

تفاوت واریانت‌های نوکلئوتیدی اختصاصی بین ژن‌های آمیلوژنین X و Y: ابزاری مناسب برای تأیید جنسیت دام‌های اهلی

- سنودا حسین‌زاده*: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- آرش جوانمرد: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- شیرین محمودی: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
- جواد قهاری: اداره کل حفاظت محیط زیست استان آذربایجان شرقی، تبریز، ایران
- محمدحسین بنابازی: موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

چکیده

در سیستم پرورش، اغلب یک جنس ارزش بیش‌تری از جنس دیگر دارد. هدف از پژوهش حاضر، استفاده از تفاوت واریانت‌های نوکلئوتیدی اختصاصی بین ژن‌های آمیلوژنین X و Y، برای تعیین جنسیت در علف‌خواران وحشی و اهلی (گوسفند، بز، گاو و گوزن) بود. بدین‌منظور، از تعداد کل ۵۹ حیوان مورد مطالعه نمونه خون و سرگین تهیه شد و سپس استخراج DNA ژنومی توسط کیت تجاری و براساس دستورالعمل الحاقی آن صورت پذیرفت. آغازگرهای مورد مطالعه، براساس مناطق محافظت شده در توالی ژن آمیلوژنین در بانک ژن و مطابق مرور منابع انجام شده انتخاب و سنتز گردید. متعاقباً، واکنش زنجیره پلی‌مراز طبق پروتکل‌های استاندارد موجود بهینه‌سازی شد. نتایج پژوهش حاضر، وجود تفاوت الگوی باندی بین جنس نر و ماده را نشان داد. اندازه باند تکثیر شده توسط آغازگرهای یکسان، بسته به نوع گونه و هم‌چنین نژاد، داخل هر گونه متغیر بود اما الگوی تفکیکی تقریباً مشابهی را بین نر و ماده ایجاد می‌کرد. هم‌چنین، الگوهای الکتروفورزی، در بعضی گونه‌ها به‌طور اجتناب‌ناپذیری همراه یک باند کاذب بود که خوشبختانه در پروسه تعیین جنسیت اختلال ایجاد نمی‌کرد. تخمین اندازه موثر جمعیت از روی نتایج حاصل در گوزن نشان داد تعداد نرها کم‌تر از حد معقول بود چراکه باید نسبت نر و ماده در زمان جفتگیری متناسب باشد (معمولاً بسته به نژاد و سن گوزن نسبت ۴ (نر) به ۱۲ (ماده) است). در نهایت تفاوت واریانت‌های نوکلئوتیدی اختصاصی بین ژن‌های آمیلوژنین را می‌توان ابزاری مناسب برای پیش‌انتخاب و شناسایی جنسیت دانست.

کلمات کلیدی: تعیین جنسیت، ژن آمیلوژنین، واکنش زنجیره پلی‌مراز، علف‌خواران



مقدمه

از نظر دامپروری، پیش انتخاب جنس و سیستم‌های پرورشی در پرورش گونه‌های با اهمیت اقتصادی بسیار مهم است (سیدشریفی و همکاران، ۱۳۹۷). دلیل عمده کنترل جنسیت این است که، اغلب در یک سیستم پرورشی بسته به هدف، یک جنس دام ارزش بیشتری از جنس دام دیگر دارد. به عنوان مثال، در سیستم پروراندی گوسفند، بره‌های نر ارزش تجاری بیشتری از بره‌های ماده دارند، زیرا سریع‌تر رشد می‌کنند و گوشت بیشتری تولید می‌کنند. بنابراین، کنترل جنسیت به اصلاح‌گران اجازه می‌دهد که جنس با ارزش‌تر را بیشتر از جنس دیگر تولید نمایند. همچنین، در سیستم‌های دورگ‌گیری خاص، کنترل جنسیت دارای مزیتی آشکار است. در سیستم‌های نر پایانه‌ای اگر نتاج تولیدی از جنس با ارزش‌تر باشند، این سیستم‌ها جذاب‌تر خواهند بود. سیستم‌های ترکیب مانند سیستم‌های چرخشی/پایانه‌ای، سیستم‌های پایانه‌ای/مربک و مانند آن نیز از کنترل جنسیت سود می‌برند. اگر نرهای نژاد مادری در این سیستم‌ها تنها دختر تولید کنند و نرهای نژاد پدری تنها نتاج نر تولید نمایند، نتاج همگی جنسیت مطلوبی خواهند داشت و بدین ترتیب هزینه‌های اضافی ناشی از تولید نتاج نر مادری و نتاج ماده پدری حذف خواهد شد. مادران کم‌تری در سمت مادری این سیستم‌ها مورد نیاز است چرا که، به جای نیمی از فرزندان، تمامی فرزندان این مادران، ماده‌های جایگزین بالقوه محسوب می‌گردند. در این صورت می‌توان از مادران اضافی حاصل برای بخش پایانه‌ای این سیستم‌ها، یعنی بخشی که باید سودمندترین باشد، استفاده نمود و نتایج بیشتری از این بخش به دست آورد. در گاو گوشتی و پروراندی گوسفند و بز سیستم‌های تک‌جنسی Single-sex system به منظور افزایش قابل توجه در بازدهی تولید گوشت طراحی شده‌اند. در چنین سیستمی هر ماده جوان بلافاصله پس از بلوغ جنسی با منی‌آئی که ماده تولید می‌کند، تلاقی داده می‌شود (یا این که یک جنین ماده دریافت می‌کند) و دختری که تولید می‌نماید پس از گذشت تنها چند ماه از شیر گرفته می‌شود. سپس مادر برای کشتار تغذیه می‌گردد و دخترش جایگزین او می‌شود. بازدهی این سیستم ناشی از این است که هیچ (یا تعداد کمی) حیوان مسن نگهداری می‌گردند. تمامی حیوانات جوان و در حال رشد می‌باشند و در مقایسه با سیستم مرسوم، سهم بیشتری از خوراک مصرفی به جای این که صرف نگهداری گاوهای بالغ گردد در جهت تولید گوشت (رشد) به کار می‌رود و از خوراک به طور مؤثرتری استفاده می‌شود. اگر چنین سیستم‌هایی در پرورش گاو گوشتی معمول شوند، تقاضا برای حیوانات تمام چرخشی یا All-around نسبت به انواع مادری یا پایانه‌ای افزایش می‌یابد و در نتیجه تأکید اصلاح‌گران بر انتخاب روی بلوغ زودرس و آسان‌زایی بیشتر خواهد شد. در صنعت گاو شیرده آمریکای شمالی، تلیسه‌ها به عنوان

جایگزین گله عمل می‌نمایند و به منظور برگشت سرمایه به فروش می‌رسند در حالی که گوساله‌های نر به جز آن‌هایی که استعداد به کارگیری به عنوان نرهای جوان را دارند، بی‌ارزش بوده یا ارزش کمی دارند. تعیین جنسیت را می‌توان، برای تحت تأثیر قرار دادن عناصر کلیدی معادله تغییر ژنتیکی و افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی مورد استفاده قرار داد. مثالی از گاوهای نر جوان را در نظر بگیرید: امروزه گاوهای نر جوان خوش آتیه با تعداد زیادی ماده گاو تلاقی داده می‌شوند و براساس رکورد‌های اولین دوره شیردهی دختران‌شان ارزیابی می‌گردند. تعداد این آمیزش‌های آزمون Test Mating به دلایل اقتصادی محدود است. با استفاده از کنترل جنسیت می‌توان با همان تعداد جفتگیری دو برابر دختر تولید نمود. بنابراین برای یک گاو نر، داده‌های مربوط به نتاج دو برابر تولید می‌شود (افزایش صحت انتخاب) و آمیزش آزمون را می‌توان در دوره‌ای کوتاه‌تر کامل نمود (کاهش فاصله نسل) و یا این که می‌توان این گاوهای نر را دو برابر بیشتر از آن چه برای اکثر گاوهای نر معمول است ارزیابی نمود یا تعداد نرها را در رقابت افزایش داد (افزایش شدت انتخاب). علی‌رغم وجود آمار مناسب دام گوسفند، بز و گاو، پرورش گوزن به عنوان منبع غذایی که در ایران ناشناخته مانده است قابل بررسی است در حالی که در خیلی کشورها از جمله آمریکا، نیوزیلند پرورش گوزن به علت گوشت با کلسترول پایین و پوست گران حائز اهمیت است. گوزن‌ها نشخوارکنندگانی هستند که در طیف گسترده‌ای از زیستگاه‌های مختلف در سراسر جهان وجود دارند و مورفولوژی آن‌ها بسیار متنوع است ویژگی‌های مختلفی از محصولات تولید شده توسط گوزن‌ها مانند گوشت (گوشت گوزن)، پوست و شاخ، جایگاه خاصی در بازار را به خود جلب کرده‌اند. پرورش گونه‌های گوزن تأثیر زیست‌محیطی را روی جمعیت گوزن‌های وحشی کاهش می‌دهند. و همچنین اجازه می‌دهد که از طریق انتخاب ژنتیکی، ویژگی‌های مورد علاقه (مانند رشد شاخ) گوزن‌ها به کار گرفته شوند. گوزن‌ها در حال حاضر در سرتاسر دنیا پرورش داده می‌شوند در ایران به علت شکار بی‌رویه و تهدیدات طبیعی و تخریب زیستگاه و توسعه شهرها و محدود شدن جنگل‌ها گوزن‌ها به مناطق ایزوله و حفاظت شده سوق داده شده‌اند لذا تعیین جنسیت مدفوع گوزن به عنوان یک ابزار نظارتی می‌تواند بازخوردی از نتایج رهاسازی و نظارت بر نسبت جنسیتی گوزن‌های موجود و زالد و ولد آن‌ها دهد. نسبت مناسب نر و ماده گوزن در زیستگاه شرط اجتناب ناپذیر حفظ اندازه موثر و بقای حیات این گونه می‌باشد و آبستنی‌های موفق را به نوعی این نسبت جنسیتی تضمین می‌کند. معمولاً بسته به نژاد و سن گوزن نسبت ۴ به ۱۲ بین نر و ماده حاکم است و نسبت مناسب جنسیتی گوزن‌ها در زیستگاه می‌تواند دینامیک تولیدمثل و بیولوژی حیوان را تحت تأثیر قرار دهد. به علاوه گوزن‌ها از رفتارهای تولیدمثل مختص به خود برخوردارند

یخ ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی (بانک ژن شمال غرب کشور) منتقل شد و تا زمان استخراج در ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید. سرگین‌های تازه بلافاصله به داخل فالكون حاوی اتانول ۷۰ درصد انتقال یافتند. پس از بهینه‌سازی، روش واکنش زنجیره پلی‌مراز انجام شد.



شکل ۱: نحوه نمونه‌برداری نمونه خون و مدفوع از گوزن ارسباران

جزییات انجام تکنیک‌های مولکولی: آغازگرا، واکنش زنجیره پلی‌مراز و الکتروفورز: استخراج DNA از نمونه سرگین توسط کیت تجاری شرکت کیاژن و نمونه خون از روش کلروفرم و ایزوآمیل الکل (Samadi shams و همکاران، ۲۰۱۱) انجام گرفت و تعیین کمیت و کیفیت توسط روش اسپکتوفوتومتری صورت گرفت. برای شرح جزئیات، ابتدا نمونه‌های سرگین بلافاصله در اتانول ۹۵ درصد قرار گرفت و به فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. سپس رسوب باقی‌مانده با محلول سالین شستشو داده شد. مابقی مراحل طبق روش تیوسولفات گوانیدین-سیلیکاژل انجام پذیرفت. ۵۰۰ میکرو لیتر بافر هضم‌کننده (۵ مول تیوسیونات گوانیدین، ۲۰ میلی‌مول EDTA، ۴۰ میلی‌مول Tris، ۴۰ گرم Triton100X، ۱۰ گرم DTT) به نمونه اضافه شد، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول نوکلئاز (۴ گرم ذرات سیلیکا، ۱۰۰ میکرولیتر گوانیدین) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی و رتکس گردید. سپس به محیط همگن شده، ۴۰۰ میکرولیتر بافر سالین - ۲۰ میلی‌مول Tris KCl، ۱۰ میلی‌مول EDTA، ۱ M HCl، ۱۰۰ میلی‌مول NaCl اضافه و در نهایت از طریق ماده ۱۰ درصد Extra Gene رزین ۰/۰۲٪ ماده رنگی OrangG، ۰/۰۱ درصد Triton100 X، DNA زرد رنگ از سایر ناخالصی‌ها جدا گردید. DNA ژنومی در ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. در طولانی مدت در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. DNA در منفی ۲۰- سانتی‌گراد به علت وجود رادیکال‌های آزاد، امکان شکسته شدن از حالت دو رشته‌ای را

که توجه به این رفتارها نقش حائز اهمیتی جهت حفظ این گونه جانوری در مناطق حفاظت‌شده خواهد داشت (اکرامی، ۱۳۹۶). در پستانداران تعیین جنسیت برخلاف سایرین تحت تأثیر محیط نیست و وابستگی تام به کروموزوم‌های جنسی دارد و ژن‌هایی که رشد و تمایز بیضه را کنترل می‌کند سبب ایجاد جنسیت نر در پستانداران می‌شوند. بر طبق بررسی منابع انجام شده خلاصه روش‌های تعیین جنسیت در پستانداران عبارتند از: آنزیم‌های وابسته به X (گلوکز-۶-فسفات) (Mathai و همکاران، ۱۹۶۶)، آنتی‌ژن H-Y (مختص جنس نر) (Wachtel و همکاران، ۱۹۷۷)، آنالیز سیتوژنتیک (کاریوتایپ) (Guttenbach و همکاران، ۱۹۹۷)، نشانگرهای مبتنی بر کروموزوم Y، نشانگرهای مبتنی بر ژن‌های مشترک روی کروموزوم‌های X و Y (Stouthamer و همکاران، ۱۹۹۲). روش‌هایی که بتواند مقرون به‌صرفه باشد و با دقت زیاد جنس نر را از جنس ماده تفکیک کند می‌تواند مطلوبیت داشته باشد. آمیلوژنین یک ژن کاندیدا با توالی نوکلئوتیدی بسیار محافظت شده در پستانداران می‌باشد که در پروسه معدنی شدن دندان نقش آفرینی می‌کند که در اسب، گاو، بز و انسان و شتر در هر دو کروموزوم جنسی X و Y هویت‌یابی شده است اما تظاهر این ژن کاندیدا برای تعیین جنسیت در گونه‌های مختلف الگوی بیانی متفاوت دارد. معمولاً ۷ اگزون دارد اما در انسان و جوندگان ۲ اگزون اضافی‌تر دارد (Salido و همکاران، ۱۹۹۲) که منجر به بروز پدیده متفاوت پیرایش mRNA می‌شود و مثلاً در گاو اگزون ۴ وجود ندارد و اسپلاسینگ به‌صورت متفاوت پیش می‌رود (Gibson و همکاران، ۱۹۹۱). با این تفاسیر، هدف از پژوهش حاضر استفاده از تفاوت واریانت‌های نوکلئوتیدی اختصاصی بین ژن‌های آمیلوژنین برای تعیین جنسیت در نشخوارکنندگان (گوسفند، بز، گاو و گوزن) از روی نمونه خون کامل و مدفوع بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه نمونه خون و سرگین در گاو، گوسفند، بز انجام شد (نمونه خون به‌عنوان کنترل مثبت و نمونه‌ای که جنسیت آن دقیقاً معلوم است در آزمایش استفاده شد. نمونه‌های گاو متعلق به گاو هلشتاین، گوسفند متعلق به قزل و بز متعلق به بز مه‌بادی بود) و گوزن‌های مورد مطالعه مربوط به پارک ملی گلستان و دیزمار کلیبر بود. تعداد نمونه‌گیری‌های انجام شده به ترتیب در گاو، گوزن، گوسفند و بز برای سرگین ۵، ۵، ۲۵ و ۵ بود و برای خون ۵، ۲، ۷ و ۵ می‌باشد. و نمونه‌گیری خون از گوزن (*Cervus claphus*) از ورید وداجی صورت گرفت و قبل از این مرحله جنسیت حیوان و محل نمونه‌گیری یادداشت شد از این نمونه‌ها به‌عنوان شاهد و برای اعتبارسنجی نمونه‌های سرگین استفاده شد (شکل ۱). داخل لوله‌های حاوی خلأ و EDTA همراه با



جهش حذف شده در جنس نر مشاهده گردید و این امر برای اعتبار سنجی نتایج انجام شد (شکل ۳).

آزمون های آماری: صرفاً برای جمعیت گوزن اقدام به محاسبه شاخص اندازه مؤثر جمعیت با در دست داشتن تعداد نر و ماده شناسایی شده از روی نمونه های سرگین در نرم افزار اکسل طبق فرمول داده شده در مقاله محاسبه گردید برای جمعیت هایی که به صورت تصادفی آمیزش می کنند با تعداد مساوی افراد نر و ماده، ارتباط بین اندازه جمعیت واقعی و اندازه جمعیت مؤثر عبارتند از:

$$\frac{1}{N_e} = \frac{1}{4} \left[\frac{1}{N_{males}} + \frac{1}{N_{females}} \right]$$

شاخص اندازه مؤثر جمعیت باتوجه به محدودیت های ممکن بهتر است از فرمول ذیل محاسبه شود (Leroy و همکاران، ۲۰۱۳):

$$\frac{1}{N_e} = \frac{1}{4} \left[\frac{1}{N_{males}} + \frac{1}{N_{females}} \right] = N_e = \left[\frac{4(N_{males} + N_{females})}{N_{males} + N_{females}} \right]$$

نتایج

نتایج مربوط به کیفیت DNA در جدول ۱ قابل مشاهده است به طور کلی نتایج این پژوهش در قدم اول نشان داد که استخراج DNA از خون با پروتکل الحاقی کیت 230 ± 10 نانوگرم DNA حاصل شد اما در مدفوع بسته به زمان کهنگی آن 63 ± 10 نانوگرم DNA حاصل شد. هر چند نمونه های سرگین تازه با دقت بسیار بالایی جمع آوری شدند با این وجود استخراج DNA با موفقیت بالایی انجام نشد. در خصوص تفکیک نر و ماده با استفاده از ژن آمیلوژنین تکثیر مناسبی با بهینه سازی واکنش صورت گرفت. از نتایجی که می توان در مشاهدات این پژوهش تاکید کرد وجود اندازه باندی متفاوت می باشد. نتایج این تحقیق با تکرار پذیری بالا، وجود دو باند پلی مورف $310-280$ و مونومورف 180 جفت باز (در جمعیت گوزن های نر و پلی مورف $310-280$ جفت باز) در جمعیت گوزن های ماده را نشان داد که در شکل ۲ قابل مشاهده است. الگوهای باندی حاوی دو یا سه باند نشان دهنده جنس نر و به علت عدم وجود جهش از نوع حذف در جنس ماده فقط یک باند دیده می شود. اندازه باندها بسته به گونه و نژاد و مقدار طول جهش از نوع حذف متفاوت مشاهده گردید. حرف M نشان دهنده جنس نر و حرف F نشان دهنده جنس ماده است. دو نوع سایز مارکر 100 و 25 برای سایز مارکر استاندارد به کار رفت. با استفاده از نرم افزار MAFFT همان طور که مشاهده می شود خیلی از نواحی بسیار حفاظت شده روی این ژن قرار گرفته اند و علت تفاوت باندی بین نر و ماده در واقع جهش حدود $100-50$ جفت بازی است که منجر به ایجاد باند کوچک تر

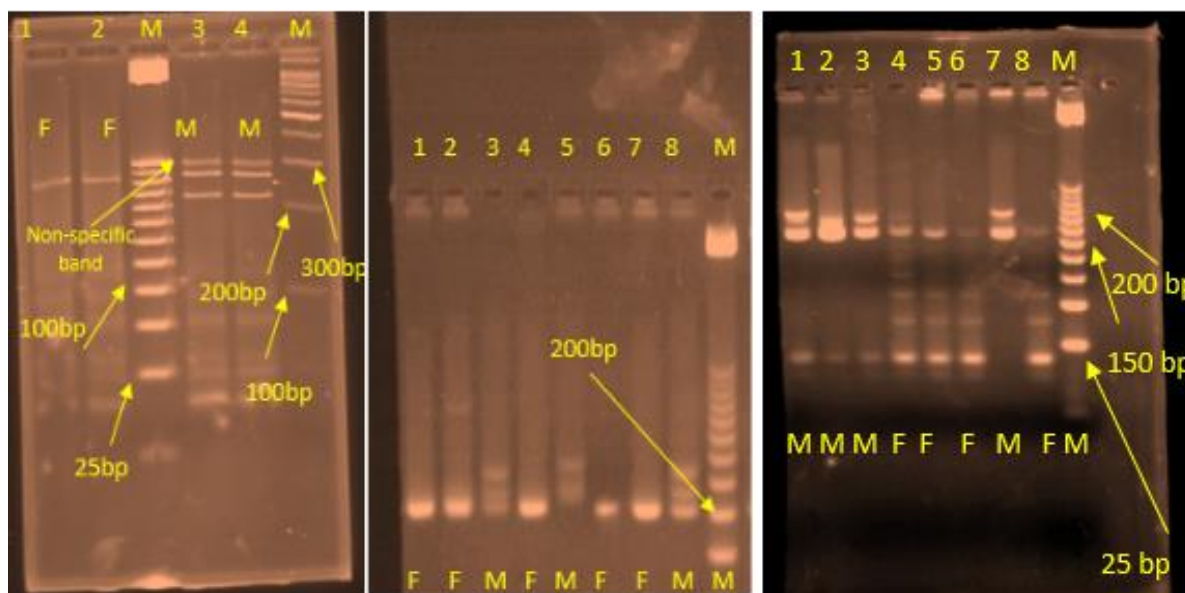
دارد. لذا برای ذخیره درازمدت، منفی 70 بیش تر از منفی 20 درجه سانتی گراد مناسب است. با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر که مدل آن HACH DR/4000U بود، میزان جذب نوری در دو طول موج 260 و 280 بررسی گردید، این نسبت باید $2-1/8$ باشد، اگر نسبت فوق کوچک تر از $1/8$ باشد نشان دهنده آلودگی پروتئین و سوسترهای آروماتیک مانند فنل است. اگر نسبت فوق بزرگ تر از 2 باشد احتمالاً نشان دهنده آلودگی ناشی از RNA می باشد. در این مطالعه جهت انجام فرایند PCR از دو پرایمر استفاده شد شایان ذکر است پرایمرها براساس مطالعات قبل انتخاب شدند (Ennis و Gallagher، ۱۹۹۴):
SE47 (5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3')
SE48 (5'-CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTC-3')
مقدار DNA مورد استفاده 100 نانوگرم برای یک واکنش 50 میکرو لیتری بود. از هر پرایمر 100 پیکومول بر میلی لیتر استفاده گردید. dNTP (10 میلی مولار) یک میکرو لیتر، PCR-Buffer 5 میکرو لیتر و از Taq-Polymerase 0.5 واحد استفاده گردید. دمای واسرشت سازی اولیه 94 درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه، دمای اتصال 61 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و دمای تکثیر 72 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و تکثیر نهایی 72 درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه برای سیکل بهینه شد. مدل دستگاه ترموسایکر Biometra Standard Power Pack P25 بود. جهت آنالیز، محصول PCR روی ژل آگارز 2% به همراه بافر سنگین کننده ران شد. جهت رنگ آمیزی ژل از اتیدیوم بر مایند استفاده گردید. برای تأیید قطعات تکثیر شده و نتایج حاصل از هضم آنزیمی از سایز مارکر $1Kb$ شرکت Fermentase، استفاده شد. ابتدا آگارز $1/8\%$ با به کار گیری بافر (TBE1X)، 9 میلی مول Tris، 9 میلی مول اسیدبوریک و 2 میلی مول EDTA) تهیه و به ازای هر 10 میلی لیتر ژل، 0.2 میکرو لیتر اتیدیوم بروماید 10 میلی گرم در میلی لیتر به آن اضافه کرده و در ظرف مخصوص حاوی شانه ریخته می شود. بعد از بسته شدن ژل، به ازای 7 میکرو لیتر محصول PCR با 2 میکرو لیتر لودینگ بافر (بروموفنل بلو 0.25 درصد، ساکارز 40 درصد) مخلوط نموده سپس در چاهک های ژل قرار داده شد. با ولتاژ بالا حدود 100 ولت شروع تا این که نمونه ها از چاهک خارج شدند. سپس ولتاژ را به حدود 70 ولت رسانیده و پس از یک ساعت الکتروفورز افقی نمونه ها با استفاده از دستگاه نور ماوراء بنفش مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن مدل دستگاه الکتروفورز Biometra Standard Power Pack P25 بود. پس از حصول نتایج و بارگذاری محصولات حاصل از تکثیر جهت تأیید آن، محصولات باقی مانده حاصل از تکثیر در دستگاه سیکونسر تزریق و اندازه قطعات و تکرار پذیری و حساسیت نتایج اولیه مجدداً مورد تأیید قرار گرفت. سپس، توسط اطلاعات پرایمرها توالی مورد هدف توسط سایت NCBI blastn قسمت MAFFT بررسی شد و با هم ردیف سازی توالی های مدنظر به تفکیک جنسیت توالی نوکلئوتیدی

دیگری در نر می‌شود و ماده‌ها این جهش را بین دو ژن آمیلوژنین ندارند.

جدول ۱: تعیین کیفیت DNA استخراج شده

حیوان	نوع نمونه	n	OD260	OD280	OD260/OD280	C
گوزن	خون	۵	۳/۳۲۰	۱/۶۲	۲/۰۵	۱۶۶
	سرگین	۲	۰/۸۲۹	۰/۳۷۰	۲/۲۴	۴۱/۴۵
گوسفند	خون	۵	۶/۹۵۴	۳/۳۹۸	۲/۰۴	۳۴۷/۷
	سرگین	۲	۳/۲۹۱	۲/۶۶۷	۱/۲۳۳	۱۶۴/۵۵
بز	خون	۵	۷/۷۸	۱۱/۰۲۷	۰/۷۰۵	۳۸۹
	سرگین	۲	۴/۹۵۴	۳/۰۷۰	۱/۶۱	۲۴۷/۷
گاو	خون	۵	۲۲/۶۶	۱۲/۲۴	۱/۸۵	۱۱۳۳
	سرگین	۲	۰/۷۸۲	۰/۳۸۱	۲/۰۵	۳۹/۱

منظور از n تعداد DNAهای تعیین کیفیت شده، منظور از OD260 طول موج ۲۶۰، OD280 طول موج ۲۸۰ و C همان غلظت براساس نانوگرم بر میکرولیتر



شکل ۲: الگوهای باندهای الکتروفورزی تفکیک نر و ماده در گاو، گوسفند، بز و گوزن با استفاده از ژن آمیلوژنین

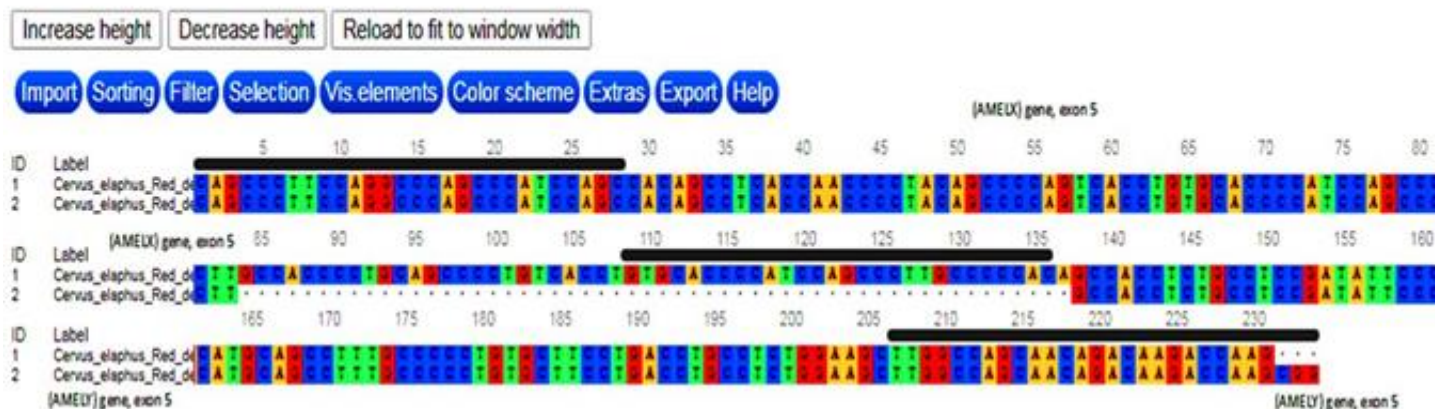
بحث

پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های مولکولی و پروتوکول‌های نمونه‌برداری غیرتهاجمی رویکردهای جدیدی برای تخمین توزیع و فراوانی گونه‌ها و تعیین جنسیت گونه‌ها در سراسر مناطق جغرافیایی ارائه می‌دهد. نشانگرهای ژنتیکی مناسبی جهت شناسایی جنسیت برای بسیاری از گونه‌های پستانداران وحشی توسعه یافته است. تعیین جنسیت در جمعیت‌های طبیعی پستانداران برای درک پویایی جمعیت، مدیریت بیماری‌ها، ساختار جمعیت، استفاده از زیستگاه و سیستم جفتگیری و رفتاری ضروری است. علاوه بر این تعیین جنسیت یک

ابزار مفید و ارزشمند برای پایش و نظارت و بررسی موارد پزشکی قانون است. روش‌های غیرمولکولی تعیین جنسیت دشوار بوده و غالباً غیرقابل اعتماد هستند، از طرفی مشاهده مستقیم ناحیه تناسلی بدیهی است که فرصت‌طلبانه و بسیار بعید است مگر این‌که حیوان صید شود و صید حیوان البته دشوار و غیرقابل قبول است. روش‌های دیگر مثل سطح تستسترون و مورفولوژی برای چندین گونه گوزن استفاده شده است (Ventrella و همکاران، ۲۰۱۸). با این حال اغلب به سن، تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی وابسته است و نمی‌تواند برای دامنه گسترده جوابگو باشد.



MSAViewer



MSAViewer



شکل ۳: نتایج هم‌ردیفی نوکلئوتیدی دو ژن AMELX و AMELX متعلق به گوزن و گوسفند

شد. هر چند نمونه‌های سرگین تازه با دقت بسیار بالایی جمع‌آوری شدند با این وجود استخراج DNA با موفقیت بالایی انجام نشد. در خصوص تفکیک نر و ماده با استفاده از ژن آمیلوژنین به‌علت طراحی مناسب آغازگر بر روی منطقه محافظت شده تکثیر مناسبی با بهینه سازی واکنش صورت گرفت (Ennis و Gallagher, ۱۹۹۴). محققان حکایت از ظهور یک باند کاذب اجتناب ناپذیر در گوزن و گوسفند کرده بودند که خوشبختانه در پروسه شناسایی جنسیت اختلال ایجاد نمی‌کند این باند سنگین‌ترین باند بین سه باند تولید شده است. الگوهای باندی حاوی دو یا سه باند نشان‌دهنده جنس نر و به‌علت عدم وجود جهش از نوع حذف در جنس ماده فقط یک باند دیده می‌شود. اندازه باندها بسته به گونه و نژاد و مقدار طول جهش از نوع حذف، متفاوت مشاهده گردید مطالعات صورت گرفته در این زمینه در جدول ۲ موجود است. از نتایجی که می‌توان در مشاهدات این پژوهش تاکید کرد وجود اندازه باندی متفاوت به‌علت تفاوت در میزان جهش از نوع حذف بین گوسفند، گاو، بز و گوزن می‌باشد. نتایج این تحقیق با تکرار پذیری بالا، وجود دو باند پلی‌مورف ۳۱۰-۲۸۰ و مونومورف ۱۸۰ جفت باز (در جمعیت گوزن‌های نر و پلی‌مورف ۳۱۰-۲۸۰ جفت

تعیین جنسیت مولکولی در شرایطی که دسترسی به حیوان ممکن نیست اما بافت حیوان موجود است یا زمانی که حیوان ویژگی جنسی خاصی دارد، ابزار مفیدی است. ژنتیک مولکولی ابزار قوی برای مطالعات ژنتیک حفاظت است و با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تسهیل می‌شود و فقط به مقدار کمی DNA نیاز دارد و امکان نمونه‌گیری را از راه دور فراهم می‌کند. از نمونه‌های سرگین (Zhang و همکاران، ۲۰۰۶)، خون و استخوان (Mandrekari و همکاران، ۱۹۹۳)، مو (Guan و همکاران، ۲۰۱۳) و پوست (Sidorova و همکاران، ۲۰۱۲) به‌عنوان منبع DNA استفاده کرده‌اند. هم‌چنین از نمونه مدفوع برای تعیین وضعیت فیزیولوژیکی در حیوانات علف‌خوار استفاده شده است برای مثال در گاو (Tolleson و همکاران، ۲۰۰۰)، گوسفند (Godfrey و همکاران، ۲۰۰۱). استخراج DNA از خون بسیار ساده‌تر از مدفوع است و هر چقدر نمونه‌ها تازه باشد خروجی کمی و کیفیت DNA ژنومی بهتر است. نتایج مربوط به کیفیت DNA در جدول ۱ قابل مشاهده است به‌طور کلی نتایج این پژوهش در قدم اول نشان داد که استخراج DNA از خون با پروتکل الحاقی کیت 230 ± 10 نانوگرم DNA حاصل شد اما در مدفوع بسته به زمان کهنگی آن 63 ± 10 نانوگرم DNA حاصل



جنس نر با تقویت ژن SRY که روی کروموزوم Y قرار دارد شناسایی می‌شود. ژن SRY پروتئینی را که به عنوان جعبه گروهی با تحرک بالا (High Motility Group =HMG) شناخته می‌شود، کددهی می‌کند. توالی نسبی مختلف ناحیه جعبه HMG در تعیین جنسیت گوزن در نژادهای Sika, Elaphus, Elk استفاده شده است (Takahashi و همکاران، ۱۹۹۸). ژن آملوژنین که بر روی هر دو کروموزوم X و Y وجود دارد و به ترتیب AMELX و AMELY نامیده می‌شود، در تعیین جنسیت گوزن قرمز اروپایی *Cervus elaphus* به کار رفته است (Pfeiffer و همکاران، ۲۰۰۵). پرایمرهای ژن آملوژنین به کار رفته در گله‌های گاوی برای تعیین جنسیت در گوزن Sika نشان داد که بالای ۹۰ درصد همولوگ میان ژن آملوژنین گونه‌های گوزن و گاو وجود دارد. AMELY در گوزن Sika ۵۴ جفت باز کوتاه‌تر از AMELX می‌باشد که این حذف تنها در یک نقطه ملاحظه گردید (Yamauchi و همکاران، ۲۰۰۰). اما در گوزن قرمز، اختلاف ۵۵ جفت بازی (bp) در طول AMELY و AMELX وجود دارد که از دو محل حذفی حادث می‌شود (Brenig و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات مولکولی نشان داده است که ژن‌های دخیل در یک گونه ممکن نیست در تعیین جنسیت گونه‌های مرتبط دخالت نمایند (Werren و همکاران، ۱۹۹۸).

باز) در جمعیت گوزن‌های ماده را نشان داد (شکل ۲). البته نتایج اخیر با پژوهش‌های مشابه دیگر هم‌خوانی داشت به‌طوری‌که اندازه باندی در گاو و گوسفند بسته به نژاد و گونه در دامنه باندی تقریبی ۲۸۰/۲۱۷ قرار داشت. در گوزن بسته به گونه گوزن که مارال، شوکا، گوزن زرد، سیکا و لوسا می‌باشد. بعضی از مقالات باند ۲۳۱/۱۸۰ را گزارش کردند اما در بعضی مطالعات باندهای ۲۳۱، ۲۵۵، ۲۲۱، ۲۱۹ و ۶۰۷ را برای باند ۲۸۰ جفت بازی که در گاو دیده شده گزارش کردند (Farahvash و همکاران، ۲۰۱۶). حتی باند سبک‌تر هم دامنه متفاوت باندی در مقالات داشت که این حاکی از تفاوت در طول جهش حذفی رخ داده شده در گونه‌ها را دارد. همان‌طور که گفته شد تفاوت دامنه باندی مشکلی را در اصل قضیه یعنی شناسایی و تفکیک نر و ماده نشان نمی‌دهد. تخمین اندازه موثر جمعیت از روی نتایج حاصل در گوزن نشان داد که تعداد نر در زیستگاه ارسباران کم‌تر از حد معقول است و نیاز به انتقال از مناطق حفاظت شده مجاور دارد. تکنیک‌های پیشرفته متعددی برای تعیین جنسیت در انواع گوزن‌ها وجود دارد (Wilson و همکاران، ۱۹۹۸؛ Yamauchi و همکاران، ۲۰۰۰). تاکنون، در میان ۱۷ گونه زیر خانواده Cervinae تنها تعداد کمی با روش‌های مولکولی تعیین جنسیت شده‌اند. در بیش‌تر گونه‌های گوزن،

جدول ۲: خلاصه و جمع‌بندی مقایسه‌ای تحقیقات انجام شده در تعیین جنسیت علف‌خواران اهلی و گوزن

منبع	دقت کار	اندازه باند متفاوت	مارکر ژنتیکی ژن کاندید	حیوان
Shi و همکاران (۲۰۰۵)	٪۱۰۰	ماده=۲۹۸ نر=۱۶۲-۲۹۸	SRY	بز
Chen و همکاران (۲۰۰۷)	٪۹۴/۷	ماده=۲۶۲ نر=۲۰۲-۲۶۲	Amelogenin	
Gour و همکاران (۲۰۰۸)	-	نر=۱۲۲-۲۱۸ ماده=۲۱۸	SRY GAPDH	بز، گوسفند، گاو
Mara و همکاران (۲۰۰۴)	٪۹۱/۲	نر=۳۰۱-۲۱۸ ماده=۲۱۶	SRY	گاو
Gokulakrishnan و همکاران (۲۰۱۲)	٪۱۰۰	ماده=۲۰۸ نر=۱۸۴-۲۰۸ نر=۱۶۲-۲۹۸ ماده=۲۹۸	DDX ₃ HMG	
Salabi و همکاران (۲۰۱۴)	٪۱۰۰	ماده=۴۸۵ نر=۳۹۵-۴۸۵	Amelogenin	گوسفند
Saravanan و همکاران (۲۰۰۳)	٪۸۳/۳	نر=۱۷۲-۲۷۳-۴۴۵ ماده=۲۷۳-۱۷۲	ZFY/ZFX	
Umauci و همکاران (۲۰۰۰)	٪۸۳/۳	ماده=۲۱۹ نر=۱۶۵-۲۱۹	AMEL	Sika deer
Barbosa و همکاران (۲۰۰۹)	-	ماده=۳۵۰ نر=۲۰۰-۳۵۰	DBY	Red deer
Qiao و همکاران (۲۰۰۷)	٪۱۰۰	ماده=۲۱۲-۴۴۷ نر=۲۷۸-۲۱۲-۴۴۷	ZFY/ZFX	Forest Musk Deer

گونه متغیر بود اما الگوی تفکیکی تقریباً مشابهی را بین نر و ماده ایجاد می‌کرد. هم‌چنین، الگوهای الکتروفورزی، در بعضی گونه‌ها به‌طور اجتناب ناپذیری همراه یک باند کاذب بود که خوشبختانه در پروسه تعیین

نتایج پژوهش حاضر، به روشنی وجود تفاوت الگوی باندی بین جنس نر و ماده را نشان داد. اندازه باند تکثیر شده از این آغازگرهای یکسان بسته به نوع گونه و هم‌چنین نژاد، در هر



۱۳. Mara, L.; Pilichi, S.; Sanna, A.; Accardo, C.; Chessa, B.; Chessa, F.; Dattena, M.; Bomboi, G. and Cappai, P., 2004. Sexing of in vitro produced ovine embryos by duplex PCR. *Mol Reprod Dev.* Vol. 69, pp: 35-42.
۱۴. Mathai, C.; Ohno, S. and Beutler, E., 1966. Sex-linkage of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene in Equidae. *Nature.* Vol. 210, pp: 115-116.
۱۵. Pfeiffer, I. and Brenig, B., 2005. X-and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*). *BMC genetics.* Vol. 6, pp: 16-22.
۱۶. Qiao, Y.; Zou, F.; Wei, K. and Yue, B., 2007. A rapid sex identification test for the forest musk deer (*Moschus berezovskii*) based on the ZFX/ZFY gene. *Zoological science.* Vol. 24, pp: 493-496.
۱۷. Salabi, F.; Nazari, M. and Cao, W., 2014. Cell culture sex determination and single cell cloning of ovine transgenic satellite cells in vitro. *Journal of Biological Research.* Vol. 12, pp: 56-68.
۱۸. Salido, E.C.; Yen, P.; Koprivnikar, K.; Yu, L. and Shapiro, L., 1992. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *American journal of human genetics.* Vol. 50, No. 2, pp: 303-316.
۱۹. Samadi shams, S.; Zununi, V.; Soltanzad, F.; Kafil, V.; Barzegari, A.; Atashpaz, S. and Barar, J., 2011. Highly effective DNA extraction method from fresh, frozen, dried and clotted blood samples. *Bio Impacts.* Vol. 4, pp: 183-187.
۲۰. Saravanan, T.; Nainar, A.; Kathaperumal, K. and Kumaresan, A., 2003. Sexing of Sheep Embryos Produced in vitro by Polymerase Chain Reaction and Sex-specific Polymorphism. *Asian-Australas J Anim Sci.* Vol. 16, pp: 650-654.
۲۱. Shi, L.; Yue, W.; Ren, Y.; Lei, F. and Zhao, J., 2008. Sex determination in goat by amplification of the HMG box using duplex PCR. *Animal reproduction science.* Vol. 105, pp: 398-403.
۲۲. Sidorova, J.V.; Biderman, B.V.; Nikulina, E.E. and Sudarikov, A.B., 2012. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. *Experimental dermatology.* Vol. 21, pp: 57-60.
۲۳. Stouthamer, R.; Luck, R.F. and Werren, J.H., 1992. Genetics of sex determination and the improvement of biological control using parasitoids. *Environmental Entomology.* Vol. 21, pp: 427-435.
۲۴. Tolleson, D.R.; Osborn, R.G.; Stuth, J.W.; Ginnett, T.F. and Applegath, M.T., 2000. Determination of dietary tannin concentration in white-tailed deer via near infrared reflectance spectroscopy of feces. In: *Proceedings of the 1st National Conference on Grazinglands, Las Vegas, Nevada, 5-8 December 2000*, pp: 727-733.
۲۵. Ventrella, D.; Elmi, A.; Barone, F.; Carnevali, G.; Govoni, N. and Bacci, M., 2018. Hair testosterone and cortisol concentrations in pre-and post-rut roe deer bucks: Correlations with blood levels and testicular morphometric parameters. *Animals.* Vol. 8, No. 7, pp: 113.
۲۶. Wilson, P. and White, B., 1998. Sex identification of elk (*Cervus elaphus canadensis*), moose (*Alces alces*), and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) using the polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Science.* Vol. 43, pp: 477-482.
۲۷. Yamauchi, K.; Hamasaki, S.-i.; Miyazaki, K.; Kikusui, T.; Takeuchi, Y. and Mori, Y., 2000. Sex determination based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in sika deer (*Cervus nippon*). *J of JVMS.* Vol. 62, pp: 669-671.
۲۸. Zhou, Y.; Liu, J.; Jiang, X.; Li, S.; Yang, S. and Chen, A., 2013. A simple method to extract DNA from hair shafts using enzymatic laundry powder. *PloS one* 8, e69588.
۲۹. Zhang, B.W.; Li, M.; Ma, L.C. and Wei, F.W., 2006. A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochemical genetics.* Vol. 44, pp: 503-512.

جنسیت اختلالی ایجاد نمی‌کرد. با توجه به مشاهدات به‌دست آمده در این پژوهش، تفاوت واریانت‌های نوکلئوتیدی اختصاصی بین ژن‌های آمیلوژنین را می‌توان ابزاری مناسب سریع و با کاربری آسان برای پیش‌انتخاب و شناسایی جنسیت در گونه‌های دامی با ارزش اقتصادی دانست. تخمین اندازه موثر جمعیت از روی نتایج حاصل، نشان داد که تعداد گوزن نر در زیستگاه ارسباران کمتر ماده‌ها می‌باشد که با توجه به سیستم چندهمسری مرال‌ها و تشکیل حرم‌سرا توسط نرها این نسبت جنسی منطقی به‌نظر می‌رسد.

منابع

۱. اکرامی، ب.، ۱۳۹۶. تولیدمثل گوزن قرمز خزری *Cervus elaphus maral* در پناهگاه حیات‌وحش سمسکنده، ساری. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۰، شماره ۴، صفحات ۵۸۱ تا ۵۸۴.
۲. سیدشریفی، ر.؛ طاهر سولا، ه.؛ هدایت‌ایوریک، ن.؛ سیف‌دواتی، ج.؛ عبدی، ح. و بوستان، آ.، ۱۳۹۷. تحلیل اقتصادی گوسفند مغانی در طول چرخه تولید سالانه در دو سیستم مختلف پرورشی. فصلنامه محیط‌زیست جانوری. دوره ۱۰، شماره ۴، صفحات ۹۹ تا ۱۰۶.
۳. Barbosa, A.M.; Fernández-García, J. and Carranza, J.A., 2009. New marker for rapid sex identification of red deer (*Cervus elaphus*). *Hystrix It. J. Mamm.* Vol. 20, No. 2, pp: 169-172.
۴. Chen, A.Q., 2007. Sexing goat embryos by PCR amplification of X-and Y-chromosome specific sequence of the Amelogenin gene. *Asian-Australas J Anim Sci.* Vol. 20, pp: 1689-1693.
۵. Farahvash, T.; Vaez Torshizi, R.; Masoudi, A.; Rezaei, H. and Tavallaei, M., 2016. AMELX and AMELY Structure and Application for Sex Determination of Iranian Maral deer (*Cervus elaphus maral*). *Iranian Journal of Applied Animal Science.* Vol. 6, pp: 963-968.
۶. Gibson, C.; Golub, E.; Herold, R.; Risser, M.; Ding, W.; Shimokawa, H.; Young, M.; Termine, J. and Rosenbloom, J., 1991. Structure and expression of the bovine amelogenin gene. *Biochemistry.* Vol. 30, pp: 1075-1079.
۷. Godfrey, R.; Dodson, R.; Bultman, J.; Tolleson, D.; Stuth, J. and Norman, A., 2001. Use of near infrared reflectance spectroscopy to differentiate pregnancy status and gender of hair sheep in the tropics. *J. Anim. Sci.* Vol. 79, No. 26.
۸. Gokulakrishnan, P.; Kumar, R.; Sharma, B.; Mendiratta, S. and Sharma, D., 2012. Sex determination of cattle meat by polymerase chain reaction amplification of the DEAD box protein (DDX3X/DDX3Y) gene. *Asian-Australas J Anim Sci.* Vol. 25, No. 5, pp: 733-737.
۹. Gour, D.S.; Dubey, P.P.; Jain, A.; Gupta, S.C.; Joshi, B.K. and Kumar, D., 2008. Sex determination in 6 bovid species by duplex PCR. *JAG.* Vol. 49, pp: 379-381.
۱۰. Guttenbach, M.; Michelmann, H.; Hinney, B.; Engel, W. and Schmid, M., 1997. Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47, XXY Klinefelter's karyotype: a FISH analysis. *Human genetics.* Vol. 99, pp: 474-477.
۱۱. Leroy, G.T.; Mary-Huard, E.; Verrier, S.; Danvy, E. and Charvolin, A., 2013. Methods to estimate effective population size using pedigree data: Examples in dog, sheep, cattle and horse. *GSE.* Vol. 45, pp: 1-8.
۱۲. Mandrekar, P.V., 2002. Forensic extraction and isolation of DNA from hair, tissue and bone. *Profiles DNA.* Vol. 21, No. 5, pp: 11-13.



Nucleotide specific variants of the Amelogenin gene allow sex verification in livestock

- **Sevda Hosseinzadeh***: Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
- **Arash Javanmard**: Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
- **Shirin Mahmoodi**: Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
- **Javad Ghahari**: Department of Environmental Protection of East Azerbaijan Province, Tabriz, Iran
- **Mohammad Hosein Bana Bazi**: Iran Institute of Animal Science Research, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Received: December 2019

Accepted: March 2020

Key words: Sex verification, Amylogenin gene, Polymerase Chain Reaction

Abstract

in the breeding system, often one livestock is more valuable than the other the purpose of the present study was to use specific nucleotide variants between the amelogenin genes for sex determination in wild and domestic herbivores (sheep, goat, cattle and deer). For this purpose, whole blood and dung were about 59 studied animals were prepared and genomic DNA was extracted by commercial kit according to its supplementary instructions. The primers studied were selected and synthesized based on conserved regions in the phylogenetic gene sequence in the Gene Bank. The polymerase chain reaction was optimized according to existing standard protocols. The results clearly showed the existence of a bond pattern difference between males and females. The amplified band size of these identical primers varied depending on the species and the breed within each species. In some species, the electrophoretic patterns were inevitably coupled to a false band, which fortunately did not interfere with the sex determination process (Usually depending on race and age of deer is 4 (male) to 12 (female)). According to the observations obtained in this study, differences in specific nucleotide variants between Amelogenin genes can be considered as a suitable tool for pre-selection and sex identification in animal species.

* Corresponding Author's email: sevdahoseinzade72@yahoo.com

