The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Mitochondrial DNA Cytochrome-b variability in Iranian Kurdish horse breed

Hasan Jalilian Majd [1], Sheida Varkoohi [2]✉, Hamid Reza Seyedabadi [3]

1. Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran. Email: jalilianmajd@razi.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran. Email: s.varkoohi@razi.ac.ir
3. Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: h_seyedabadi@asri.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 23 April 2022

Received: 24 September 2022

Accepted: 28 September 2022

Published online: 22 June 2023

Keywords:

Kurdish horse,

Genetic Diversity,

Mitochondrial Genome,

Cyt-b,

Phylogeny.

ABSTRACT

Investigation of mitochondrial genome sequence of cytochrome-b region within population can be a good indicator for diversity in the studied population. A recent study was conducted to investigate the genetic diversity in Kurdish horses and phylogenetic relationship of between Kurdish horse with other horse breeds in the world using cytochrome-b region. Blood samples were collected from 30 Kurdish horses and total DNA was extracted by modified salting out method. Cytochrome-b sequences were amplified by primers pairs with 1029 bp length and then were sequenced after purifying. The sequences were trimmed to 882 bp using BioEdit software. The samples were aligned with the horse reference sequence with access number (X79547) using Clustal-W package. Haplotype and polymorphic site numbers, Haplotype and nucleotide diversity were estimated using DNASP4 software. Phylogenetic tree was constructed in MEGA7 software by neighbor joining method. 7 haplotypes with 7 polymorphic site were identified. Whole haplotypes were belonged to K haplogroup. Haplotype and nucleotide diversities were 0.784±0.001 and 0.00218±0.001, respectively. The compositional frequency of consensus sequences was including: A base, 21.27%; C base, 32.77%; G base, 13.15% and T base, 26.87%. According to the phylogenetic analysis, Kurdish horses were genetically more closely related to Japanese and Chinese breeds and one Polish and Saudi Arabian breeds which shows that Kurdish horse has genetic similarities with Asian and some European horse breeds.

Cite this article: Moazen klour, Z., Movahed Mohammadi, S. H.; Rezvanfar, A. & Hejazi S. Y. (2023). Mitochondrial DNA Cytochrome-b variability in Iranian Kurdish horse breed. *Iranian Journal of Animal Science*, 54 (2), 139-149. DOI: http//doi.org/10.22059/IJAS.2022.342038.653886

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: http//doi.org/10.22059/IJAS.2022.342038.653886

Extended Abstract

Introduction

Comparative sequence analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) represents the standard molecular approach for species identification, with a particular emphasis on the cytochrome (cytb) gene. The most common molecular genetic approaches to species identification involve analysis of the mitochondrial DNA cytochrome b gene in nucleotide sequence of the cyt b gene contains species specific. Cytochromeb (cyt-b) has been considered as one of the most useful genes for phylogenetic work, and is probably the best-known mitochondrial gene with respect to structure and function of its protein product. Kurdish horse is one of the most valuable horse genetic resources in the Middle East. Despite the existence of a diverse range of different breeds on native horses in Asia, genetic research on some of these horse breeds, such as the Kurdish horse, is rare.

Therefore, Our main goals in the present study is to explore the utility of cyt-b to identify genetic structure and genetic variations in Kurdish horse and determination of phylogenetic relationships between Kurdish horses and other horse breed in the world.

Materials and Methods

Total DNA was extracted from the collected blood samples by modified salting out method. The cytochrome b was amplified by PCR and then sequenced using ABI PRISM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Consequently, the sequences were trimmed to 882 bp using BIOEDIT to become comparable with other reported cytochrome b sequences in GeneBank. Sequence alignment was performed using CLUSTALW package. Haplotype and nucleotide diversity were estimated using

DNASP5.10 and phylogenetic tree was constructed by Neighbour joining method.

Results

Based on results, 7 different haplotypes and 7 polymorphic sites were detected. The largest haplotype

group consisted of 12 individuals. Haplotype diversity and nucleotide diversity 0.784±0.001and 0.00218±0.001, respectively. Kurdish horse showed a high haplotype and low nucleotide diversity. The compositional frequency of consensus sequences for base A was the highest (27.21%) compared to other three nucleotides (C = 32.77%, T = 26.87% and G = 13.15%).

Conclusion

According to the phylogenetic analysis, Kurdish horses were genetically more closely related to Japanese (Hokkaido and Yakutia), Chinese (Lijiang and Sanhe), Polish and Arabic hors breeds, which indicates the greater genetic similarity of the Kurdish horse with Asian and to some extent European breeds.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۴، شماره ۲

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

تنوع توالی سیتوکروم–b ژنوم میتوکندی در اسبهای کرد ایران

حسن جلیلیان مجد [۱] | شیدا ورکوهی [۲]✉ | حمید رضا سیدآبادی [۳]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: jalilianmajd@razi.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: s.varkoohi@razi.ac.ir

۳. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: h_seyedabadi@asri.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۶
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

کلیدواژه‌ها:
اسب کرد، تنوع ژنتیکی، ژنوم میتوکندری، سیتوکروم b، فیلوژنی.

چکیده

بررسی توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم–b ژنوم میتوکندری در درون جمعیت‌ها می‌تواند شاخص مناسبی از میزان تنوع موجود در جمعیت مورد مطالعه باشد. تحقیق اخیر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در اسب کرد و رابطه فیلوژنتیکی اسب کرد با سایر نژادهای اسب در دنیا با استفاده از ناحیه سیتوکروم–b انجام شد. بدین منظور از ۳۰ رأس اسب نژاد کرد خون‌گیری بعمل آمد و DNA آن به روش نمکی استخراج گردید، سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه سیتوکروم–b به طول ۱۰۲۹جفت باز تکثیر و تمام نمونه‌ها بعد از خالص سازی توالی‌یابی شدند. قطعه مورد نظر پس از توالی‌یابی، با نرم‌افزار BioEdit ویرایش و قطعهٔ ۸۸۲ جفت بازی از آن استخراج شد. نمونه‌ها با توالی مرجع اسب به شماره دسترسی (X79547)با استفاده از رویه Clustal-W همردیف شدند. تعداد هاپلوتیپ، جایگاههای نوکلئوتیدی متغیر، تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار DNASP4.0 تعیین شد. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA6.1 به روش Neighbour-joining ترسیم شد. تعداد ۷ هاپلوتایپ با ۷ جایگاه نوکلئوتیدی متغیر شناسایی شد. هاپلوتایپهای بدست آمده همگی در هاپلوگروه K قرار گرفتند. میزان تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۷۸۴±۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۲۱۸/۰۰۱±۰ برآورد شد. ترکیب نوکلئوتیدها در توالی شاخص شامل ۲۱/۲۷٪ نوکلئوتید A، ۳۲٪/۷۷ نوکلئوتید C، ۱۳٪/۱۵ نوکلئوتید G و ۲۶/۸۷٪ نوکلئوتید Tبود. بر اساس نتایج آنالیز فیلوژنی، اسب کرد از نظر ژنتیکی به نژادهایی از ژاپن، چین ، نژادی از لهستان و عربستان نزدیکتر است، که نشان دهنده تشابه ژنتیکی بیشتر اسب کرد با نژادهای آسیایی و تا حدودی اروپایی می‌باشد..

استناد: جلیلیان مجد، حسن؛ ورکوهی، شیدا و سیدآبادی، حمیدرضا (۱۴۰۲). تنوع توالی سیتوکروم–b ژنوم میتوکندی در اسبهای کرد ایران. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۲)، ۱۴۹-۱۳۹. DOI: http//doi.org/10.22059/IJAS.2022.342038.653886

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org/10.22059/IJAS.2022.342038.653886

مقدمه

نژادهای بومی دام‌های اهلی به عنوان سرمایه ملی در هر کشور به حساب می‌آیند که حفظ و تکثیر آنها از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است. ایران به علت شرایط خاص جغرافیایی دارای اقلیم‌های متنوعی است و در چنین شرایطی انتخاب‌های طبیعی و مصنوعی موجب شده است که نژادهای حیوانات اهلی با استعدادهای متنوع در این کشور به وجود آید. جمعیت‌های مختلف اسب ایرانی برحسب مناطق پراکنش یا اقوام پرورش دهنده آنها نامگذاری می‌شوند, ۲۰۰۵; Behroozinia et al., 2011).اسب کرد یکی از نژادهای اصیل و بومی ایران است که شامل زیر خانواده‌های جاف، افشاری و سنجابی می‌باشد. این نژاد بیشتر در استان‌های کردستان و کرمانشاه که دارای جاده‌های صعب العبور و تپه‌ها و کوه‌های فراوان می‌باشند، یافت می‌شود. اسب کرد بدلیل داشتن ویژگیهای منحصر بفردی از قبیل توانایی و هوش بالا، قوی و آرام بودن، توانایی راهپیمایی در مناطق کوهستانی و استعداد ذاتی در بازیهای چوگان و درساژ بعنوان یکی از با ارزشترین و اصیل ترین اسبهای بومی ایرانی به شمار می رود ((Khalili, 2008، لذا شناخت دقیقتر و کسب اطلاعات بیشتر در مورد این نژاد اسب، جهت حفظ این ذخایر ژنتیکی ضروری به نظر می‌رسد.یکی از راههای شناسایی این نژادها استفاده از ژنوم میتوکندریایی است. ژنوم میتوکندری بدلیل دارا بودن ویژگی‌هایی از قبیل توارث مادری، تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول، میزان جایگزینی نوکلئوتیدی و نرخ موتاسیون بالا، به عنوان منبع مهمی از اطلاعات برای مطالعات فیلوژنتیکی می‌باشد (.(Bowling et al., 2000سیتوکروم- b (cyt-b) بعنوان بخشی از ژنوم میتوکندری، یکی از مفیدترین ژنها برای مطالعات فیلوژنتیک است و با توجه به ساختار و عملکرد محصول پروتئینی آن، شناخته شده ترین ژن میتوکندریایی می‌باشد .Esposti) (et al., 1993تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای توالی DNA میتوکندریایی ((mtDNAبا تأکید ویژه بر ژن سیتوکروم-b، روش مولکولی استانداردی برای شناسایی گونه ها می‌باشد.

با تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک ناحیه سیتوکروم-b ژنوم میتوکندری یکی از نژادهای اسب بومی مجارستان (گیدران) با استفاده از قطعه ۶۸۶ جفت بازی، ۲۴ هاپلوتایپ شناسایی شد و تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی به ترتیب ۰/۰۰۴۷۲ و۰/۸۷۳۵ برآورد شد .((Sziszkosz et al., 2016با بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی توالی سیتوکروم-b ژنوم میتوکندری در ۲۲ نمونه اسب لیچوان چین با استفاده از قطعه ۱۱۴۰جفت بازی، ۹ هاپلوتایپ شناسایی شد و تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتایپی به ترتیب ۰/۰۰۵ و۰/۸۴۰ برآورد شد (.(Qin et al., 2009طی تحقیقی با بررسی ۲۶۵ نمونه اسب نژاد هوکول اروپا با استفاده از ناحیه ۶۸۶ جفت بازی ژن سیتوکروم-b، ۱۳ هاپلوتایپ شناسایی شد و تنوع نوکلوتیدی و تنوع هاپلوتایپی به ترتیب ۰/۰۰۵ و ۰/۸۳۵ گزارش شد (.(Kusza et al., 2013در تحقیق دیگری بر روی ۵ نژاد اسب یونانی با استفاده از قطعه ای از ژن سیتوکروم-b، ۹ هاپلوتایپ مشاهده شد که همه اسبها متعلق به یک هاپلوگروه K بودند(. (Apostolidis et al., 2000

تابحال مطالعات زیادی روی تکامل و تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف نژادهای اسب دنیا و خصوصا در آسیا انجام شده ولی تحقیقات اندکی در این زمینه بر روی اسبهای کرد انجام شده است، لذا هدف از این مطالعه استفاده از ناحیه سیتوکروم-b ژنوم میتوکندری برای بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین رابطه فیلوژنتیکی اسب کرد با سایر نژادهای اسب بانک ژن می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری و استخراج DNA

نمونه گیری خون از ۳۰ راس اسب کرد از جمعیت اسب‌های کرد در نقاط مختلف استان کرمانشاه انجام شد. برای استخراج DNA از روش اصلاح شده نمکی استفاده شد و کیفیت DNA با روش طیف سنجی توسط دستگاه نانودراپ (Thermo, Wilmington, USA)بررسی شد.

PCR، خالص سازی و توالی یابی محصولات

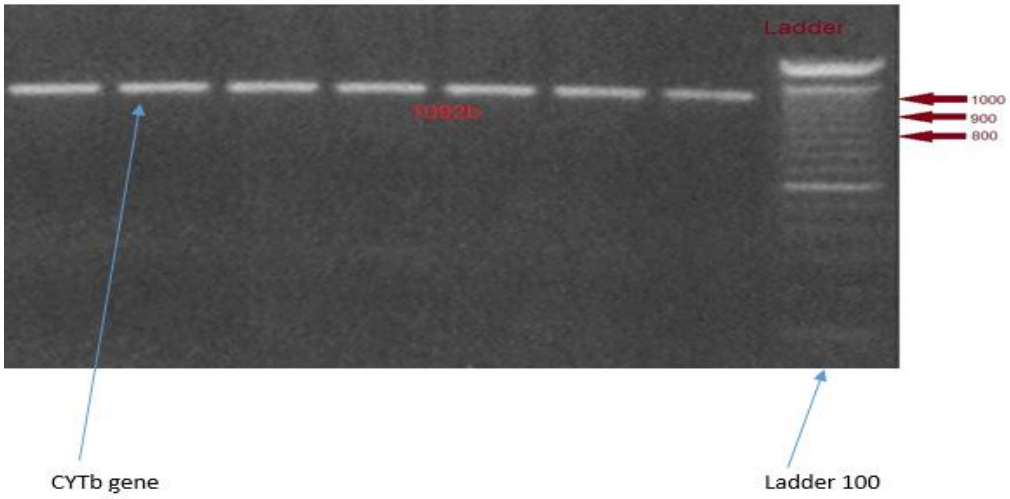
با استفاده از توالی mt-DNA اسب، آغازگرهای رفت با توالی۵'– 'TTCCCACGTGGAATCTAACC-3'و برگشت با توالی۵'– 'GTCCGCCGATTCATGTTAGT-3'با استفاده از نرم‌افزار (Primer Premierشرکت سیناکلون) یک برنامه جامع طراحی پرایمر است، که طراحی پرایمرها را برای کاربردهای مختلف PCR تحت یک پلتفرم مشترک انجام می دهد و بر اساس توالی مرجع اسب X79547 طراحی شدند (.(Arnason & Xu, 1994سپس واکنش‌های PCR در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری که حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر mix master، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر رفت، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت، ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل شده و ۲/۵ میکرولیتر DNA بودند، انجام شد. تمام واکنش‌های PCR با استفاده از برنامه استاندارد واکنش PCR انجام شد که شامل ۱۰ دقیقه واسرشت سازی آغازین زنجیره های الگو در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۵ ثانیه در دمای اتصال ۶۳ درجه سانتیگراد و۳۰ ثانیه در دمای۷۲ درجه سانتیگراد بسط اولیه و در تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت. سپس محصولات PCR ، پس از بررسی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، با استفاده از کیت (Wat-son Bio Technologies, Shanghai)مطابق دستورالعمل شرکت سازنده خالص سازی شدند. نمونه‌های خالص‌سازی شده با استفاده از کیت ABI PRISM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction و ABI PRISM 3130 Geneti Analyzer تعیین توالی شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها

قطعه ۱۰۹۲ جفت بازی محصولات PCR بدست آمده از توالی‌یابی، با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999) ویرایش شده و قطعهٔ ۸۸۲ جفت بازی از آن استخراج شد. توالی‌ها با استفاده از رویه ClustalW (Thompson et al., 1994) توسط توالی مرجع، زیر یکدیگر مرتب شده و توالی‌های حذف و اضافه شناسایی و از آنالیز حذف شدند. توالیهای مشابه به عنوان یک هاپلوتیپ در نظر گرفته شد. با توسعه مطالعات تکاملی نامگذاری DNA میتوکندریایی تغییر و تکامل پیدا کرد. Vila et al. (2001)شش هاپلوگروه ((A-Fدر نمونه های اسب شناسایی کرد. Jansen et al. (2002)یک هاپلوگروه اضافی ((G شناسایی کرد که شامل ۱۷ دسته فیلوژنیک مجزا بود. سپس، McGahren et al. (2006)دو هاپلوگروه جدید A7 و F3 را شناسایی کرد و توالیها را در ۱۹ دسته فیلوژنیک گروهبندی کرد. Cieslak et al. (2010)یک نامگذاری جدید برای هاپلوگروه ها از A تا K و از X1 تا X8 معرفی کرد. هاپلوگروه اسب کرد با استفاده از روش نامگذاری (Cieslak et al., 2010)تعیین شد. شاخصهای تنوع ژنتیکی شامل تعداد جایگاههای نوکلئوتیدی متغیر، تعداد هاپلوتیپها، تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار DNASP4.0 تعیین شد (.(Rozas et al., 2003درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA6.1 به روش Neighbour-joining ترسیم شد .(Tamura et al., 2013)).

نتایج و بحث

نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار است (شکل ۱). الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به‌خوبی تکثیر شده و قطعه اختصاصی را برای ناحیه سیتوکروم–b به طول ۱۰۹۲ جفت باز تکثیر کردند و پس از ویرایش قطعه ۸۸۲ جفت بازی از آن استخراج شد.



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR

Figure 1. Electrophoresis of PCR products

تعداد ۷ هاپلوتایپ از بین توالی‌های مورد بررسی شناسایی شد که دارای ۷ جایگاه نوکلئوتیدی متغیر (Polymorphic site) بودند (جدول ۱). هفت هاپلوتایپ بدست آمده در این تحقیق همگی بر اساس تقسیم بندی (Cieslak *et al*., 2010) در هاپلوگروه K قرار می‌گیرند.

جدول ۱. نوکئوتیدهای متفاوت در قطعه ۸۸۲ جفت بازی سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی اسب کرد در مقایسه با توالی مرجع X79547

Table 1. Variable nucleotide position in 882 bp region of mtDNA cyt-b of Kurdish horse compared to reference sequence GeneBank accession number X79547.

شماره دسترسی بانک ژن	موقعیت نوکئوتیدهای متفاوت						
هاپلوتایپ	14280	14298	14335	14575	14751	14957	15092
X79547	A	A	T	G	C	C	C
(۱۲) هاپلوتایپ ۱	.	.	.	.	.	.	.
(۳) هاپلوتایپ ۲	.	.	.	.	.	T	.
(۲) هاپلوتایپ ۳	.	.	.	.	.	T	T
(۲) هاپلوتایپ ۴	.	.	.	A	.	T	.
(۷) هاپلوتایپ ۵	.	.	.	.	T	T	T
(۲) هاپلوتایپ ۶	T	.	A	.	.	T	.
(۲) هاپلوتایپ ۷	.	G	.	.	T	T	T

میزان تنوع هاپلوتیپی در اسب کرد ۰/۰۰۱ ± ۰/۷۸۴ برآورد شد (جدول ۲). با توجه به اینکه ناحیه ژنوم میتوکندریایی نرخ جهش بالایی دارد، بنابراین انتظار می‌رود در اسب کرد تنوع هاپلوتایپی بالا باشد. میزان تنوع هاپلوتیپی احتمالاً بیانگر ورود نژادهای اسب از مناطق دیگر است (Lister *et al*., 1998). به نظر می‌رسد، تنوع نسبتاً بالای جمعیت اسب‌های کرد احتمالا به‌دلیل تاثیر بیشتر انتخاب طبیعی در مقایسه با انتخاب مصنوعی در تشکیل جمعیت آنها باشد. اسب‌های کرد جمعیت کوچکی

دارند و احتمالا رویکردهای حفاظتی و اهداف به‌نژادی مناسب در حفظ تنوع ژنتیکی آنها موثر است. در مطالعه بر روی ناحیه سیتوکروم–b اسب‌های چینی، تنوع هاپلوتایپی در دامنه ۰/۷۰۶ تا ۰/۹۷۵ قرار گرفت (Yue *et al*., 2012)، که در راستای نتایج تحقیق حاضر می باشد. با مطالعه بر روی ناحیه ۱۱۴۰ جفت بازی سیتوکروم–b ۲۲ در اسب نژاد *Lichuan* میزان تنوع هاپلوتایپی ۰/۸۴ برآورد شد (Qin *et al*., 2009) که تقریبا مشابه با نتایج مطالعه اخیر است.

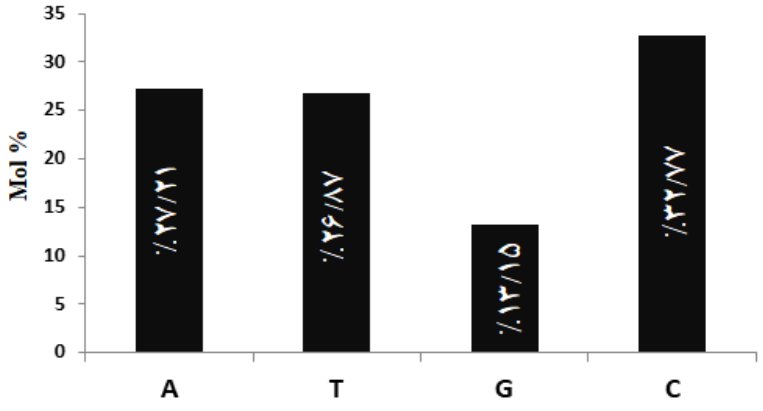
تنوع نوکلئوتیدی در اسب کرد ۰/۰۰۱± ۰/۰۰۲۱۸ برآورد شد (جدول ۲) که مشابه تنوع نوکلئوتیدی اسبهای نژادهای *Gidran*(۰/۰۰۴۰± ۰/۰۱۵۵) و *Marwari* (۰/۰۱۲۶۲ ±۰/۰۳۹۷۳) می‌باشد (Ghosh & Devi, 2013; Luis *et al*., 2006; Sziszkosz *et al*., 2016) و تنوع نوکلئوتیدی کم در اسب کرد احتمالا به دلیل تعداد نسبتاً کم حیوانات نمونه گیری شده، انتخاب برای صفات خاص فنوتیپی و برنامه های بسته اصلاح نژادی باشد. نتایج تحقیقات نشان داده که اسب کرد کمترین تنوع نوکلئوتیدی را در میان سایر نژادهای اسب بومی ایران (عرب، ترکمان ، خزر و مینیاتور سیستانی) دارد (Moridi *et al*., 2012).

جدول ۲. شاخص های تنوع ژنتیکی اسب کرد

Table 2. Genetic diversity indices of the Kurdish horse

تنوع هاپلوتایپی	تنوع نوکلئوتیدی	تعداد هاپلوتایپ	تعداد جایگاه نوکلئوتیدی متغیر	اندازه نمونه
۰/۷۸۴ ± ۰/۰۰۱	± ۰/۰۰۱ ۰/۰۰۲۱۸	۷	۷	۳۰

تعیین توالی مورد توافق یکی از روش‌های معمول جهت ثبت و شناسایی نژادهای مختلف است. بدین منظور نمونه‌های هم‌ردیف شده، با استفاده از نرم افزار BioEdit و توالی مورد توافق با طول ۸۸۲ جفت باز به‌عنوان توالی شاخص برای این نژاد به‌دست آمد. آنالیزها به کمک رویه Composition برنامه BioEdit نشان داد که این توالی برای ناحیه سیتوکروم b شامل ۲۴۰ نوکلئوتید A (۲۷/۲۱٪)، ۲۸۹ نوکلئوتید C (۳۲/۷۷٪)، ۱۱۶ نوکلئوتید G (۱۳/۱۵٪) و ۲۳۷ نوکلئوتید T (۲۶/۸۷٪) بوده و ترکیب نوکلئوتیدهای C+G و A+T به ترتیب ۴۵/۹۲ و ۵۴/۰۸ درصد بود (شکل ۲)، که نتایج اخیر در راستای نتایج حاصل از اسب‌های گیدران مجارستان است (Sziszkosz *et al*., 2016). ناحیه سیتوکروم–b در اسب کرد غنی از بازهای A+T است که با سایر نژادهای اسب سازگاری دارد (liu *et al*., 2014; Lippold *et al*., 2011; Xiao *et al*., 2016).



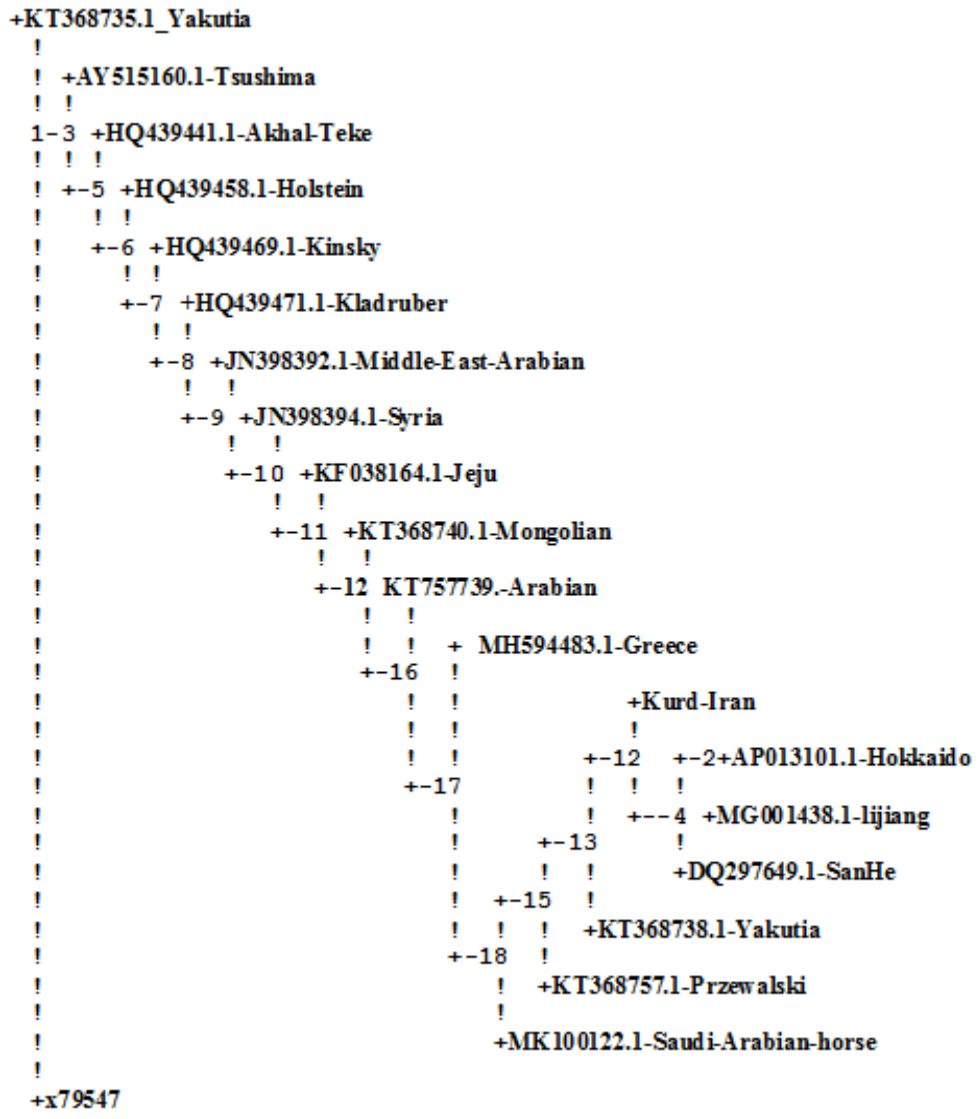
شکل ۲. ترکیب بازهای توالیهای ناحیه سیتوکروم–b در اسب کرد

Figure 2. Bases composition of cyt-b region sequences in Kurdish horse.

1Consensus

درخت فیلوژنتیک یک نمودار انشعابی است که روابط تکاملی در میان گونه‌های مختلف زیستی را بر اساس شباهت‌ها و تفاوت‌های فیزیکی و یا خصوصیات ژنتیکی نشان می‌دهد. واحدهایی که در درخت متصل به هم هستند، از یک نسب مشترک جدا شده‌اند. از آن جا که تکامل در طول دوره‌های زمانی طولانی که به طور مستقیم قابل مشاهده نیست اتفاق می افتد، زیست شناسان باید ارتباط فیلوژنی را با استنباط روابط تکاملی میان جانداران امروزی بازسازی کنند. امروزه، داده‌های مولکولی، شامل پروتئین و DNA، برای تشخیص روابط تبارزایی و ساخت درخت‌های فیلوژنتیک استفاده می‌شوند. بدین صورت که در مرحله اول توالی مورد توافق این نواحی با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI توسط BLAST[1] همردیف شده و مورد مقایسه قرار گرفت. طی این فرآیند تعدادی توالی از ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی اسب از کشورهای مختلف که با نواحی مورد مطالعه هم پوشانی داشتند، از این پایگاه دریافت و تحت رویه Clustal W برنامه BioEdit توالی‌های به دست آمده از سایت NCBI با توالی مورد توافق این تحقیق همردیف‌سازی شدند و سپس در برنامه Bioedit درخت فواصل ژنتیکی به روش Neighbour-joining ترسیم شد. نتایج ترسیم درخت فیلوژنتیکی نشان دادکه اسب کرد با نژادهای اسب از ژاپن (*Hokkaido* و *Yakutia*)، از چین (*Lijiang* و *Sanhe*)، لهستان و عربستان در یک شاخه قرار گرفت، که نشان دهنده تشابه ژنتیکی بیشتر اسب کرد با نژادهای آسیایی و تا حدودی اروپایی می‌باشد (شکل ۳). دلیل این نزدیکی می‌تواند وارد شدن اسب از نقاط مختلف جهان به ایران بدلایل مختلفی از جمله جنگ‌ها و یا توسط پادشاهان و آمیزش آن جمعیت‌ها با اسب‌های بومی ایران و اسب کرد باشد.

1. Basic Local Alignment Search Tool



شکل۳. درخت فیلوژنی که نشان دهنده رابطه بین ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی اسب کرد با دیگر توالی های سایر نژادهای اسب در بانک ژن است.

Figure 3. Neighbour-joining tree showing relationship between mt-DNA cyt-b region in Kurdish horse and other horse breed sequences in the GeneBank database.

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر تلاش شد اطلاعاتی در مورد ناحیه سیتوکروم–b ژنوم میتوکندری بدست آید. نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داد، ناحیه سیتوکروم–b می‌تواند به عنوان نشانگر مولکولی مناسبی در تحقیقات ژنتیکی و علوم زیستی گونه‌های جانوری مانند اسب مورد استفاده قرار گیرد و استفاده از این ناحیه کمک فراوانی به بررسیهای فیلوژنی نژادها در سطح دنیا می‌کند. نتایج این تحقیق بیانگر تنوع نسبتاً زیاد جمعیت مورد بررسی اسب کرد بومی کشور می‌باشد که اشتقاق اولیه متفاوتی دارند. این تنوع بالا، می‌تواند به علت اختلاط اسبهای کرد با سایر نژادها و آمیزشهای غیر اصولی آنها با دیگر نژادها باشد. اگر چه بر اساس سوابق تاریخی کشور و جایگاه اسب برای حفظ قلمرو حاکمان و دستیابی به نواحی دور دست، اختلاط اسب‌های

بومی با سایر جمعیت‌ها برای بدست آوردن اسب‌هایی قدرتمند، شجاع و یا سریع بعید نیست و توجیه‌کننده بخشی از تنوع موجود در این جمعیت است. در مجموع نتایج نشان داد که اسب کرد دارای تنوع هاپلوتایپی بالا و تنوع نوکلئوتیدی کم می‌باشد و هاپلوتایپها متعلق به هاپلوگروه K می باشند. نتایج آنالیز فیلوژنی نشان داد که اسب کرد تشابه ژنتیکی بالایی با اسبهای نژادهای آسیایی و تا حدودی اروپایی دارد.

REFERENCES

Apostolidis, A.P., Alifakiotis, T., Mamuris, Z. & Karkavelia, E. (2000). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA cytochrome b gene among Greek horse breeds. *Italian Journal of Zoology*, 67, 159-162.

Behroozinia, S., Mirhoseini, S.Z., Afraz, F., Sohrabi, A., Mohammadi, S.A., Shahbazi, S. & Dalirsefat, S.P. (2011). Genetic description of two horse breed population, Iranian Turkmen horses in the Turkmen Sahara and Turkmen Jorglan regions using microsatellite markers. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 3(1), 63-66. (In Persian)

Bowling, A.T., Valle, A.D. & Bowling, M. (2000). A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. *Journal of Animal Genetics*, 31, 1-7.

Cieslak, M., Pruvost, M., Benecke, N., Hofreiter, M., Morales, A., Reissmann, M. & Ludwig, A. (2010). Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses. *PLoS ONE*, 5, e15311.

Devi, K.M. & Ghosh, S.K. (2013). Molecular phylogeny of Indian horse breeds with special reference to Manipuri pony based on mitochondrial D-loop. *Molecular Biology Reports*, 40, 5861-5867.

Esposti, M.D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T. & Meyer, A. (1993). Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1143, 243–71.

Hall, T.A. (1999). BIOEDIT (computer software): a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-8.

Ibrahimpoor, M.T. & Rezaeinejad, Y. (2005). *Horse* (1th ed.). Isfahan University of Technology.

Jansen, T., Forster, P., Levine, M.A., Oelke, H., Hurles, M., Renfrew, C., Weber, J. & Olek K. (2002). Mitochondrial DNA and the origins ofthe domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10905–10.

Khalili, M. (2008). Horses and my Expertise. (3th ed.). Zarreh.

Kusza, S., Priskin, K., Ivankovic, A., Jedrzejewska, B., Podgorski, T., Jávor, A. & Mihók, S. (2013). Genetic characterization and population bottleneck in the Hucul horse based on microsatellite and mitochondrial data. *Biological Journal of the Linnean Society*, .109, 54-65.

Lippold, S., Matzke, N.J., Reissmann, M. & Hofreiter, M. (2011). Whole mitochondrial genome sequencing of domestic horses reveals incorporation of extensive wild horse diversity during domestication. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 328.

Lister, A.M., Kadwell, M., Kaagan, L.M., Jordan, W.C., Richards, M.B. & Stanley, H.F. (1998). Ancient and modern DNA in study of horse domestication. *Ancient Biomolecules*, 2, 267–280.

Liu, G., Xu, C.Q., Cao, Q., Zimmermann, W., Songer, M., Zhao, S.S & K, Hu, D.F. (2014). Mitochondrial and pedigree analysis in Przewalski's horse populations: implications for genetic management and reintroductions. *Mitochondrial DNA*, 25, 313-318.

Luís, C., Bastos-Silveira, C., Cothran, E. G. & do Mar Oom, M. (2006). Iberian origins of New World horse breeds. *Journal of Heredity*, 97, 107-113.

McGahern, A., Bower, M.A.M., Edwards, C.J., Brophy, P.O., Sulimova, J., Zakharov, I., Vizuete-Forster, M., Levine, M., Li S., MacHugh, D. E. & Hill, E.W. (2006). Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA sequences in Eastern horse populations. *Animal Genetics*, 37, 494–7.

Moridi, M., Masoudi, A.A., Vaez Torshizi, R. & Hill, E.W. (2012). Mitochondrial DNA D-loop sequence variation in maternal lineages of Iranian native horses. *Animal Genetics*, 44, 209–213.

Qin, F., Wang, X., Zhang, Y., Zhang, M., Li, X. & Lei, C. (2009). Analyses on mtDNA cytb genetic diversity in Lichuan horse. *Hubei Agricultural Sciences*, 12, 11-12.

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.
Sziszkosz, N., Mihók, S., Jávor, A. & Szilvia, K. (2016). Genetic diversity of the Hungarian Gidran horse in two mitochondrial DNA markers. *PeerJ*, 4, e1894.
Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W (computer software): Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–80.
Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
Vila, C., Leonard, J.A., Gotherstrom, A., Marklund, S., Sandberg, K., Liden, K., Wayne, R.K. & Ellegren, H. (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. *Science*, 291, 474–7.
Xiao, X., Yang, S., Lin, D., Wang, Y. & Hua, Y. (2016). The complete mitochondrial genome and phylogenetic analysis of Chinese Jianchang horse (*Equus caballus*). *Cloning and Transgenesis*, 5(149), p.2.
Xu, X. & Arnason, U. (1994). The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, Equus caballus: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene*, 148, 357–62.
Yue, X.P., Qin, F., Campana, M.G., Liu, D.H., Mao, C.C., Wang, X.B., Lan, X.Y., Chen, H. & Lei, C.Z. (2012). Characterization of cytochrome b diversity in Chinese domestic horses. *Animal Genetics*, 43, 624-626.