**Animal Production Research**

Vol. 12, No. 1, 2023 (53-64)
doi: 10.22124/AR.2023.22264.1703
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Gullan

**RESEARCH PAPER** **OPEN ACCESS**

# Investigation of the genetic structure of Arabian horses using microsatellite markers

**H. R. Seyedabadi[1], J. Ahmadpanah[2], A. Javanrouh[3*], H. Baneh[3]**

1. Associate Professor, Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Ilam Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ilam, Iran
3. Assistant Professor, Department of Animal Breeding and Genetics, Animal Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

(Received: 15-05-2022 – Revised: 06-03-2023 – Accepted: 12-03-2023 – Available online: 12-03-2023)

**Introduction:** Horse has been of great interest to humans due to its speed, strength, and endurance. Based on its role in human history and civilization, it is considered the most important domesticated animal. Iranian horse breeds are bred in the north, south, and west regions of the country. Arabian horse is one of the international breeds in the world, which is bred in more than 60 countries. Preliminary evidence shows that the Arabian horse breed was established about 3000 years ago and was bred in small populations in many countries of the Middle East, including Egypt, Iran, Saudi Arabia, and Syria. These separate populations have led to the development of different maternal strains of the Arabian horse. Genetic diversity is necessary for genetic conservation and survival of the breeds. Molecular markers are used to assess the structure and genetic diversity of different populations. Therefore, one of the suitable markers is a microsatellite. Regarding the importance of genetic diversity in the survival of the breed, and designing the genetic conservation and breeding programs, the purpose of this study was to investigate the population structure and genetic diversity of Arabian horse breeds using microsatellite markers.

**Materials and Methods:** In this study, hair root samples were obtained from 8673 (5602 mares and 3071 stallions) Arabian horses from Khuzestan, Yazd, Kerman, Isfahan, Lorestan, and Alborz provinces. DNA samples were extracted from hair roots using the Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). The quantity and quality of the extracted DNA were controlled by spectrophotometry and agarose gel methods. The number of 10 microsatellite markers including AHT04, AHT05, ASB02, ASB17, ASB23, HMS03, HMS06, HMS07, HTG10, and VHL20 were used based on ISAG recommendation. Then, the amplification of genomic fragments and the genotype of samples was determined by COrDIS Horse Reagent Kit (Moscow, Russia). Forward primers were labeled with fluorescent dye at 5'-end. These microsatellite loci were amplified by the multiplex PCR method. Then, the PCR products were genotyped by the Genetic Analyzer system and the capillary electrophoresis method. Obtained data were used to estimate demographic parameters. The number of effective alleles, the number of observed alleles, the observed heterozygosity, the expected heterozygosity, and the Shannon index were calculated by GenAlex 6.5 software. Genpop 4.7.5 software was used to calculate the $F_{IS}$ statistic or Fixation index in the population.

**Results and discussion:** The results showed that the lowest and highest number of observed alleles were related to ASB17 (17 alleles), HMS06 (eight alleles), and HMS07 (eight alleles) markers, respectively. The total number of alleles observed at all loci was 113 alleles. The average number of observed alleles was estimated to be 11.3, which indicates high allelic diversity in the Persian Arabian horse. The mean number of effective alleles, Shannon index, observed and expected heterozygosity and Fixation index were 3.97, 1.58, 0.721, 0.736, and 0.021,

* Corresponding author: a.javanrouh@gmail.com

CC BY

respectively. The mean genetic diversity in the Arabian horse's population was calculated to be 0.736. The highest and lowest genetic diversity was observed in VHL20 (0.803) and ASB02 (0.620) markers, respectively. The average number of effective alleles per locus in studies conducted in different countries on Arabian horses, including Egypt, Syria, and Western countries, with Persian Arabian horses in this research, showed that number of effective alleles is higher in Persian Arabian horses. The average Shannon's index has been reported to be slightly lower in previous studies of Persian Arabian horses, which is probably due to the small number of samples in these studies compared to the present study. The highest and lowest observed heterozygosities in this study were related to AHT4 (0.788) and ASB02 (0.613) markers, which were consistent with the results of the research conducted on Arabian horses of Iran, Syria, and Egypt. The positive $F_{IS}$ value in Arabian horses made a decrease in heterozygosity in the population, an increase in homozygosity and consequently inbreeding in Arabian horse populations. In this research, all studied loci showed a significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. Except for the AHT04 marker, which deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium at $P<0.01$, the others have deviated at $P<0.001$. Deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium can indicate the presence of some factors disturbing Hardy-Weinberg equilibrium, such as migration and selection, which in Persian Arabian horses, the entry of stallions from outside the herd and the gene flow between different maternal strains and also the existence of a selection program among breeders are the main factors of deviation from Hari-Weinberg equilibrium.

**Conclusions:** Evaluation of the genetic structure of Arabian horses of Iran and comparison with other Arabian horses in the world, including those in the Middle East region, showed that Arabian horses of Iran have a higher genetic diversity, which is probably due to the presence of different maternal strains in Iran, high gene flow among the different strains, a large import of Arabian horses and crossbreeding with Arabian horses of Iran, as well as a high number of samples and so identification of new alleles in this research. On the other hand, the rate of inbreeding was positive according to the $F_{IS}$ in Iran Arabian horses, indicating a risk of genetic diversity loss and increasing inbreeding in these horses. Therefore, management of genetic diversity and prevention of mating among related animals should be considered.

**Keywords:** Arabian horse, Genetic diversity, Population parameters, Microsatellite marker

**Conflicts of interest:** The authors declare no conflicts of interest.

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

**How to cite this article:**

Seyedabadi, H. R., Ahmadpanah, J., Javanrouh, A., & Baneh, H. (2023). Investigation of the genetic structure of Arabian horses using microsatellite markers. *Animal Production Research*, *12*(1), 53-64. doi: 10.22124/AR.2023.22264.1703

تحقیقات تولیدات دامی

سال دوازدهم/شماره اول/بهار ۱۴۰۲ (۶۴-۵۳)

Animal Production Research

**مقاله پژوهشی**

# بررسی ساختار ژنتیکی اسب نژاد عرب با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

**حمیدرضا سیدآبادی[۱]، جواد احمدپناه[۲]، علی جوانروح[۳*]، حسن بانه[۳]**

۱- دانشیار، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- استادیار، بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایلام، ایران

۳- استادیار، بخش تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد دام، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۵ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۱)

**چکیده**

هدف از این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی اسب‌های عرب ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بود. به این منظور از تعداد ۱۰ نشانگر ریزماهواره شامل AHT04، AHT05، ASB02، ASB17، ASB23، HMS03، HMS06، HMS07 و VHL20 مورد تایید انجمن بین‌المللی ژنتیک دام استفاده شد. تعداد ۸۶۷۳ نمونه موی اسب از استان‌های خوزستان، یزد، کرمان، اصفهان، لرستان و البرز جمع آوری شد و سپس استخراج DNA از نمونه‌های اخذ شده انجام گرفت. نشانگرهای ریزماهواره با روش Multiplex PCR تکثیر شدند. سپس محصولات تکثیر شده به وسیله سیستم Genetic analyzer و با روش الکتروفورز مویینه تعیین ژنوتیپ شدند. بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده به ازای هر نشانگر، به ترتیب مربوط به نشانگرهای ASB17 (۱۷ آلل)، HMS06 (هشت آلل) و HMS07 (هشت آلل) بودند. مجموع تعداد کل آلل‌های مشاهده شده در همه جایگاه‌ها و میانگین تعداد آلل مشاهده شده به ترتیب برابر با ۱۱۳ و ۱۱/۳ بودند. میانگین تعداد آلل موثر، شاخص شانون، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و شاخص تثبت به ترتیب ۳/۹۷، ۱/۵۸، ۰/۷۲۱، ۰/۷۳۶ و ۰/۰۲۱ به‌دست آمد. میانگین تنوع ژنتیکی در جمعیت اسب عرب مورد بررسی برابر با ۰/۷۳۶ محاسبه شد. بیشترین تنوع ژنتیکی در نشانگر VHL20 با فراوانی برابر با ۰/۸۰۳ و کمترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به نشانگر ASB2 با مقدار ۰/۶۲۰ بود. فراسنجه‌های جمعیتی در اسب عرب نشان داد که چندشکلی و تنوع ژنتیکی در این نژاد نسبتاً بالا است. وجود تنوع ژنتیکی در این نژاد جهت اجرای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت نژادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

**واژه‌های کلیدی:** اسب عرب، تنوع ژنتیکی، فراسنجه‌های جمعیتی، نشانگر ریزماهواره

* نویسندهٔ مسئول: a.javanrouh@gmail.com

doi: 10.22124/AR.2023.22264.1703

**مقدمه**

اسب به دلیل سرعت، قدرت و استقامت زیاد مورد توجه انسان‌ها بوده و به دلیل تأثیر بر تاریخ و تمدن بشر، از مهم‌ترین حیوانات اهلی محسوب می‌شود. از اسب به عنوان وسیله‌ای برای حمل و نقل، مشارکت درکارهای کشاورزی، ورزش و در برخی کشورها برای تأمین غذا استفاده می‌شود (Mahrous *et al*., 2011). جمعیت برخی از نژادهای اسب در جهان در حال کاهش بوده و در خطر انقراض قرار گرفته‌اند و ضرورتاً نیاز به توجه و احیاء دارند، این در حالی است که برخی از نژادهای اسب نیز منقرض شده‌اند که تعداد آن به ۹۸ نژاد می‌رسد که بیشترین سهم آن مربوط به قاره اروپا بوده است (FAO, 2021).

نژادهای مختلف اسب‌های بومی ایران بر حسب شرایط جغرافیایی، خاستگاه و منشا آنها، در بخش‌های مختلفی از فلات ایران پرورش داده شده و پراکنده هستند. در کل، ۷۸۴ نژاد اسب در سرتاسر جهان وجود داردکه از این تعداد، ۶۵۵ نژاد از نوع محلی، ۶۲ نژاد از نوع منطقه‌ای و ۶۷ نژاد نیز از نوع بین المللی هستند. ایران با حدود ۱۳۲ هزار رأس، جزء کشورهای با تعداد متوسط اسب محسوب می‌شود (Mostafavi *et al*., 2019). کمک به حفظ تنوع ژنتیکی در یک گونه این امکان را فراهم می‌آورد تا با توجه به تغییرات شدید اقلیمی در قرن اخیر، تا حدودی بقای آن گونه در طبیعت، تضمین شده و از خطر انقراض دور بماند (Sadeghi *et al*., 2019). در واقع تنوع ژنتیکی یک عامل مهم برای پیشرفت ژنتیکی و سازگاری به شرایط محیطی به شمار می‌رود. برآورد تنوع ژنتیکی و شناسایی قابلیت‌های یک گونه، اولین گام برای کمک به حفظ تنوع ژنتیکی و بقای آن گونه است. جهت حفاظت از یک گونه حیوانی، شناخت عمیق منبع ژنتیکی آن گونه لازم است (Shamsaddini *et al*., 2016).

اسب‌های موجود در ایران شامل نژادهای مختلفی از جمله ترکمن، دره شوری، کرد، عرب، تالشی و کاسپین هستند که تنوع ژنتیکی مناسبی را ایجاد کرده‌اند. اسب‌های عرب طی جنگ و تجارت در سراسر جهان مخصوصاً خاورمیانه پخش شدند. از زمان‌های گذشته، پرورش‌دهندگان اسب عرب از تلاقی اسب عرب با اسب‌های غیر عرب خودداری کرده و از سویه‌های مختلف این نژاد حفاظت می‌کردند (Van Lent and Upton, 1999). این نژاد به زیر خانواده‌های کهیلان، هادیان، حمدانی، سگلاوی و عبیان تقسیم می‌شود (Mahrous *et al*., 2011). اسب عرب یکی از نژادهای بین‌المللی در جهان است که در بیش از ۶۰ کشور جهان پرورش داده می‌شود. شواهد اولیه نشان می‌دهد که نژاد اسب عرب حدود ۳۰۰۰ سال قبل به‌وجود آمده و به‌صورت جمعیت‌های کوچک در بسیاری از کشورهای خاورمیانه از جمله مصر، ایران، عربستان سعودی و سوریه پرورش داده می‌شد. این جمعیت‌های مجزا منجر به توسعه سویه‌های مادری مختلف اسب عرب شده است (Sadeghi *et al*., 2019). از ویژگی‌های شاخص اسب عرب می‌توان به باهوشی، رفتار آرام، استقامت زیاد و ساختار بدنی زیبا اشاره کرد. آمیخته‌گری با سایر نژادها در اسب عرب کمتر مشاهده می‌شود و به نوعی خالص و حفاظت شده است. در واقع برای حفظ اصالت اسب عرب ایران و رسیدن به حد استانداردهای علمی و جهانی لازم است که در مورد شناسایی، حفظ و بهبود خصوصیات ژنتیکی این نژاد تحقیقات جامع‌تری انجام گیرد (Khalili, 2009; Khalili, 2015).

یکی از ابزارهای پرکاربرد برای شناسایی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف، نشانگرهای مولکولی هستند که یکی از نشانگرهای مناسب، نشانگرهای ریزماهواره هستند. در دهه گذشته، نشانگرهای ریزماهواره به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی تنوع ژنتیکی داخل و بین نژادی استفاده شده است (Khanshour *et al*., 2014). همچنین از این نشانگرها جهت تهیه نقشه پیوستگی ژنتیکی دام‌های اهلی استفاده شده است (Javanrouh and Khodamoradi, 2022).

در مطالعات پیشین از نشانگرهای ریزماهواره جهت بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی اسبهای جهان استفاده شده است. Badbarin *et al.* (2022) میزان تنوع ژنتیکی اسب عرب و تیره‌های مختلف آن را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که تیره‌های مختلف اسب عرب ایران دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند. همچنین آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در آن تحقیق نشان داد که گروه‌بندی خاصی ناشی از جدا شدن تیره‌های مختلف اسب عرب در ایران وجود ندارد. Abdoli *et al.* (2021) ساختار ژنتیکی اسب‌های عرب، کاسپین، دره‌شوری، کرد و ترکمن را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مطالعه کردند. نتایج این تحقیق بیانگر

چندشکلی بالای جایگاه‌های مورد استفاده در اسب‌های بومی کشور بود. لازم به ذکر است که در آن تحقیق، اسب-های عرب ایران نسبت به سایر جمعیت‌های اسب در ایران، تنوع ژنتیکی کمتری نشان دادند. از نشانگرهای ریزماهواره-ای جهت بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت اسب‌های شمال غرب ایران شامل اسب‌های بومی اردبیل، اسب‌های موجود در باشگاه‌های پرورش اسب اردبیل و نژادهای عرب، دره‌شوری، کردی و قره‌باغ استفاده شده است. این نتایج نشان داد که جمعیت‌های اسب شمال غرب ایران از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند (Hedayat-Evrigh *et al.,* 2019). در تحقیقی دیگر، ساختار ژنتیکی اسب‌های عرب ایران، کاسپین و تالشی با استفاده از جایگاه‌های ریزماهواره مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج، اسب عرب ایران در شاخه مجزایی قرار گرفت، در حالی‌که اسب‌های کاسپین و تالشی در یک شاخه قرار گرفتند (Seyedsharifi *et al.,* 2019). در تحقیق دیگر، از تعداد ۱۲ نشانگر ریزماهواره برای بررسی تنوع ژنتیکی سه سویه اسب عرب سوریه استفاده شده است. نتایج آن تحقیق نشان داد که سطوح پائینی از تمایز جمعیتی در بین سویه‌های اسب عرب سوریه وجود دارد (Almarzook *et al.,* 2022). در تحقیقی که به منظور ارزیابی ساختار جمعیتی سه جمعیت اسب عرب شامل صحرایی، مصری و لهستانی انجام شد، سطوح بالایی از جریان ژنی در بین این زیرجمعیت‌ها نشان داده شد. لذا به نظر می‌رسد این زیرجمعیت‌ها دارای اجداد مشترکی بوده و انشقاق آنها اخیراً اتفاق افتاده است. همچنین ارزیابی میزان همخونی در این زیرجمعیت‌ها بر اساس شاخص $F_{IS}$ نشان داد که افزایش هموزیگوسیتی در همه زیرجمعیت‌ها وجود دارد و باید برای جلوگیری از کاهش تنوع ژنتیکی، برنامه‌های اصلاح نژادی مناسب تدوین شود (Machmoum *et al.,* 2020). بر اساس ۱۵ نشانگر ریزماهواره، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های اسب عرب در کشورهای خاورمیانه از جمله ایران، آمریکا و کشورهای اروپایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح بالاتری از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های خاورمیانه نسبت به جمعیت‌های غربی مشاهده شد. همه اسب‌های عرب آمریکایی از جمعیت‌های خاورمیانه تمایز نشان دادند و تا حدودی در بین خود یکنواختی داشتند (Khanshour *et al.,* 2013). مشخص شد که اسب‌های عرب ایران نسبت به اسب‌های عرب ثبت شده سوریه و اسب‌های عرب عربستان سعودی از تنوع ژنتیکی بالاتری برخوردار بودند.

با توجه به اهمیت تعیین تنوع ژنتیکی اسب عرب ایرانی و استفاده از اطلاعات به‌دست آمده در طراحی برنامه حفاظت ژنتیکی و اصلاح نژاد این نژاد ارزشمند، هدف از مطالعه حاضر بررسی ساختار جمعیتی و تنوع ژنتیکی اسب‌های عرب ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بود.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه، نمونه‌های ریشه مو از یال اسب‌های عرب مربوط به ۸۶۷۳ اسب عرب (۵۶۰۲ رأس مادیان و ۳۰۷۱رأس نریان) از استان‌های خوزستان، یزد، کرمان، اصفهان، لرستان و البرز تهیه و به آزمایشگاه موسسه تحقیقات علوم دامی کشور منتقل شد. استخراج DNA از ریشه مو و با استفاده از دستورالعمل و کیت استخراج Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius,Lithuania) انجام شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده نیز دو روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز استفاده شد. از تعداد ۱۰ آغازگر مربوط به جایگاه‌های ریزماهواره اسب مورد تایید انجمن بین‌المللی ژنتیک حیوانات (جدول ۱) جهت تکثیر قطعات ژنومی استفاده شد. برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها از کیت COrDIS Horse Reagent Kit (Moscow, Russia) استفاده شد. آغازگرهای رفت (Forward) در انتهای '۵ با رنگ‌های فلورسنتی FAM، VIC، PET و NED نشان‌دار شدند. همچنین آغازگرهای برگشت (Reverse) به‌صورت معمولی و بدون رنگ فلوئورسنتی تهیه شدند.

به منظور تکثیر قطعات ژنومی جایگاه‌های ریزماهواره از روش Multiplex PCR استفاده شد. برای این منظور، برای هر یک از آغازگرهای ریزماهواره، مناسب‌ترین دمای اتصال با استفاده از شیب حرارتی دستگاه ترموسایکلر مشخص شد. سپس با مخلوط کردن هر یک آغازگرهای رفت و برگشت و انجام PCR با استفاده از شرایط بهینه شده در جدول ۲، عمل تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره به‌طور همزمان انجام شد. چرخه حرارتی بهینه برای تکثیر نشانگرها در جدول ۳ ارائه شده است. مرحله ۲ تا ۴ به تعداد ۳۰ چرخه حرارتی در برنامه PCR تکرار و عمل تکثیر انجام گرفت.

جدول ۱- مشخصات جایگاه‌های ریزماهواره شامل توالی آغازگرها، محدوده آللی و شماره کروموزوم

Table 1. Characteristics of microsatellite loci including primer sequence, allele range and Choromosome number

| Marker | Primer sequence | Reference | Length (bp) | Chromosome number |
|---|---|---|---|---|
| AHT4 | F: AACCGCCTGAGCAAGGAAGT<br>R: CCCAGAGAGTTTACCCT | Binns *et al.* (1995) | 144-164 | 24 |
| AHT5 | F: ACGGACACATCCCTGCCTGC<br>R: GCAGGCTAAGGGGGCTCAGC | Binns *et al.* (1995) | 126-144 | 8 |
| ASB2 | F: CCTTCCGTAGTTTAAGCTTCTG<br>R:CACAACTGAGTTCTCTGATAGG | Breen *et al.* (1997) | 216-250 | 15 |
| ASB17 | F: GAGGGCGGTACCTTTGTACC<br>R: ACCAGTCAGGATCTCCACCG | Breen *et al.* (1997) | 87-129 | 2 |
| ASB23 | F: GAGGTTTGTAATTGGAATG<br>R: GAGAAGTCATTTTTAACACCT | Irvin *et al.* (1998) | 175-211 | 3 |
| HMS3 | F: CCAACTCTTTGTCACATAACAAGA<br>R: CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT | Guerin *et al.* (1994) | 148-170 | 9 |
| HMS6 | F: GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG<br>R: CTCCATCTTGTGAAGTGTAACTCA | Guerin *et al.* (1994) | 151-169 | 15 |
| HMS7 | F: CAGGAAACTCATGTTGATACCATC<br>R:TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT | Guerin *et al.* (1994) | 165-185 | 1 |
| HTG10 | F: CAATTCCCGCCCCACCCCCGGCA<br>R: TTTTTATTCTGATCTGTCACATTT | Marklund *et al.* (1994) | 95-115 | 21 |
| VHL20 | F: CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG<br>R: AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG | Van Haeringen *et al.* (1994) | 87-105 | 30 |

جدول ۲- ترکیبات Multiplex PCR

Table 2. Multiplex PCR compounds

| Reaction components | Final concentration |
|---|---|
| Buffer PCR | 1X |
| $Mgcl_2$ | 2 mM |
| Primer mix (F) (labeled) | 0.25 µM (each primer) |
| Primer mix (R) | 0.25 µM (each primer) |
| dNTPs | 200 µM |
| Taq DNA polymerase | 1 unit/reaction |
| DNA template | 10 ng/reaction |
| dd H2O | variable |
| Final volume | 15 µL |

جدول ۳- چرخه‌های حرارتی Multiplex PCR

Table 3. Multiplex PCR thermal cycles

| Row | Steps PCR | Temperatures (˚C) | Time |
|---|---|---|---|
| 1 | Initial denaturation | 95 | 10 minutes |
| 2 | Denaturation | 95 | 45 seconds |
| 3 | Annealing | 58 | 1 minute |
| 4 | Extension | 72 | 1 minute |
| 5 | Final extension | 72 | 10 minutes |

پس از انجام Multiplex PCR با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره، جهت تعیین ژنوتیپ و خوانش آلل‌ها از دستگاه Genetic Analyser 3130 ساخت شرکت Applied Biosystem (ABI) آمریکا استفاده شد. در این دستگاه از سیستم موئین الکتروفورز جهت خوانش آلل‌ها استفاده می‌شود. به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای موئین الکتروفورز، ۱/۵ میکرولیتر از محصول PCR با مقدار ۱۱ میکرولیتر از فرمامید، رقیق شده و مقدار ۰/۳ میکرولیتر DNA استاندارد

با نام تجاری GeneScan–500 LIZ با همدیگر مخلوط و در پلیت دستگاه بارگذاری و عمل ران شدن نمونه‌ها برای تعیین ژنوتیپ هر یک از جایگاه‌های ریزماهواره انجام شد. نرم افزارهای مربوط به تعیین فراسنجه‌های جمعیتی جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. به منظور محاسبه آماره‌های تعداد آلل‌های موثر (Ne)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (No)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و شاخص شانون (Shannon Index) از نرم افزار GenAlex 6.5 استفاده شد (Peakal and Smouse, 2012). به منظورمحاسبه آماره $F_{IS}$ یا شاخص وجود همخونی در جمعیت از نرم افزار Genpop4.7.5 استفاده شد (Rousset, 2008).

## نتایج و بحث

کیفیت DNAهای استخراج شده جهت تکثیر، مناسب ارزیابی شد که نسبت اسیدهای نوکلئیک به پروتئین‌ها در تمام نمونه‌ها بین ۲-۱/۸ مشاهده شد که دلیل بر کیفیت خوب نمونه‌های استخراجی بود. غلظت نمونه‌های DNA استخراج شده، ۲۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر بود. شرایط PCR برای تک تک نشانگرهای مورد بررسی بهینه شد. نتایج حاصل از برآورد فراسنجه‌های جمعیت شامل: تعداد آلل مشاهده شده در هر جایگاه، تعداد آلل موثر، شاخص شانون، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و شاخص تثبیت در ۱۰ جایگاه ریزماهواره اسب عرب ایران در جدول ۴ ارائه شده است. مجموع تعداد کل آلل‌های مشاهده شده در همه جایگاه‌ها برابر با ۱۱۳ آلل بود. میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده ۱۱/۳ برآورد شد که حاکی از تنوع آللی بالا برای این نژاد است. بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده در هر جایگاه به ترتیب مربوط به نشانگرهای ASB17 (۱۷ آلل)، HMS06 (هشت آلل) و HMS07 (هشت آلل) بود. در تحقیقی که Sargious *et al.* (2022) به منظور مطالعه ساختار ژنتیکی اسب عرب مصری انجام دادند، نشانگرهای ASB17 و HMS06 به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده در هر جایگاه را داشتند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین در تحقیق دیگر که به منظور بررسی ساختار ژنتیکی اسب‌های عرب ایرانی، تالشی و کاسپین انجام شد، نشانگرهای ASB17 و HMS06 به ترتیب کمترین و بیشترین تعداد آلل در هر جایگاه را نشان دادند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (Seyedsharifi *et al.,* 2019). میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده در این بررسی، کمتر از میانگین مشاهده شده در جمعیت اسب‌های شمال غرب ایران (۱۳/۷۲) بود (Hedayat-Evrigh *et al.,* 2019). این تفاوت احتمالاً به دلیل ساختار جمعیتی مختلف، نشانگرهای مختلف استفاده شده و نیز متفاوت بودن روش تعیین ژنوتیپ در دو مطالعه است. میانگین تعداد آلل مشاهده شده در اسب عرب ایران که به وسیله Jabbari *et al.* (2020) بررسی شده بود برابر با ۶/۵ آلل محاسبه شد که کمتر از مقدار برآورد شده در مطالعه حاضر است که می‌تواند به دلیل تعداد نمونه و نشانگر کمتر نسبت به تحقیق حاضر باشد. میانگین تعداد آلل مشاهده شده در اسب‌های تونسی برابر با ۶/۷۹ برآورد شد (Jemmali *et al.,* 2017) که کمتر از مقدار مشاهده شده در این مطالعه است. احتمالاً بالا بودن تعداد آلل مشاهده شده در این تحقیق به دلیل تعداد بالای حیوانات و شناسایی انواع آلل‌های مختلف در جایگاه‌های مورد نظر در این جمعیت بزرگ است.

یکی از معیارهای مورد استفاده برای چندشکلی نشانگرها، تعداد آلل مؤثر است که بیانگر تعداد آلل‌هایی است که هتروزیگوسیتی یکسان ایجاد می‌کنند. این در شرایطی است که همه آلل‌ها دارای فراوانی یکسان بوده و با آلل‌های نادر تحت تاثیر قرار نمی‌گیرند. برخلاف تعداد آلل مشاهده شده در هر جایگاه، تعداد آلل موثر به میزان کمتری متاثر از تعداد نمونه است و لذا معیار بهتری در مطالعات جمعیتی محسوب می‌شود (Hedrick, 2000). در این تحقیق، میانگین تعداد آلل مؤثر در همه جایگاه‌های مورد مطالعه برابر با ۳/۹۷ بود. در پژوهش حاضر، بیشترین و کمترین تعداد آلل موثر در نشانگرهای مورد مطالعه به ترتیب با مقادیر ۵/۰۷ و ۲/۶۳ مربوط به نشانگرهای VHL20 و ASB02 بود. میانگین تعداد آلل موثر در اسب‌های عرب صحرایی، مصری و لهستانی به ترتیب ۳/۳، ۳/۳ و ۳/۶ به‌دست آمد که پائین‌تر از مقادیر به‌دست آمده در اسب‌های عرب ایران در تحقیق حاضر است (Machmoum *et al.,* 2020). در تحقیقی که به وسیله Khanshour *et al.* (2013) انجام شد، میانگین تعداد آلل موثر اسب‌های عرب عربستان سعودی، سوریه و ایران به ترتیب ۳/۳، ۳/۵۱ و ۳/۶۱ به‌دست آمد که پائین‌تر از مقادیر مربوطه در اسب‌های عرب ایران بود. مقایسه میانگین تعداد آلل موثر در هر جایگاه در

مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف روی اسب عرب از جمله مصر، سوریه و کشورهای غربی با اسب‌های عرب ایران در این تحقیق نشان داد که میانگین تعداد آلل موثر به ازای هر جایگاه در اسب‌های عرب ایران بالاتر است (Khanshour *et al.,* 2013; Almarzook *et al.,* 2022; Sargious *et al.,* 2022). میانگین تعداد آلل موثر به ازای هر جایگاه در این تحقیق از مقادیر گزارش شده در اسب-های عرب ایران در تحقیقات گذشته اندکی بالاتر است که احتمالاً به دلیل تعداد نمونه خیلی زیادتر و نیز شناسایی آلل‌های بیشتر در جایگاه‌های مورد مطالعه است (Abdoli *et al.,* 2021; Badbarin *et al.,* 2022). البته میانگین تعداد آلل موثر در سایر نژادهای اسب ایران از جمله در اسب‌های کرد، کاسپین، دره شوری، ترکمن و تالشی بالاتر گزارش شده است که احتمالاً به دلیل ساختار ژنتیکی متفاوت این نژادها و تنوع ژنتیکی پائین‌تر در اسب‌های عرب ایران باشد (Seyedsharifi *et al.,* 2019; Abdoli *et al.,* 2021). میانگین تعداد آلل مؤثر در زیر جمعیت‌های اسب آخال-تکه که به تعداد ۵۴۵۷ نمونه از کشورهای مختلف جهان از جمله روسیه، کشورهای آسیای میانه، اروپا و آمریکا جمع-آوری شده بود، ۳/۷۹ برآورد شد (Ustyantseva *et al.,* 2019) که کمتر از اسب‌های عرب ایران در تحقیق حاضر است. میانگین شاخص شانون در جمعیت اسب عرب ایران در این تحقیق، برابر ۱/۵۸ به‌دست آمد. در تحقیقات گذشته، میانگین شاخص شانون در اسب‌های عرب ایران اندکی پائین‌تر گزارش شده است که احتمالاً به دلیل تعداد پائین نمونه در این مطالعات در مقایسه با تحقیق حاضر است (Abdoli *et al.,* 2021; Badbarin *et al.,* 2022). بیشترین و کمترین شاخص شانون به ترتیب مربوط به نشانگرهای AHT04 (۱/۸۰) و ASB23 (۱/۴۰) بود. هر چقدر شاخص شانون به صفر نزدیک‌تر شود، تنوع کمتر و هر چه یک جایگاه ژنی، شاخص شانون بیشتری نشان دهد، تنوع بالاتری وجود دارد (Hedrick, 2000). در مطالعه حاضر بر اساس شاخص شانون، نشانگر AHT04 بیشترین تنوع را نشان داد. در واقع استفاده از نشانگر AHT04 برای بررسی تنوع موجود در جمعیت مورد بررسی تأثیرگذارتر خواهد بود (Moravcicova *et al.,* 2016). میانگین شاخص شانون در این بررسی از میانگین گزارش شده توسط Ala-Amjadi *et al.* (2017) در اسب کرد (۱/۶۸) کمتر بود. همچنین در تحقیقی که به وسیله Abdoli *et al.* (2021) انجام شد، شاخص شانون در نژادهای اسب ترکمن، کاسپین، کرد، دره شوری و عرب ایران به ترتیب ۱/۶۷، ۱/۸۲، ۱/۶۹، ۱/۶۲ و ۱/۵۱ گزارش شد که نشان می‌دهد اسب عرب ایران نسبت به سایر نژادهای اسب ایران دارای تنوع ژنتیکی پائین‌تری است.

بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این تحقیق به ترتیب مربوط به نشانگرهای AHT04 (۰/۷۸۸) و ASB02 (۰/۶۱۳) بود. در تحقیقی که به وسیله Badbarin *et al.* (2022) انجام شد، بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به نشانگر AHT04 (۰/۷۸۱) و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به نشانگرهای ASB23 (۰/۶۳۱) و ASB02 (۰/۶۳۶) برآورد شد که با نتایج تحقیق حاضر، مطابقت دارد. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده بر اساس ۱۲ نشانگر ریزماهواره در سه سویه اسب عرب سوریه متعلق به نشانگر AHT04 بود که با نتایج این تحقیق، همخوانی دارد (Almarzook *et al.,* 2022). نتایج مشابهی در مطالعه تنوع ژنتیکی اسب‌های عرب مصر به‌دست آمد (Sargious *et al.,* 2022). بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در این تحقیق مربوط به نشانگرهای VHL20 (۰/۸۰۳) و ASB02 (۰/۶۲۱) بود. میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در تحقیق انجام شده به وسیله Badbarin *et al.* (2022) در نشانگرهای AHT04 (۰/۷۸۴) و VHL20 (۰/۷۶۲) بیشترین مقدار و کمترین مقدار مربوط به نشانگر ASB02 (۰/۵۹۸) بود که با نتایج تحقیق حاضر در اسب-های عرب ایران مطابقت دارد.

بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در اسب‌های عرب مصر و سوریه به ترتیب مربوط به نشانگرهای AHT04 و ASB17 بود که با نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر مغایرت دارد. این مغایرت به دلیل ساختار ژنتیکی اسب‌های عرب در کشورهای مختلف قابل توجیه است (Almarzook *et al.,* 2022; Sargious *et al.,* 2022). میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب برابر ۰/۷۲۱ و ۰/۷۳۶ بود. این مقادیر $H_O$ و He بالاتر از مقادیر برآورد شده در تحقیقات گذشته روی اسب عرب ایران است که می‌تواند به دلیل تعداد نمونه بیشتر در تحقیق حاضر باشد (Jabbari *et al.,* 2020; Badbarin *et al.,* 2022; Moshkelani *et al.,* 2011; Abdoli *et al.,* 2021;

جدول ۴- تعداد آلل مشاهده شده در هر جایگاه (Na)، تعداد آلل موثر (Ne)، شاخص شانون (I)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب (uHe) و شاخص تثبیت( $F_{IS}$) در ۱۰ جایگاه ریزماهواره اسب عرب ایران

Table 4. Number of alleles observed in each locus (Na), number of effective alleles (Ne), Shannon index (I), observed heterozygosity (Ho) and expected (He), Unbiased expected heterozygosity (UHe) and Fixation index ($F_{IS}$) in 10 microsatellite loci of Iranian Arab horses

| Marker | No. | Na | Ne | I | Ho | He | UHe | $F_{IS}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AHT4 | 8666 | 12 | 5.02 | 1.80 | 0.788 | 0.801 | 0.801 | 0.016 |
| AHT5 | 8659 | 9 | 3.55 | 1.50 | 0.706 | 0.718 | 0.718 | 0.018 |
| ASB17 | 8305 | 17 | 4.39 | 1.72 | 0.760 | 0.772 | 0.772 | 0.016 |
| ASB2 | 8628 | 13 | 2.63 | 1.41 | 0.613 | 0.621 | 0.621 | 0.013 |
| ASB23 | 8348 | 13 | 2.80 | 1.40 | 0.620 | 0.644 | 0.644 | 0.037 |
| HMS3 | 8649 | 10 | 3.72 | 1.48 | 0.712 | 0.731 | 0.731 | 0.027 |
| HMS6 | 8657 | 8 | 4.49 | 1.59 | 0.749 | 0.777 | 0.777 | 0.036 |
| HMS7 | 8649 | 8 | 3.69 | 1.51 | 0.722 | 0.729 | 0.729 | 0.010 |
| HTG10 | 8638 | 12 | 4.35 | 1.66 | 0.753 | 0.770 | 0.770 | 0.023 |
| VHL20 | 8655 | 11 | 5.07 | 1.75 | 0.787 | 0.803 | 0.803 | 0.020 |
| Mean | 8585.4 | 11.3 | 3.97 | 1.58 | 0.721 | 0.736 | 0.736 | 0.021 |

مقایسه میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در اسب‌های عرب ایران در این تحقیق با سایر اسب‌های عرب دنیا در تحقیقات انجام شده نشان داد که این مقادیر در اسب‌های عرب ایران بالاتر است که احتمالاً به دلایلی همچون تعداد نمونه خیلی بیشتر، شناسایی آلل‌های جدید، وجود نه سویه مادری اسب عرب در ایران ( برخی از این سویه‌ها مختص ایران هستند) و نیز واردات زیاد اسب عرب از سایر نقاط جهان و تلاقی با اسب‌های عرب ایران باشد (Khanshour *et al.,* 2013; Benahamad *et al.,* 2020; Machmoum *et al.,* 2020; Almarzook *et al.,* 2022; Sargious *et al.,* 2022). از طرفی مقایسه مقادیر $H_O$ و He در اسب‌های عرب ایران با سایر نژادهای اسب ایران نشان می‌دهد که این مقادیر در اسب‌های عرب ایران پائین‌تر است (Ala-Amjadi *et al.,* 2017; Abdoli *et al.,* 2021). همچنین مقایسه مقادیر $H_O$ و He در اسب‌های کره، چین، بوتان و مکزیک با اسب‌های عرب در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که این مقادیر در اسب‌های عرب ایران پائین‌تر است که احتمالاً به دلیل آمیزش‌های کنترل نشده، همخونی پایین و عدم وجود برنامه انتخاب در اسب‌های کشورهای مذکور باشد ( Ling *et al.,* 2011; Seo *et al.,* 2016; Vazquez-Armijo *et al.,* 2017; Dorji *et al.,* 2018). میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در این مطالعه بیشتر از هتروزیگوسیتی مشاهده شده برآورد شد که نشان‌دهنده غیرتصادفی بودن آمیزش‌ها در اسب‌های عرب ایران است (Khanshour *et al.*, 2013). بر اساس یافته‌های Ott (1992)، زمانی که تنوع ژنی یا هتروزیگوسیتی مورد انتظار نااریب ( UHe) در هر جایگاه ریزماهواره بیشتر از ۰/۷ یا برابر آن باشد، آن جایگاه به عنوان یک جایگاه بسیار چندشکل در نظر گرفته می‌شود. در مطالعه حاضر به استثنای نشانگرهای ASB02 و ASB23، بقیه نشانگرها تنوع ژنی بالای ۰/۷ نشان دادند.

میانگین آماره $F_{IS}$ که نشان‌دهنده میزان همخونی در جمعیت موردنظر است، در تمام نشانگرهای مورد مطالعه برابر با ۰/۰۲۱ بود. میانگین شاخص تثبت رایت در اسب-های عرب ایرانی در مطالعه انجام شده به وسیله Khanshour *et al.* (2013) برابر ۰/۰۱۷ برآورد شد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در تحقیق انجام شده به وسیله این محققین، مقدار $F_{IS}$ در اسب‌های عرب سوریه و عربستان سعودی به ترتیب ۰/۰۰۸ و ۰/۰۰۷- برآورد شد. در تحقیقی دیگر، مقدار $F_{IS}$ در اسب‌های عرب فرانسه، مثبت و برابر با ۰/۰۸ برآورد شد که بالاتر از اسب‌های عرب ایران در تحقیق حاضر بود (Leroy *et al.,* 2009). همچنین در تحقیقات جدیدتر انجام شده روی اسب‌های مصر، سوریه، الجزایر و لهستان، مقدار $F_{IS}$ به ترتیب برابر ۰/۰۲۸، ۰/۰۵۳، ۰/۰۴۸ و ۰/۱۱ به‌دست آمد که بالاتر از مقدار $F_{IS}$ در اسب‌های عرب ایران در تحقیق حاضر بود (Benahamad *et al.,* 2020; Machmoum *et al.,* 2020; Almarzook *et al.,* 2022; Sargious *et al.,* 2022). مقدار $F_{IS}$ مثبت در تحقیق حاضر و سایر مطالعات انجام شده روی

اسب‌های عرب، نشان‌دهنده کاهش هتروزیگوسیتی در جمعیت مورد مطالعه است که سبب افزایش هموزیگوسیتی و در نتیجه، وجود همخونی در جمعیت‌های اسب عرب می‌شود. در تحقیق دیگری که به وسیله Sadeghi *et al.* (2019) انجام شد، ارزیابی تنوع ژنتیکی اسب عرب ایران با استفاده از اطلاعات ژنومی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آن تحقیق نشان داد که با وجود بالا بودن میزان تنوع ژنتیکی بر اساس هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و همچنین پایین بودن میانگین ضریب همخونی ناشی از رشته‌های هموزیگوت ژنومی، به دلیل کاهش محسوس اندازه مؤثر جمعیت در شش نسل قبلی، خطر کاهش تنوع ژنتیکی و افزایش همخونی در اسب‌های عرب ایران وجود دارد. از دلایل مثبت بودن مقدار $F_{IS}$ و افزایش هموزیگوسیتی در اسب‌های عرب ایران می‌توان به وجود برنامه انتخاب به وسیله پرورش‌دهندگان اسب عرب از گذشته‌های دور و تاکید بر وجود تعدادی صفات، استفاده زیاد از نریان خاص در آمیزش‌ها، تمرکز زیاد بر خطوط خونی خاص و همچنین اندازه نسبتاً کوچک جمعیت اسب عرب در ایران اشاره نمود که باعث افزایش خویشاوندی و همخونی در این نژاد شده است (Sadeghi *et al.,* 2019). در تحقیقات انجام شده در سایر نژادهای اسب ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، مقادیر منفی $F_{IS}$ در اسب‌های ترکمن و کرد گزارش شده است که نشان‌دهنده پایین بودن آمیزش‌های خویشاوندی در این جمعیت‌ها است (Ala-Amjadi *et al.,* 2017; Abdoli *et al.,* 2021). در این تحقیق، تعادل هاردی-وینبرگ با استفاده از آزمون مربع کای سنجیده شد. تمامی جایگاه‌های مورد مطالعه، انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی-وینبرگ نشان دادند. به‌جز نشانگر AHT04 که در سطح آماری یک درصد از تعادل هاردی-وینبرگ انحراف داشت، بقیه نشانگرها در سطح آماری یک هزارم از تعادل خارج بودند. انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در جایگاه‌ها می‌تواند نشان‌دهنده حضور برخی از عوامل برهم زننده تعادل از جمله مهاجرت و انتخاب باشد که در اسب‌های عرب ایران، ورود نریان از خارج گله، ایجاد جریان ژنی در بین سویه‌های مادری مختلف و نیز وجود برنامه انتخاب در بین پرورش دهندگان از عوامل اصلی انحراف از تعادل هاری- وینبرگ هستند (Sadeghi *et al.,* 2019). نتایج حاصل از آزمون تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از داده‌های ژنومی و ریزماهواره در تحقیقات گذشته، نشان داد که تمایز مشخصی در سویه‌های مختلف اسب عرب ایران وجود ندارد و جریان ژنی بالایی در اسب‌های عرب ایران وجود دارد که می‌تواند توجیه‌کننده تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا و انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در جایگاه‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر باشد (Sadeghi *et al.,* 2019; Badbarin *et al.,* 2022).

## نتیجه‌گیری کلی

بررسی ساختار ژنتیکی اسب عرب ایران با استفاده از جایگاه‌های ریزماهواره در این تحقیق و مقایسه آن با سایر اسب‌های عرب دنیا از جمله اسب‌های عرب منطقه خاورمیانه، نشان داد که اسب‌های عرب ایران از تنوع ژنتیکی بالاتری برخوردار هستند که احتمالاً به دلیل وجود سویه‌های مادری مختلف اسب عرب در ایران، جریان ژنی بالا در بین سویه‌های مختلف، واردات زیاد اسب عرب و تلاقی با اسب‌های عرب ایران و نیز تعداد نمونه بالا و شناسایی آلل های جدید در تحقیق حاضر باشد. از طرفی، اگرچه میزان همخونی بر اساس معیار $F_{IS}$ در اسب‌های عرب ایران خیلی بالا نبود، اما مقدار $F_{IS}$ مثبت در این تحقیق نشان می‌دهد که خطر کاهش تنوع ژنتیکی و افزایش همخونی در اسب‌های عرب ایران وجود دارد. بنابراین باید مدیریت تنوع ژنتیکی و جلوگیری از آمیزش حیوانات خویشاوند مدنظر قرار گیرد.

## فهرست منابع

Abdoli, M., Zandi, M. B., Harkinezhad, M. T., & Khalili, M. (2021). Genetic structure survey of Iranian native horse breeds by microsatellite markers. *Journal of Animal Production*, *23*(2), 155-163. [In Persian]

Ala-Amjadi, M., Mehrabani Yeganeh, H., & Sadeghi, M. (2017). Study of genetic variation in Iranian Kurdish horse using microsatellite markers. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *11*(4), 481-487. [In Persian]

Almarzook, S., Abdel-Shafy, H., Ahmed, A. S., Reissmann, M., & Brockmann, G. A. (2022). Genetic diversity of Arabian horses using microsatellite markers. *Egyptian Journal of Animal Production*, *59*(1),19-27.

Badbarin, S., Seyedsharifi, R., & Falahi, H. (2022). Investigation the genetic diversity of Arabian horses and their different strains using SSR markers. *Research on Animal Production*, *13*(37), 158-165. [In Persian]

Benhamadi, M. E. A., Naima Berber, N., Benyarou, M., Ameur, A. A., Haddam, H. Y., Piro, M., & Gaouar, S. B. S. (2020). Molecular characterization of eight horse breeds in Algeria using microsatellite markers. *Biodiversitas*, *21*(9), 4107-4115.

Binn, M. M., Uolmes, N. G., Holliman, A., & Scott, A. M. (1995). The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in Troroughbred parentage testing. *British Veterinary Journal*, *151*, 9-15.

Breen, M., Lindgren, G., Binns, M. M., Norman, J., & Irvin, Z. (1997). Genetical and physical assignments of equine microsatellite first integration of anchored markers on horse genome mapping. *Mammalian Genome*, *8*, 267-273.

Dorji, J., Tamang, S., Tshewang, T., Dorji, T., & Dorji, T. Y. (2018). Genetic diversity and population structure of three traditional horse breeds of Bhutan based on 29 DNA microsatellite markers. *PLoS ONE*, *13*(6), e0199376.

FAO. (2021). Commission on genetic resources for food and agriculture. CGRFA/WG-AnGR-11/21/Inf.6.

Guerin, G., Bertaud, M., & Amigues, Y. (1994). Cgaracterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. *Animal Genetics*, *25*, 62.

Hedayat-Evrigh, N., Azadmard, E., SeyedSharifi, R., Nikbin, S., Shakouri, M. D., & Khalkhali-Evrigh, R. (2019). Investigation of genetic diversity of Iran northwest horses using microsatellite markers. *Agricultural Biotechnology Journal*, *11*(4), 35-50. [In Persian]

Hedrick, P. W. (2000). Genetic of populations. Second edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, USA. 553 p.

Irvin, Z., Giffard, J., Brandon, R., Breen, M., & Bell, K. (1998). Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci 21, 23, 25 and 37-43. *Animal Genetics*, *29*(1), 67.

Jabbari, S., Mashayekhi, M. R., Hasanpour, A., & Shirmohammadly, B. (2020). Evaluation of the genetic diversity of Iranian Arabian horses. *Iranian Journal of Animal Sceince Research*, *11*(4), 481-487. [In Persian]

Javanrouh, A., & Khodamoradi, S. (2022). Study of the genetic structure of the Shin Bash sheep population by molecular markers. *Animal Production Research*, *11*(3), 27-40. [In Persian]

Jemmali, B., Haddad, M. M., & Barhoumi, N. (2017). Genetic diversity in Tunisian horse breeds. *Archives Animal Breeding*, *60*, 153-160.

Khalili, M. (2009). Horses and my expertise. (ed. by M. Khalili), Nashr-e Zare Publication, Iran. 694 p. [In Persian]

Khalili, M. (2015). Asil stud book of the Islamic Republic of Iran, Volume III, Published by Equestrian Federation, Tehran, Iran. [In Persian]

Khanshour, A., Conant, E., & Juras, R. (2013). Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Arabian horse populations. *Journal of Heredity*, *104*, 386-398.

Khanshour, A., Juras, R., Blackburn, R., & Cothran, E. G. (2014). The Legend of the Canadian Horse: Genetic Diversity and Breed Origin. *Journal of Heredity*, *106*(1), 37-44.

Leroy, L., Callède, L., Verrier, E., Mériaux, J. C., Ricard, R., Danchin-Burge, C., & Rognon, X. (2009). Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by microsatellite polymorphism. *Genetics Selection Evolution*, *41*, 1-12.

Ling, Y. H., Ma, Y. H., Guan, W- J., Cheng, Y. J., Wang, Y. P., Han, J. L., Mang, L., Zhao, Q. J., He, X. H., Pu, Y. B., & Fu, B. L. (2011). Evaluation of the genetic diversity and population structure of Chinese indigenous horse breeds using 27 microsatellite markers. *Animal Genetics*, *42*(1), 56-65.

Machmoum, M., Boujenane, I., Azelhak, R., Badaoui, B., Petit, D., & Piro, M. (2020). Genetic diversity and population structure of Arabian horse populations using Microsatellite markers. *Journal of Equine Veterinary Science*, *93*, 103200.

Mahrous, K. F., Hassanane, M., Abdel Mordy, M., Shafey, H. I., & Hassan, N. (2011). Genetic variations in horse using microsatellite markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *9*, 103-109.

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

Moravcikova, N., Kasarda, R., Kukuckova, V., Vostry, L., & Kadleclk, O. (2016). Genetic diversity of old Kladruber and Nonius horse populations through microsatellite variation analysis. *Acta Agriculturae Slovenica*, *5*, 46.

Moshkelani, S., Rabiee, S., & Javaheri-Koupaei, M. (2011). DNA fingerprinting of Iranian Arab horse using fourteen microsatellites marker. *Research Journal of Biological Sciences*, *6*, 402-405.

Mostafavi, A., Asadi Fozi, M., Esmailizadeh Koshkooieh, A., Mohammadabadi, M. R., Ivanivna Babenko, O., & Ihorivna Klopenko, N. (2019). Effect of LCORL gene polymorphism on body size traits in horse populations. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, *42*, e47483.

Ott, J. (1992). Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *American Journal of Human Genetics*, *51*, 283-290.

Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, *28*, 2537-2539.

Sadeghi, R., Moradi-Shahrbabak, M., MiraeiAshtiani, S. R., Schlamp, F., Cosgrove, E. J., & Antczak, D. F. (2019). Genetic diversity of Persian Arabian horses and their relationship to other native Iranian horse breeds. *Journal of Heredity*, *110*(2), 173-182.

Sargious, M. A., Ahmed, H. A., El-Shawarby, R. M., Bakery, H. H., Ramadan, S., Cothran, E. G., & Farid, A. S. (2022). Genetic diversity and population assignment of Arabian Horses. *Pakistan Journal of Zoology*, *54*, 825-833.

Seo, J. H., Park, K. D., Lee, H. K., & Kong, H. S. (2016). Genetic diversity of Halla horses using microsatellite markers. *Journal of Animal Science and Technology*, *58*, 40.

Seyedsharifi, R., Badbarin, S., Hedayat-Evrigh, N., Savarsofla, S., Seifdavati, J., & Khamisabadi, H. (2019). Investigation of the genetic structure and phylogenic relationships of Caspian, Arabic and Taleshi horses. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *11*(2), 223-232. [In Persian]

Shamsalddini, S., Mohammadabadi, M. R., & Esmailizadeh, A. K. (2016). Polymorphism of the prolactingene and its effect on fiber traits in goat. *Russian Journal of Genetics*, *52*, 405-408.

Rousset, F. (2008). genepop'007: A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, *8*(1), 103-106.

Van Haeringen, H., Bowling, A. T., Stott, M. L., Lenstra, J. A., & Zwaagstra, K. A. (1994). A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. *Animal Genetics*, *25*(3), 207.

Van Lent, R., & Upton, P. (1999). Arabians (ed. H. Amirsadeghi). Chronicle Books.

Vázquez-Armijo, J., Parra-Bracamonte, M., Velazquez, M., Sifuentes Rincon, A., Tinoco-Jaramillo, J., Ambriz-Morales, P., Arellano-Vera, W., & Moreno-Medina, V. (2017). Diversity and effective population size of four horse breeds from microsatellite DNA markers in south-central Mexico. *Archives Animal Breeding*, *60*, 137-143.