مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۲، شماره ۴، ۱۳۹۰ (۳۴۴-۳۳۷)

کاربرد نشانگرهای ریزماهواره برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی

آمنه محمدی‌فر[1] و محمدرضا محمدآبادی[2]*
۱، دستیار علمی دانشگاه پیام نور مروست، ۲، دانشیار دانشگاه شهید باهنر کرمان
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۵ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۵)

چکیده

گوسفند کرمانی یکی از نژادهای اصلی گوسفند در ایران، به ویژه در استان کرمان است که تاکنون از طریق نشانگرهای ریزماهواره ویژه کروموزوم Y مطالعه نشده است. در این پژوهش وضعیت تکثیر ۱۷ نشانگر ریزماهواره ویژه کروموزوم Y گاوی در گوسفند کرمانی مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد صد قوچ و ۲۰ میش غیرخویشاوند به طور تصادفی انتخاب و خون‌گیری انجام شد. استخراج DNA با استفاده از کیت Purification Kit DNA انجام شد. واکنش‌های PCR با تمام آغازگرها با موفقیت انجام شد. همه آغازگرها، یعنی UMN2303، UMN0929، UMN0907، UMN0108، BM861، INRA057، INRA189، INRA124، UMN0307، UMN2405، UMN0301، UMN2706، UMN3008، UMN0406، UMN0504، UMN2713 و UMN0803 چندشکل بودند. در مجموع ۱۰۲ آلل در این ۱۷ ریزماهواره شناسایی شد که بیشترین و کمترین باندهای مشاهده شده به ترتیب مربوط به جایگاه‌های INRA124 (۱۶ باند) و UMN2303 (۵ باند) بود. نتایج این پژوهش نشان داد که می‌توان از ریزماهواره‌های ویژه کروموزوم Y گاوی به منظور تعیین تنوع ژنتیکی در گوسفند استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: گوسفند کرمانی، کروموزوم Y، نشانگرهای ریزماهواره

مقدمه

امنیت غذایی از جمله مباحث جهانی است که به مفهوم دسترسی به غذای کافی برای همه مردم در تمام اوقات و به منظور زندگی سالم و فعال می‌باشد (Hamidi, 2006). بر اساس برآورد متخصصان علوم زیستی، در هر ساعت حدود ۸ گونه از جانداران از دست می روند و به این ترتیب، ۷۰/۰۰۰ گونه در طول سال در دنیا نابود می‌شود. با توجه به مطالب ذکر شده درحوزه ژنتیک و اصلاح، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی در برنامه ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد (Iranian National Atlas, 2001). روش‌های مولکولی[1] و استفاده از نشانگرهای مولکولی[2] در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید. زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به ما می‌دهد، می‌تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش‌های آماری به دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است که آنها را رد کند (Daneshyar, 2003). نژادهای کنونی گوسفند بر اساس نوع فرآوردهای تولیدی (گوشتی، پشمی، پوستی یا شیری)، وضعیت شاخ (شاخدار یا بی شاخ) و یا از روی رنگ و نیز دنبه‌دار بودن یا نبودن طبقه‌بندی شده‌اند. گوسفندان ایرانی فزون بر آن که از نظر کیفیت پشم در ردیف گوسفندان پشم ضخیم قرار دارند، همگی به جز نژاد زل، دنبه‌دار می‌باشند. گوسفند

1. Molecular methodes

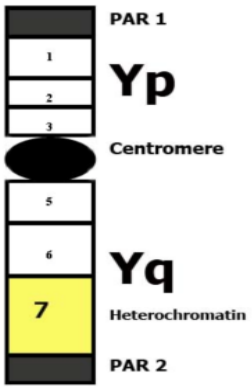
2. Molecular Markers

* نویسنده مسئول: محمدرضا محمدآبادی تلفن: ۰۹۱۳-۳۹۸۷۵۳۴ E-mail: mmohammadabadi@yahoo.com

کرمانی نیز در این گروه است. این گوسفندان دارای رنگی سفید و وزن متوسط می‌باشند که به دلیل مقاومت زیاد در برابر گرما در محیطی مثل استان کرمان به خوبی پرورش داده می‌شود. برنامه‌های اصلاح‌نژادی بیشتر برای بهبود وضعیت تولیدی حیوانات اهلی عمل می‌کنند و توفیق این برنامه‌ها به مقدار تنوع ژنتیکی موجود در گله بستگی دارد (Bahrampoor et al., 2008; Rajaei, 2005; Msoffe et al., 2005). تنوع ژنتیکی در داخل و یا بین جمعیت‌ها، بدون در نظر گرفتن تعداد آلل در هر جایگاه ژنی، جهش، انتخاب، مهاجرت و روش‌های تولیدمثلی محاسبه می‌شود و به عنوان ابزاری ارزشمند در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nagamine & Higuchi, 2001). برای تعیین هویت حیوانات اهلی و مشخص کردن والدین آنها و روابط شجره‌ای بین افراد جمعیت و بررسی ساختار و تمایز جمعیت‌ها از ریزماهواره‌ها[1] استفاده می‌شود (Moore et al., 1991). با توجه به سابقه اهلی شدن گوسفندان در ایران و تنوع نژادی آن در کشور و عدم انجام تحقیقات مولکولی روی این نژادها، لازم است که چنین مطالعاتی روی آنها انجام شود. به علاوه، نقشه ژنتیکی کروموزوم Y برای خیلی از حیوانات مزرعه‌ای به طور کامل در دسترس نیست و نشانگرهای چندشکل ویژه کروموزوم Y برای این حیوانات موجود نمی‌باشد، تاکنون بررسی‌های اندکی روی ناحیه ویژه کروموزوم Y این حیوانات انجام گرفته است (Liu et al., 2003). کروموزوم Y (به استثنای ناحیه کاذب) به صورت یک واحد غیر نوترکیب عمل می نماید و به صورت هاپلوییدهای خاص جنس نر مورد بررسی قرار می گیرد (Edwards et al., 2000). تلفیقی از اطلاعات مربوط به کروموزوم Y (شجره پدری) و اطلاعات مربوط به شجره مادری (mtDNA) می‌تواند اطلاعات کلیدی برای تصمیم‌گیری در برنامه‌های اصلاحی در اختیار اصلاح‌گران قرار دهد. هدف از این پژوهش بررسی مقدار کارایی و سودمندی نشانگرهای ریزماهواره ویژه کروموزوم Y گاوی در تعیین تنوع ژنتیکی در گوسفند کرمانی می‌باشد. از آنجا که نشانگرهای مولکولی مستقل از اثرات محیطی عمل می‌کنند، فاکتورهای مناسبی برای مطالعات تنوع ژنتیکی می‌باشند (Naghavi et al., 2004). انجمن بین‌المللی ژنتیک حیوانی[2]، 2004). ریزماهواره‌ها را به عنوان بهترین نشانگر جهت تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های حیوانی معرفی می‌شوند. بر اساس بررسی‌های ثبت شده توسط FAO، ۶۶ درصد کل مطالعات تعیین فاصله ژنتیکی با استفاده از ریزماهواره‌ها انجام گرفته است. همچنین در تحقیقاتی که توسط FAO در رابطه با انتخاب نشانگر (بدون در نظر گرفتن فاکتورهای هزینه) جهت مطالعات تنوع ژنتیکی انجام شده، گزارش‌ها حاکی از این است که ۷۰ درصد پژوهشگران ریزماهواره‌ها را انتخاب کرده‌اند و ۳۰ درصد آنها نیز SNP را برگزیده‌اند (FAO, 2004). مشخص شده که استفاده از ریزماهواره‌های گاوی می‌تواند برای مطالعهٔ ژنتیک جمعیت در گوسفند و بز و دیگر گونه‌های در حال انقراض، به منظور حفظ و نگهداری و مدیریت صحیح آنها مفید باشد. کروموزوم Y پستانداران از دو ناحیه مجزا شامل ناحیه اتوزومی کاذب[3] (PAR) بخش کوچکی که با کروموزوم X همولوگ است و ناحیه ویژه Y[4] تشکیل شده است. این دو قسمت خصوصیات ژنتیکی متفاوتی دارند (Liu et al., 2002). اندازه کروموزوم Y در انسان به طور متوسط ۶۰ میلیون جفت باز است (Kayser et al., 2000). ناحیه اتوزومی کاذب کروموزوم Y هنگام تقسیم میوز با کروموزوم X نوترکیب می‌شود در حالی که در ناحیه ویژه کروموزوم Y نوترکیبی صورت نمی گیرد (Liu et al., 2002). نوترکیبی در کروموزوم Y بیشتر در قسمت دیستال[5] (پایانی) بازوی کوچک (۲/۶ mb) و به مقدار کمتری در قسمت نوک بازوی بزرگ (۰/۳۲ mb) رخ می‌دهد (Kayser et al., 2000). بخش دیستال Y_q هتروکروماتین است در حالی که ۱۴/۵ mb از بخش پروکسیمال Y_q و ۸ mb از بخش Y_p یوکروماتین است (شکل ۱). تمام ژن‌های شناخته شده وابسته به Y در قسمت یوکروماتین هستند (Hannah, 2003).

1. Microsatellite

2. International society for animal genetics
3. Pseodo Autosomal Region
4. Y-Specific Region
5. Distal



شکل ۱- موقعیت ناحیه اتوزومی کاذب (PAR)، بخش هتروکروماتین (7) و دو بازوی کروموزوم Y (Y_p و Y_q)

ناحیه‌ای که نوترکیبی در آن رخ نمی‌دهد عمدتاً از توالی‌های تکراری تشکیل شده است و حدوداً ۹۵٪ از کروموزوم Y را تشکیل می‌دهد. ظاهراً بیش از ۳۰ ژن یا خانواده ژنی در ناحیه غیر نوترکیب کروموزوم Y انسان قرار دارد. این ژن‌ها فزون بر تعیین جنسیت، نقش مهمی در اسپرم سازی، باروری نرها و کنترل رشد دارند. پروژه عظیم تعیین توالی ژنوم انسان نشان داده است که حداقل ۱۰۴ ژن روی کروموزوم Y انسان قرار دارد (Liu et al., 2002). به دلیل این که نقشه ژنتیکی کروموزوم Y برای خیلی از حیوانات مزرعه‌ای به طور کامل در دسترس نیست و نشانگرهای چندشکل ویژه کروموزوم Y برای این حیوانات موجود نیست، تاکنون بررسی‌های اندکی روی ناحیه ویژه کروموزوم Y این حیوانات صورت گرفته است (Liu et al., 2003). کروموزوم Y (به استثنای ناحیه کاذب) به صورت یک واحد غیر نوترکیب عمل می‌نماید و به صورت هاپلوییدهای خاص جنس نر مورد بررسی قرار می‌گیرد (Edwards et al., 2000). تلفیقی از اطلاعات مربوط به کروموزوم Y (شجره پدری) و اطلاعات مربوط به شجره مادری (mtDNA) می‌تواند اطلاعات کلیدی برای تصمیم‌گیری در برنامه‌های اصلاحی در اختیار اصلاح‌گران قرار دهد. در یک مطالعه، Edwards et al. (2000) چندشکلی کروموزوم Y در گونه‌های گاوی را به وسیله ریزماهواره‌های ویژه کروموزوم Y بررسی کردند. در این پژوهش از چهار ریزماهواره ویژه کروموزوم Y گاوی استفاده شد و در مجموع ۱۱ آلل متفاوت مشاهده شد (Edwards et al., 2000). در پژوهشی، Meadows et al. (2004) تنوع نوکلئوتیدی ۴۳۸۰pb از پنج ژن در ناحیه MSY[1] را در ۱۴ گوسفند نر از هفت نژاد بررسی کردند که معادل $۰/۹±۰/۵×۱۰^{-۴}$ بود (Kayser et al., 2000). Liu et al. (2003) چندشکلی ریزماهواره‌ای کروموزوم Y را در ۱۷ گاو نر غیر خویشاوند با استفاده از ۳۸ ریزماهواره بررسی کردند که ۱۴ ریزماهواره چندشکلی نشان دادند (Liu et al., 2003). Liu et al. (2004) چندشکلی کروموزوم Y در گاو و گوسفند و بز را با استفاده از ۳۸ ریزماهواره کروموزوم Y گاوی با یکدیگر مقایسه کردند، در گاوها، هر ۳۸ ریزماهواره و در گوسفند و بزها، به ترتیب ۳۲ و ۲۸ ریزماهواره در PCR تکثیر شدند (Liu et al., 2004). در پژوهش حاضر وضعیت تکثیر ۱۷ ریزماهواره ویژه کروموزوم Y گاوی در نژاد گوسفند کرمانی مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این پژوهش بررسی مقدار کارایی و سودمندی نشانگرهای ریزماهواره ویژه کروموزوم Y گاوی در تعیین تنوع ژنتیکی در گوسفند بود.

مواد و روش‌ها

در این طرح از ۱۰۰ قوچ و ۲۰ میش، به طور انفرادی از مناطق پراکنش نمونه‌گیری شد. خون‌گیری عمدتاً از سیاهرگ وداجی انجام گرفت. نمونه‌های خون در لوله‌های ونوژکت حاوی EDTA جمع‌آوری و بلافاصله به ظرف دارای یخ منتقل شد. پس از اضافه کردن ماده ضد انعقاد و به خوبی مخلوط کردن آن با خون می‌توان به مدت ۳ـ۲ روز تا زمان استخراج نمونه‌ها را در یخچال نگه داشت و در صورتی که کار استخراج به تعویق می‌افتاد، نمونه‌ها در فریزر منجمد و نگهداری می‌گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت Purification DNA Kit انجام شد. و تعیین غلظت DNAی استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر و با روش مقایسه باندها با DNA لامبدا روی ژل آگارز صورت گرفت. برای انجام واکنش‌های PCR، مواد مورد استفاده که درون یک کیت قرار داشتند از شرکت سینا ژن تهیه شدند. تمام وسایل مورد استفاده استریل شدند. برای هر مخلوط واکنش، مقدار ۲ میکرو لیتر DNAی تهیه شده به ۲۳ میکرولیتر از مخلوط اجزای دیگر اضافه شد که حجم محلول

1. Male – Spcific Region of the Ovine Y-Chromosome

واکنش در پایان به ۲۵ میکرولیتر رسید و این مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش از ۱۷ ریزماهواره ویژه کروموزوم Y گاوی استفاده شد. ویژگی‌های آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. این آغازگرها با غلظت‌های متفاوت در داخل میکروتیوب‌های جداگانه قرار داشتند. آغازگرها در ابتدا به صورت جامد که با آب مقطر آماده شدند در فریزر و دمای $-۲۰^{\circ}C$ نگهداری شده و فقط در هنگام استفاده، ذوب و دوباره سریعاً به فریزر منتقل می شدند. برای این تحقیق از برنامه دمائی زیر استفاده شد.

واسرشت‌سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه و دمای $۹۵^{\circ}C$ (یک سیکل)، واسرشت‌سازی (تک رشته شدن) DNA به مدت ۳۰ ثانیه و $۹۴^{\circ}C$، اتصال آغازگر به DNA ی تک رشته ای به مدت۳۰ ثانیه و $۵۴-۶۱^{\circ}C$، سنتز (بسط آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه و $۷۲^{\circ}C$ (۳۶ سیکل) و سنتز پایانی به مدت ۵ دقیقه و $۷۲^{\circ}C$ (یک سیکل). پس از تکمیل چرخه‌های دستگاه، نمونه‌ها بلافاصله از دستگاه خارج شده و در دمای $۴^{\circ}C$ نگهداری شدند. محصولات PCR روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد الکتروفورز شدند. برای نمایان‌سازی باندها از روش سریع رنگ‌آمیزی نقره[1] استفاده شد. برای خواندن آلل‌ها ژل رنگ‌آمیزی شده اسکن شده و با استفاده از نرم‌افزار UVIDOC فاصله باندها از چاهک‌ها اندازه‌گیری شد. با استفاده از فاصله باندهای نشانگر اندازه و وزن هر باند، می‌توانیم وزن آن آلل را به صورت جفت باز به دست آوریم.

1. Rapid Silver Staining

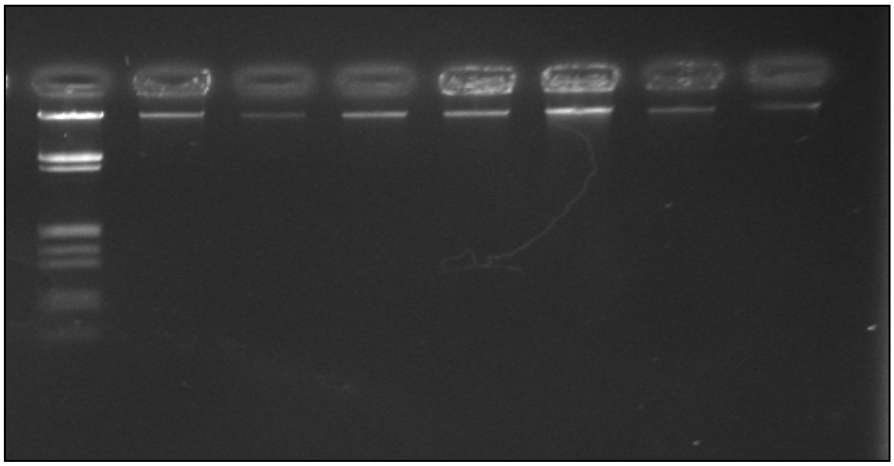
نتایج و بحث

DNAهای استخراج شده از کیفیت و کمیت بسیار مطلوبی برخوردار بوده و عاری از هر گونه آلودگی بودند و بعد از اینکه باندها روی ژل آگارز مشاهده شدند (شکل۲)، با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر کمیت و کیفیت DNA استخراجی محاسبه و ثبت شد. شکستگی DNA که به صورت هاله و اسمیر بر روی ژل آگارز دیده می‌شود، در هیچ کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد. درخشندگی و وضوح باندها به علت غلظت زیاد DNA در محلول استخراج شده می‌باشد.

واکنش‌های PCR با تمام آغازگرها با موفقیت انجام شدند. همه آغازگرها، یعنی UMN2303، UMN0929، UMN0907، INRA124، INRA189، INRA057، BM861، UMN0108، UMN0307، UMN2405، UMN0301، UMN2706، UMN3008، UMN0406، UMN0504، UMN2713 و UMN0803 چندشکل بودند. برخلاف ریزماهواره‌های معمول که معمولاً یک

جدول ۱- ویژگی های آغازگرهای مورد استفاده

نشانگر	آغازگر رفت (5-3)	آغازگر برگشت (5-3)	دمای اتصال ($^{\circ}C$)
UMN0803	GATCCACATCCCCCTCAC	CTGCTTTTGTCCCGCTAA	۶۰
UMN0929	ACCAGCTGATACACAAGTGC	GGTCAGAGAATGAAACAGAG	۶۱
UMN0108	GATCCATCCACATTGCTGCA	CCAAGCGTCCATCAATTTAC	۶۰
UMN3008	TTGTGGAGGACTATTCATGG	TCTGGACTCGACAGGACACC	۵۶
UMN0307	GATACAGCTGAGTGACTAAC	GTGCAGACATCTGAGCTGTG	۵۸
UMN0907	CTGTTGATACTTTCTTCCTG	CTGATGGACATCTGATATTC	۵۵
UMN2303	TACTTGCTTGAGACTTACTG	TGTGAACACATCTGATTCTG	۵۶
UMN0301	GCCTGGGCTAGTGCGCAACC	CAAAACTGTTGCACTGTTTC	۶۰
UMN0406	GTTGAGGACTCTTGCATCTG	TGCTTCATCCTTCATTCCAC	۵۶
UMN0504	AGGCCATCTGCATAGTGAAG	TGCTGGACTGCTCATCTCTG	۵۶
UMN2405	CCTGCCATCCATTGTGAAGA	CTGCTTACCTGGTCAGGATT	۵۵
UMN2706	TTGTTGAGGACTCTTGCATC	CCACATATCAGGCAAAGTCAT	۵۴
UMN2713	GTACCTACACTAATATGTTCA	CCAAAGAAAGTTCAGGTACA	۵۴
INRA057	CCTAGCGACTGTCCAAGCG	CACGGGCTGAGAATTCAAAC	۵۸
INRA124	GATCTTTGCAACTGGTTTG	AGGACACAGGTCTGAGAATG	۵۶
INRA189	TTTTGTTTCCCGTGCTGAG	GAACCTCGTCTCCTTGTAGCC	۵۸
BM861	TTGAGCCACCTGGAAAGC	CAAGCGGTTGGTTCAGATG	۵۶



شکل ۲- DNA استخراج شده روی ژل آگارز دو درصد

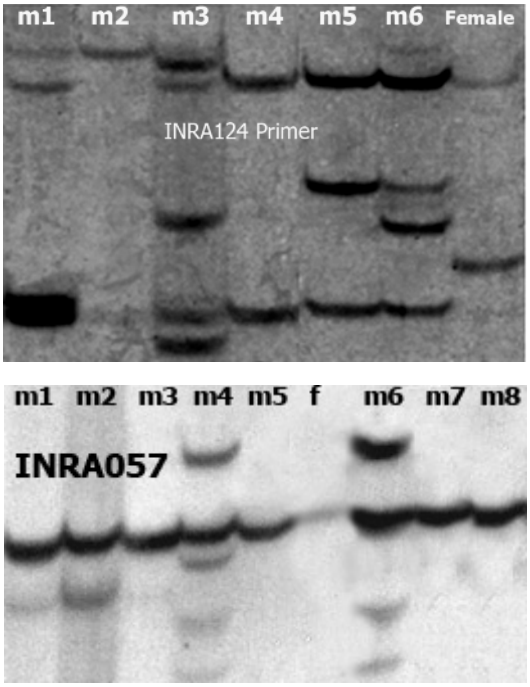
نسخه از آن در طول ژنوم وجود دارد، تعداد زیادی از ریزماهواره‌های ویژه کروموزوم Y یافت شده‌اند که چندین نسخه از آنها در طول کروموزوم Y وجود دارند (Liu et al., 2002). در نتیجه در ناحیه ویژه کروموزم Y، یک جایگاه ژنی می‌تواند چندین نسخه در طول کروموزوم داشته باشد. هر نسخه یک جایگاه هموزایگوت است و بنابراین یک ژن هموزایگوت با چندین نسخه ایجاد می‌کند. اگر این گونه جایگاه‌ها در PCR تکثیر شوند، ممکن است دو نوع محصول به دست آید. نوع اول محصول ممکن است دارای یک نوار باشد و هیچ گونه تنوع توالی در آن مشاهده نشود، که در این صورت به سختی می‌توان نتیجه گرفت که ژن هموزایگوت دارای چند نسخه است. به علاوه، ممکن است محصولی با چندین نوار در اندازه‌های مختلف برای هر فرد به وجود آید که به خاطر تفاوت در اندازه ریزماهواره در هر جایگاه است و بیانگر این است که ژن مورد نظر دارای چندین نسخه در طول کروموزم است (Liu et al., 2003). با تعیین توالی DNA مشخص شده است که توالی جایگاه UMN0705 متعلق به خانواده ژن TSPY گاوی است که این ژن به صورت کامل کروموزم Y گاوی را پوشانده است (Matthews and Reed, 1992). شکل ۳ الگوی الکتروفورز محصول PCR چند آغازگر را به طور نمونه روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد نشان می‌دهد. اندازه نوارهای مشاهده شده در این مطالعه با اندازه نوارهای مشاهده شده توسط Liu et al. (2004) مشابه بود. محدوده اندازه و تعداد نوارهای مشاهده شده برای ۱۷ نشانگر در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- اندازه و تعداد نوارهای مشاهده شده در ۱۷ نشانگر ریزماهواره چندشکل

نشانگر	محدوده اندازه نوارها (bp)	تعداد نوارهای چندشکل مشاهده شده در کل جمعیت‌ها
UMN0803	۹۰-۱۲۰	۷
UMN0929	۱۷۰-۱۸۰	۶
UMN0108	۸۰-۱۶۰	۷
UMN3008	۱۳۰-۲۷۰	۸
UMN0307	۹۰-۱۸۰	۶
UMN0907	۷۰-۸۰	۶
UMN2303	۱۰۰-۱۳۰	۵
UMN0301	۵۰-۱۰۰	۹
UMN0406	۱۴۰-۲۳۰	۸
UMN0504	۵۰-۱۹۰	۶
UMN2405	۶۰-۱۸۰	۱۰
UMN2706	۱۰۰-۱۳۰	۶
UMN2713	۱۰۰-۲۲۰	۷
INRA057	۸۰-۹۰ ۱۱۰-۱۳۰	۱۵
INRA124	۶۰-۲۰۰	۱۶
INRA189	۵۰-۱۵۰	۱۰
BM861	۶۰-۵۰ ۱۴۰-۲۵۰	۱۳

در مجموع، ۱۰۲ آلل در این ریزماهواره‌ها شناسایی شد که بیشترین و کمترین نوارهای مشاهده شده به ترتیب در جایگاه INRA124 (۱۶ نوار) و UMN2303 (۵ نوار) بود. در مطالعه‌ای که وضعیت تکثیر ۳۸ ریزماهواره ویژه کروموزم Y گاوی روی گوسفند مورد بررسی قرار گرفت، شش جایگاه چندشکل بودند. با این حال تعداد نوارهای آنها به حدی زیاد بود که امکان شمارش تعداد نوارها وجود نداشت، ۱۳ جایگاه یک شکل

بود و ۱۳ جایگاه نیز چندشکلی مناسبی را نشان دادند (Liu et al., 2004). همچنین در مطالعه دیگری که با استفاده از ۳۸ ریزماهواره ویژه کروموزم Y گاوی روی ۱۷ گاو نر غیر خویشاوند انجام شد، محصولات ۲۹ جایگاه چندشکل بودند (Liu et al., 2003). در تحقیقی Xin et al. (2006) چندشکلی دو ریزماهواره کروموزوم Y (UMN2404 و UMN0103) را در گاوهای چینی بررسی کردند، هر دو جایگاه نوارهای مشخصی را نشان دادند، در حالی که در مطالعه Liu et al. (2003) جایگاه UMN2404 شبیه شاخص اندازه بود و نوارهای آن قابل شمارش نبود. به جز ریزماهواره UMN2713 تمام ریزماهواره‌ها در نمونه‌های DNA گوسفندان ماده نیز تکثیر شدند. در بیشتر موارد محصولات PCR به دست آمده در نمونه‌های ماده با محصولات PCR نمونه‌های نر از نظر اندازه و غلظت باندها متفاوت بود. نشانگرهای ویژه کروموزم Y می‌توانند به دلایل مختلف در نمونه‌های DNA هر دو جنس نر و ماده تکثیر شوند. اول آن که کروموزهای X و Y از یک جفت کروموزم مشترک منشاء گرفته‌اند. به عنوان مثال، در نواحی ویژه کروموزم‌های X و Y انسان، قسمت‌هایی از این دو کروموزم که مکمل یکدیگر نیستند و طی میوز نوترکیب نمی‌شوند، توالی‌های مشترک مشابه‌ای یافت شده است (Liu et al., 2003). دلیل دوم این است که نشانگرهای ویژه کروموزم Y گاوی چندین نسخه در طول کروموزم دارند. یک مثال از این مورد، خانواده توالی مرتبط با (BRY) TSPY است که تقریباً ۱۲۰۰ نسخه از آن در طول کروموزم Y است و ۱۰۰ نسخه از آن کروموزم X را پوشانده است (Matthews & Reed, 1992). دلیل سوم این که امکان دارد آغازگرهای ریزماهواره ویژه کروموزم Y در نمونه‌های DNA ماده، محصولات PCR غیراختصاصی تولید کنند. هر چند که در این مطالعه شرایط PCR بهینه شده بود، با وجود آن نمی‌توان امکان تکثیر محصولات غیراختصاصی را کاملاً نادیده گرفت، به ویژه هنگامی که با توالی‌های تکراری کروموزم Y و یا نشانگرهایی با چندین نسخه در طول کروموزم کار می‌کنیم. در مطالعه Liu et al. (2004) نیز گزارش شد که از شش نشانگری که در ناحیه اتوزومی کاذب کروموزوم Y گاوی قرار داشتند، سه نشانگر در جنس نر گوسفند و یک نشانگر در جنس نر بز تکثیر شدند، ولی در جنس ماده تکثیر نشدند. همچنین از ۳۲ نشانگر دیگر که در ناحیه ویژه کروموزوم Y گاو قرار داشتند، ۲۰ نشانگر در گوسفند و ۱۶ نشانگر در بز در هر دو جنس نر و ماده تکثیر شدند. این نتایج نشان داد که ناحیه اتوزومی کاذب و ناحیه ویژه کروموزوم Y، در کروموزوم Y این گونه‌ها حفظ نشده است (Liu et al., 2004). در مطالعه Nguyen et al. (2005) از ۱۳۱ نشانگر ریزماهواره گاوی برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی گاومیش سوئیسی استفاده شد که ۱۲۴ نشانگر تکثیر شده و محصولات ۱۱۷ نشانگر چندشکل بود. در این مطالعه دو نشانگر ریزماهواره ویژه کروموزوم Y گاوی (INRA126 و BM861) در DNA ژنومی هر دو جنس نر و ماده گاومیش تکثیر شدند و دو نشانگر ویژه کروموزوم Y گاوی (INRA124 و INRA189) فقط در جنس نر گاومیش‌ها تکثیر شدند (Nguyen et al., 2005).



شکل ۳- نمونه‌ای از الگوی الکتروفورز محصولات PCR دو آغازگر INRA124 و INRA057 برای چند حیوان نر (m ها) و یک حیوان ماده (f) گوسفند کرمانی

همچنین در مطالعه Han et al. (2002) روی گاومیش نیز جایگاه INRA124 تکثیر نشد و جایگاه

INRA126 در هر دو جنس گاومیش تکثیر شد. Han et al. (2002) و Qi et al. (2002) دریافتند که جایگاه INRA189 در گاومیش یک نشانگر چندشکل است که ۳ آلل تولید می‌کند. جایگاه BM861 که قبلا توسط Han et al. (2002) با ۸۳ گاومیش نر مورد آزمایش قرار گرفته بود و به عنوان یک جایگاه یک شکل معرفی شده بود، توسط Qi et al. (2002) با ۲۵۲ گاومیش مورد آزمایش قرار گرفت و مشخص شد که این جایگاه نیز چندشکل است. فزون بر آن در مطالعه Nguyen et al. (2005) نیز دو نشانگر ریزماهواره ویژه کروموزوم Y گاوی (INRA126 و BM861) در هر دو جنس با موفقیت تکثیر شدند. همچنین در مطالعه دیگری چهار ریزماهواره INRA124، INRA126، INRA189 و BM861 در گونه های گاو، گاومیش باتلاقی، گاومیش اهلی و گوسفند استفاده شد. هر چهار ریزماهواره در تمام حیوانات جنس نر تکثیر شدند. ولی ریزماهواره INRA126 در گاو میش اهلی ماده نیز تکثیر شد و اندازه محصول آن دقیقاً برابر با اندازه محصول تکثیر شده در جنس نر بود (۱۸۲ bp). این نتیجه نشان داد که کروموزم X گاو میش اهلی توالی هومولوگ خود را با کروموزم Y حفظ کرده است و این قسمت ریزماهواره INRA126 را نیز دارا است (Edwards et al., 2000). نتایج این مطالعه و چندشکلی‌های مشاهده شده در ریزماهواره‌های مورد بررسی، نشان می‌دهد که می‌توان از ریزماهواره‌های ویژه کروموزوم Y گاوی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، فراوانی ژنی، هتروزیگوسیتی، فاصله ژنتیکی و کلاستربندی در گوسفندان استفاده کرد.

REFERENCES

1. Bahrampoor, V., Mohammadabadi, M. R., Mirzaei, H., Baghizadeh, A., Dashab, Gh., Mohammadi, A., Alinaghizadeh, R., Soflaei, M. & Khesali, A. (2008). Molecular analysis of Calpastatin gene in Kermani sheep herds. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources*, 15(4), 124-131.
2. Daneshyar, P. (2003). *Polymorphism determination of 9 microsatellite markers in Balouchi sheep breed of Abasabad station of Mashhad*. M.Sc. thesis of Animal science. Zabol University.
3. Edwards, C. J., Gaillard, C., Bradley, D. G. & MacHugh, D. E. (2000). Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Animal Genetics*, 31(2), 127-130.
4. FAO. (2004). Measurement of domestic animal diversity-A review of recent diversity studies. Commission on genetic resources for food and agriculture. Third session.
5. Hamidi, Z. (2006). *Study of Genetic diversity for microsatellite loci in Mazandaran native chickens*. M.Sc. thesis of Animal science. Agriculture and natural resources university of Varamin. Ahvaz. Iran.
6. Han, J., Ochieng, J. W., Rege, J. E. O. & Hanotte, O. (2002). Low level of cattle introgression in yak populations from Bhutan and China: Evidences from Y-specific microsatellites and mitochondrial DNA markers. In: Proceedings of *the third international congress on yak*, in Lhasa, China, 4-9 September 2000. International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, pp. 190-196.
7. Hannah, S. (2003). Mutation and Diversity in Avian Sex Chromosomes. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, ISSN 1104-232X; 900.
8. Iranian National Atlas. (2001). *Study of biological environment*. (1st ed.). Mapping center of Iran publication.
9. ISAG/ FAO standing committee. (2004). Secondary guidelines for development plans. MODAD: Recommended microsatellite markers. To be presented at ISAG.
10. Kayser, M., Roewer, L., Hedman, M., Henke, L., Henke, J., Brauer, S., Kruger, C., Krawczak, M., Nagy, M., Dobosz, T., Szibor, R., Knijff, P., Stoneking, M. & Sajantila, A. (2000). Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *American Journal of Human Genetics*, 66(5), 1580-1588.
11. Liu, W. S., Beattie, C. W., Cockett, N. E. & Ponce de Leon, F. A. (2004). Comparative analysis of 38 bovine Y-chromosome microsatellite in cattle, sheep and goat.Plant & Animal Genomes XII Conference. Poster: P 632.
12. Liu, W. S., Beattie, C. W. & Ponce de Leon, F. A. (2003). Bovine Y chromosome microsatellite polymorphisms. *Animal Genomics*, 102, 53-58.
13. Liu, W. S., Mariani, P., Beattie, C. W., Alexander, L. J. & Ponce de Leon, F. A. (2002). A radiation hybrid map for the bovine Y chromosome. *Mammalian Genome*, 13, 320- 326.
14. Matthews, M. E. & Reed, K. C. (1992). Sequences from a family of bovine Y-chromosomal repeats. *Genomics*, 13, 1267-1273.
15. Meadows, J. R. S., Hawken, R. J. & Kijas, J. W. (2004). Nucleotide diversity on the ovine Y

chromosome. *Animal Genetics*, 35(5), 379-385.
16. Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M. & Hatzel, D. J. S. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allow the use of heterologous RCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10, 654-660.
17. Msoffe, P. L. M., Mtambo, M. M. A., Minga, U. M., Juul-Madsen, H. R. & Gwakisa, P. S. (2005). Genetic structure among the local chicken ecotypes of Tanzania based on microsatellite DNA typing. *African Journal of biotechnology*, 4(8), 768-771.
18. Nagamine, Y. & Higuchi, M. (2001). Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. *Journal of Animal Breeding and Genetic*, 118, 101-109.
19. Naghavi, M. R., Moradi, M., Ramshini, H. A. & Fazelinasab, B. (2004). Comparative analyses of the genetic diversity among wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2(3), 195-202.
20. Nguyen, T. T., Genini, S., Menetrey, F., Malek, M., Vogeli, P., Goe, M. R. & Stranzinger, G. (2005). Application of bovine microsatellite markers for genetic diversity analysis of Swiss yak (*Poephagus grunniens*). *Animal Genetics*, 36(6), 484-489.
21. Qi, X., Han, J., Rege, E. O. & Hanotte, O. (2002). Y-chromosome specific microsatellite polymorphism in Chinese yak. In: Proceedings of *the 7th world congress on genetics applied to livestock production held in Montpellier*, France, 19-23 August 2002, 33, 509-512.
22. Rajaei, M. A. (2005). *Study of Genetic diversity for Japan quil population using microsatellite Markers*. M.Sc. thesis of Animal science. Faculty of Agriculture. Tarbiat Modares University.
23. Xin, C., Hong, C., Shan, W., Kai, X. & Chuzhao, L. (2006). Polymorphisms of two Y chromosome microsatellites in Chinese cattle. *Genetic Selection Evolution*, 38, 525-534.