰۵
ASB23	۱۰	۵/۳۸	۰/۸۲	۰/۸۱	۱/۸۲	-۰/۰۰۶
HMS3	۸	۴/۸۴	۰/۷۲	۰/۷۹	۱/۷۳	۰/۰۹۵
HMS6	۷	۴/۸۶	۰/۷۷	۰/۷۹	۱/۶۸	۰/۰۳۲
HMS7	۸	۴/۵۲	۰/۷۷	۰/۷۸	۱/۶۹	۰/۰۱۲
HTG10	۱۱	۴/۵۱	۰/۷۶	۰/۷۸	۱/۷۱	۰/۰۲۲
HTG4	۷	۳/۴۹	۰/۷۱	۰/۷۱	۱/۴۷	۰/۰۰۴
LEX33	۹	۴/۶۷	۰/۸۳	۰/۷۹	۱/۶۸	-۰/۰۵۸
VHL20	۱۰	۵/۶۸	۰/۸۲	۰/۸۲	۱/۹۱	۰/۰۱۱
میانگین	۹/۵۰	۴/۷۱	۰/۷۷	۰/۷۸	۱/۷۲	۰/۰۱۶
انحراف استاندارد	۲/۶۸	۰/۷۳	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۱۵	۰/۰۳۴

* Nei's Unbiased Measures of Genetic distance (Nei 1978)

جدول ۳- فاصله ژنتیکی نااریب نئی میان اسب‌های کرد، عرب و ترکمن (Nei, 1978)

نژاد	کرد	عرب	ترکمن
کرد	****		
عرب	۰/۸۵۷	****	
ترکمن	۰/۷۹۷	۰/۸۷۴	****

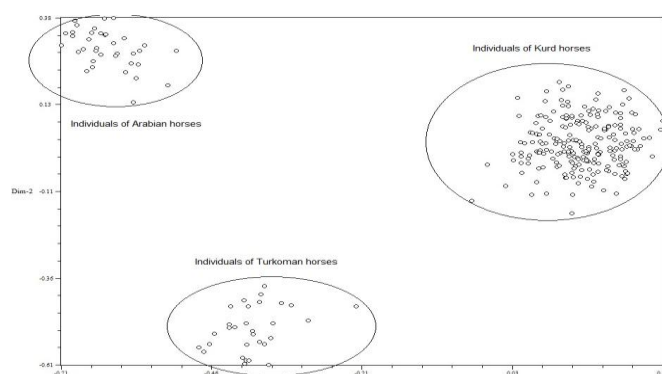
میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین اسب‌های کرد برابر با ۰/۷۷ بود. بیشترین و کمترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر با ۰/۷۱ و ۰/۸۳ بود که به ترتیب برای نشانگرهای HTG4 و LEX33 محاسبه شد. همچنین میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای تمام نشانگرها برابر با ۰/۷۸ بود. کمترین و بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۷۱ و ۰/۸۳ بود که به ترتیب برای نشانگرهای ASB17 و HTG4 محاسبه شد. در تحقیقات پیشین میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در اسب‌های کرد توسط Vahdani-Manaf et al. (2017) برابر با ۰/۷۵ و توسط Ala-Amjadi et al. (2017) برابر با ۰/۸۳ گزارش شده است. در تحقیقی با استفاده از پنج نشانگر ریزماهوره میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای اسب‌های عرب، تروبرد و بومی مصر به ترتیب برابر با ۰/۷۵، ۰/۸۳ و ۰/۸۱ محاسبه شد (Mahrous et al. 2011). میانگین شاخص شانون در بین اسب‌های کرد برابر با ۱/۷۲ بود. بیشترین میزان شاخص شانون مربوط به نشانگر HTG4 و برابر با ۲/۰۵ و کمترین میزان مربوط به نشانگر ASB17 و برابر با ۱/۴۷ بود. مقادیر به دست آمده برای شاخص شانون از نظر بیشترین و کمترین مقدار، متناسب با نتایج به دست آمده از مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود (جدول ۳). ضریب همخوانی اسب‌های کرد با استفاده از ۱۲ نشانگر ریزماهوره و بر اساس شاخص رایت (Fis) از ۰/۰۵۸- برای جایگاه LEX33 تا ۰/۰۹۵ برای جایگاه HM3 متغیر بود (جدول ۳). مقدار شاخص Fis در جایگاه‌های ASB23 و LEX33 منفی بود و برای سایر جایگاه‌ها مثبت برآورد شد. مقادیر منفی شاخص Fis به معنی کمتر بودن میزان همخوانی محاسبه شده نسبت به میزان همخوانی مورد انتظار در حالت آمیزش تصادفی است. بر اساس این شاخص میانگین ضریب همخوانی در تمام نشانگرها برابر با ۰/۰۱۶ برآورد شد. بنابراین به نظر می‌رسد همخوانی پایینی بین اسب‌های کرد در جمعیت مورد بررسی وجود دارد. پایین بودن میزان همخوانی نشان‌دهنده پایین بودن آمیزش‌های خویشاوندی است. بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت اسب‌های عرب و ترکمن (۰/۸۷۴) و کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت اسب‌های کرد و ترکمن (۰/۷۹۷) وجود داشت. فاصله ژنتیکی بین نژاد کرد و عرب نیز برابر با ۰/۸۷۴ برآورد شد. هرچند فاصله جغرافیایی

دارد (Bjornstad and Roed 2002). بنابراین اگر جمعیت‌ها به اندازه کافی از هم دور باشند، نشانگرهای ریزماهواره به راحتی می‌توانند منشاء نژادی افراد را مشخص کنند. (Dalvit et al. 2006). نشان دادند که استفاده از نشانگرهای ریزماهواره با تنوع ژنتیکی بالا و روش آماری بیزی، امکان دستیابی به بیشترین میزان انتساب صحیح افراد به جمعیت مبدا را فراهم می‌آورد. از آنجا که انتساب افراد به نژادهایی که تمایز ژنتیکی کمتری دارند، مشکل‌تر است بنابراین توصیه می‌شود در این گونه موارد برای دستیابی به صحت بیشتر نشانگرهای ریزماهواره بیشتری استفاده شود.

نتیجه‌گیری

تعداد آل زیاد و هتروزیگوسیتی بالا نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده تنوع و چندشکلی بالایی در جمعیت اسب‌های کرد ایران دارند، بنابراین این نشانگرها برای انجام آزمون‌های انساب و انتساب روی این نژاد در تحقیقات آتی توصیه می‌شوند. یکی از مهم‌ترین کاربردهای این نشانگرها تعیین نسب در موجودات مختلف می‌باشد به طوری که با کمک گرفتن از این روش می‌توان در شناخت نژادهای اصیل بهره برد. همچنین با توجه به تنوع ژنتیکی بالای اسب‌های کرد، می‌توان با طراحی برنامه‌های اصلاح نژادی متناسب با ظرفیت‌های آن، این نژاد را به عنوان یک برند اسب ایرانی به جهان معرفی کرد و باعث ارز آوری و اشتغال زایی بالایی برای کشور شد.

نمودار دو بعدی پراکنش افراد روی محور X و Y با استفاده از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و به کمک نرم‌افزار NTSYS V2.02 (Rohlf 1999) رسم شد. بر این اساس کل افراد مورد بررسی گروه‌بندی کاملاً مجزایی نشان دادند، به طوری که هر فرد در گروه خود و در دسته‌بندی مجزایی نسبت به افراد نژادهای دیگر قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲- نمودار پراکنش دو بعدی نژادهای کرد، عرب و ترکمن روی محور مختصات به کمک روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

نتیجه آزمون انتساب افراد به جمعیت مبدا خود نشان داد که تمام افراد هر نژاد جزء جمعیت خود قرار گرفتند. احتمالاً این اسب‌ها مسیر تکامل متفاوتی در گذشته داشته‌اند و تلاقی کمی بین آن‌ها صورت گرفته است. بنابراین ۱۰۰ درصد اسب‌های مورد بررسی به درستی به منشاء نژادی خود منتسب شدند. میزان فاصله ژنتیکی نژادهای مورد بررسی تاثیر بسیار زیادی بر دقت آزمون انتساب

منابع

- Ala-Amjadi M, Mehrabani Yeganeh H, Sadeghi M (2017) Study of Genetic variation in Iranian Kurdish horse using microsatellite marker. Iranian Journal of Animal Science. 48: 342-335. (In Farsi).
- Benaabadi H, Mashayekhi MR, Hasanpour A, Ayubi MR (2017) The study of genetic variability of Arabian and Caspian horses using microsatellite. Animal Science Researches. 27: 175-183. (In Farsi).
- Bjornstad G, Roed KH (2001) Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. Animal Genetics. 32: 59-65.
- Bjornstad G, Roed KH (2002) Evaluation of factors affecting individual assignment precision using microsatellite data from horse breeds and simulated breed crosses. Animal Genetics. 33: 264-270.
- Cosenza M, La Rosa V, Rosati R, Chiofalo V (2019) Genetic diversity of the Italian thoroughbred horse population. Italian Journal of Animal Science. 18: 538-545.
- Dalvit C, De Marchi M, Dal Zotto R, Gervaso M, Meuwissen T, Cassandro M (2008) Breed assignment test in four Italian beef cattle breeds. Meat Science. 80: 389-395.
- FAO (2011) Molecular genetics characterization of animal genetic resources. FAO, Animal production and health guidelines. No 9. Rome.
- Fotovati A (2000) Persian horse breeds from ancient time to present and their rules in development of world horse breeds. Asian-Australasian Journal of Animal Science. 13: 401-410.

- Fornal A, Radko A, Piestrzynska-Kajtoch A (2013) Genetic polymorphism of Hucul horse population based on 17 microsatellite loci. *Acta Biochimica Polonica*. 60: 761-765.
- Khanshour A, Conant E, Juras R, Gus-Cothran E (2013) Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Arabian horse populations. *Journal of Heredity*. 104: 386-398.
- Laliotis GP, Avdi M (2017) Genetic diversity assessment of an indigenous horse population of Greece. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 33: 81-90.
- Mahrous KF, Hassanane M, Mordy MA, Shafey HI, Hassan N (2011) Genetic variations in horse using microsatellite markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 9: 103-109.
- Marletta D, Tupac-Yupanqui I, Bordonaro S, Garcia D, Guastella AM, Criscione A, Canon G, Dunner S (2006) Analysis of genetic diversity and the determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 123: 315-325.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16: 1215-1215.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. *Iranian Journal of Animal Science*. 42: 337-344. [In Farsi].
- Mostafavi A, Asadi Fozi M, Esmailizadeh A, Mohammadabadi MR, Babenko OI, Klopenko NI (2019) Effect of LCORL gene polymorphism on body size traits in horse populations. *Acta Scientiarum of Animal Sciences*. 42: 452-456.
- Mousavizadeh A, Mohammad Abadi M R, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H, Esmailizadeh AK (2009) Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology*. 7: 51-53.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. *Population genetic software for teaching and research*. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2004) GeneClass2: A software for genetic assignment and first generation migrant detection. *Journal of Heredity*. 95: 536-539.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 94: 9197-9201.
- Rohlf FJ (1999) NTSYS: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. *Applied Biostatistics*, New York.
- Ruzina MN, Shtyfurko TA, Mohammadabadi MR, Gendzhieva OB, Tsedev T, Sulimova GE (2010) Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in the Mongolian, Kalmyk, and Yakut cattle breeds. *Russia Journal of Genetics*. 46: 456-463.
- Samozad M, Nasir M, Aslaminejad M, Tahmoorespour A, Doosti M, Ghyadi M, Ghovati SH (2011) Investigation of genetic variation in Turkman horses of Iran using 4 microsatellite sites. *Iranian Journal of Animal Science*. 4: 345-351. (In Farsi).
- Shamsalddini S, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK (2016) Polymorphism of the prolactin gene and its effect on fiber traits in goat. *Russia Journal of Genetics*. 52: 405-408.
- Shannon CE, Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. *University of Illinois Press*, Urbana.
- Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N, Dayani O (2009) Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. *Animal Science Research*. 19: 81-89. (In Farsi).
- Thirstrup JP, Pertoldi C, Loeschcke V (2008) Genetic analysis, breed assignment and conservation priorities of three native Danish horse breeds. *Animal Genetics*. 39: 496-505.
- Vahdani-Manaf MA, Mashayekhi M, Hassanpour A, Ayobi MR (2017) Study of genetic diversity in the Iranian Kurdish horse population. *Journal Animal Science Research*. 27: 95-102. (In Farsi).
- Vajed Ebrahimi MT, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK (2017) Using microsatellite markers to analyze genetic diversity in 14 sheep types in Iran. *Archives Animal Breeding*. 60: 183-189.
- Van de Goor LHP, Van Haeringen WA, Lenstra JA (2011) Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis. *Animal Genetics*. 42: 627-633.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15: 323-354.
- Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999) POPGENE 1.31. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. *University of Alberta*, Edmonton, Canada.
- Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi M (2015) Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Research*. 132: 123-127.