ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹
صفحه ۱۰۱-۹۵

بررسی وضعیت تکثیر ۱۷ نشانگر ریزماهواره مختص کروموزوم Y گاو در گوسفند

سید ضیاءالدین میرحسینی*[۱]، هادی زارع[۲]، سید محمدفرهاد وحیدی[۳]، اکبر خالق‌زادگان[۴]، سید بنیامین دلیرصفت[۵]

۱،۲و۴- به ترتیب دانشیار، دانشجویان کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

۳- مربی گروه ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال کشور، رشت، گیلان

۵- کارشناس ارشد گروه پژوهشی کرم ابریشم، دانشکده منابع طبیعی صومعه سرا، دانشگاه گیلان

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mirhosin@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۹)

چکیده

در این تحقیق وضعیت تکثیر ۱۷ نشانگر ریزماهواره مختص کروموزوم Y گاو در پنج نژاد گوسفند بومی ایران شامل کبوده شیراز، ترکی-قشقایی، افشاری، فراهانی و نایینی مورد مطالعه قرار گرفت. از هر نژاد ۳۰ راس نر و دو راس ماده غیرخویشاوند به طور تصادفی انتخاب و خونگیری شد. استخراج DNA بر اساس روش نمکی انجام گرفت. محصولات سه جایگاه UMN0803، UMN2706 وUMN0301 به صورت هاله‌ای و سه جایگاه UMN0108، UMN0307 و UMN2405 شبیه شاخص اندازه بود. با توجه به این‌که امکان وجود چندین نسخه از یک ریزماهواره در طول کروموزوم Y وجود دارد، احتمالاً باندهای هاله‌ای و شبیه شاخص اندازه به دست آمده در محصولات PCR حاصل از این ریزماهواره‌ها به علت وجود تعداد زیاد نسخه‌های این جایگاه‌ها در کروموزمY هر یک از نمونه‌ها است. چهار جایگاه UMN3008، UMN0406، UMN0504 و UMN2713 یک شکل بودند درحالیکه هفت جایگاه دیگر شامل UMN2303، UMN0929، UMN0907، INRA124، INRA189، INRA057 و BM861 چندشکل بودند. در مجموع ۷۱ آلل در این هفت ریزماهواره شناسایی شد که بیشترین و کمترین باندهای مشاهده شده به ترتیب مربوط به جایگاه‌های INRA124 (۱۷ باند) و UMN2303 (٤ باند) بود. نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان از ریزماهواره‌های مختص کروموزوم Y گاو به منظور تعیین تنوع ژنتیکی در گوسفند استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

ریز ماهواره،
کروموزوم Y گاو،
گوسفند،
نشانگر

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.10.5]

مقدمه

کروموزوم Y پستانداران از دو ناحیه مجزا شامل ناحیه اتوزومی کاذب[1] (PRA)، بخش کوچکی که با کروموزوم X همولوگ است و ناحیه مختص Y[2] تشکیل شده است. این دو قسمت خصوصیات ژنتیکی متفاوتی دارند (۸). ناحیه اتوزومی کاذب کروموزوم Y هنگام تقسیم میوز با کروموزوم X نوترکیب می‌شود در حالیکه در ناحیه مختص کروموزوم Y نوترکیبی صورت نمی-گیرد (۸). نوترکیبی در کروموزوم Y بیشتر در قسمت دیستال[3] (انتهای) بازوی کوچک (۲/٦ mb) و به مقدار کمتری در قسمت نوک بازوی بزرگ (۰/۳۲ mb) رخ می‌دهد (۵). تمام ژن‌های شناخته شده وابسته به Y در قسمت یوکروماتین هستند (٤). به دلیل این که نقشه ژنتیکی کروموزوم Y برای خیلی از حیوانات مزرعه‌ای به طور کامل در دسترس نیست و نشانگرهای چندشکل مختص کروموزوم Y برای این حیوانات موجود نیست، تا کنون بررسی‌های اندکی بر روی ناحیه مختص کروموزوم Y این حیوانات صورت گرفته است (۷). 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 تحقیق حاضر وضعیت تکثیر ۱۷ ریزماهواره مختص کروموزومY گاو در پنج نژاد گوسفند ایرانی شامل کبوده شیراز، ترکی- قشقایی، افشاری، فراهانی و نایینی مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این مطالعه بررسی میزان کارایی و سودمندی نشانگرهای ریزماهواره مختص کروموزومY گاو در تعیین تنوع ژنتیکی در گوسفند بود.

مواد و روش‌ها

از هر جمعیت ۳۰ قوچ و دو میش غیر خویشاوند به طور تصادفی و انفرادی از مناطق پراکنش نمونه‌گیری شد. استخراج نمونه‌های DNA از خون کامل و با استفاده از روش استخراج نمکی[4] انجام گرفت (۱). در این تحقیق از ۱۷ ریز ماهواره مختص کروموزومY گاو استفاده شد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ آمده است. برای انجام واکنش PCR از بافر PCR با غلظت ۱۰X (۲۰۰ Tris-HCl میلی‌مول با pH=8، ۵۰۰ KCl میلی مول)، محلول کلرید منیزیم (۲۵ mM)، مخلوط چهار نوع dNTP و آنزیم *Taq* DNA پلیمراز استفاده گردید. واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر[5] مدل ۹۷۰۰ انجام شد. غلظت‌های مختلف اجزاء PCR شامل ۲۰ng از DNA الگو، بافر PCR ۱X، ۲mM کلریدمنیزیم، Pmol ۳ از هر آغازگر، ۰/۲۵ واحد از آنزیم *Taq* DNA پلیمراز، در حجم کلی ۱۲ میکرولیتر بود.

برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۶ چرخه (۹۴ °C به مدت۳۰ ثانیه، ۶۱-۵۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه) و در نهایت دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه بود. محصولات PCR بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد الکتروفورز شد.

نتایج و بحث

الگوی الکتروفورز محصولات PCR برای سه آغازگر UMN0803، UMN2706 و UMN0301 به صورت هاله‌ای[6] و برای سه آغازگر UMN0108، UMN0307 و UMN2405 شبیه شاخص اندازه[7] بود و در نتیجه امکان شمارش تعداد جایگاه‌های تکثیر شده و تشخیص چندشکلی در این شش ریزماهواره وجود نداشت. بر خلاف ریزماهواره‌های معمول که معمولاً یک نسخه از آن در طول ژنوم وجود دارد، تعداد زیادی از ریزماهواره‌های مختص کروموزوم Y یافت شده‌اند که چندین نسخه از آنها در طول کروموزوم Y وجود دارند (۸). در نتیجه احتمالاً نوارهای هاله‌ای و شبیه شاخص اندازه به دست آمده در محصولات PCR حاصل از این شش ریز ماهواره به علت وجود تعداد زیاد نسخه-های این جایگاه‌ها در کروموزم Y هر یک از نمونه‌ها است. در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰٤) که وضعیت تکثیر ۳۸ ریز ماهواره مختص کروموزم Y گاو بر روی گوسفند و بز را مورد بررسی قرار دادند نتایج به دست آمده از تکثیر آغازگرهای UMN2706،

[1] Pseudo Autosomal Region
[2] Y-Specific Region
[3] Distal
[4] Salting- out
[5] Thermocycler
[6] Smear
[7] Ladder-Like

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.10.5]

UMN0301 و UMN0307 مشابه نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر بود، ولی آغازگرهای UMN0108، UMN0803 و UMN2405 در گوسفندان چندشکل و در بزها یک شکل بودند (۶). احتمالا متفاوت بودن نتایج به دست آمده در مورد سه آغازگر UMN0108، UMN0803 و UMN2405 در تحقیق حاضر و مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰٤) به علت تفاوت در نژادهای مورد بررسی می‌باشد. همچنین در مطالعه دیگری که توسط Liu و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از ۳۸ ریزماهواره کروموزمY گاو بر روی چندین نژاد گاو انجام شد نیز آغازگر UMN2706 شبیه شاخص اندازه بود ولی پنج آغازگر دیگر به‌خوبی تکثیر شدند، که آغازگرهای UMN0803، UMN0108 و UMN0307 چندشکل و آغازگرهای UMN0301 و UMN2405 یک شکل بودند (۷). احتمالا تکثیر مناسب این پنج آغازگر در مطالعهLiu و همکاران (۲۰۰۳) نسبت به تحقیق حاضر به این دلیل باشد که این آغازگرها مختص کروموزوم Y گاو هستند، در نتیجه انتظار می‌رود که در گاوها وضعیت تکثیر بهتری داشته باشند.

چهار آغازگر UMN3008، UMN0406، UMN0504 و UMN2713 نیز یک شکل بودند (شکل۱). در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰٤) نیز سه آغازگر UMN3008، UMN0504 و UMN2713 در بزها یک شکل بودند و آغازگر UMN0406 چند شکل بود، اما در گوسفندان هر چهار آغازگر چند شکلی مناسبی را نشان دادند. همچنین در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰۳) آغازگر UMN0406 یک شکل بود ولی آغازگر UMN0504 چند شکل و آغازگرهای UMN3008 و UMN2713 شبیه شاخص اندازه بود.

هفت آغازگر باقیمانده شاملUMN2303، UMN0929، UMN0907، INRA124، INRA189، INRA057 و BM861 چندشکل بودند (شکل۲). در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰٤) نیز مشابه تحقیق حاضر این هفت آغازگر در گوسفندان چندشکل بودند ولی در بزها آغازگر UMN0929 هیچ محصولی در PCR نداشت، آغازگر UMN2303 چندشکل و آغازگرهای UMN0907، INRA124، INRA057 و BM861 یک شکل بودند (۶). همچنین در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰۳) نیز نتایج حاصل از تکثیر آغازگرهای UMN0929 و INRA189 چند شکل، UMN2303 چندشکل ولی شبیه شاخص اندازه و INRA124، BM861، UMN0907 و INRA057 یک شکل بود (۷). در مطالعه Han و همکاران (۲۰۰۲) و Qi و همکاران (۲۰۰۲) نیز جایگاه INRA189 در گاومیش یک نشانگری چند شکل بود (۳ و ۱۲). همچنین در مطالعه Edwards و همکاران (۲۰۰۰) که چندشکلی کروموزوم Y در گونه‌های گاوی را بوسیله ریز ماهواره‌های مختص کروموزوم Y بررسی کردند نیز آغازگرهای INRA124، INRA189 و BM861 چند شکل بودند (۲)، اما در مطالعه Han و همکاران (۲۰۰۲) که بر روی گاومیش انجام شد جایگاه INRA124 تکثیر نشد (۳).

اندازه نوارهای مشاهده شده در این مطالعه با اندازه نوارهای مشاهده شده توسط Liu وهمکاران (۲۰۰۴) مشابه بود. جدول۲ محدوده اندازه و تعداد نوارهای مشاهده شده در هفت نشانگر چند شکل را نشان می‌دهد. در بیشتر موارد محصولات PCR به دست آمده در نمونه‌های ماده با محصولات PCR نمونه‌های نر از نظر اندازه و غلظت باندها متفاوت بود. در مجموع ۷۱ آلل در این هفت ریز ماهواره شناسایی شد که بیشترین و کمترین نوارهای مشاهده شده به ترتیب در جایگاه INRA124 (۱۷ نوار) و UMN2303 (۴نوار) بود. احتمالا زیاد بودن تعداد آلل‌ها در ریزماهواره‌های مورد بررسی به دلیل وجود چندین نسخه از آنها در طول کروموزوم Y باشد. در مطالعه Liu وهمکاران (۲۰۰۴) آغازگرهای UMN2303، UMN0929، UMN0907، INRA124، INRA189، INRA057 و BM861 به ترتیب ۶، ۲، ۶، ۲۰، ۱۱، ۱۳ و ۱۴ آلل در گوسفندان تولید کردند (۶).

به جز ریزماهواره UMN2713 تمام ریز ماهواره‌ها در نمونه‌های DNA گوسفندان ماده نیز تکثیر شدند. در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰٤) از ۳۲ نشانگری که در ناحیه مختص کروموزوم Y گاو قرار داشتند، ۲۰ نشانگر در گوسفند و ۱٦ نشانگر در بز در هر دو جنس نر و ماده تکثیر شدند (٦). همچنین در مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰۳) از ۳۲ نشانگری که در ناحیه مختص کروموزوم Y گاو قرار داشتند ۲۱ نشانگر در هر دو جنس گاو تکثیر شدند (۷). در مطالعه Nguyen و همکاران (۲۰۰۵) نشانگر ریزماهواره BM861 در DNA ژنومی هر دو جنس گاو میش تکثیر شد (۱۱).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.10.5]

علاوه بر این در مطالعه دیگری توسط Nguyen و همکاران (۲۰۰۵) نیز نشانگر ریز ماهواره BM861 در هر دو جنس ساعولا تکثیر شد (۱۰).

نشانگرهای مختص کروموزم Y می‌توانند به دلایل مختلف در نمونه‌های DNA هر دو جنس نر و ماده تکثیر شوند. اول آنکه کروموزم‌های X و Y از یک جفت کروموزم مشترک منشاء گرفته-اند. به عنوان مثال، در نواحی مختص کروموزم‌های X و Y انسان، قسمت‌هایی از این دو کروموزم که مکمل یکدیگر نیستند و در طی میوز نوترکیب نمی‌شوند توالی‌های مشترک مشابه‌ای یافت شده است (۷). دلیل دوم اینست که نشانگرهای مختص کروموزم Y گاو چندین نسخه در طول کروموزم دارند. یک مثال از این مورد خانواده توالی مرتبط با TSPY (BRY) است که تقریباً ۱۲۰۰ نسخه از آن در طول کروموزمY است و ۱۰۰ نسخه از آن کروموزم X را پوشانده است (۹). این احتمال نیز وجود دارد که آغازگرهای ریز ماهواره مختص کروموزم Y در نمونه‌های DNA ماده، محصولات PCR غیر اختصاصی تولید کنند. هر چند که در این مطالعه شرایط PCR بهینه شده بود، با این حال نمی‌توان امکان تکثیر محصولات غیر اختصاصی را کاملاً نادیده گرفت، مخصوصاً هنگامی که با توالی‌های تکراری کروموزمY و یا نشانگرهایی با چندین نسخه در طول کروموزم کار می‌شود.

نتایج حاصله از این مطالعه و چند شکلی‌های مشاهده شده در ریزماهواره‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که می‌توان از ریزماهواره‌های مختص کروموزوم Y گاو به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، فراوانی ژنی، هتروزیگوسیتی، فاصله ژنتیکی و کلاستربندی در گوسفندان استفاده کرد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده(۸)

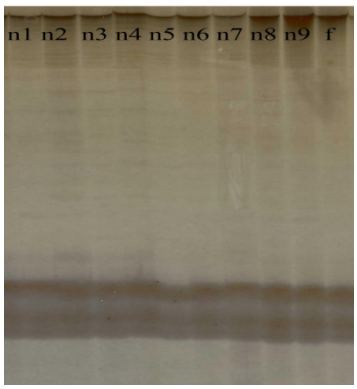
نشانگر	آغازگر رفت (5́-3́)	آغازگر برگشت (5́-3́)	دمای اتصال (°C)
UMN0803	GATCCACATCCCCCTCAC	CTGCTTTTGTCCCGCTAA	۶۰
UMN0929	ACCAGCTGATACACAAGTGC	GGTCAGAGAATGAAACAGAG	۶۱
UMN0108	GATCCATCCACATTGCTGCA	CCAAGCGTCCATCAATTTAC	۶۰
UMN3008	TTGTGGAGGACTATTCATGG	TCTGGACTCGACAGGACACC	۵۶
UMN0307	GATACAGCTGAGTGACTAAC	GTGCAGACATCTGAGCTGTG	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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

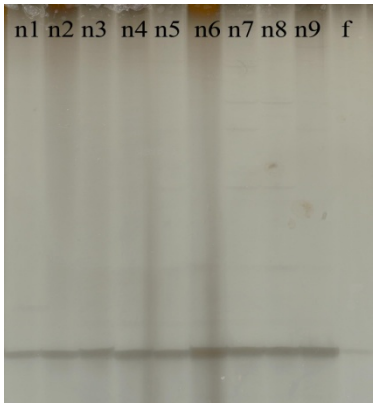
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.10.5]

جدول ۲- اندازه و تعداد نوارهای مشاهده شده در هفت نشانگر ریزماهواره چند شکل

نشانگر	محدوده اندازه نوارها (bp)	تعداد نوارهای چند شکل مشاهده شده در کل جمعیت‌ها
UMN0929	۱۷۰-۱۸۰	۶
UMN0907	۷۰-۸۰	۶
UMN2303	۱۰۰-۱۳۰	۴
INRA057	۸۰-۹۰ ۱۱۰-۱۳۰	۱۵
INRA124	۶۰-۲۰۰	۱۷
INRA189	۵۰-۱۵۰	۱۰
BM861	۶۰-۵۰ ۱۴۰-۲۵۰	۱۳



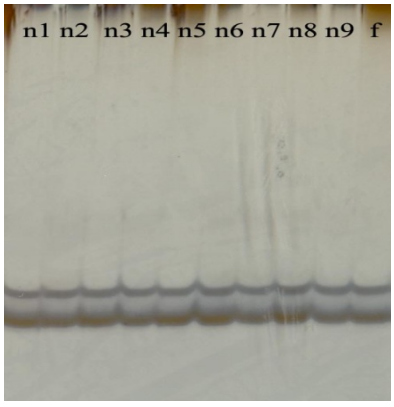
UMN0504



UMN2713



UMN3008

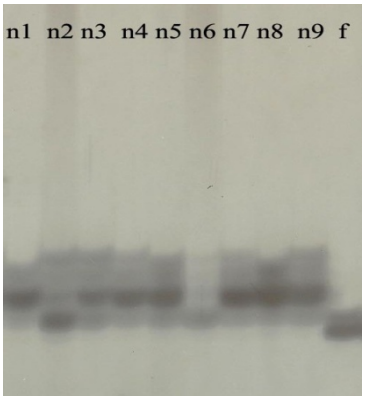


UMN0406

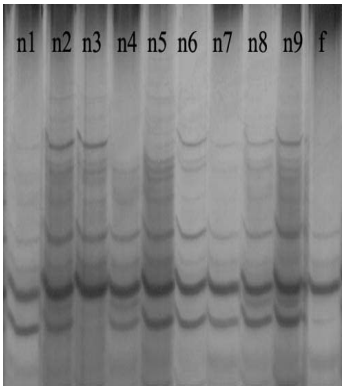
شکل ۱- الگوی الکتروفورز محصول PCR چهار آغازگر یک شکل شامل UMN2713، UMN0504، UMN0406 و UMN3008 مربوط به ۹ نمونه گوسفند نر(n1 تا n9) و یک نمونه گوسفند ماده (f)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

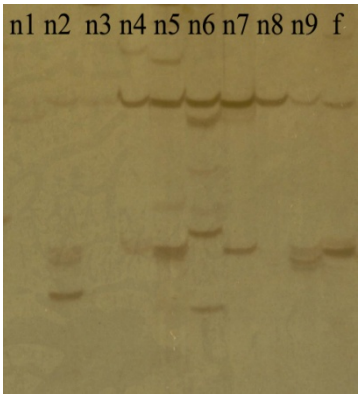
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.10.5]



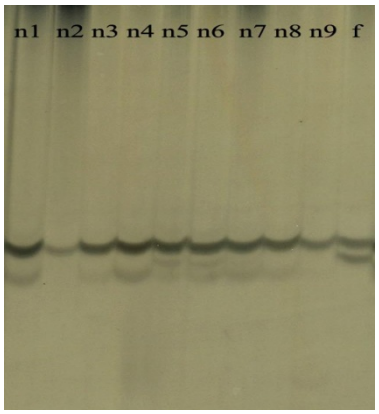
UMN2303



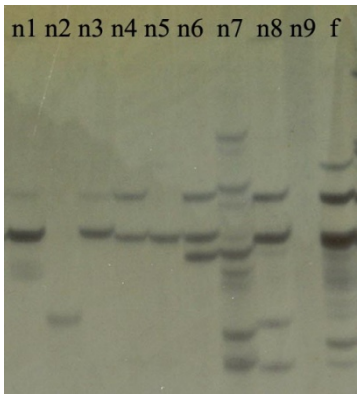
BM861



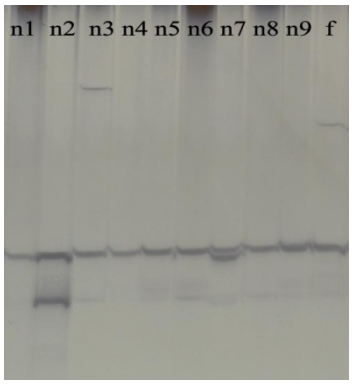
INRA124



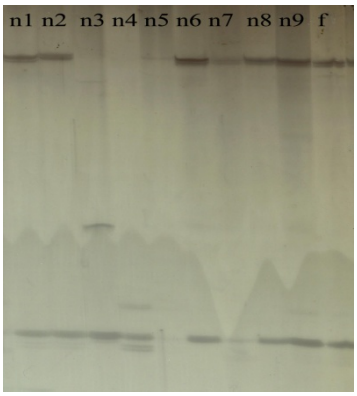
UMN0907



INRA057



UMN0929



INRA189

شکل ۲- الگوی الکتروفورز محصول PCR هفت آغازگر چند شکل شامل INRA124، BM861، UMN2303، UMN0929، INRA0507، UMN0907 و INRA189 مربوط به ۹ نمونه گوسفند نر(n1 تا n9) و یک نمونه گوسفند ماده (f).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.10.5]

سپاسگزاری

این تحقیق در پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه شمال کشور انجام گرفت. از کلیه کارکنان این پژوهشکده به خاطر همکاری و مساعدت بی دریغشان سپاسگذاری می‌گردد.

منابع

1. Anonymous 2005 Blood protocol. www.ilri.org.
2. Edwards C J and 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.
3. Han J and 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. Proceedings of the third international congress on yak, in Lhasa, China, 4-9 September 2000. International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, pp. 190-196.
4. 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.
5. Kayser M and 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.
6. Liu W S and 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 P632.
7. Liu W S and Beattie CW, Ponce de Leon F A (2003) Bovine Y chromosome microsatellite polymorphisms. Animal Genomics. 102: 53-58.
8. Liu W S and 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.
9. Matthews M E and Reed K C (1992) Sequences from a family of bovine Y-chromosomal repeats. Genomics 13: 1267–1273.
10. Nguyen T T and Menetrey F, Genini S, Nguyen V L, Vogeli P, Nguyen B X, Stranzinger G (2005) Application of bovine microsatellite markers on Saola (Pseudoryx nghetinhensis). Animal Breeding and Genetics. 122(3): 195-198.
11. Nguyen T T and 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.
12. Qi X and Han J, Rege E O, Hanotte O (2002) Y-chromosome specific microsatellite polymorphism in Chinese yak. Proceedings of the 7th world congress on genetics applied to livestock production held in Montpellier, France, 19-23 August 2002, 33, 509-512.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.3.10.5]