نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۷ شماره ۱/ سال۱۳۹۶/ صفحات ۹۵ تا ۱۰۲

بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت اسب‌های کرد ایران

محمد امین وحدانی مناف[۱]، محمد رضا مشایخی*[۲]، علی حسن پور[۳] و محمد رضا ایوبی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۶

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه ژنتیک ، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی
[۲] استاد یار گروه ژنتیک، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی
[۳] دانشیار گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی ، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی
[٤] دانشجوی دکتری، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران
*مسئول مکاتبه:Email: M.mashayekhi@iaut.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: نژادهای مختلفی از اسب‌ها وجود دارد و این نژادها را می‌توان با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی از یکدیگر تمییز داد. با این وجود این روش دقیق نیست و با خطا همراه است. برای جبران این کاستی امروزه پژوهشگران از ریزماهواره‌ها به عنوان شاخص تعیین نژاد و مطالعه جمعیت اسب‌ها استفاده می‌کنند زیرا این روش بسیار دقیق می‌باشد. **هدف:** در این مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت اسب‌های کرد ایران با استفاده از ریزماهواره‌ها مورد بررسی قرار گرفته شد. **روش کار:** در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۵۲ اسب نژاد کرد مورد بررسی قرار گرفته است. برای این منظور از مارکرهای ریزماهواره پیشنهادی ISAG استفاده شد. این مارکرها شامل ریزماهواره های VHL20، HTG4، AHT4 وHMS7 می‌باشد. این جایگاه‌ها توسط روش مولتی پلکس PCR با چهار جفت پرایمر نشاندار به رنگ فلورسانس تکثیر شدند و اندازه محصولات حاصل از PCR توسط الکتروفورز مویینه جداسازی و مورد بررسی قرار گرفتند. **نتایج:** داده‌ها نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در جمعیت اسب‌های کرد وجود دارد. تعداد آل‌های مشاهده شده برای هر جایگاه از ۸ تا ۱۳ متغیر بوده است و مارکر AHT4 با ۱۳ آلل دارای بیشترین تعداد آلل و بیشترین هتروزیگوسیتی می‌باشد. جایگاه‌های HTG4 و HMS7 دارای ۸ آلل می باشند که کمترین تعداد آلل در میان جایگاه‌های بررسی شده را دارا می‌باشند و جایگاه HTG4 دارای پایین‌ترین مقدار هتروزیگوسیتی می‌باشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده فراوانی بالای تنوع ژنتیکی جمعیت اسب های کرد در مقایسه با سایر نژادهای اسب می باشد.

واژگان کلیدی: اسب کرد ، ریزماهواره ، تنوع ژنتیکی، مولتی پلکس PCR

مقدمه

اسب جزء پستانداران است که به خانواده *ایکوئیده*[۱] تعلق دارد و از سرعت، قدرت و استقامت قابل توجهی برخوردار است. این حیوان یکی از مهمترین حیوانات اهلی محسوب می‌شود که در زندگی آدمی نقش فراوانی داشته است (ماهروسا و همکاران ۲۰۱۱). اسب نقش ویژه‌ای در تمدن انسان در ۵۰۰۰ سال اخیر داشته است و از این حیوان در جنگ‌ها، کشاورزی، ورزش و غیره

1- Equidae

استفاده شده است (اولسن ۲۰۰٦). نژادهای مختلفی از اسب در جهان زندگی می‌کنند که از لحاظ ویژگی‌های مرفولوژیکی نظیر اندازه، وزن، رنگ و غیره با همدیگر تفاوت دارند. در روش‌های سنتی اسب‌ها را از ویژگی‌های ظاهری و مرفولوژیکی از یکدیگر تمایز می‌دادند که بعضی از شاخص‌ها از جمله رنگ، وزن، سرعت، استقامت و غیره می‌توانستند به عنوان یک شاخص جهت تفکیک نژادها باشند. با این وجود استفاده از نشانگرهای مرفولوژیکی شاخص مناسبی برای متمایز کردن تفاوت های ژنتیکی نمی باشند زیرا دقیق نیستند و استفاده از این روش همواره با خطا همراه است. برای حل این مشکل و بهبود بخشیدن در تشخیص نژادهای مختلف اسب از همدیگر، تکنیک‌های مولکولی به کمک متخصصین آمده است که امکان بررسی جانوران به صورت مستقیم را فراهم کرده است. از بین این روش‌ها استفاده از ریزماهواره‌ها[2]به عنوان مارکر، جهت مطالعات ژنتیکی موجود در نژادها امری دقیق و ارزشمند می‌باشد زیرا این مارکر دارای چندشکلی بالایی است (نیکولاس و همکاران ۲۰۰۹). ریزماهواره‌های مربوط به اسب اولین بار در سوئد از ژنوم شناسایی و جداسازی شدند که نشان داده شد که در اسب‌ها این جایگاه‌ها بسیار پلی مورف می‌باشند (ماکولند و همکاران ۱۹۹٤). برای بررسی دقیق تنوع ژنتیکی لازم است که از روش‌های نوین مولکولی استفاده شود که با تکثیر نمودن STR های خاص اسب که توسط انجمن بین المللی ژنتیک حیوانات (ISAG) برای این مطالعات پیشنهاد شده است انجام می‌گیرد. این جایگاه‌ها در ژنوم اسب‌های مختلف وجود داشته و دارای پلی مورفیسم بالایی هستند (لی و همکاران ۲۰۰٦). تست‌هایی که بر اساس ریزماهواره ها انجام می‌گیرند به مقادیر کمی از نمونه‌های بیولوژیکی نیاز دارند و به یک منبع یا بافت خاص محدود نمی‌گردند (وبر و همکاران ۱۹۹۰). این جایگاه‌ها به صورت پراکنده در سراسر ژنوم پخش شده‌اند و چندشکلی بالایی را نشان می‌دهد. ریزماهواره‌ها دارای سطح بالایی از هتروزیگوسیتی هستند و به صورت هم بارز تظاهر می‌یابند. به دلیل وجود چنین ویژگی‌ها از این مارکرها برای تجزیه و تحلیل پیوستگی،آزمون‌های والدی و نسب ، نقشه برداری ژنوم وهمچنین مطالعات فیلوژنی به طور وسیعی استفاده می‌شود (لی و همکاران ۲۰۰٦). طبق گزارش FAO در سال ۱۹۹۵ تعداد اسب‌ها به ویژه اسب‌های کارگر و اسب‌های وحشی رو به کاهش می‌باشد. برخی از نژادها را می‌توان حفظ نمود اما برخی از نژادها منقرض شده‌اند. به منظور توسعه و برنامه‌های حفاظتی از اسب‌ها ، بررسی تنوع اسب‌های کنونی در جمعیت ضروری به نظر می‌رسد. از این رو رسم درخت فیلوژنی و پیدا نمودن ارتباطات بین جمعیت اسب‌های مختلف برای درک بیشتر ما از تکامل و اهلی نمودن این حیوانات امری ضروری به نظر می‌رسد (میلز و همکاران ۲۰۰۵). تاکنون مطالعات متعددی جهت سنجش تنوع ژنتیکی در جمعیت اسب‌ها صورت گرفته است در این مطالعات جمعیت نژادهای مختلف از جمله اسب‌های باربر آلمانی(آبرله و همکاران ۲۰۰٤)، اسب‌های نژاد عرب (خانشور و همکاران ۲۰۱۳)، اسب‌های نژاد کاسپین (سید آبادی و همکاران ۲۰۰٦) و غیره انجام پذیرفته است و نتایجی متفاوتی برای این مطالعات گزارش شده است. با این وجود تاکنون مطالعه‌ای برای سنجش تنوع ژنتیکی جمعیت اسب‌های نژاد کرد با استفاده از ریزماهواره‌ها انجام نگرفته است.

هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی در میان جمعیت اسب‌های کرد ایران با استفاده از ٤ جایگاه *VHL20، HTG4 ، AHT4* و *HMS7* می باشد.

2- Microsattlite

مواد و روش‌ها

خونگیری از ۵۲ راس از اسب‌های نژاد کرد موجود در استان‌های آذربایجان شرقی، اردبیل و گیلان به عمل آمد. استخراج DNA به روش نمک اشباع صورت پذیرفت (مایلر و همکاران ۱۹۸۸) و کیفیت DNA با روش طیف سنجی توسط دستگاه نانودراپ[۳] (Thermo, Wilmington, USA) انجام پذیرفت. واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از ٤ جفت پرایمر نشاندار به رنگ فلئورسانس FAM در سمت '۵ ، که توالی آنها توسط سایت انجمن ژنتیک حیوانات(ISAG) معرفی شده بود توسط دستگاه ترموسایکلر (Peqlab, UK)به صورت مولتی پلکس صورت پذیرفت.(جدول ۱) اجزای واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (Amplicon, Denmark) ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (Bioneer, South Korea) ، ۱۵۰ نانو گرم بر میکرولیتر از DNA و آب دیونیزه (Sinaclon, Iran) بود.چرخه‌های دمایی واکنش به صورت واسرشت سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس تعداد ۲۵ چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت واسرشت سازی، دمای ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ٤۵ ثانیه جهت اتصال پرایمرها ، دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه جهت مرحله طویل سازی و در نهایت دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه جهت مرحله طویل سازی نهایی اجرا گردید. اندازه قطعات تکثیر یافته به روش الکتروفورز مویینه[٤] (Genetic Analyzer ABI 3130, USA) انجام گرفت و داده‌های حاصل از دستگاه توسط نرم افزار (Genmarker,V2.6.3) مورد بررسی قرار گرفت.

تعداد آلل‌های هر جایگاه به صورت شمارش مستقیم انجام گرفت و هتروزیگوتی مشاهده شده و هتروزیگوتی مورد انتظار با استفاده از فرمول‌های زیر استفاده شد.

الف) $Ho = \sum \frac{Nij}{N}$

ب) $He = 1 - \sum Pi^2$

در فرمول فوق N تعداد افراد بررسی شده می باشد و N_{ij} تعداد افراد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت را نشان می‌دهد. همچنین Pi^2 فراوانی هموزیگوت ها را در جمعیت بیان می کند.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده

Table 1- Used Primers

جایگاه Locus	توالی پرایمر فوروارد Forward Primer Sequences	توالی پرایمر ریورز Reveres Primers Sequences
AHT4	AACCGCCTGAGCAAGGAAGT	GCTCCCAGAGAGTTTACCCT
HTG4	CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC	CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC
HMS7	CAGGAAACTCATGTTGATACCATC	TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT
VHL20	CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG	AACTCAGGGAGAATCTTCCTGAG

نتایج و بحث

شمارش آلل‌های مشاهده شده در نتایج حاصل از الکتروفورز مویینه نشانگر وجود آللها با اندازه‌های مختلف در جایگاه‌های مورد مطالعه می‌باشد. اندازه این آللها به صورت پیک گزارش داده می شود که هر پیک معرف یک آلل می‌باشد. جدول ۲ تعداد آلل‌های مشاهده شده برای جایگاه‌های *VHL20*، *HTG4*، *AHT4* و *HMS7* را نشان می‌دهد که به طور میانگین ۹/۵ آلل به ازای هر جایگاه در جمعیت اسب‌های کرد مورد مطالعه مشاهده شده است. در میان جایگاه‌های مطالعه شده

3 Nanodrop

4 Capillary Electrophoresis

جایگاه *AHT4* بیشترین تعداد آلل را دارا می‌باشد و پلی مورف ترین جایگاه به حساب می‌آید که هتروزیگوسیتی بالایی را نشان می‌دهد. جایگاه‌های *HTG4* و *HMS7* دارای کمترین تعداد آلل در جمعیت مورد مطالعه بودند. برای جایگاه *VHL20* در جمعیت مورد مطالعه ۹ آلل مشاهده گردید که فراوانترین آلل مربوط به آللی با اندازه ۱۰۷ جفت باز بود. قابل توجه است که این آلل خارج از محدوده مورد انتظار معرفی شده توسط ISAG بود. در این جایگاه آلل ۹۰ جفت بازی کمترین فراوانی را در میان جمعیت دارا می‌باشد. کوچکترین آلل مشاهده شده در این جایگاه ۸۸ جفت باز و بزرگترین آلل مشاهده شده ۱۰۷ جفت باز می‌باشد .هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای این جایگاه ۰/۷۵و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۸٤ محاسبه گردید.

برای جایگاه *HTG4*، ۸ آلل در جمعیت مشاهده گردید که آلل ۱۳۲ جفت بازی فراوانترین آلل مشاهده شده در میان اسب‌های نژاد کرد برای این جایگاه می‌باشد و آلل ۱۲٤ جفت بازی کمترین مقدار فراوانی را در میان این جمعیت دارا می‌باشد. کوچکترین آلل مشاهده شده ۱۲٤ جفت باز و بزرگترین آلل مشاهده شده ۱۳۸ جفت باز می‌باشد. همچنین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر ۰/۷۳ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار برابر ۰/۷۲ محاسبه گردید.

برای جایگاه *AHT4*، ۱۳ آلل در این جمعیت مشاهده گردید که آلل ۱۵٦ جفت بازی بیشترین فراوانی را نشان داد و آلل‌های ۱۵۰ و ۱٤۷ جفت بازی کمترین فراوانی را نشان دادند. بزرگترین آلل مشاهده شده در این جایگاه ۱۵٦ جفت باز می‌باشد و آلل‌های ۱٤۰ و۱٤۲ جفت بازی کوچکتر از محدوده انتظار می‌باشند. این جایگاه دارای هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۸۰ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۸۵ می‌باشد.

در جایگاه *HMS7* آلل ۱۷۳ جفت بازی فراوانترین آلل می‌باشد و آلل ۱۸۳ جفت بازی کمترین فراوانی را در این جمعیت دارا می‌باشد. بزرگترین آلل مشاهده شده ۱۸۳ جفت باز و کوچکترین آلل ۱٦۹ جفت باز می‌باشد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای این جایگاه ۰/۷۵ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار برابر ۰/۷۳ محاسبه گردید.

جدول ۲- تعداد آلل ونیز هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوزیستی مورد انتظار
Table 2- Number of allele, Observed heterozygosity and Expected heterozygosity

لوکوس Locus	تعداد آلل Allele number	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity
VHL20	9	0.75	0.84
HTG4	8	0.73	0/72
AHT4	13	0.80	0/85
HMS7	8	0.75	0/73
میانگین mean	9.5	0.75	0/78

در مطالعه‌ای که بر روی جمعیت اسب‌های نژاد تروبرد انجام شد تعداد آلل‌های مشاهده شده برای جایگاه‌های مورد مطالعه از ۳ تا ۹ متغیر بود که به طور میانگین ٦/۳٦ آلل به ازای هر لوکوس مشاهده شد و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این جمعیت ۰/٦٦۳ گزارش گردید. در مطالعه مذکور برای جایگاه *AHT4*، ۵ آلل و برای جایگاه *HMS7*، ٦ آلل گزارش شد و همچنین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای این ۲ جایگاه به ترتیب برابر ۰/۷۸۱ و ۰/٦۷٦ بود (لی و همکاران ۲۰۰٦). این نتایج نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی کمتری میان اسب‌های تروبرد بررسی شده نسبت به اسب‌های کرد وجود دارد. در مطالعه سیدآبادی و

همکاران (۲۰۰٦) که بر روی اسب‌های نژاد کاسپین انجام شده بود تعداد آلل‌ها از ۳ تا ٤ متغیر بود و به طور میانگین ۳/۸٦ آلل به ازای هر لوکوس مشاهده شده بود. در تحقیق مذکور تعداد ٤ آلل برای جایگاه‌های *VHL20* و *AHT4* گزارش شده بود و هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای این دو جایگاه به ترتیب برابر ۱ و ۰/۷٥٦ براورد شده بود. این نتایج نشانگر تنوع ژنتیکی پایین‌تر جمعیت اسب‌های کاسپین در مقایسه با اسب کردی می‌باشد. در مطالعه‌ای که بر اساس ریزماهواره‌ها انجام گرفته بود برای جایگاه *HTG4* در اسب‌های تروبرد اوکراین و اسب های تروبرد روسیه ٥ آلل مشاهده گردیده است. همچنین تعداد آلل‌های مشاهده شده برای جایگاه *AHT4* در اسب‌های تروبرد اوکراین ۹ و برای اسب‌های تروبرد روسیه ٤ آلل گزارش شد. تعداد ۸ و ٦ آلل نیز برای جایگاه *HMS7* به ترتیب برای اسب‌های تروبرد اوکراین و روسیه گزارش شد و به طور میانگین ۷/۳ آلل به ازای هر لوکوس در اسب‌های تروبرد اوکراین و ٥ آلل به ازای هر لوکوس در اسب‌های تروبرد روسیه مشاهده گردید (شلو و همکاران ۲۰۱٤). نتایج مطالعه مذکور نشانگر آن است که اسب‌های تروبرد اوکراین تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به اسب‌های تروبرد روسیه می‌باشد و از لحاظ تنوع ژنتیکی اسب‌های تروبرد اوکراینی مشابهت بیشتری به جمعیت اسب‌های کرد بررسی شده در مطالعه کنونی دارد. در مطالعه‌ای دیگر که بر روی اسب‌های عرب سوریه صورت پذیرفت برای جایگاه *HTG4* ٦۰ آلل با هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/٥۳٥ گزارش شد. همچنین جایگاه *HMS7* دارای ٦ آلل بود که دارای هتروزیگوسیتی ۰/۷۸۷ می‌بود .به طور میانگین ۷/٥ آلل به ازای هرجایگاه مشاهده گردیده بود(خانشور و همکاران ۲۰۱۳). در مطالعه کنونی که بر روی جمعیت اسب‌های کرد انجام گرفت به طور میانگین ۹/٥ آلل به ازای هر جایگاه مشاهده شده است که در مقایسه با مطالعات قبلی انجام شده بیشترین مقدار آلل و تنوع ژنتیکی را دارا می‌باشد.

نتیجه گیری

تنوع بالای آلل‌های مشاهده شده در میان جمعیت اسب‌های کرد مطالعه شده نشانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا در میان این جمعیت می‌باشد. در مقایسه با نژادهای دیگر این نژاد از اسب ها دارای بالاترین تنوع ژنتیکی می‌باشند. این تنوع بالا می‌تواند به علت اختلاط اسب‌های کرد با سایر نژادها و آمیزش‌های غیر اصولی آنها با دیگر نژادها باشد که باعث به وجود آمدن این تنوع بالا در جمعیت شده است.

منابع مورد استفاده

Aberle KS, Hamann H, Drögemüller C and Distl O, 2004. Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. Journal of Animal Genetics 35: 270-277.

Azor PJ, Valera M, Gomez DM, Goyache F and Molina A, 2007. Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. Journal of Genetics and Molecular Biology 30:37-42.

Beate D. Scherf (Ed.), World Watch List for Domestic Animal Diversity, second ed ,1995. FAO, Rome, Italy.

Goldstein DB and Pollock DD, 1997. Launching microsatellttes: a review of mutation. processes and methods of phylogenetic inference. The Journal of Heredity 88: 335-342.

Behruziniya S, Mir Hoseini SZ, Afraz F, Mohammadi SA, Shahbazi S and Delir Sefat SB, 2013. Study of Genetic Diversity in Iranian Turkmen Horse by Four Microsatellite Markers, Iranian Journal of Animal Science Research 4: 345-351(In Persian).

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 37:9-14.

Lee SY. and Cho GJ, 2006. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. Journal of Veterinary Science 7:63-67.

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 9:103-9.

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

Mills DS and McDonnell SM, 2005. The domestic horse: the origins, development and management of its behaviour. Cambridge University Press.

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

Nicholas FW, 2009. Introduction to veterinary genetics. John Wiley & Sons.

Olsen SL, 2006. "Early horse domestication on the Eurasian steppe."Documenting domestication: New genetic and archaeological paradigms:20: 245-269.

Seyedabadi HR, Amirinia S, Banabazi MH, and Emrani H, 2006. Parentage verification of Iranian Caspian horse using microsatellites markers. Iranian Journal of Biotechnology 4:260-264.

Shelyov AV, Melnyk OV, Suprun IO, Spyrydonov VG, Melnychuk SD, Dzitsiuk VV, Gopka BM, 2014. The Comparative Analysis of the Allele Pool of Thoroughbred Horses in Different Countries. Iranian Journal of Applied Animal Science. 4: 637-41.

Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M and Gnerre S, 2009. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. Science 326: 865–867.

Weber JL, 1990. Informativeness of human (dC-dA)*n*- (dG-dT)n polymorphisms. Genomics 7: 524–30.

Evaluation of the genetic diversity of Iranian Kurdish horses

MA Vahdani Manaf[1], MR Mashayekhi [2]*, A Hasanpour[3] and MR Ayubi[4]

Received: May 01, 2016 Accepted: November 16, 2016
[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: The horse is a large land mammal notable for its speed, strength, and endurance. Horses are members of the Equidae family, the horse′s influence on human history and civilization make it one of the most important domestic animals. The horse has various breeds and these breeds can be distinguished from each other based on morphological characteristics (Mahrous et al. 1994). However, this method is not accurate enough. Among molecular markers, microsatellites are suitable for biodiversity evaluation owing to their codominant inheritance, high heterozygosity and distribution across the genome, ease and reliability of scoring. Microsatellites or Short Tandem Repeats (STRs) are used as useful markers found in the DNAs of most species. They are defined as tandem repeats of 2-10 base pair units and are often present as perfect or imperfect repeats. The number of repeats found in any given microsatellite region is sometimes highly variable, with as many as hundreds of copies of the repeat unit in each microsatellite. As a result of their highly polymorphic nature, microsatellites are informative molecular markers that can be applied to research in the fields of population genetics, medical genetics, forensic science, evolutionary biology, and plant breeding. Once potentially useful (i.e. polymorphic) microsatellites are found, PCR primers are constructed from the DNA sequences flanking the microsatellite regions Thus researchers are using microsatellite markers for parentage testing as well as for population genetics studies. In the last decade microsatellite markers have been widely used to assess genetic variability within and between different horse breeds (Nicholas et al. 2009). In the current work genetic diversity of the Kurdish horse breed was studied using 52 individual horses.

Material and methods: Sampling from Kurdish horse was done and their DNAs extracted based on salting out method (Miller et al. 1988). Extracted DNAs was run in an agarose gel and concentration and quality of DNAs was measured by Nano-drop. We used four microsatellite markers that all have been recommended by ISAG for parentage testing. These markers include VHL20, HTG4, AHT4, and HMS7. These loci were amplified by multiplex PCR with fluorescent dye-labeled primers. Polymerase chain reaction was performed using 25 micro liters for each sample and PCR products were separated and analyzed with capillary electrophoresis and the outputs were analyzed using Genmarker software.

Results and discussion: The results showed there are high genetic diversity within the Kurdish horse population. At VHL20 locus 9 alleles was seen and the most frequent allele at VHL20 locus was 170 bp and the lowest frequent allele was 90 bp also the biggest allele in this locus was 107 bp and the smallest allele was 88 bp, observed heterozygosity in VHL20 locus was 0/75 however the expected heterozygosity was 0/84. At HTG4 locus 8 allele was seen and the most frequent allele at HTG4 locus was 132 bp and the allele with 126 bp had a lowest allelic frequency, the allele with 138bp was the biggest allele at this locus and the smallest allele was 124bp. At this locus observed heterozygosity was 0/73 and expected heterozygosity was 0/72. At AHT4 locus 13 allele was seen also the allele with 156 bp had a highest allelic frequency and the alleles with 147 and 150 bp had a lowest allelic frequency, at this locus the biggest allele was 156bp and the allele with 140 bp was the

smallest allele in this locus. Observed and expected heterozygosity at this locus were 0/80 and 0/85 At HMS7 locus 8 alleles was seen and the allele with 183 bp was the most frequent and the allele with 183 bp had a low allelic frequency. At HMS7 locus the biggest allele was 183 bp and smallest allele was 169 bp. Observed and expected heterozygosity was calculated 0/75 and 0/73. In average 9/5 allele per each locus seen in this population. The number of alleles was between 8 and 13. The AHT4 marker had 13 alleles with the highest allelic frequency and the highest heterozygosity. Either of HTG4 and HMS7 markers had 8 alleles and had the lowest allelic frequency and heterozygosity.
Conclusion: Results of this study showed high frequency genetic diversity in Iranian Kurdish population in compare with the other horse breeds. The non-standard mating and mixing of Kurdish horses with other breeds can be the reason of the high diversity.

Keyword: Kurdish horse, Microsatellite, Genetic diversity, Multiplex PCR