Archive of SID

Iranian Journal of Animal Science
Vol 49, No 2, Summer 2018 (257-265)
DOI: 10.22059/ijas.2018.250993.653611

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۷ (ص ۲۶۵-۲۵۷)

تعیین جنسیت قناری بر پایهٔ ژن CHD مربوط به کروموزوم‌های جنسی با استفاده از پر

حمیدرضا عبداللهی[۱]، حسن مهربانی یگانه[۲*] و حسین مرادی شهربابک[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۰)

چکیده

هدف از این تحقیق استفاده از پر به‌عنوان روشی ساده، سریع، کم‌هزینه، بدون خطر و ایمن و مطمئن برای تعیین جنسیت قناری در اوایل تولد، برای کمک به برنامه‌های اصلاح نژادی و پرورش این پرنده است. شکل ظاهری جنس نر و مادهٔ بسیاری از پرندگان از جمله قناری تا حدودی همانند هم بوده و تشخیص جنسیت آن‌ها بسیار دشوار است. با استفاده از این روش مولکولی بر پایهٔ اختلاف طول ژن Chromo-helicase-DNA (CHD) در کروموزوم‌های جنسی Z و W و با به‌کارگیری روش PCR می‌توان در بدو تولد جنسیت پرنده را تشخیص داد. در این بررسی از خون و پر ۱۴۰ قطعه قناری از ده نژاد مختلف نمونه‌گیری و استخراج DNA انجام شد. لازم به یادآوری است در آغاز پنج جفت آغازگر برای انجام PCR طراحی و درنهایت یک جفت آغازگر اختصاصی بر پایهٔ دقت تشخیص جنسیت تأیید و استفاده شد. نتایج نشان‌دهندهٔ افزونش قطعهٔ DNA به طول ۲۵۲ جفت باز در جنس نر (ZZ) و دو قطعه به طول‌های ۲۵۲ و ۳۰۹ جفت باز (تفاوت ۵۷ جفت بازی) در جنس ماده (ZW) بود. توالی‌یابی DNA این دو قطعه انجام شد و برای نخستین بار توالی این دو قطعه از ژن CHD در گونهٔ قناری به نام‌های CHDZ-1 و CHDW-1 با شماره‌های شناسایی MG679825.1 و MG679826.1 در سایت NCBI ثبت شد. با توجه به نتایج، می‌توان از این روش، که برای نخستین بار با استفاده از توالی DNA ژن CHD قناری به دست آمد به‌عنوان روشی کاربردی و مطمئن برای تعیین جنسیت قناری استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تعیین جنسیت، روش مولکولی، ژنCHD، قناری، PCR.

Sex determination in the canary based on the CHD gene located at the sex chromosome using feather

Hamidreza Abdollahi[1], Hassan Mehrabani Yeganeh[2*] and Hossein Moradi Shahrbabak[3]
1, 2, 3. Former M. Sc. Student, Associat Professor and Assistant Professor, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Jan. 27, 2018 - Accepted: Mar. 1, 2018)

ABSTRACT

The aim of this research was to utilize a simple, rapid, cheap and safe method for sex determination of newly born canaries through feather to help accurately breeding this bird. The external morphology of males and females of many birds such as canary are fairly similar to each other, Therefore, determining their sexes is very difficult. The different length of CHD (chromo-helicase-DNA-binding) gene in Z and W chromosomes can recignized by using molecular technique based and PCR method, for the sex determination of young birds. In this study, blood and feathers samples of 140 canaries from 10 different breeds were used and their DNA were extracted. It should be mentioned that for PCR, at first 5 primers designed and finally 1 specific primer were confirmed and used. The results showed that the amplification of a fragment with the length of 252 bp for males (ZZ) and two fragments with the lengths of 252 and 309 bp for female (ZW). The bands had a length difference of 57 bp. The DNA sequencing of these two fragments was done for the first time, the sequence of these two fragments of the CHD gene in canary species was submitted and accepted in the NCBI site under the names of CHDZ-1 and CHDW-1 with the accession numbers of MG679825.1 and MG679826.1.

Keywords: Canary, CHD gene, molecular technique, PCR, sex determination.

* Corresponding author E-mail: hmehrabani@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

قناری نام علمی، *Serinus canaria* (Sangster *et al.*, 2016) پرنده‌ای متعلق به راستهٔ گنجشک‌سانان[1]، خانوادهٔ سهرگان[2] و است و به دو صورت اهلی و وحشی وجود دارد. تاریخچهٔ پرورش قناری به بیش از پنج سده در جهان (Koch & Hill, 2015) و یک سده در ایران (Moghaddas, 2011) می‌رسد. این پرنده به سه دستهٔ کلی آوازخوان، رنگی و دارای شکل بدنی خاص تقسیم شده و ده‌ها نژاد مختلف دارد. تنها جنس نر این پرنده قادر به خواندن آواز است و در نژادهای آوازخوان جنس نر ارزش اقتصادی بیشتری نسبت به جنس ماده دارد. البته در بعضی نژادهای خاص (با شرایط یکسان فیزیکی نر و ماده)، جنس ماده ارزش اقتصادی بیشتری دارد.

برای تعیین جنسیت قناری با روش‌های معمول باید تا رسیدن پرنده به سن بلوغ (حدود نه‌ماهگی) و آماده شدن برای تولیدمثل، منتظر ماند. در آن هنگام اندام‌های تناسلی جنس نر و ماده شکل متفاوتی پیدا می‌کنند که تشخیص جنسیت را ممکن می‌سازد و در همان زمان است که پرندهٔ نر آغاز به آواز خواندن می‌کند (Moghaddas, 2011). این تأخیر در تشخیص جنسیت قناری، دشواری‌هایی را در فروش، نگهداری و اصلاح نژاد آن ایجاد می‌کند. درصورتی‌که بتوان تعیین جنسیت را در اوان زندگی انجام داد این دشواری‌ها کاهش یافته و به لحاظ اقتصادی نیز سود بیشتری عاید پرورش‌دهندگان می‌شود.

جنس نر و مادهٔ قناری و بیش از ۵۰ درصد پرندگان مانند مینا و کاسکو، از لحاظ ظاهری بسیار همسان است (به‌ویژه در آغاز تولد و دوران پیش از بلوغ) و شناسایی جنسیت آن‌ها بر پایهٔ شکل ظاهری به‌علت نداشتن اندام جنسی خارجی، بسیار دشوار است و این چالشی بزرگ برای جانورشناسان و پرورش‌دهندگان این پرندگان است (Griffiths *et al.*, 1998). برای تعیین جنسیت این نوع پرندگان از روش‌های مختلفی از جمله روش‌های زیر استفاده می‌شود:

۱) مشاهدهٔ رفتار پرنده ۲) اختلاف در صفات ظاهری ۳) معاینهٔ غدد جنسی به‌وسیلهٔ لاپاراسکوپی ۴) تعیین کاریوتایپ ۵) بررسی کروموزوم‌های جنسی. روش اول مستلزم بلوغ پرنده و زمان تولیدمثل است و روش دوم قابل‌اطمینان نیست، روش لاپاراسکوپی هم در قناری بسیار دشوار و خطرهای فراوان دارد و حتی می‌تواند منجر به مرگ پرنده شود. روش تعیین کاریوتایپ نیز پرهزینه و زمان‌بر است. با پیشرفت‌های بزرگی که در علم ژنتیک مولکولی رخ داده است تا حد زیادی بر این دشواری‌ها غلبه شده است. با توجه به اینکه روش‌های مبتنی بر PCR در بسیاری از تحقیقات مولکولی جزء روش‌های رایج آزمایشگاه‌های زیستی است (Law *et al.*, 2015; Centeno *et al.*, 2017) و در مقایسه با روش‌های سنتی سریع‌تر و قابل‌اعتمادتر بوده (Ahsani *et al.*, 2011) و تشخیص مستقیم را فراهم می‌آورد (Ahsani *et al.*, 2010) لذا استفاده از روش‌های مولکولی بر پایهٔ DNA، با کمک PCR به‌عنوان یکی از بهترین روش‌ها برای تمایز پرندگان نر و ماده است (Ciorpac *et al.*, 2016; Cerit & Avanus, 2008). به‌طورکلی جنسیت فرد به‌وسیلهٔ ژن‌های موجود روی کروموزوم‌های جنسی مشخص می‌شود. در پستانداران این کروموزوم متمایزکننده، Y نام گرفته که وجود آن نشانهٔ جنسیت نر و نبود آن نشانهٔ جنسیت ماده است، ولی در پرندگان این کروموزوم W نام دارد و برخلاف پستانداران وجود آن نشانگر جنس ماده و نبود آن نشانهٔ جنس نر است. پرندهٔ نر جورگامت (هموگامت) یا ZZ و پرندهٔ ماده ناجورگامت (هتروگامت) یا ZW است (Nanda *et al.*, 1999; Fridolfsson & Ellegren, 1999).

ژن CHD روی کروموزوم‌های جنسی قرار دارد که بسیار محافظت‌شده است. در پرندگان بزرگ جثه مانند شترمرغ، این ژن از لحاظ طول و نوع بازها در دو کروموزوم Z و W بسیار همانند هم بوده، ولی در بسیاری از پرندگان کوچک‌جثه مانند قناری و پرندگان همسان، در توالی اگزونی از لحاظ شمار و نوع بازها بسیار همانند هم ولی در قسمت اینترونی اختلاف طول دارند. به همین دلیل این ژن در کروموزوم W بلندتر از کروموزوم Z است (Griffiths *et al.*, 1998;

1. *Passeriformes*
2. *Fringillidae*

www.SID.ir

Archive of SID

Cerit & Avanus, 2008). لذا اگر یک جفت آغازگر (رفت‌وبرگشت)، طوری طراحی شود که PCR قادر به افزونش بخشی از ژن مورد نظر در دو کروموزوم جنسی یک پرنده باشد و قطعهٔ افزونش‌شده در دو جنس نر و ماده اختلاف طول قابل تشخیص روی ژل آگارز داشته و همچنین روی نژادهای مختلف آن پرنده این قابلیت وجود داشته باشد، می‌توان با استفاده از آن به‌سادگی این‌گونه پرندگان را تعیین جنسیت کرد.

با توجه به اینکه قناری جثه‌ای کوچک داشته و به عامل‌های تنش‌زا بسیار حساس است، لذا خون‌گیری از این پرنده خطرناک و حتی می‌تواند مرگ‌آفرین باشد. بنابراین بهترین گزینه برای دستیابی به DNA این پرندگان، استفاده از پر دم و یا پر بال است.

گروهی از محققان ژنتیک با نمونه‌گیری از ۸۵ قطعه پرنده شامل ۳۶ گونه، برای بهینه‌سازی روش ژنتیکی شناسایی جنسیت این پرندگان بر پایهٔ روش‌های مولکولی مرتبط با ژن CHD اقدام کردند و با استفاده از آغازگرهای P2 و P8 همهٔ ۸۵ پرنده را به‌درستی تعیین جنسیت کردند (Griffiths *et al.*, 1998). همچنین، مشخص کردند که اختلاف طول اینترون مورد بررسی در گونه‌های مختلف، متفاوت است (Gábor *et al.*, 2014).

با توجه به نبود آغازگرهای تخصصی برای تعیین جنسیت قناری و اهمیت شناخت جنسیت در پرورش این پرنده، هدف این پژوهش تعیین جنسیت قناری از آغاز دوران زندگی با استفاده از روش‌های مولکولی بر پایهٔ DNA، با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است.

با مرور مقاله‌ها و گزارش‌های منتشرشده و توالی‌های ثبت‌شده برای تعیین جنسیت پرندگانی مانند عروس هلندی[1] (Cerit & Avanus, 2008)، پاشلک معمولی[2] (Włodarczyk *et al.*, 2011)، سسک نما[3] (Doosti *et al.*, 2009)، طوطی خاکستری آفریقایی[4] (Vucicevic *et al.*, 2013) و مرغ[5] (Khaerunnisa *et al.*, 2013)، اگزون‌های شماره (۹ و ۱۰)، (۱۷ و ۱۸)، (۲۳ و ۲۴) و اینترون‌های بین آن‌ها بررسی شده‌اند (جدول ۱).

با توجه به بررسی‌های صورت گرفته در ارتباط با ژن CHD برای تعیین جنسیت پرندگان (جدول ۱)، بیشترین بررسی‌ها روی اگزون‌های ۲۳ و ۲۴ انجام پذیرفته و همچنین مشخص شد که اختلاف طول بین اینترون‌های این ژن در گونه‌های مختلف پرندگان متفاوت است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این بررسی ۱۴۰ قطعه قناری از هفت سالن پرورش در استان تهران نمونه‌گیری شد. در آغاز ۱۳ قطعه قناری شامل هشت ماده و پنج نر انتخاب و از هرکدام به میزان ۰/۵ تا ۱ میلی‌لیتر خون گرفته شد. نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی مادهٔ ضد انعقاد (EDTA) گردآوری و سپس ۱۲۷ قطعه قناری دیگر شامل ۶۸ ماده و ۵۹ نر انتخاب و از هرکدام یک تا سه قطعه پر از ناحیهٔ دم یا بال جدا شده و در کیسه‌های جداگانهٔ زیپ‌دار قرار داده شدند. همهٔ نمونه‌ها درون فلاسک یخ به آزمایشگاه منتقل و درون فریزر نگهداری شدند. این ۱۲۷ قناری متعلق به ده نژاد مختلف شامل: ۱) آمیخته (*Cross*) شش نر و شش ماده، ۲) رسمی ایرانی (*Persian rasmi*) پنج نر و پنج ماده، ۳) لانکشایر (*Lancashire*) پنج نر و پنج ماده، ۴) کرست (*Crest*) پنج نر و پنج ماده، ۵) فری پاریسی (*Parisian frill*) چهار نر و شش ماده، ۶) گلاستر فنسی (*Gloster fancy*) هشت نر و هفت ماده، ۷) اُپال (*Opal*) هشت نر و نه ماده، ۸) جیبر (*Jiber*) چهار نر و دوازده ماده، ۹) موزاییک (*Mosaic*) نه نر و هفت ماده، ۱۰) فیورینو (*Fiorino*) پنج نر و شش ماده بودند.

1. *Nymphicus hollandicus*
2. *Gallinago gallinago*
3. *Hemispingus frontalis*
4. *Psittacus erithacus*
5. *Gallus gallus*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. اگزون‌های مورد بررسی ژن CHD مربوط به پرندگان مختلف در تحقیقات گذشته

Table 1. The studied exons of the CHD gene of different birds in previous researchs

Scientific name	Exon number in Z chromosome	Exon number in W chromosome	Length difference between introns in Z &W	Accession number
Nymphicus hollandicus	23,24	23,24	-	AF181828.1 & AF181827.1
Gallinago gallinago	23,24	-	-	KP243175.1
Hemispingus frontalis	23,24	23,24	39 bp	AF288491.1 & AF288510.1
Psittacus erithacus	9,10	23,24	30 bp	JX460793.1 & KF425694.1
Gallus gallus	17,18	17,18	92 bp	GU132943.1 & GU132944.1

استخراج DNA

در این تحقیق استخراج DNA از خون ۱۳ قطعه قناری به روش فنل کلروفرم انجام گرفت. ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از روش طیف‌سنجی با دستگاه نانودراپ و همچنین روی ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز افقی صورت گرفت. همچنین (پس از به نتیجه رسیدن تحقیق، برای آزمون نهایی)، استخراج DNA از پر ۱۲۷ قطعه قناری (شامل ۱ تا ۳ قطعه پر از ناحیهٔ دم یا بال قناری) با بهینه‌سازی روش‌های Hot Shot و فنل-کلروفرم انجام شد (Truett *et al*., 2000; Centeno *et al*., 2017).

روش کار استخراج از پر به‌این‌ترتیب بود که: ۵ میلی‌متر از انتهای کالاموس یک قطعه پر تازه دارای خون و یا دو تا سه قطعه پر خشک جداسازی و خرد و درون ریزلولهٔ (میکروتیوپ) ۰/۲۲ میلی‌لیتر ریخته شد و سپس ۳۰ میکرولیتر NaOH (0.2N) به آن افزوده شد و پس از ۳۰ ثانیه تکان دادن (ورتکس) درون دستگاه ترمال سایکلر با دمای $96\ C^{\circ}$ به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد و با افزودن ۲۰ میکرولیتر DDT و ۲۵ میکرولیتر Proteinase K و ۵ ثانیه تکان دادن درون هات پلیت با دمای $60C^{\circ}$ به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. مواد درون میکروتیوپ ۰/۲ به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر انتقال داده شد و سپس مقدار ۱۲۰ میکرولیتر Tris-HCl (0.04N) به آن اضافه و ۱۵ ثانیه تکان دادن شد. با افزودن ۴۰۰ میکرولیتر از ترکیب Phenol: Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1, v/v) و تکان دادن آن، در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای $4\ C^{\circ}$ قرار داده شد و پس از آن مایع رویی از میکروتیوپ خارج و به میکروتیوپ جدید منتقل شد. میزان ۴۰۰ میکرولیتر Chloroform به آن افزوده شد و در دستگاه سانتریفیوژ با شرایط بیان‌شده قرار گرفت و دوباره مایع رویی بیرون آورده و درون میکروتیوپ جدید ریخته شد. این مایع به‌عنوان مایع حاوی DNA استفاده شد و تعیین میزان و کیفیت DNA توسط روش طیف‌سنجی با دستگاه نانودراپ صورت پذیرفت.

بررسی ژن CHD و طراحی آغازگرهای اختصاصی

به‌منظور یافتن توالی ژن CHD در کروموزوم‌های جنسی W و Z مربوط به قناری، بانک‌های اطلاعاتی (پایگاه‌های داده) متفاوت از جمله DDBJ (ژاپن)، EMBL (اروپا) و NCBI (امریکا) جستجو و تنها رونویسی (ترانسکریپتوم) برآورد شده (Predicted) این ژن بدون نقشه‌یابی اگزون‌ها، به دست آمد و در ارتباط با توالی DNA این ژن در این‌گونه توالی ثبت‌شده‌ای وجود نداشت. (XM_018920545.1 و NCBI Reference Sequence: XM_018923511.1)

برای نقشه‌یابی اگزون‌های این ژن از نرم‌افزار Geneious استفاده شد و با هم‌ردیفی آن‌ها با توالی mRNA ژن CHD1 در انسان (NCBI Reference Sequence: NM_001270.2) جایگاه اگزون‌ها در قناری نقشه‌یابی شد.

با توجه به بررسی‌های تعیین جنسیت در پرندگان دیگر (جدول ۱) و پس از موقعیت‌یابی اگزون‌های ژن CHD در قناری، برای انجام این تحقیق از اگزون‌های (۱۰، ۱۱، ۱۲) و (۲۳، ۲۴، ۲۵،۲۶) و اینترون‌های میان آن‌ها استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزارهای primer3plus، OligoAnalyzer 3.1، OligoCalc و primer-blast، پنج جفت آغازگر مورد نیاز روی اگزون‌های هدف، طراحی و ساخت (سنتز) شدند (جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. آغازگرهای طراحی‌شده

Table 2. Designed primers

Primer	Exon	Primer sequence (5’ -> 3’)	Length
F10	9	AGCAGAAATCAATCCAAGACCAC	23
R10	10	CATGAGTGAGCAAGCCAATTC	21
F11	9	AGAAATCAATCCAAGACCACTCC	23
R11	12	GGCACAACCAACAAGAAAGG	20
F23.1	23	GCGAAGAATAGAAGAGGAGGAAAG	24
R23.1	24	GCCGTATCTCTGCATCACTAAATC	24
F23.2	23	TCCCAGAATGAGAAACTGTGC	21
R23.2	24	TGAGATGGAGTCACTATCAGATCC	24
F24	23	CTTCCAAGAATGAGAAACTGTGC	23
R24	26	GTACAAGCTCTCCCAAACGTC	21

PCR با شرایط زمانی و دمایی مناسب

نمونه‌های DNA استخراج‌شده از خون با پنج جفت آغازگر طراحی‌شده، آزمایش شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه ترموسایکلر (ساخت شرکت Bio-Rad مدل MySycler) با استفاده از پنج جفت آغازگر انجام شد. بهترین دمای اتصال هر جفت آغازگر و زمان مورد نیاز پس از آزمون گرادیانت تعیین شد (جدول ۳).

اجزای واکنش PCR و غلظت آن‌ها برای دست‌یابی به ۲۵ میکرولیتر محصول به‌شرح زیر بود:

نمونهٔ DNA 100 نانوگرم (۲/۵ میکرولیتر)، مسترمیکس (۱۲/۵ میکرولیتر) شامل: (یک واحد آنزیم، بافر 1X، میزان بازهای نوکلئوتید آزاد (dNTPs) ۰/۲ میلی‌مولار وMgCl2 با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار)، آغازگر رفت ۰/۳ میلی‌مولار (۱ میکرولیتر)، آغازگر برگشت ۰/۳ میلی‌مولار (۱ میکرولیتر) و آب مقطر دیونیزه (۸ میکرولیتر).

محصول‌های افزونش‌شده به همراه نشانگر اندازه[1] با شمارهٔ شناسایی (DM3100) روی ژل آگارز ۳درصد به‌مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز شدند و آنگاه از نوار (باند)های مربوطه توسط دستگاه ژل‌داک تصویربرداری شد.

توالی یابی

قطعه‌های به‌دست‌آمده از PCR با استفاده از جفت آغازگر رفت‌وبرگشت F(23.2) و R(23.2) برای توالی‌یابی DNA به شرکت ماکروژن (Macrogen) واقع در کرهٔ جنوبی ارسال شد. با توجه به اینکه طراحی آغازگرها بر پایهٔ رونویسی برآورد شده این ژن صورت گرفته بود لذا پس از توالی‌یابی این قطعه‌ها، برای رسیدن به نتیجهٔ مطلوب‌تر، این جفت آغازگر بر پایهٔ توالی به‌دست‌آمده دوباره اصلاح و طراحی شدند و جفت آغازگر F23.3 و R23.3 به‌عنوان جفت آغازگرهای نهایی استفاده شدند.

آزمایش جفت آغازگرهای (F23.3 و R23.3) روی DNA استخراج‌شده از پر

در آزمایش نهایی، از شمار ۱۲۷ نمونهٔ DNA استخراج‌شده از انتهای کالاموس پرهای بال و یا دم قناری با جنسیت مشخص، برای تعیین جنسیت استفاده شد. PCR با برنامهٔ گرمایی مربوط به جفت آغازگرهای ۲۳/۳ بنا بر برنامهٔ آغازگرهای ۲۳/۲ مندرج در جدول ۲ انجام شد و پس از افزونش قطعه‌های مورد نظر، محصول‌های به‌دست‌آمده به همراه نشانگر اندازهٔ مناسب روی ژل آگارز ۳درصد الکتروفورز و سپس توسط دستگاه ژل‌داک تصویربرداری شد.

نتایج و بحث

نتایج طیف‌سنجی DNA استخراج‌شده از خون و پر قناری با دستگاه نانودراپ، نشانگر کیفیت و کمیت مناسب DNA برای انجام PCR بود.

با هم‌ردیفی توالی mRNA قناری و انسان، جایگاه اگزونی ژن CHD در قناری نقشه‌یابی شد (شکل ۱).

نوارهای قابل مشاهده مربوط به ژلِ الکتروفورزِ قطعه‌های افزونش‌شده توسط PCR با استفاده از نمونه‌هایِ DNA استخراج‌شده از خون قناری با پنج جفت آغازگر طراحی‌شده است (شکل ۲).

1. DNA Lader or Size Marker

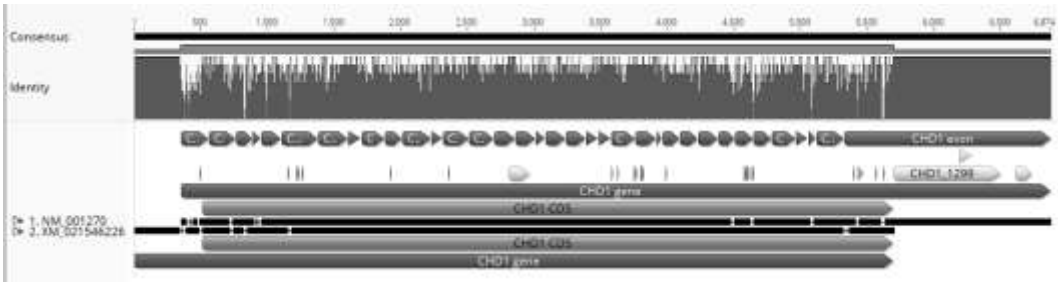
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. برنامهٔ دمایی و زمانی جایگاه‌های افزونش‌شده در PCR

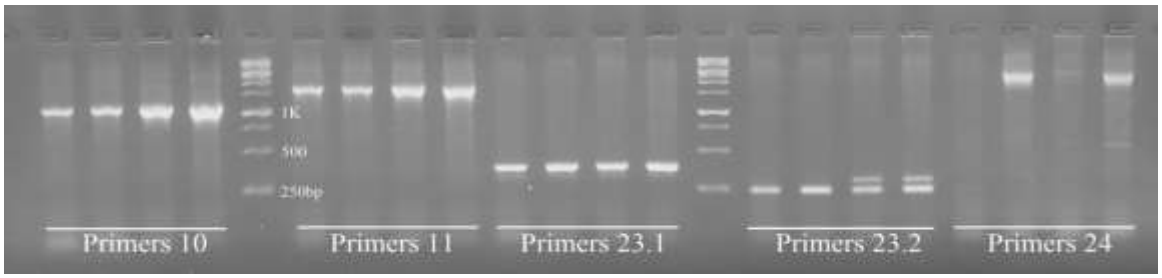
Table 3. Temperature and time features of different loci in PCR

Primer	Number of cycles	Primary Denaturation	Denaturation	Anneling	Extension	Final Extension
F,R(10)	35	94°C-5'	94°C-1'	66.1°C-40"	72°C-50"	72°C-5'
F,R(11)	35	94°C-5'	94°C-1'	60.2°C-40"	72°C-50"	72°C-5'
F,R(23.1)	35	94°C-5'	94°C-1'	63°C-40"	72°C-50"	72°C-5'
F,R(23.2)	35	94°C-5'	94°C-1'	57°C-40"	72°C-50"	72°C-5'
F,R(24)	35	94°C-5'	94°C-1'	58°C-40"	72°C-50"	72°C-5'



شکل ۱. هم‌ردیفی ژن CHD قناری و انسان با نرم‌افزار Geneious

Figure 1. The alignment of the CHD gene of canary and human



شکل ۲. نوارهای به‌دست‌آمده از آزمایش پنج جفت آغازگر طراحی‌شده روی نمونه‌های DNA استخراج‌شده از خون قناری با استفاده از PCR روی ژل آگارز ۳ درصد

Figure 2. Experimental bands of 5 primer pairs designed on DNA samples extracted from canary blood using PCR on 3% agarose gel

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است، با توجه به نشانگر اندازهٔ به‌کار گرفته‌شده، قطعه‌های مربوط به جفت آغازگر۱۰ طول بیش از ۱۰۰۰ و برای جفت آغازگر ۱۱ بیش از ۱۵۰۰ جفت باز داشتند که جداسازی این نوارها با اختلاف طول کم، دشوار است. جفت آغازگر ۲۳/۱ نیز تنها یک نوار داشته و این نشانهٔ عملکرد ناقص این آغازگرها در افزونش قطعهٔ مورد نظر در کروموزوم‌های Z و W است و همان‌طور که مشاهده می‌شود این جفت آغازگر تنها قطعه‌ای از ژن CHD از کروموزوم Z را که در هر دو جنس نر و ماده مشترک است را افزونش کرده‌اند. جفت آغازگر ۲۳/۲ محصول‌هایی تک نوار و دو نوار با طول حدود ۲۵۰ و ۳۰۰ جفت باز تولید کرده‌اند که نشان‌دهندهٔ وجود دو پرندهٔ نر (ZZ) و دو پرندهٔ ماده (ZW) است. قطعه‌های مربوط به آغازگرهای ۲۴ به‌علت طول بلندشان به‌خوبی افزونش نشده‌اند. لذا تمرکز اصلی ما روی آغازگرهای ۲۳/۲ بوده و از قطعه‌های افزونش‌شده به‌وسیلهٔ این جفت آغازگر برای توالی‌یابی و تعیین جنسیت به‌وسیلهٔ پر استفاده شد. پس از توالی‌یابی این قطعه‌ها و بررسی آن‌ها، توالی DNA قسمتی از ژن CHD روی کروموزوم‌های جنسی قناری تعیین و به‌نام‌های CHDW-1 و CHDZ-1 به طول ۳۰۹ و ۲۵۲ جفت باز با شماره‌های شناسایی MG679826.1 و MG679827.1 در سایت NCBI ثبت شد. شماری از بازها در اینترون قطعهٔ مربوط به کروموزوم Z حذف و همین امر باعث اختلاف طول بین این دو قطعه از ژن در اینترون ۲۳ به‌اندازهٔ ۵۷ جفت‌باز شده است (شکل‌های ۳ و ۴).

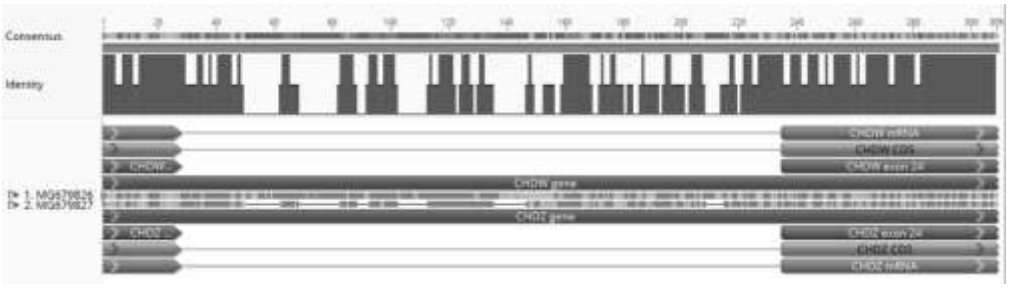
www.SID.ir

Archive of SID

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در شش قسمت از اینترون ۲۳ مربوط به ژن CHDZ در مقایسه با CHDW شماری از بازها حذف و درج (deletion and insertion) شده و همهٔ حذف‌ها در CHDZ صورت گرفته است. همین امر موجب اختلاف طول این دو قطعه از ژن به‌اندازهٔ ۵۷ جفت‌باز شده است.

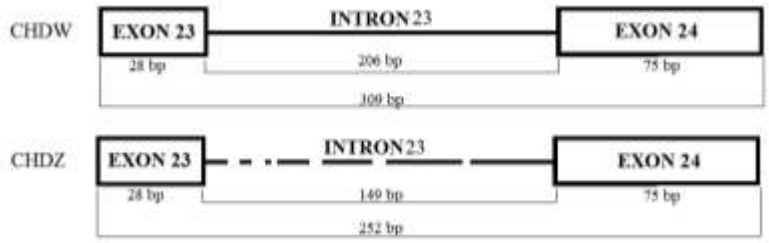
با مشخص شدن توالی DNA این قطعه‌ها و با اصلاح آغازگرهای ۲۳/۲، برای نتیجه‌گیری بهتر از PCR، آغازگرهای نهایی ۲۳/۳ طراحی شد (جدول ۴).

تصویر به‌دست‌آمده از ژلِ الکتروفورز قطعه‌های به‌دست‌آمده از PCR نمونهٔ DNAهای استخراج‌شده از کالاموس پر ۱۲۷ قطعه قناری با استفاده از جفت آغازگر ۲۳/۳، گویای نتیجهٔ شایان پذیرش این روش برای تعیین جنسیت قناری، با درستی بسیار بالا است. جنسیت همهٔ قناری‌های مورد آزمایش به‌درستی تشخیص داده شد. جنس نر یک نوار (۲۵۲ جفت‌باز) و ماده دو نوار (۳۰۹ و ۲۵۲ جفت‌باز) بسیار مشخص دارد (شکل ۵).



شکل ۳. هم‌ردیفی دو ژن CHDW-1 و CHDZ-1 با نرم‌افزار Geneious

Figure 3. The alignment of the two CHDW-1 and CHDZ-1 genes by Geneious software



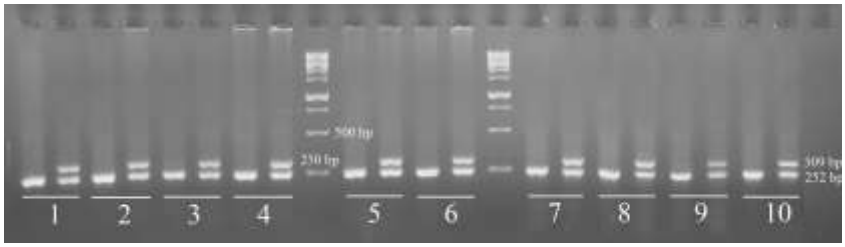
شکل ۴. اختلاف طول اینترون ۲۳ ژن‌های CHDW و CHDZ در قناری

Figure 4. The difference between the length of the intron 23 CHDW and CHDZ genes in canary

جدول ۴. جفت آغازگر نهایی (۲۳/۳)

Table 4. Final primers (23/3)

Primer name	Exon	Primer sequence (5’ -> 3’)	Length
F23.3	23	TCCAAGRATGAGRAACTGTGC	21
R23.3	24	TGAGACTGAGTCACTATCAGATCC	24



شکل ۵. نتایج ژل‌گذاری محصولات PCR به‌دست‌آمده از DNA استخراج‌شده از پر ده نژاد قناری

۱- آمیخته ۲- رسمی ۳- لانکشایر ۴- کرست ۵- فری پاریسی ۶- گلاستر فنسی ۷- اپال ۸- جیبر ۹- موزائیک ۱۰- فیورینو

Figure 5. Results of gelation of PCR products derived from DNA extracted from 10 Canary Canopy feathers. 1- Cross 2- Rasmi 3- Lancashire 4- Crest 5- Parisian Fril 6-Gloster Fancy 7- Opal 8- Jiber 9- Mosaik 10- Fiorino

www.SID.ir

Archive of SID

گروهی از محققان با نمونه‌گیری از ۲۸ گونه پرنده و تعیین جنسیت آن‌ها به روش مولکولی با استفاده از PCR و بر پایهٔ اختلاف طول ژن CHD در کروموزوم‌های جنسی، مشخص کردند که در اغلب موارد ژن CHDW (مربوط به جنس ماده) نسبت به ژن CHDZ محصول بلندتری را تولید می‌کند اما در حیوان‌هایی مانند کبوتر چاهی و زنبورعسل اروپایی این حالت معکوس بوده و در برخی پرندگان بزرگ‌جثه مانند شترمرغ و جغد جنگلی اندازهٔ طول این دو ژن تا حدودی با هم برابر است (Griffiths *et al*., 1998). نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نیز گویای آن است که در قناری اندازهٔ این ژن در کروموزوم جنسی W بلندتر از Z است.

در یک پژوهش با نمونه‌گیری از گونه‌های به‌نسبت دور از لحاظ تبارزایی (فیلوژنیکی) و استفاده از دستورکار (پروتکل)های مناسب، نتایج بسیار خوب و موفقیت‌آمیزی از تعیین جنسیت ۵۰ گونه پرنده با یک جفت آغازگر و تنها با تغییر جزئی در شرایط PCR و دستورکارهای حرارتی به‌دست آمد (Vucicevic *et al*., 2013). این محققان برای استخراج DNA از پر پرندگان از کیت استخراجی DNeasy®Blood & Tissue Kit, Cat. No 69504 ساخت شرکت Qiagen استفاده کردند و این در حالی است که در این تحقیق استخراج با استفاده از روشی بهینه‌شده که ساده، سریع و ارزان است صورت پذیرفت.

در بررسی دیگری با بررسی ژن CHD در پرندگان مختلف محققان دریافتند که به‌علت وجود چندشکلی (پلی‌مورفیسم) در جایگاه اینترون ژن CHD روش معمول در PCR در تعیین جنسیت بعضی گونه‌ها مانند *Fulica americana* دچار اشکال است و به‌صورت اشتباه در جنس نر دو قطعه نامساوی تولید می‌کند که با به‌کارگیری آغازگرهای مناسب می‌توان بر این نارسایی چیره شد (Shizuka & Lyon, 2008). ولی نتایج این تحقیق نشان داد، این نارسایی در قناری ایجاد نشده و با استفاده از روش معمول PCR در ۱۰ نژاد انتخاب‌شده در قناری تشخیص جنسیت به‌درستی انجام گرفت.

برای تعیین جنسیت قناری نیز تحقیقی صورت پذیرفته است، ولی به‌علت ثبت نشدن اطلاعات مربوط به‌توالی قناری در سال ۲۰۰۹ این محققان از توالی پرندهٔ دیگری به‌نام سسک‌نما با نام علمی *Hemispingus frontalis* استفاده کردند و آغازگرهای خود را بر پایهٔ این توالی طراحی کرده‌اند. محققان این پژوهش، اختلاف طول قطعه‌های افزونش‌شده را در کروموزوم‌های Z و W ۳۹ جفت‌باز (اختلاف طول در پرندهٔ سسک‌نما با شماره‌های شناسایی AF288510.1 و AF288491.1 اعلام کردند (Doosti *et al*., 2009). با بررسی‌های به‌عمل‌آمده مشخص شد، هر دو تحقیق اشاره‌شده، روی اگزون‌های ۲۳ و ۲۴ و اینترون ۲۳ صورت گرفته ولی اختلاف طول به‌دست‌آمده در این پژوهش ۵۷ جفت‌باز است که نشانگر نتایج متفاوت است.

بر پایهٔ توالی ثبت‌شده در سایت NCBI، موقعیت اگزونی ژن CHDZ مربوط به طوطی خاکستری آفریقایی با نام علمی *Psittacus erithacus*، اگزون ۹ و ۱۰ اعلام شده است (Gilbert & Silversides, 2012). در این بررسی با همردیفی این قطعه با توالی ژن CHD مشخص شد، موقعیت اگزونی این قطعه، مربوط به اگزون‌های ۲۳ و ۲۴ و اینترون ۲۳ است درصورتی‌که اگزون ۹ و ۱۰ اعلام شده است (Accession number: JX460793.1).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، مشخص شد که استفاده از پر برای تعیین جنسیت به روش مولکولی، بر پایهٔ اختلاف طول ژن CHD در کروموزوم‌های جنسی و با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) روشی ساده، کم‌هزینه، بی‌خطر و با درستی بسیار بالا است.

سپاسگزاری

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام پذیرفت. بر خود لازم می‌دانیم از همکاری صمیمانهٔ اساتید، دانشجویان و کارکنان محترم گروه علوم دامی پردیس که بنده را در این مسیر همراهی کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

1. Ahsani, M. R., Bafti, M. S., Esmailizadeh, A. K. & Mohammadabadi, M. R. (2011). Genotyping of isolates of Clostridium perfringens from vaccinated and unvaccinated sheep. *Small Ruminant Research*, 95(1), 65-69.
2. Ahsani, M. R., Mohammadabadi, M. R. & Shamsaddini, M. B. (2010). Clostridium perfringens isolate typing by multiplex PCR. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(4), 573-578.
3. Centeno-Cuadros, A., Abbasi, I. & Nathan, R. (2017). Sex Determination in the Wild: A Field Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification Successfully Determines Sex across Three Raptor Species. *Molecular Ecology Resources*, 17(2), 153-60
4. Cerit, H. & Avanus, K. (2008). Sex determination by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes in Nymphicus hollandicus. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31(6), 371-374.
5. Ciorpac, M., Druica, R. C., Ghiorghita, G., Cojocaru, D. & GORGAN, D. L. (2016). CHD genes: a reliable marker for bird populations and phylogenetic analysis? Case study of the superfamily Sylvioidea (Aves: Passeriformes). *Turkish Journal of Zoology*, 40(5), 749-757.
6. Doosti, A., Fathpour, H. & Moshkelani, S. (2009). Sex Identification in the Canary Using DNA Typing Methods. *Bjvm*, 12(3), 207-11.
7. Fridolfsson, A. K. & Ellegren, H. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*, 116-121.
8. Gábor, M., Miluchová, M., Trakovická, A., Hrnčár, C. & Radosová, E. (2014). Sex determination of superorder Neognathae (class Aves) by molecular genetics methods. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologie*s, 47(1), 69-72.
9. Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K. & Dawson, R. J. (1998). A DNA test to sex most birds." *Molecular Ecology*, 7(8), 1071-1075.
10. Khaerunnisa, I., Sari, E., Ulfah, M. & Sumantri, C. (2013). Avian Sex Determination Based on Chromo Helicase DNA-binding (CHD) Genes Using Polymerase Chain Reaction (PCR). *Media Peternakan*, 36(2), 85.
11. Koch, R. E. & Hill, G. E. (2015). Rapid evolution of bright monochromatism in the domestic Atlantic Canary (*Serinus canaria*). *The Wilson Journal of Ornithology*, 127(4), 615-621.
12. Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G. & Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, 770.
13. Moghaddas, E. (2011). Breeding, maintenance and canary diseases. *Nilouberg Publishing.* (in Farsi)
14. Nanda, I., Shan, Z., Schartl, M., Burt, D. W., Koehler, M., Nothwang, H. G., ... & Engel, W. (1999). 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nature Genetics*, 21(3), 258-259.
15. Sangster, G et al. (2016). Taxonomic Recommendations for Western Palearctic Birds: 11th Report. *Ibis*, 158(1), 206-12.
16. Shizuka, D. & Lyon, B. E. (2008). Improving the reliability of molecular sexing of birds using a W-specific marker. *Molecular Ecology Resources*, 8(6), 1249-1253.
17. Truett, G. E., Walker, J. A. & Baker, D. G. (2000). Eradication of infection with Helicobacter spp. by use of neonatal transfer. *Comparative Medicine*, 50(4), 444-451.
18. Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N. & Stanimirovic, Z. (2013). Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biology*, 32(3), 269-276.
19. Włodarczyk, R., Minias, P., Gogga, P., Kaczmarek, K., Remisiewicz, M. & Janiszewski, T. (2011). Sexing Common Snipe Gallinago gallinago in the field using biometric criteria. *Wader Study Group Bull*, 118(1), 10-13.

www.SID.ir