Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره سوم ، شماره۳ ، پاییز ۱۳۸۷
صفحه ۳٤-۳۱

تعیین جنسیت قناری با استفاده از نشانگر های ژنتیکی

عباس دوستی*، سعادت مشکلانی
مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : adleishmania@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۳۱ – تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۱۸)

چکیده

تعیین جنسیت اغلب پرندگان تا زمان بلوغ و حتی گاهی بعد از بلوغ امری نسبتا مشکل است. اما جنسیت پرندگان و سایر جانوران از بدو تشکیل نطفه، به لحاظ ژنتیکی معین است. امروزه با پیشرفت روش های مولکولی، تعیین جنسیت جانداران در هر مرحله از زندگی میسر می باشد. در تحقیق حاظر تعیین جنسیت در قناری با استفاده از واکنش PCR و براساس دو ژن CHD-W و CHD-Z شرح داده شده است. در این تحقیق جمعا از ۲۹ قطعه قناری استفاده شد. استخراج DNA از انتهای کالاموس پر قناری های زنده صورت پذیرفت و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده در این طرح، واکنش PCR تنظیم گردید. نتایج نشان دهنده تکثیر دو قطعه DNA به طول های ۳٤۵ و ۳۰٦ جفت باز برای جنس ماده و فقط یک باند ۳۰٦ جفت باز برای جنس نر بود. این نتایج برای کلیه نمونه های پر مشاهده شد. از آنجا که طراحی این سیستم تعیین جنسیت برای اولین بار در قناری مورد استفاده قرار می گیرد و نتایج مولکولی با ویژگی های مورفولوژیک دو جنس نر و ماده کاملا مطابقت دارد، لذا تعیین جنسیت جوجه های قناری با انجام واکنش PCR روی نمونه های پر، آسان، سریع، بی خطر و ارزان می باشد.

واژه های کلیدی

تعیین جنسیت ،
نشانگر های ژنتیکی ،
قناری ،
PCR

مقدمه

قناری ها (*Serinus canaria canaria*) از جمله زیباترین پرندگان خانگی هستند که از زمان های بسیار دور نگهداری آنها به خاطر آواز دلنشین و رنگ آمیزی زیبایشان رایج شده و مورد توجه مردم سراسر دنیا قرار گرفته است. طبق دسته بندی سیستماتیک زیست شناسی، قناری وحشی به راسته گنجشک ها (*Passeriformes*) و به خانواده فنچ ها (*Fringillidae*) تعلق دارند. با توجه به اینکه قناری ها از زمان بلوغ شروع به آواز خواندن می کنند و صدای زیبای قناری ها بیشتر توسط جنس نر تولید می شود، به همین دلیل جنس نر این پرنده نسبت به جنس ماده از لحاظ اقتصادی دارای ارزش بیشتری است و با قیمت افزون تری نسبت به جنس ماده به فروش می رسد (۱، ۲و ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از بهترین راه ها برای تمایز دادن پرندگان نر و ماده استفاده از روشهای مولکولی بر اساس DNA است. یافتن یک نشانگر مولکولی مناسب برای تعیین جنسیت، کاری دشوار است. از آنجا که ژنوتیپ پرنده ماده ZW و ژنوتیپ پرنده نر ZZ می‌باشد، لذا کروموزوم W فقط در جنس ماده پرندگان وجود دارد و بر اساس آن می توان مارکر ژنتیکی مناسبی برای تفکیک جنس‌های نر و ماده از هم یافت. این ویژگی همانند کروموزوم Y در انسان است با این تفاوت که در انسان و سایر پستانداران، جنس نر هتروگامتیک است و جنس ماده هموگامتیک می‌باشد ولی در پرندگان وضعیت دقیقا عکس است (٤و٥). برخی از ژن‌های موجود بر روی کروموزوم W بسیار حفظ شده بوده و با استفاده از این گونه ژن‌ها می توان در تمام گونه‌های پرندگان، جنسیت پرنده را با استفاده از یک جفت پرایمر و طی یک مرحله انجام واکنش PCR تعیین کرد (٦). در برخی از پرندگان، نظیر پرندگان عظیم الجثه مانند شترمرغ، پرایمرهای مربوط به ژن *CHD*، سبب تکثیر قطعاتی در هر دو ژن *CHD-W* و *CHD-Z* می‌گردد زیرا این پرایمرها همزمان با هم قسمت‌های همولوگ از ژن *CHD-W* و ژن مرتبط آن یعنی *CHD-Z* را تکثیر می‌نمایند اما در این قطعات تکثیر شده، تفاوت طول مشاهده می‌گردد و از همین خاصیت می‌توان به منظور تعیین جنسیت پرندگان بهره گرفت (٧و٨). هدف از این تحقیق تنظیم روش PCR برای تعیین جنسیت قناری برای اولین بار با پرایمرهای جدید طراحی شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به منظور تعیین جنسیت قناری جمعا از ٢٩ قطعه قناری نمونه‌گیری به عمل آمد. نمونه گیری از انتهای کالاموس پر قناری‌های زنده (١١ ماده و ٦ نر و١٢ جوجه قناری با جنسیت نامعلوم) صورت گرفت و DNAی ژنومی با استفاده از روش استاندارد فنل-کلروفرم استخراج گردید و جهت اطمینان از کیفیت DNA و مشاهده قطعات DNAی استخراج شده از ژل آگارز ١ درصد و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم برماید استفاده شد، همچنین کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نیز بررسی گردید. به منظور انجام PCR، نیاز به پرایمرهای اختصاصی تعیین جنسیت می باشد که بر اساس ژن *CHD* قناری طراحی گردند. اما پس از انجام مطالعات بسیار، توالی ژن *CHD* قناری یافت نشد لذا به منظور طراحی پرایمر از توالی ژن *CHD-W* مربوط به پرنده ای با نام علمی *Hemispingus frontalis* که از خانواده *Fringillidae* می باشد و قرابت فیلوژنتیکی بالایی با *Serinus canaria* دارد، استفاده شد. توالی پرایمرهای طراحی شده برای این تحقیق به صورت زیر است:

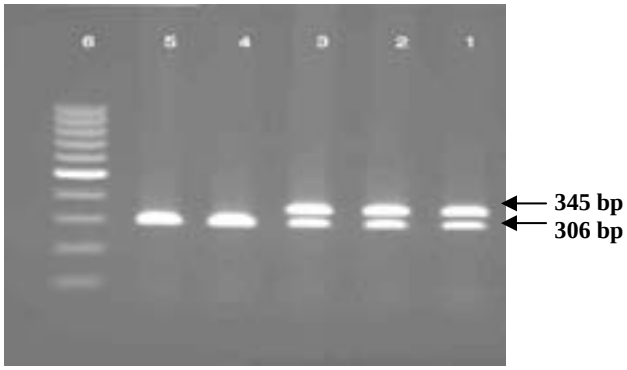
Canary-F: 5'- GGATGAGGAACTGTGCAAAAC -3'
Canary-R: 5'- AATAGTTCGCGGTCTTCCAC -3'

برای انجام واکنش PCR حجم نهایی واکنش ٢٥ میکرولیتر بوده که شامل: ٢٠ نانوگرم DNA الگو، ٢ میلی مولار $MgCl_2$، ٢٥ پیکومول از هر پرایمر، ١ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq و٢٠٠ میکرو مولار dNTP Mix بود. برای انجام واکنش PCR از دستگاه مسترسایکلر گرادینت شرکت Eppendorf استفاده شد. برنامه ی حرارتی مورد استفاده شامل: ٩٥ درجه سانتی گراد ٥ دقیقه، سپس ٣٠ چرخه دمایی به ترتیب ٩٤ درجه سانتی گراد ١ دقیقه، ٥٨ درجه سانتی گراد ١ دقیقه و ٧٢ درجه سانتی گراد ١ دقیقه و یک مرحله نهایی ٧٢ درجه سانتی گراد ٥ دقیقه تنظیم گردید. سپس محصولات PCR با ژل آگارز ١/٥ درصد الکتروفورز گردید و توسط اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد و با استفاده از نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

از کالاموس پر پرندگان مورد آزمایش، DNAی ژنومی با موفقیت استخراج گردید و کیفیت DNA ی استخراج شده با استفاده از روش طیف سنجی و الکتروفورز روی ژل آگارز ١ درصد تعیین گردید. سپس غلظت DNA استخراج شده به میزان ٢٠ ng/µl تنظیم شد. انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده‌ی تعیین جنسیت در قناری و مشاهده ی نتایج حاصل بر روی ژل آگارز ١/٥ درصد نشان دهنده تکثیر دو قطعه DNA به طول‌های ٣٤٥ و ٣٠٦ جفت باز برای جنس ماده و یک باند ٣٠٦ جفت باز برای جنس نر بود که در شکل ١ مشاهده می‌شود.

Archive of SID



شکل ۱- واکنش PCR برای تعیین جنسیت قناری.
شماره های ۱ تا ۳ مربوط به قناری های ماده بوده که دو قطعه DNA به طول های ۳٤٥ و ۳۰٦ جفت باز تکثیر گردیده و شماره های ٤ و ٥ که فقط یک باند به طول ۳۰٦ جفت باز دارند، نشان دهنده جنسیت نر در این پرنده می باشد.
شماره ٦ مارکر 100bp ساخت شرکت Fermentas می باشد.

نتایج حاصل نشان می‌دهد، تعیین جنسیت قناری با استفاده از این روش، بسیار سریع، دقیق و کم هزینه بوده و در هر دوره از زندگی این پرنده می تواند بکار رود. از آنجایی که تعیین جنسیت پرندگان با استفاده از روش‌های قدیمی مانند لمس کلواک، سنجش میزان استروئید، کاریوتایپینگ و... دشوار و زمانبر می‌باشد و حتی در برخی موارد موجب مرگ پرنده می‌شود(۹) لذا محققین متعددی تا کنون در راستای تعیین جنسیت مولکولی موجودات تلاش نموده‌اند و برخی نیز به نتایج مطلوبی دست یافته‌اند. برای مثال در سال ۱۹۹۸ Griffiths و همکاران با استفاده از دو ژن *CHD-W* و *CHD-Z* و طراحی پرایمرهای متعدد، به تعیین جنسیت گروهی از پرندگان (شتر مرغ، قو، کبوتر، غاز وحشی و ...) پرداخته‌اند (۱۰). در سال ۲۰۰۰، Nesje و همکاران سعی کردند با استفاده از دو جایگاه میکروستلایتی، پرندگانی از قبیل شاهین، باز وحشی، قوش و غیره را تعیین جنسیت نمایند اما این روش در تعیین جنسیت برخی از پرندگان مورد آزمایش موفقیت آمیز نبود (۱۱). همچنین در سال ۲۰۰٤، Agate و همکاران برای تعیین جنسیت *Zebra Finches* از ژن *CHD1-Z* و *CHD1-W* استفاده کردند (۱۲). در این تحقیق با توجه به اینکه توالی ژن‌های *CHD-W* و *CHD-Z* مربوط به قناری در بانک ژن جهانی ثبت نگردیده‌اند، لذا همان طور که در بالا اشاره شد، از روی توالی ژن *CHD-W* مربوط به پرنده‌ای شبیه به قناری، ترتیب نوکلئوتیدی پرایمرها انتخاب و نتایج مطلوبی در مورد تعیین جنسیت قناری بدست آمد. این سیستم تعیین جنسیت مولکولی بر اساس PCR که برای قناری ماده دو قطعه DNA و برای قناری نر، یک قطعه DNA تکثیر می‌نماید برای اولین بار تنظیم و معرفی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و همچنین کلیه همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه تقدیر و تشکر به عمل می آید.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱- فرشچی ع. (۱۳٦۲). قناری: نگهداری، تغذیه، بیماری ها، تکثیر و پرورش، آوازخوانی و شناخت حالات، اتوفون فریش(مولف). چاپ نهم. تهران: موسسه انتشاراتی روزبهان، ۱۳٦۲؛ ٤٥-۷.

2- Takagi N, Itoh M and Sasaki M (1972) Chromosome studies in four species of
ratitae (Aves). Chromosoma, 36: 281-291.

3-Jensen T, Pernasetti FM and Durrant B (2003) Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels and feathers. Zoo Biology, 22: 561-567.

4- Stefos K and Arrighi FE. (1971) Heterochromatic nature of W chromosomes in birds Experimental Cell Research, 68: 228-231.

5- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P and Lovell-Badge R (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature, 346, 245–250.

6- Griffiths R and Tiwari B (1996) Avian *CHD* genes and their use in methods in sex identification of birds. International patent publication, WO9639505.

7- Griffiths R and Korn R (1997) A *CHD*1 gene is Z chromosome linked in the chicken Gallus domesticus. Gene, 197: 225-229.

8- Bermúdez-Humarán LG, García-García A, Leal-Garza CH, Riojas-Váldez V, Jaramillo-Rangel G and Montes-de-Oca-Luna R (2002) Molecular sexing of monomorphic endangered Ara birds. Journal of Experimental Zoology, 292: 677–680.

9- Cerit H and AvanusK (2007) Sex identification in avian species using DNA typing methods. World's Poultry Science Association, 63: 91-99.

10- Griffiths R, Double MC, Orr K and Dawson RJG (1998) A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology, 7: 1071-1075.

11- Nesje M and Roed K (2000) Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers. Hereditas, 132: 261-263.

12- Agate RJ, Choe M and Arnold AP (2004) Sex Differences in Structure and Expression of the Sex Chromosome Genes *CHD*1Z and *CHD1W* in Zebra Finches. Molecular Biology and Evolution, 21(2): 384-396.