Archive of SID

مقاله کوتاه

تعیین جنسیت شترمرغ با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی به روش PCR

مصطفی فغانی[1*]، عباس دوستی[1]

۱. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: *mostafafaghani @yahoo.com*

(دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۲۲، پذیرش نهایی: ۸۹/۲/۲۳)

چکیده

پرورش شتر مرغ (*Struthio camelus*) از اهمیت روز افزونی در سطح جهان برخوردار است. همچنین، پرورش شترمرغ در ایران به طرز چشمگیری در حال افزایش است. در بسیاری از پرندگان، تمایز بین جنس‌های نر و ماده، از روی شکل ظاهری به‌خصوص در مورد پرندگان جوان بسیار مشکل است. هدف از این تحقیق، شناسایی و توسعه نشانگرهای ژنتیکی برای تعیین جنسیت شتر مرغ با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌باشد. در این بررسی، از نمونه‌های خون و پر شترمرغ‌های نر و ماده (۲۰ قطعه) استخراج DNA صورت پذیرفت. برای انجام PCR از یک جفت پرایمر مخصوص شناسایی کرومزوم W بهره گرفته شد. نتایج نشان‌دهنده یک قطعه ٦٤٨ جفت بازی برای شترمرغ‌های با جنسیت ماده بود و از طرفی پس از انجام آزمایش، هیچ باندی برای نرها مشاهده نشد. بنابراین، روش استفاده از مارکرهای مولکولی، روشی سریع، دقیق و ارزان برای تعیین جنسیت گله‌های بزرگ شترمرغ می‌باشد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۳، ٦٠٤-٦٠١.
کلمات کلیدی: شترمرغ، تعیین جنسیت، نشانگرهای ژنتیکی

مقدمه

پرورش شترمرغ در سال‌های اخیر به‌طور گسترده در دنیا و همچنین در کشور ما توسعه یافته است. علت این افزایش به دلیل قابلیت این حیوان برای تولید گوشت با چربی پائین، چرم مناسب، روغن با کیفیت بالا و حاوی اسیدهای چرب غیراشباع بالا و پرهای تزئینی می‌باشد. پرورش این پرنده در نواحی گرم و خشک مانند آفریقا عمومی‌تر است زیرا این پرنده به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گرما مقاوم بوده و نیاز به آب کمی دارد و مقاومت آن در مناطق سردسیر نیز قابل ملاحظه می‌باشد (۲). یکی از مشکلات اساسی در پرورش این پرنده این است که جنسیت جوجه‌ها تا سن نزدیکی بلوغ یعنی در حدود ١٤ ماهگی مشخص نمی‌باشد و بایستی از تکنیک‌های تعیین جنسیت استفاده نمود. یک روش تعیین جنسیت مناسب باید دقیق، سریع و ارزان باشد. تکنیک‌های مرسوم تعیین جنسیت در این دام دقت مناسبی ندارد. به عنوان مثال تکنیک مشاهده یا

www.SID.ir

Archive of SID

لمس کلواک، علاوه بر درصد اشتباه بالا ممکن است در دام نیز استرس زیادی ایجاد کند (۲ و ٦). در تکنیک مشاهده کاریوتیپ نیز مشکلاتی مانند جدا نشدن کرومزوم‌های Z و W وجود دارد (۵). امروزه از تکنیک‌های مولکولی بر روی DNA در بسیاری از موجودات به‌ویژه طیور برای تعیین جنسیت استفاده می‌شود که از دقیق‌ترین و سریع‌ترین روش‌های تعیین جنسیت می‌باشد (۱). در سال‌های گذشته مطالعات مختلفی در رابطه با تعیین جنسیت در شترمرغ با استفاده از مارکرهای ژنتیکی ارائه شده است. در برخی از این مطالعات با کمک PCR و با استفاده از پرایمرهای تعیین جنسیت قطعاتی از DNA عمدتاً بر روی کرومزوم W در جنس ماده تکثیر شده و با کمک الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد شناسائی قرار می‌گیرد (۳). در بیشتر این مطالعات DNA مورد نیاز از خون استخراج گردیده است. در این مطالعه یک روش سریع، دقیق و ارزان تعیین جنسیت با کمک پرایمرهای تعیین جنسیت در جنس ماده شترمرغ و با استفاده از استخراج DNA از خون و پر ارائه شده است.

مواد و روش‌کار

در این تحقیق ابتدا ۲۰ قطعه شترمرغ شامل ۷ نر، ۷ ماده و ٦ جوجه نابالغ انتخاب گردید و نمونه‌های خون آنها در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه با استفاده از کیت استخراج DNA (ساخت شرکت سیناژن ایران)، DNA از نمونه‌های خون کامل استخراج گردید. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی کروموزوم W مطابق سکانس تعیین شده از روی مقالات مرتبط به شرح ذیل تکثیر قطعه مورد نظر با دستگاه PCR صورت گرفت (٤). توالی پرایمرها، پس از ارائه به شرکت سیناژن ایران، در حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر با OD برابر ۵، تهیه شد.

Primer F: 5'-TCTACACCTAAGGAGTCCCATATT-3'
Primer R: 5'GGTCTACACCTGTTGAAAATCATT-3'

غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش PCR، در حجم کل ۲۵ میکرولیتر به صورت ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز و ۲۰۰ میکرومولار dNTP Mix تعیین گردید. همچنین ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل برای جلوگیری از تبخیر شدن مخلوط PCR اضافه گردید. برای کنترل آزمایشات از شاهد منفی نیز استفاده شد که شامل مخلوط واکنشگرهای PCR به‌جزء DNA هدف بود که به آن، هم‌حجم DNA هدف، آب مقطر اضافه گردید.

برنامه دمائی واکنش PCR به ترتیب یک مرحله به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه دمائی به ترتیب ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله نهائی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه تنظیم گردید. یک میکرولیتر از محصولات PCR به همراه ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری (Loading Buffer) روی ژل آگارز ۱/۵ درصد دارای رنگ اتیدیوم بروماید برده شد و پس از مشاهده با نور ماورای بنفش (UV) عکس‌برداری انجام گرفت.

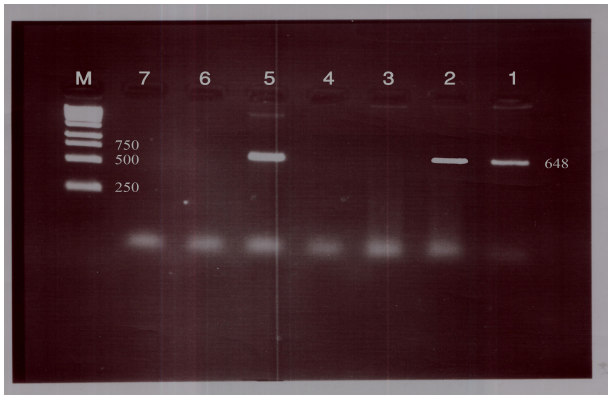
پس از تنظیم روش استخراج DNA و تکنیک PCR و اطمینان گرفتن از نتایج صحیح در خصوص تعیین جنسیت، در مرحله بعد استخراج DNA از کالاموس پر، مدنظر قرار گرفت و پس از تهیه نمونه‌های مورد نظر کلیه مراحل و روش‌های کار مشابه مراحل فوق صورت پذیرفت. این مرحله از نظر سهولت کار در مزارع پرورشی و کاهش استرس نمونه‌گیری به‌خصوص با توجه به مشکل خون‌گیری در پرنده‌های کوچک از اهمیت بالائی برخوردار می‌باشد. با توجه به تعداد نمونه آزمایش شده و با توجه به قانون توزیع دو جمله‌ای دقت این روش در حدود ۱۰۰ درصد می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

از نمونه‌های خون، DNA ژنومی با موفقیت استخراج گردید. انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی تعیین جنسیت در شترمرغ و مشاهده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان‌دهنده تکثیر یک قطعه DNA به طول ٦٤٨ جفت باز برای جنس ماده بود. همین نتایج در نمونه‌های DNA استخراج شده از کالاموس پر حاصل گردید که در نگاره ۱ برخی موارد آورده شده است.



نگاره ۱- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR که شماره‌های ۱ و ۲ پرندگان ماده بالغ، شماره‌های ۳ و ٤ پرندگان بالغ نر و شماره‌های ۵ و ٦ پرندگان نابالغ بوده‌اند که ۵ ماده و ٦ نر تشخیص داده شد. شماره ۷ هم شاهد منفی می‌باشد و مارکر مورد استفاده 1Kb است.

همان‌طور که در تصویر نیز مشخص می‌باشد، پس از الکتروفورز محصولات PCR در جنس ماده یک باند مشخص گردید که جنس نر فاقد این باند بود. این نتایج حاکی از وجه تمایز جنسیت نمونه‌های مورد بررسی و وجود توالی ژن W در جنس ماده می‌باشد. با توجه به تعداد نمونه آزمایش شده و با توجه به قانون توزیع دو جمله‌ای دقت این روش در حدود ۱۰۰ درصد می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در پرندگان کروموزوم‌های جنسی در جنس‌های نر و ماده به ترتیب ZZ و ZW می‌باشند. یعنی در جنس ماده کروموزوم W وجود دارد که جنس نر فاقد این کروموزوم می‌باشد. اکثر روش‌های تعیین جنسیت با استفاده از مارکرهای DNA در پرندگان نیز از مارکرهای متصل به کروموزوم W (W-linked marker) استفاده کرده‌اند (۳). شترمرغ نیز از این قاعده مستثنی نبوده و بنابراین مارکر شناسائی شده در این مطالعه یک مارکر متصل به کروموزوم W می‌باشد.

از تکنیک‌های مختلفی نیز برای شناسائی این مارکرها استفاده می‌شود مانند RAPD، PCR، RFLP و غیره. تکنیک RAPD از جهاتی ارزان‌تر و راحت‌تر می‌باشد، اما در این تکنیک از آغازگرهای کوتاه‌تر استفاده می‌شود و احتمال مشاهده باندهای اضافی وجود دارد و همچنین تکرارپذیری پائینی دارد. بنابراین در این مطالعه از تکنیک PCR استفاده شد که در نتیجه یک روش با دقت بالا و قابل استفاده در اکثر آزمایشگاه‌های مولکولی کشور طراحی گردید.

در این مطالعه همچنین جهت استخراج DNA از نمونه‌های کالاموس پر نیز استفاده گردید، که این روش نیز کمک زیادی به سهولت نمونه‌گیری و کاهش استرس دام هنگام نمونه‌گیری می‌نماید. نمونه‌های DNA استخراج شده از پر نیز از کیفیت بالائی برخوردار بوده و به راحتی در آزمایشات قابل استفاده می‌باشند. نتیجه حاصله از این مطالعه با نتایج تحقیقات Malago و همکاران (۲۰۰۲) در این رابطه تطابق داشت (٤). بنابراین، استفاده از مارکرهای ژنتیکی به روش PCR یک روش سریع، دقیق و ارزان برای تعیین جنسیت در شترمرغ می‌باشد که می‌توان از آن برای انجام دیگر تحقیقات در این دام مانند مقایسه عملکرد رشد جنس‌های نر و ماده در سنین پروار یا انتخاب پرنده‌های برتر اصلاح نژادی جهت جایگزینی در مزارع پرورشی به منظور تولید بیشتر استفاده‌های فراوان نمود.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از زحمات کلیه کارکنان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تقدیر و تشکر می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

فهرست منابع

1. Feridolfsson, A. and Ellegren, H. (1999): A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. Journal of Avian Biology, 30: 116-121.
2. Hinckley, D., Park, R., Xiong, S., Andersen, W. and Kooyman, D. (2005): Identification and development of sex specific DNA markers in the Ostrich using polymerase chain reaction. International journal of Poultry Science, 4(9): 663-669.
3. Leon, H., Craig, M. and David, L. (2002): A DNA test to sex ratite birds. Molecular Ecology, 11: 851-856.
4. MalagÓ, W., Heito, R.M., Euclides, M., Adriana, M. and Flavio, H. (2002): Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. BMC Biotechnology, 2: 19.
5. Ogawa, A., Murata, K. and Mizuno, S. (1998): The location of Z and W-linked marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosomes of the ostrich and the emu. Proceedings of the national academy of science of the USA, 95: 4415-4418.
6. Samour, J., Markham, J. and Neiva, O. (1984): Sexing ratite birds by cloacal examination. Veterinary Research, 5: 167-169.

www.SID.ir