نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۷ شماره ۳/ سال۱۳۹۶/ صفحات ۱۷۵ تا ۱۸۳

مطالعه تنوع ژنتیکی اسب‌های عرب و کاسپین با استفاده از مارکرهای ریز ماهواره

حمید بناءآبادی[۱]، محمد رضا مشایخی[۲*]، علی حسن پور[۳] و محمد رضا ایوبی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه ژنتیک ، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

[۲] استادیار گروه ژنتیک، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

[۳] دانشیار گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

[٤] دانشجوی دکتری تخصصی بیماری‌های دام‌های بزرگ، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*]مسئول مکاتبه: Email: M.mashayekhi@iaut.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: امروزه استفاده از مارکس‌های ژنتیکی جهت حفظ و مدیریت تنوع در نژادهای مختلف اسب در سراسر جهان بسیار مرسوم است. **هدف**: در این تحقیق تنوع توالی تکراری کوتاه در نژادهای اسب‌های عرب و کاسپین با استفاده از ٤ جایگاه *VHL20, HTG4, AHT4, HMS7* موردتوافق انجمن ژنتیک حیوانات (ISAG) موردبررسی قرار گرفته و فراوانی آللی تعیین شده است. **روش کار**: برای این منظور DNA ژنومی از نمونه خونی اسب‌ها توسط روش مایلر استخراج گردید. DNA به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه توسط پرایمر نشان‌دار تکثیر شد. محصولات حاصل توسط دستگاه الکتروفورز کاپیلاری مورد آنالیز ژنتیکی قرار گرفت. **نتایج**: نتایج حاصل از ژنوتایپ، حاکی از وجود متوسط ۷/۵ آلل در اسب‌های عرب و۷ آلل در اسب‌های کاسپین بود. متوسط هتروزیگوسیته مشاهده‌شده (Ho) ۰/۷٦۱ در اسب عرب و ۰/۷۹۹ در اسب کاسپین و همچنین متوسط هتروزیگوسیته مورد انتظار (He) ۰/۷۷۹ در اسب عرب و ۰/۸٤ در اسب کاسپین بود. **نتیجه‌گیری نهایی**: نتایج نشان‌دهنده چندشکلی و کارآمدی بالای چهار جایگاه مورد-استفاده در تعیین نژاد، تنوع و تست‌های ابوت می‌باشد.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، توالی تکراری کوتاه، ریز ماهواره، تست‌های ابوت، مولتی پلکس PCR

مقدمه

امروزه از مارکرهای ژنتیکی مختلفی برای تعیین نژاد و خلوص اسب‌ها استفاده می‌شود (بولینگ و همکاران ۲۰۰۱). استفاده از مارکرهای مولکولی، پلی-مورفیسم‌هایی در سطح DNA آشکار نموده است، که یک نکته کلیدی در مطالعات ژنتیکی حیوانات به شمار می‌رود (بایناس و همکاران ۱۹۹۵ و الگرن و همکاران ۱۹۹۲). 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 (کیمپتون و همکاران ۱۹۹٤؛ مایکا و همکاران ۱۹۹٦؛ و وینستوک و همکاران ۲۰۰۵). از این روش‌های دقیق و سریع جهت تعیین تنوع ژنتیکی و به طبع آن برنامه‌ریزی اقتصادی پرورش اسب‌ها، می‌توان سود جست (گورگسو و همکاران ۲۰۰۵).

طبق آخرین جلسه انجمن بین‌المللی ژنتیک حیوانات[1] که در سال ۲۰۱٤ در کشور چین به‌منظور بررسی ژنتیکی نژادهای مختلف اسب جهان برگزار گردید، ۱۷ جایگاه ژنی برای بررسی و اثبات نسب و نژاد اسب‌ها معرفی گردید. این انجمن، میکروساتلیت‌هایی که امروزه کاربرد فراوانی در ژنوتایپینگ اسب دارد را مورد تجزیه و تحلیل قرار داده و جهت استفاده در مراکز تحقیقاتی و خدماتی سراسر جهان معرفی نموده است (وینتون و همکاران ۲۰۱۵).

استفاده از این تکنولوژی پتانسیل عظیمی را برای توسعه و پرورش نژادهای مختلف اسب اصیل ایجاد می‌کند که می‌تواند از لحاظ اقتصادی اهمیت بسزایی داشته باشد (وایمرز و همکاران ۱۹۹۸ و هایرنجن و همکاران ۱۹۹٤). با توجه به عدم تحقیقات جامع و کامل در ایران هنوز یک الگوی جامع مشخصی برای بررسی نژادهای مختلف اسب وجود ندارد. بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی موجود در بین نژادهای مختلف اسب ایران و مقایسه با سایر کشورها می‌تواند در شناسایی و حفظ نژادهای اصیل ضرورت فراوانی داشته باشد.

با توجه به اینکه صنعت پرورش اسب به‌عنوان چهارمین صنعت از لحاظ درآمدزایی در جهان مطرح است (سایت رسمی سازمان غذا و کشاورزی[2]؛ و نیز با عنایت به تنوع اسب‌های ایران که از آن جمله می‌توان به اسب‌های عرب، کرد، ترکمن و کاسپین اشاره نمود. تعیین خلوص و نسب، نزد صاحبان و پرورش‌دهندگان اسب، لزوم تحقیقات آزمایشگاهی را در این مورد به اثبات می‌رساند. با توجه به تحقیقات گذشته در داخل و خارج کشور که به‌صورت موردی و بر روی نژاد خاصی انجام‌شده، خلاء موجود در بررسی اسب‌های مناطق مختلف ایران از لحاظ تنوع مارکرهای ژنتیکی مثل STR ضرورت پیدا می‌کند. از جمله محاسن این مارکرها وراثت مندلی، هم‌بارزی، پلی‌مورفیسم بالا و پراکندگی در کل ژنوم و نیز از معایب این روش هزینه بالا و نیز مشکل طراحی پرایمر می‌توان نام برد. در ضمن لازمه تعیین دقیق توالی‌های تکراری کوتاه استفاده از روش‌هایی همچون مولتی‌پلکس چندگانه که دارای مزایایی همچون استفاده هم‌زمان از چند پرایمر و تکثیر چند جایگاه در یک میکروتیوب، سرعت بالا و کاهش حجم مواد مصرفی و درعین‌حال از محدودیت-های این روش به مشکل اپتیمایز کردن چند پرایمر، باندهای کاذب و نیز نیاز به دستگاه ترمو سایکلر گرادیانت اشاره نمود (اسکلوترر ۲۰۰۰؛ فرنال و همکاران ۲۰۱۳ و گویکین و همکاران ۱۹۹٤). از این‌رو اهتمام مؤسسات علمی و تحقیقاتی کشورمان در راستای شناسایی دقیق نژادهای اسب ایرانی که به‌عنوان ذخایر ملی محسوب می‌شود در معرفی و ایجاد نژادهای اصیل ایرانی و جدید به جهان توفیقات روزافزونی را به‌دنبال خواهد داشت. هدف تحقیق حاضر تعیین تنوع ژنتیکی اسب‌های مناطق مختلف ایران و نیز یافتن یک الگوی مشخص جهت شناسایی نژاد و حفظ گونه‌های در معرض خطر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

خون‌گیری از ۲۲ رأس اسب نژاد عرب آذربایجان شرقی (اطراف تبریز) و ۱۵ رأس اسب نژاد کاسپین (بندر انزلی) انجام و در لوله‌های ونوجکت حاوی EDTA جمع‌آوری و سپس درون آیس پک به آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه آزاد تبریز منتقل و توسط روش مایلر (مایلر و همکاران ۱۹۸۸)، DNA ژنومی استخراج گردید. پس از بررسی اولیه DNA در ژل الکتروفورز ۰/۸ درصد، برای اطمینان از عدم آلودگی و غلظت مناسب DNA استخراجی جهت انجام PCR از دستگاه نانودراپ استفاده شد. چهار جفت پرایمر *VHL20*، *HTG4*، *AHT4* و *HMS7* مورد توافق انجمن ژنتیک حیوانات که در انتهای ´۵، توسط رنگ فلورسانت 6-FAM نشان‌دار شده به شرکت BIONEER کانادا سفارش داده شد

[1]International Society for Animal Genetics (ISAG)
[2]Food and Agriculture Organization (FAO)

(جدول ۱). در هر میکروتیوب ۰/۲ سی‌سی، جهت انجام Multiplex PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس و از هر تک جفت پرایمرها ۰/۵ میکرولیتر و ۱ میکرولیتر DNA و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر در روی آیس پک مخلوط گردید. چرخه دمایی Multiplex PCR شامل واسرشت اولیه در ۹۵ درجه، ۵ دقیقه و ۲۵ چرخه به ترتیب واسرشت در ۹۵ درجه ۳۰ ثانیه و اتصال در ۵۹ درجه ۱ دقیقه و طویل شدن در ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهائی در ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام گردید. محصولات حاصل از واکنش Multiplex PCR در ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد مشاهده‌شده و پس از اطمینان از تکثیر جایگاه‌ها، باقیمانده محصولات Multiplex PCR توسط دستگاه الکتروفورزکاپیلاری مورد آنالیز ژنتیکی قرارگرفت. تعداد آللها و نیز هتروزیگوسیته مشاهده‌شده و مورد انتظار از تعادل هاردی- وینبرگ که توسط آزمون کای مربع به اثبات رسید، محاسبه گردید.

جدول ۱- پرایمرهای مورداستفاده

Table 1- Used Primers

جایگاه Locus	موقعیت کروموزومی Gene position	توالی تکراری Repeated Sequence	توالی پرایمرها Primers sequences	اندازه آللی Allele size	منابع References
AHT4	24q14	$(AC)_nAT(AC)_n$	F: AACCGCCTGAGCAAGGAAGT R: GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	144-164	Binns et al. (1995)
HMS7	1q25	$(AC)_2(CA)_n$	F: CAGGAAACTCATGTTGATACCATC R: TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	165-185	Guerin et al. (1994)
HTG4	9	$(TG)_nAT(AG)_5A$ AG $(GA)_5$ $ACAG(AGGG)_3$	F: CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R: CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	127-139	Ellegren et al. (1992)
VHL20	30	$(TG)_n$	F: CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R: AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	87-105	Haeringen et al. (1994)

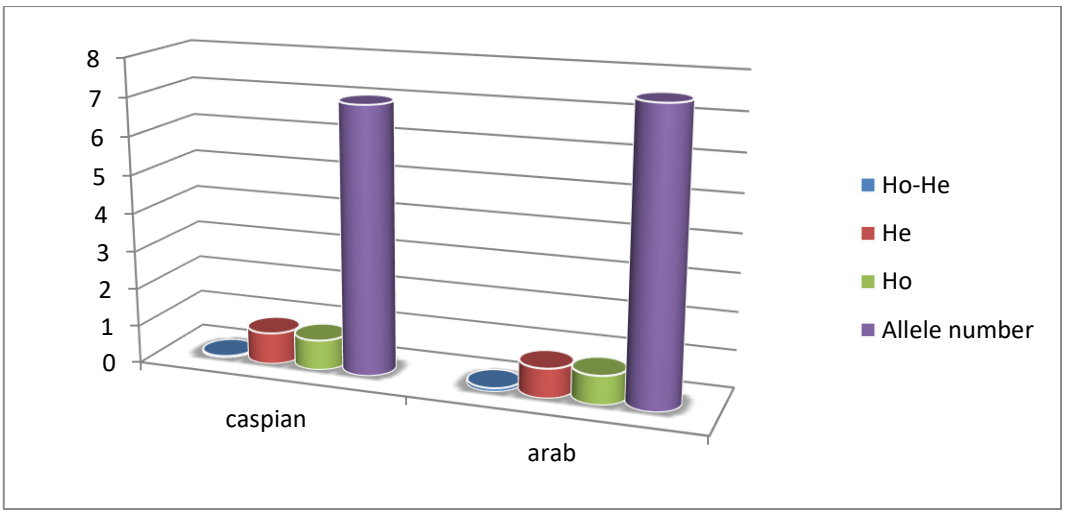
نتایج و بحث

تعداد آلل و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار و اختلاف هتروزیگوزیسته مشاهده‌شده و مورد انتظار و میانگین در چهار جایگاه موردبررسی در اسب‌های نژاد عرب و کاسپین پس از محاسبه در جدول ۲ و شکل ۱ خلاصه‌شده است.

جدول ۲- تعداد آلل و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (H_o) و مورد انتظار(H_e) و اختلاف هتروزیگوزیستی مشاهده‌شده و مورد انتظار (H_O-H_e) و میانگین در اسب‌های نژاد عرب و کاسپین

Table 2- Number of Allele, Observed and expected hetrozygosity, Diffrences Observed and expected hetrozygosity and average in Arab and Caspian horse breeds

لوکوس Locus	نژاد Breed	تعداد آلل Allele number	H_O	H_e	(H_O-H_e)
VHL20	کاسپین Caspian	7	0.866	0.84	0.026
	عرب Arab	7	0.727	0.782	0.055
HTG4	کاسپین Caspian	6	0.8	0.858	0.058
	عرب Arab	6	0.863	0.71	0.153
AHT4	کاسپین Caspian	8	0.733	0.862	0.129
	عرب Arab	10	0.818	0.876	0.058
HMS7	کاسپین Caspian	7	0.8	0.8	0
	عرب Arab	7	0.636	0.749	0.113
متوسط Average	کاسپین Caspian	7	0.799	0.84	0.053
	عرب Arab	7.5	0.761	0.779	0.095



شکل ۱_ تعداد آلل و نیز هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (H_O) و مورد انتظار (H_e) و اختلاف هتروزیگوزیستی مشاهده‌شده و مورد انتظار(H_O-H_e) در اسب‌های نژاد عرب و کاسپین

Figure 1- Number of Allele, Observed and expected hetrozygosity, Diffrences Observed and expected hetrozygosity and average in Arab and Caspian horse breeds

با توجه به این‌که که طول قطعات تکثیری قابل‌انتظار در جایگاه *VHL20*،۸۷-۱۰۵ جفت باز است، در نژاد اسب عرب بررسی‌شده در این تحقیق در این جایگاه، ۷ آلل که بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل‌های ۹٤ و ۱۰٦/۸ با فراوانی ۰/۲۷۳ و نیز کم‌ترین فراوانی آللی در همان جایگاه در آلل‌های ۸٦/٥ و ۱۰۰/۸ با فراوانی برابر ۰/۰۲۳ مشاهده گردید. در جایگاه *HTG4* طول قطعات تکثیری قابل‌انتظار ۱۳۹- ۱۲۷ جفت بازاست، در این جایگاه ٦ آلل که بیش‌ترین فراوانی آللی مربوط به آلل ۱۳۱/٤ با فراوانی ٤۷۸ /۰ و نیز کم‌ترین فراوانی آللی در همان جایگاه در آلل‌های ۸/ ۱۳٥ و ۱۳۸ با فراوانی برابر ۰/۰۲۳ مشاهده گردید. در جایگاه *AHT4* طول قطعات تکثیری قابل‌انتظار ۱٦٤-۱٤٤ جفت بازاست، در این جایگاه ۱۰ آلل که بیش‌ترین فراوانی آللی مربوط به آلل ۱٤٦/۱ با فراوانی ۲۷۳ /۰ و نیز کم‌ترین فراوانی آللی در همان جایگاه در آلل‌های ۱٤۰/٥ و ۱٥٥/۳ با فراوانی برابر ۰/۰۲۳ مشاهده گردید که از محدوده مورد انتظار کمی متفاوت بود. در جایگاه *HMS7* طول قطعات تکثیری قابل‌انتظار ۱۸٥- ۱٦٥جفت بازاست، در این جایگاه ۷ آلل که بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل ۱۷۳/۷ با فراوانی ۰/٤۰۹ و نیز کم‌ترین فراوانی آللی در همان جایگاه در آلل ۱۸۳/۲ با فراوانی برابر ۰/۰۲۲ مشاهده گردید .

با توجه به مطالعات خوانشور و همکاران (۲۰۱۳) بر روی اسب‌های عرب سوریه در جایگاه *HMS7* تعداد ٦ آلل و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۷۹ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار۷٦ /۰ برآورد گردیده که در مقایسه بامطالعه حاضر اسب‌های عرب ۷ آلل و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/٦٤ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۷٤ است و برای *AHT4*، ٦ آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۷و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/٦ برای اسب‌های عرب سوریه که در مقایسه با اسب‌های عرب ایران برعکس جایگاه قبلی هموزیگوسیتی در اسب‌های سوریه بیش‌تر است. در جایگاه *VHL20* تقریباً اسب‌های ایران و سوریه مشابه‌اند ولی در جایگاه *HTG4* میزان هتروزیگوسیتی در نژادهای اسب عرب ایران خیلی بیش‌تر از اسب‌های عرب سوریه است.

در مطالعه ماهروس و همکاران (۲۰۱۱) بر روی اسب-های عرب مصر در *AHT4*، ٦ آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۳۳ و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۹۲ که در مقایسه با اسب‌های عرب ایران ۱۰ آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۸۲ و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۸۱ که نشانگر هتروزیگوسیتی بالا در این جایگاه در مقایسه با اسب‌های عرب ایران دارد.

در مطالعه‌ای که توسط مصطفی و همکاران (۲۰۱۱) در استان چهارمحال و بختیاری انجام گردید میزان هتروزیگوسیتی نسبت به مطالعه حاضر کم‌تر بوده و نشان از هموزیگوسیته بالا نسبت به اسب‌های عرب منطقه آذربایجان شرقی دارد.

در نژاد اسب کاسپین در جایگاه *VHL20*، ۷ آلل که بیش‌ترین فراوانی آللی مربوط به آلل ۹۸/٥ با فراوانی ۰/٤ و نیز کم‌ترین فراوانی آللی در همان جایگاه در آلل-های ۹٥/٥ و۱/ ۱۰۲ و ۱۰٤/۸ با فراوانی برابر ۰/۰۳۳ مشاهده گردید که خارج از محدوده آللی مورد انتظار بود. در جایگاه HTG4، ٦ آلل که بیش‌ترین فراوانی آللی مربوط به آلل ۱۲۹/۳ با فراوانی ۰/۳٦٦ و نیز کم-ترین فراوانی آللی در همان جایگاه در آلل‌های ۱۲٤/٦ و ۱۳۳/٦ و ۱۳۷/۹ با فراوانی برابر ۰/۰۳۳ مشاهده گردید که از محدوده مورد انتظار بیش‌تر بود. در جایگاهAHT4، ۸ آلل که بیش‌ترین فراوانی آللی مربوط به آلل ۱٤۸/۳ با فراوانی ۰/۳۳۳ و نیز کم‌ترین فراوانی آللی در همان جایگاه در آلل‌های ۱٤۲/۷و ۱٤٤/۹ و ۱٦۰/۲ با فراوانی برابر ۰/۰۳۳ مشاهده گردید که در محدوده مورد انتظار نبود. در جایگاه HMS7، ۷ آلل که بیش‌ترین فراوانی آللی مربوط به آلل ۱۷۳/۷ با فراوانی ۰/۳ و نیز کم‌ترین فراوانی آللی در همان جایگاه در آلل-های ۱۷۱/۱ و ۱۷۲/۹ با فراوانی برابر ۰/۰۳۳ دیده شد.

در مطالعه‌ای که توسط شهسورانی و همکاران (۲۰۱۰) بر روی جمعیت اسب‌های کاسپین انجام شد در جایگاه *VHL20*، ۱۲ آلل با هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۸۶ و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۴۲ گزارش‌شده که در مقایسه با مطالعه حاضر بر روی اسب‌های کاسپین بندر انزلی که تعداد ۷ آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۸۴ و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۸۶۶ تفاوت معناداری دارد که نشانگر هتروزیگوسیتی بالای مطالعه حاضر دارد. و نیز درهمان تحقیق در جایگاه *HTG4*، ٦ آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۷۱ و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۴۲ که در مقایسه با مطالعه حاضر با تعداد آلل مشابه و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۸ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۸۵۸ است. نیز در جایگاه *HMS7* تعداد ۹ آلل و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۴۱ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۷۷ برآورد گردیده که در مقایسه با مطالعه حاضر تعداد ۸ آلل و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۸ است.

در مطالعه دیگری که توسط امیر نیا و همکاران (۲۰۰۷) بر روی جمعیت اسب‌های کاسپین انجام شد در جایگاه *VHL20*، ٥ آلل با هتروزیگوسیتی مورد انتظار۰/۷۵ و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۱ گزارش‌شده و برای *AHT4*، ٤ آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/٦۳ و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۸٦ گزارش‌شده که در مقایسه با نتایج حاضر برای جایگاه *VHL20*، ۷ آلل با هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۸٤ و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۸٦٦ و برای *AHT4*، ۸ آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۸٦۲ و هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده ۰/۷۳۳ است، تفاوت معناداری دارد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاکی از کارآمدی ژنوتایپینگ ریز ماهواره‌های DNA در تشخیص نژاد اسب و تست‌های ابوت می‌باشد. این دست مطالعات برای شناسایی تنوع ژنتیکی، حفظ، مدیریت و برنامه‌ریزی برای گونه‌های در معرض خطر و نیز پرورش نژادهای اسب اصیل بسیار مفید است. تعداد آلل‌ها و میزان هتروزیگوسیته در چهار جایگاه موردبررسی در این تحقیق نشان‌دهنده پلی-مورفیسم و تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت موردبررسی می‌باشد.

منابع مورداستفاده

Amirinia C, Seyedabadi H, Banabazi M. H and Kamali M. A, 2007. Bottleneck Study and Genetic Structure of Iranian Caspian Horse. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(9): 1540-1543.

Binns MM, Holmes NG, Rolliman A and Scott AM, 1995. The identification of polymorphicmicrosatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. British Veterinary Journal 151(1): 9-15.

Bowling AT, 2001. Historical development and application of molecular genetic tests for horse identification and parentage control. Livestock Production Science 72(1): 11-116.

Ellegren H, Johansson M, Sandberg K and Andersson L, 1992. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. Animal Genetics 23(2): 133-142.

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.

Georgescu SE, Condac E, Rebedea M, Tesio CD, Dinischiotu A and Costache, M, 2005. Arabian horses genotyping using seventeen microsatellites. Archiva Zootechnica 8:173-178.

Guerin 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.

Haeringen HV, Bowling AT, Stott ML, Lenstra JA and Zwaagstra KA, 1994. A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. Animal Genetics 25(3): 207-207.

Khanshour AM, Conant EK, Juras R and Cothran EG, 2013. Microsatellite analysis for parentage testing of the Arabian horse breed from Syria. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 37(1): 9-14.

Kimpton C, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J and Gill P, 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.

Mahrous KF, Hassanane M, Mordy MA, Shafey HI and Hassan N, 2011. Genetic variations in horse using microsatellite markers. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 9(2): 103-109.

Micka KA, Sprecher CJ, Lins AM, Comey CT, Koons BW, Crouse C and Ma M, 1996. Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications. Journal of Forensic Science 41(4): 582-590.

Miller SA, Dykes DD and Polesky HF, 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16(3): 1215.

Mostafa F, Mohammad JK, Abbas D and Saadat M, 2011. Identity testing with fourteen genetic markers of Arabian horses in Charmahal-va-Bakhtiari province. International Conference on Life Science and Technology 3: 202-204.

Schlötterer C, 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma 109(6): 365-371.

Shahsavarani H and 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): 293-299.

Weinstock J, Willerslev E, Sher A, Tong W, Ho SY, Rubenstein D and Prieto A, 2005. Evolution, systematics, and phylogeography of Pleistocene horses in the New world: a molecular perspective. PLOS Biology 3(8): e241.

Wimmers K, Ponsuksili S, Schmoll F, Hardge T, Hatzipanagiotou A, Weber J and Schellander K, 1998. Efficiency of microsatellite markers of the international standard panel for parentage control in German horse populations. Zuechtungskunde (Germany) 7:233-241.

Winton CL, Plante Y, Hind P, McMahon R, Hegarty MJ, McEwan NR and Nash DM, 2015. Comparative genetic diversity in a sample of pony breeds from the UK and North America: a case study in the conservation of global genetic resources. Ecology and Evolution 5(16): 3507-3522.

The study of genetic variability of Arabian and Caspian horses using microsatellite

H Benaabadi[1], MR Mashayekhi [2]*, A Hasanpour[3] and MR Ayubi[4]

Received: May 01, 2016 Accepted**:** January 08, 2017

[1]MSc Graduated, Department of Genetic, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[2]Assistant professor, Department of Genetic, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[3]associate professor, Department of Clinical Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[4]PhD Student, Department of Large Animal Internal Disease, Faculty of Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
*Corresponding author: M.mashayekhi@iaut.ac.ir

Introduction: Nowadays the genetic markers are very usual for the diversity and management in different horse breeds all around the world. One of the most important goals for horse breeders is conserving the typical phenotype and characters of horses. This conservation is performed based on selection and inbreeding (Winton et al. 2015). In this regard, the main disadvantage is the homozygosity of undesirable alleles in the populations, which results in the reduced level of genetic variation, that in turn leads to lots of defects and susceptibility to recessive diseases (Shahsavarani et al. 2010). DNA genotyping by microsatellites is usually used for determining genetic diversity and parentage testing. However, there are inherited regions of DNA that can vary in different creatures. Variations in DNA sequence are named "polymorphisms". As findings show, sequences with the highest degree of polymorphism are very useful for DNA analysis in paternity verifications. This term is based on analyzing the inheritance of a class of DNA polymorphisms known as Short Tandem Repeats (STR). STRs are short sequences of DNA, normally of length 2-5 base pairs, that are repeated numerous times in a head-tail manner. The polymorphisms in STRs are due to the different number of copies of the repeat element that can occur in a population of individuals. On the basis of different repeat units, STRs can be classified into different types. On the one hand, according to the length of the major repeat unit, STRs are classified into mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, and hexanucleotide repeats. The total number of each type decreases as the size of the repeat unit increases. Short tandem repeats (STRs) like microsatellites represent lots of advantages including codominant inheritance and extreme polymorphism (Miller et al. 1988). This study determined short tandem repeat (STR) and allele frequency of Arab and Caspian horse breeds in different regions of Iran using four loci (VHL20, AHT4, HTG4, HMS7) recommended by the (ISAG).

Material and methods: Blood samples were collected from 37 Iranian horse breeds (East Azerbaijan and Gilan provinces). EDTA as an anticoagulant agent was used in blood tubes. Genomic DNA was extracted and purified by salting out method from whole blood (Miller et al. 1988). Then, DNA concentration was evaluated using NanoDrop at 260 nm. Next, four microsatellite markers were used as labelled with fluorescent dye (6-FAM) (Table1). Afterwards, multiplex PCR was performed in a total volume of 25 µl using the following cycling conditions: the first denaturation at 95˚C for 5 min followed by 25 cycles at 95˚C for 30 sec, 59˚C for 1 min, 72˚C for 30 sec, and a final extension at 72˚C for 5 min. PCR products were checked through electrophoresis on 1/8% agarose gel. Then, they were genotyped by capillary electrophoresis on Genetic Analyzer ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA). The size of alleles was measured by fluorescent fragment analyzer Gene Marker genotype software and the alleles per locus were calculated by counting.

Results and discussion: Genotypes showed the mean number of alleles 7.5 in Arab horses and 7 in Caspian horses. As regards that mean observed heterozygosity (Ho) 0.761 in Arab and 0.799 in

Caspian horse also expected heterozygosity (He) calculated 0.779 in Arab and 0.84 in Caspian horse. The equine microsatellite was introduced by (Ellegren et al. 1992). In the present study, the highest number of polymorphism was 10 for AHT4 locus in Arabian horses compared with 9 in Egyptian Native horses (Mahrous, Hassanane et al. 2011). Two Iranian horse populations (Caspian and Arabian) had high heterozygosity. Iranian Caspian pony heterozygosity (0.84) was higher than that of UK Pony (Winton, Plante et al. 2015). This result was even higher than what was obtained in another study 0.605 (Amirinia et al. 2007) and lower than 0.8 (Shahsavarani et al. 2010).

Conclusion: Our findings were in agreement with other studies in that microsatellite DNA genotyping is useful for individual identification, and paternity and maternity verification on horse population. These kinds of studies help in assessing genetic diversity for conservation, management and breeding program in horse breeds. The number of alleles and heterozygosity level in four loci in our studied population showed higher genetic variability and polymorphism.

Keywords: Genetic variability, Microsatellite, Paternity testing, Multiplex PCR

View publication stats