

## بررسی چندشکلی ژن آگوتی در جمعیت اسب اصیل عرب خوزستان

انتظار غزی<sup>۱\*</sup>، هدایت اله روشنفکر<sup>۲</sup> و خلیل میرزاده<sup>۳</sup>

شماره صفحات

۹۱-۹۸

(۱) کارشناس ارشد امور دام جهاد کشاورزی استان خوزستان، اهواز، ایران.

(۲) استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

(۳) دانشیار گروه علوم دامی - دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی - دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

\*ایمیل نویسنده مسئول: Entezarghezzi68@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰

### چکیده

ارتباط بین رنگ اسب و برتری نژاد و خلوص نژادی، مطالعه چندشکلی ژن آگوتی را مورد توجه خاصی قرار داده است. ژن آگوتی (ASIP) نشانگر نحوه ی توزیع سیاهی در بدن است. هدف از این تحقیق، بررسی چند شکلی اگزون ۲ ژن آگوتی در جمعیت اسب اصیل عرب استان خوزستان می باشد. در این مطالعه خونگیری ۴۵ رأس اسب اصیل عرب برای تشخیص آلل های متفاوت ژن آگوتی استفاده شد که از شهرستان های شوش، دزفول، اهواز صورت گرفت. DNA از خون کامل به کمک روش استخراج نمکی انجام گرفت. واکنش زنجیره ای پلی مرآز جهت تکثیر قطعه ۱۰۱ جفت بازی از اگزون ۲ ژن آگوتی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ژن انجام شد. حذف (۱۱ جفت باز در اگزون ۲ ژن ASIP (آگوتی سیگنالینگ پروتئین) مشاهده شد. که دلیل آن In/del (حذف و جهش) بودن ژن آگوتی است. در نهایت سه الگوی بانندی AA، Aa، aa با فراوانی ۰/۴۱۴ و ۰/۴۵۷ و ۰/۱۲۷ مشاهده شد. فراوانی آللی A و a به ترتیب ۰/۶۴۴ و ۰/۳۵۶ است. نتایج نشان داد که این قطعه از ژن آگوتی چند شکل بوده و ژنوتیپ های AA، Aa، aa در جمعیت اثبات گردید. نتایج حاصل نشان داد که تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه اسب های اصیل عرب وجود ندارد.

کلمات کلیدی: چندشکلی، آگوتی و اسب.

## مقدمه

در دنیا بیش از دویست نژاد اسب وجود دارد. حدود چهل سال پیش جمعیت جهانی اسب ۹۵ میلیون رأس بوده ولی در حال حاضر شصت و پنج میلیون رأس می‌باشد که از این تعداد حدود صد و چهل هزار رأس متعلق به ایران است. حدود نیمی از اسب‌های دنیا در اروپا و بقیه از نظر تعداد به ترتیب در آمریکا، آسیا، استرالیا و آفریقا هستند (Nasiriyani, 2009). اسب عرب به عنوان زیباترین اسب جهان نام گرفته است (Ebrahimipur, 2005). که امروزه به طور طبیعی به عنوان اسب سوارکاری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Costantino, 2003). رنگدانه عمده در بدن حیوانات ملانین است که به دو حالت فائوملانین (رنگدانه قرمز) و ائوملانین (رنگدانه سیاه یا قهوه‌ای) وجود دارد. علاوه بر جذب و عبور نور، سایر پدیده‌های نوری همانند انعکاس، انکسار و تجزیه نور نیز در ظهور رنگ پوست مؤثر می‌باشد. تغییراتی که در رنگ پوشش بدن اتفاق می‌افتند، با سن، فصل، سال یا سایر عوامل تصادفی دیگر مرتبط است (Sharghi & Norouzian, 2008). ژن‌هایی که رنگ پوشش را کنترل می‌کنند میزان و توزیع رنگدانه‌های ملانین در پوست و مو را تعیین می‌کنند. در بسیاری از گونه‌های پستاندار، این ژن‌ها اغلب اثرات پلی‌تروپیک بر فنوتیپ‌های رفتاری دارند. ژن‌های کنترل‌کننده رنگ بدن پرشمار بوده و اثر متقابل این ژن‌ها رنگ نهایی را به وجود می‌آورد. به طور کلی در پستانداران، رنگ پوشش توسط ۱۲۷ لوکوس و ۸۰۰ آلل متفاوت کنترل می‌شود (and Lamoreux, 2003). Bennett). ولی دو ژن آگوتی و گسترش، نقش اصلی را در تعیین، تنظیم و کنترل رنگ پوشش بر عهده دارند (Bennett, 1968). به طور معمول جایگاه گیرنده ملانوکورتین بر جایگاه آگوتی غالب است و در یک حیوان ژن آگوتی هنگامی بروز می‌کند که ژن گیرنده ملانوکورتین در حالت مغلوب خود باشد. تنوع در صفت رنگ پوشش ناشی از حضور، توزیع و فعالیت‌های بیوشیمیایی ملانوسیت‌ها در ساخت (سنتز) دو نوع متفاوت ملانین (یومالین و فیمالین) است (Fontanesi *et al.*, 2009) که هر دو ژن آگوتی و گسترش در این فرآیند دخیل هستند. ۲ ژن که در درجه اول مسئول تعیین رنگ پایه پوشش در اسب هستند شامل گیرنده‌ی یک ملانوکورتین (MC1R) و آنتاگونیست آن، پروتئین کد کننده آگوتی (ASIP) می‌باشند (Rieder *et al.*, 2001; Baileyand Brooks, 2013).

در یک جهش از دست دادن عملکرد در ASIP،  $\alpha$ -MSH به گیرنده‌های ملانوکورتین پیوند می‌دهد که باعث آزاد شدن گلوکوکورتیکوئید ناشی از استرس می‌شود و پاسخ استرس را کاهش می‌دهد (Harris *et al.*, 2001). هنگامی که  $\alpha$ -MSH متصل می‌شود، نقش مهمی در مسیرهای دوپامین، افزایش تغذیه و رفتارهای تغذیه ایفا می‌کند، در حالی که پروتئین محصول ASIP متصل می‌شود برخلاف آن عمل می‌کند (Roseberry *et al.*, 2015). در میان انواع مختلف، افراد مبتلا به از دست دادن عملکرد ASIP آرام تر هستند و نسبت به ترس واکنش کمتری نشان می‌دهند (Baileyand Brooks, 2013). در رنگ اسب سه ژن (آگوتی، اکستنشن و نیله) دخیل می‌باشند. ژن آگوتی (ASIP) نشانگر نحوه‌ی توزیع سیاهی در بدن است (Saryazdi,

(2010). علاوه بر این، اخیراً توصیف یک واکنش ترس خاص، مرتبط با پوشش نقره‌ای در اسب‌های ایسلندی توصیف شده است (Brunberg *et al.*, 2013).

مطالعات بسیاری چندشکلی در حیوانات بومی ایران را گزارش نموده‌اند (Chenani *et al.*, 2021; Yavari *et al.*, 2021; ASIP (Chaab *et al.*, 2022; Nazari *et al.*, 2020; Hezarsi *et al.*, 2020). همچنین، محققین قبلاً پلی مورفیسمی در ژن ASIP را گزارش کرده‌اند (Rieder *et al.*, 2001) که در نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که حذف ۱۱ جفت باز در اگزون ۲ از ژن ASIP موجب نمایان شدن آلل مغلوب (a) در اسب‌ها می‌شود. آلل A باعث از دست رفتن عملکرد پروتئین می‌شود، فرآیند سیگنال‌دهی مسدود نمی‌شود و در نتیجه ایمبولانین در کل بدن شکل می‌گیرد (Sild *et al.*, 2012). در یک پژوهش بررسی ارتباط سه ژن MATP (پروتئین مرتبط با حمل و نقل غشا)، PCR-RFLP چند گانه برای ژن MC1R و ژن ASIP، با رنگ در اسب مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت ارتباط بین این سه ژن با فنوتیپ بررسی شد که نشان از ارتباط بین فنوتیپ و ژنوتیپ بود (Horecka & Konol, 2013). اما چندشکلی ژن آگوتی در اسب اصیل عرب مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا هدف از این تحقیق بررسی چندشکلی ژن آگوتی در اسب‌های اصیل عرب خوزستان جهت بررسی ارتباط بین ژنوتیپ و رنگ پوشش بدن است.

### مواد و روش‌ها

خونگیری به صورت کاملاً تصادفی از ۴۵ رأس اسب اصیل عرب استان خوزستان، واقع در اصطبل‌های شهر اهواز، شهرستان‌های دزفول و شوش صورت گرفت. نمونه‌های خون از سیاهرگ و داج به میزان ۵ سی‌سی با استفاده از لوله‌های خلاء دار حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه شد و در داخل یخ به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل گردید و تا زمان استخراج دی. ان. ای در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های خون روی یخ به آزمایشگاه مرکزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل شده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج دی. ان. ای از نمونه خون کامل با استفاده از روش بهینه شده و تغییر یافته نمکی (Miller *et al.*, 1988) انجام گرفت. میزان و کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ و ژل آگارز ارزیابی شد. تکثیر قطعه دارای ۱۰۱ جفت بازی اگزون ۲ ژن آگوتی با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی (Rieder *et al.*, 2001) طی واکنش PCR و دستگاه ترموسیکلر انجام شد (جدول ۱).

#### جدول ۱. مشخصات پرایمر مورد استفاده برای این مطالعه

**Table 1. Primer specifications used for this study**

ژن	توالی آغازگر طول قطعه تکثیر شده	طول قطعه
آگوتی	F: 5'-CTTTTGTCTCTTTGAAGCATTG-3' R: 5'-GAGAAGTCCAACGCCTACCTACCTTG-3'	۱۰۱

آغازگرها طبق دستورالعمل شرکت سازنده با آب دو بار تقطیر رقیق شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل دو میکرولیتر (حدود ۱۵۰ نانوگرم) DNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، یک میکرولیتر  $MgCl_2$ ، یک میکرولیتر از پرایمر رفت (۰/۲۵ میکرومول)، یک میکرولیتر از پرایمر برگشت (۰/۲۵ میکرومول)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک‌پلیمرز (یک واحد) و ۱۶/۸ میکرولیتر آب استریل یا دو بار تقطیر به ازای هر نمونه انجام شد. به منظور واکنش PCR از دستگاه ترموسایکلر (مدل Bio rad) استفاده شد و چرخه حرارتی مطابق جدول ۲ بود.

برای آشکار کردن الگوهای باندهای حاصل از تکثیر PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۲/۵ درصد استفاده شد. پس از تکثیر، برای مشاهده حذف و جهش در ژن آگوتی محصول PCR توسط ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. انواع ژنوتیپ بر اساس مشاهده تعداد و اندازه باندها با استفاده از دستگاه عکسبرداری ژل داک تعیین شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار آنالیز اطلاعات ژنتیک جمعیت (GenAlex 6.3) فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی محاسبه شد. برای اطمینان از صحیح بودن قطعه تکثیر شده و از نشانگر M100 استفاده شد.

جدول ۲. چرخه حرارتی PCR (برای تکثیر قطعه ۱۰۱ جفت بازی ژن آگوتی)

Table 2. PCR thermal cycle (for the amplification of the 101 bp fragment of the agouti gene)

مرحله	واسرشت	اتصال	تکثیر	تعداد سیکل
اول	۹۴ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه			۱
دوم	۹۴ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه	۵۶ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتیگراد ۴۵ ثانیه	۳۴
سوم			۷۲ درجه سانتیگراد ۱۰ دقیقه	۱

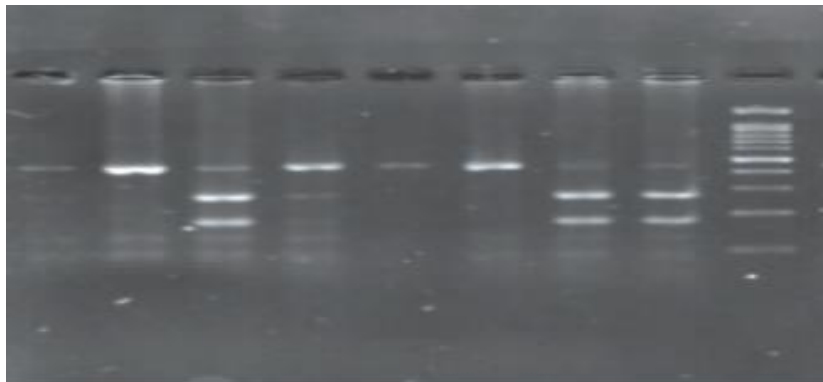
## نتایج و بحث

استخراج دی. ان. ای به روش Boom *et al* (1989) که مبتنی بر استفاده از گوانیدین تیوسیانات و سیلیکا ژل است صورت گرفت. نتایج تعیین مقدار و کیفیت DNA نشان داد که DNA استخراج شده برای ادامه پژوهش مناسب می باشد (شکل ۱). برای مشخص شدن ژنوتیپ ها محصول پی سی آر به کمک ژل آگاروز ۲ درصد تفکیک شدند، جهت تأیید اندازه قطعه حاصله از سایز مارکر ۱۰۰ استفاده شد. (شکل ۲).



شکل ۱. تعیین کیفیت DNA با بارگذاری بر روی ژل آگارز ۲٪

**Figure 1. Determination of DNA quality by loading on 2% agarose gel.**



شکل ۲. محصولات پی سی آر تفکیک شده بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد

**Figure 2. PCR products separated on 2.5% agarose gel.**

چند شکلی ژن آگوتی بدین صورت است که، طول قطعه ژن آگوتی ۱۰۱ جفت باز است ( آلل AA) اگر ۱۱ جفت باز از آن حذف گردد به ۹۱ جفت باز می‌رسد (aa) اگر اسبی که دارای هر دو قطعه باشد به صورت هتروزیگوت (Aa) می باشد ( Rider *et al.*, 2001).

الگوی الکتروفورزی حاصل از تک رشته ایی کردن محصولات پی سی آر قطعه ۱۰۱ جفت بازی ژن آگوتی در اسب های اصیل عرب استان خوزستان سه الگوی ژنوتیپی شامل AA، Aa و aa را ایجاد کرد. اسب های با الگوی ژنوتیپی AA یک باند با طول ۱۰۱ جفت باز، اسب های دارای الگوی ژنوتیپی aa نیز دارای یک باند شامل ۹۱ جفت باز و اسب های دارای الگوی ژنوتیپی Aa، شامل دو باند ۱۰۱ و ۹۱ جفت باز بر روی ژل آگارز نمایان ساختند.

در این تحقیق، ۳ ژنوتیپ و ۲ آلل شناسایی شدند. فراوانی ژنوتیپ های AA، Aa و aa به ترتیب ۰/۴۱۴، ۰/۴۵۷ و ۰/۱۲۷ درصد و فراوانی آلل های A و a به ترتیب ۰/۳۵۶ و ۰/۶۴۴ محاسبه شد (جدول ۳). ژنوتیپ Aa با ۰/۴۵۷ و آلل A با ۰/۶۴۴ دارای بیشترین فراوانی بودند.

## جدول ۳. فراوانی ژنوتیپی و آلی ژن آگوتی

Table 3. Genotypic and allelic frequencies of the agouti gene

فراوانی	ژنوتیپ و آلل	
۰/۴۱۴	Aa	فراوانی ژنوتیپی
۰/۴۵۷	Aa	
۰/۱۲۷	aa	
۰/۶۴۴	A	فراوانی آلی
۰/۳۵۶	a	

براساس نتایج بدست آمده در این تحقیق، فراوانی آلل AA تفاوت چندانی با فراوانی آلل Aa ندارد، اما با فراوانی آلل aa تفاوت زیادی دارد.

تنوع ژنتیکی در یک جمعیت را می‌توان با معیارهایی نظیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار و هتروزیگوسیتی مشاهده شد تعیین کرد. در این تحقیق متوسط هتروزیگوسیتی ۴۵ درصد است که نشانه تنوع نسبتاً زیاد در ژن آگوتی اسب عربی است (جدول ۴).

## جدول ۴. هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار جایگاه ژنی

Table 4. Observed heterozygosity and expected heterozygosity of gene locus

جایگاه ژنی	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار
ژن آگوتی	۰/۴۴۴	۰/۴۵۸

یکی دیگر از معیارهای تنوع و چندشکلی تعداد آلل مؤثر می‌باشد که در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار GenALEX محاسبه شد. در جایگاه ژنی آگوتی ۲ نوع آلل واقعی (A و a) شناسایی شد. نتایج حاصل نشان داد که اندازه آلل مؤثر (۱/۸۴۶) می‌باشد. شاید نزدیکی فراوانی آلل مؤثر و آلل واقعی به یکدیگر نشانه کارایی خوب آلل‌ها در ایجاد چندشکلی باشد.

در جایگاهی که تفاوت بین این دو مقدار (آلل واقعی و آلل مؤثر) زیاد باشد، دلیل بر وجود فراوانی آلل با پراکندگی بالا در آن جایگاه‌ها است. جایگاه‌هایی که فراوانی آلی در آن‌ها تقریباً برای تمام آلل‌ها مشابه باشد، تعداد آلل مؤثر بیشتری را نشان خواهد داد. تعداد آلل مؤثر تنها زمانی با تعداد آلل واقعی برابر خواهد بود که همه آلل‌ها فراوانی مشابهی داشته باشند، ولی در بیشتر مواقع تعداد آلل مؤثر کمتر از تعداد آلل واقعی است. اکنون با توجه به نتایج مشاهده می‌شود که تفاوت بین دو آلل چندان زیاد نیست، به عبارتی تفاوت چندانی بین آلل واقعی و مؤثر مشاهده نشده است که بیان‌کننده این موضوع می‌باشد که اگرچه در جمعیت تنوع وجود

داشت اما این تنوع در سطح بالایی نبود. بیشترین تعداد آلل مؤثر (۲) وقتی بدست می‌آید که فراوانی هیچ آلی بیشتر از ۵۰٪ نباشد.

در یک تحقیق که به منظور بررسی ارتباطات بین صفات ژنتیکی برای رنگ پوشش و ویژگی‌های خلق و خو در اسب با روش PCP-RFLP، بر روی ۲۱۵ اسب سوارکاری امریکایی انجام شد، کهدو آلل رایج (E/e) در ژن (MC1R) و (A/a) در ژن ASIP

مشاهده شد که فاکتور اعتماد به نفس با ژنوتیپ های آگوتی در ارتباط بود. اسب سیاه و سفید با ژنوتیپ (AA) مستقل تر از اسب قرمز با ژنوتیپ (Aa) بود (Lauren *et al.*, 2016).

در یک پژوهش ژنوتیپ اسب های خونسرد چهار نژاد لهستان با فنوتیپ مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج آزمایشات مولکولی را در تعیین دقیق رنگ بدن اسب تأیید می کند. تفاوت در پلی مورفیسم چهار ژن مرتبط با رنگ بدن مشاهده شد این تفاوت ها به طور عمده برای ژن MC1R و ASIP مشاهده گردید. در نهایت گزارش گردید که گاهی ژنوتیپ با فنوتیپ هم خوانی ندارد و برای دست یافتن دقیق به آن باید آزمایش مولکولی صورت گیرد (Jacob *et al.*, 2016).

در یک تحقیق، ژنوتیپ ۱۳۰ اسب توسط PCP-RFLP برای ژن پروتئین مرتبط با حمل غشا (MATP) و PCR-RFLP چندگانه برای MC1R (گیرنده ملانوکورتین ۱) و ASIP) تعیین شد. در ادامه، برای تعیین ارتباط بین پلی مورفیسم در MATP و فنوتیپ، فراوانی آلل ها و ژنوتیپ ها در نژادهای مختلف با استفاده از برنامه SAS بررسی شد که از لحاظ آماری نشان از ارتباط بالایی فنوتیپ با ژنوتیپ بود (Horecka & Konol, 2013).

### نتیجه گیری

بر اساس نتایج این تحقیق اسب عرب دارای سه ژنوتیپ AA، Aa و aa بود. در تحقیقات مختلف بر روی اسب، ارتباط بین ژنوتیپ و رنگ پوشش بدن و همینطور ارتباط بین رفتار اسب (آرام بودن) با ژنوتیپ بررسی گردیده است. از آنجایی که اسب عرب نیز دارای سه ژنوتیپ می باشد می توان در جهت اصلاح نژاد این اسب اصیل برای رنگ پوشش بدن و نیز نوع رفتار آن برای پرورش دست به بهگزینی از طریق انتخاب ژنوتیپ مرتبط زد.

### سپاسگذاری

از مسئولین پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان بدلیل تامين بودجه این تحقیق تشکر می گردد.

### منابع

Abdel-Malek, Z.A., Scott M.C., Fumura M., Lamoreux M.L., Ollmann M., Barsh G.S and Hearing V.J. (2001). The melanocortin 1 receptor is the principal mediator of the effects of agouti signaling protein on mammalian melanocytes. *Journal of cell science*, 114: 1019-1024.

Bailey, E. and Brooks, S. A. (2013). Chapter 4: Black, Bay and Chestnut (Extension and Agouti). In: *Horse Genetics*, 2nd edn. Boston: CABI. p. 36-42.

Bennett, D. C. and Lamoreux, M. L. (2003). The Color Loci of Mice-A Genetic Century. *Pigment Cell Society*. 16: 333-344.

Brunberg, E., Gille, S., Mikko, S., Lindgren, G., Keeling L. J. (2013). Icelandic horses with the Silver coat color show altered behavior in a fear reaction test. *Applied Animal Behavior Science*. 146:72-78.

Chaab, S., Beigi Nassiri, M.T., Nazari, M. and Fayazi J. (2022). Determination of Myxovirus (Mx) resistant gene polymorphism in Khuzestan native chickens using PCR-RFLP technique. *Breeding and Improvement of Livestock*. 2 (3): 59-67.

**Chenani, H., Nazari, M., Nassiri, M.T., et al. (2021).** Exonic SNP in MHC-DMB2 is associated with gene expression and humoral immunity in Japanese quails. *Vet Immunol Immunopathology*. 239: e110302.

**Costantino, M. (2003).** The handbook of horse breeds. Webb, S. Menal Bridge, Wales. 15: 21-23.

**Ebrahimipour, M. (1384).** Horse. Publications of Isfahan University of Technology. Edition 1. P: 314

**Fontanesi, L., Tazzoli, M., Beretti, F. and Russo, V. (2006).** Mutations in the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Animal genetics*. 37(5): 489-493.

**Harris, R. B. S., Zhou, J., Shi, M., Redmann, Jr S Mynatt RL Ryan DH. (2001).** Overexpression of agouti protein and stress responsiveness in mice. *Physiol Behav*. 73:599–608.

**Hezarsi, S., Beigi Nassiri, M.T., Roshanfekar, H. and Nazari, M. (2020).** Investigation of Polymorphism in Exon II of MHC-DRB1 Gene Using PCR-RFLP Technique and Its Association with Growth Traits in Adani Goat. *Research on Animal Production*. 11 (29): 107-115.

**Horecka, E. and Knoll, A. (2013).** Polymorphism in ASIP, MC1R and MATP genes in relation to color in horses. *Mendelnet*. 726-731.

**Jakub, C., Grzegorz, C. and Mariusz, M. (2013).** Genotyping of coat color genes (MC1R, ASIP, PMEL17 and MATP) polymorphisms in cold-blooded horses bred in Poland reveals sporadic mistakes in phenotypic descriptions. *Animal Science Papers and Reports*. 31(2): 159-164.

**Lauren, N., Jacobs Elizabeth, A. Staiger Julia, D. Albright Samantha, and Brooks, A. (2016).** The MC1R and ASIP Coat Color Loci May Impact Behavior in the Horse *Journal of Heredity*. 107(3): 214–219.

**Nasiriyan, A. (2009).** Color atlas of horse breeds of Iran and the world. Serva Publications.

**Nazari, M., Salabi, F. and Radpoor, S. (2020).** Investigation of heat shock protein 70 gene polymorphism in Khuzestan native chickens. *Agricultural Biotechnology Journal*. 12 (1): 81-100.

**Rieder, s., Taourit, s., Mariat, D., Langlois, B., and Guering. (2001).** Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome*. 12: 450-455.

**Roseberry, A.G., Stuhrman, K. and Dunigan, A.I. (2015).** Regulation of mesocorticolimbic and mesostriatal dopamine systems by  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone and agouti-related protein. *Neurosci Biobehav Rev* . 56: 15–25.

**Sar Yazdi, S. (2011).** Publisher of Sarina Equestrian Club.

**Searle, A. G. (1968).** Comparative genetics of coat colour in mammals. *Mammalian Genome*. 19(1): 394-397.

**Shargi, Gh. and Nowruzian M. A. (2008).** Principles of horse breeding. Noorbakhsh Publications.

**Sild, E., Varv, S. and Viinalass, H. (2012).** The occurrence of silver dilution in horse coat colors. *Veterinarija ir Zootechnika*. 60 (82): 67-71, ISSN: 1392- 2130.

**Sponenberg, D. P. (2003).** Equine color Genetics. Blackwell Publishing, Iowa state university press, 215 p. ISBN O-8138- 0759 –X.

**Yavari, E., Fayazi, J., Nazari, M. and Mirzadeh K. (2021).** Study of polymorphism in exon 14 of Diacylglycerol O-Acyltransferase 1 (DGAT1) Gene in Dromedary Camel of Khuzestan. *Veterinary Research & Biological Products*. 34 (4): 25-31.