نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۳، شماره ۱، بهار۱۳۹۰، ص. ۸۳-۸۱

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 3, No. 1, Spring 2011, p. 81-83

تعیین جنسیت در شترمرغ با استفاده از تکنیک PCR

مسعود علی پناه[۱*]- مهدی تقوی[۲]- آدم ترکمن زهی[۳]- مصطفی یوسف الهی[٤]

تاریخ دریافت:۸۸/۵/۲۸
تاریخ پذیرش:۸۹/۳/۳

چکیده

اهمیت پرورش شترمرغ در ایران همچون سایر کشورهای جهان در حال افزایش است. در گونه‌های بسیاری از پرندگان، از جمله شترمرغ، جنس نر و ماده فاقد هرگونه تمایز مورفولوژیکی می‌باشند به نحوی که تشخیص پرنده نر و ماده را بویژه در سنین پائین دشوار می‌سازد. این امر برنامه‌های پرورشی را دچار مشکل می‌سازد. خونگیری به طور تصادفی از جوجه شترمرغ‌های چند روزه انجام شد و سپس، استخراج DNA از خون صورت گرفت. برای تعیین جنسیت واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه ۴۳۲ جفت بازی به کمک پرایمر OSFES استفاده شد. نتایج تحقیق ما نشان داد که تعیین جنسیت با استفاده از روش PCR در جوجه‌های چند روزه مفید، آسان و کم هزینه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: شترمرغ، تعیین جنسیت، PCR

مقدمه

گونه‌های بسیاری از پرندگان از نظر ظاهری مونومورفیک می‌باشند. بنابراین جنس نر و ماده بویژه در سنین پایین از نظر ظاهری قابل تمایز نمی باشند (۱و۲). اهمیت گونه هایی همانند شترمرغ در سرتاسر جهان در حال افزایش است. جنس‌های نر و ماده شترمرغ در سنین پایین هیچ نوع تفاوت مورفولوژیکی ندارند (۳). تعیین جنسیت پرندگان اولین نقطه کلیدی در مطالعات اصلاح نژادی می‌باشد. تفاوت در قیمت فروش و هزینه نگهداری جنس نر و ماده و زمان صرف شده برای فرآیندهای تولید مثلی ضررهای مالی فراوانی به بار می‌آورد (۲). در پرندگان، بر خلاف انسان کروموزوم جنسی ماده، تعیین کننده جنسیت می‌باشد. پرنده نر هوموگامتیک (ZZ) و پرنده ماده هتروگامتیک (ZW) است (۴). لاپاراسکوپی، تعیین کاریوتیپ، تعیین جنسیت از طریق کلوآک و تعیین جنسیت استروئیدی روش‌های متداول تعیین جنسیت پرندگان می‌باشند، اما این روش ها معمولاً پر هزینه، وقت گیر و نا مطمئن هستند (۲). دلیل اصلی مشکل تعیین جنسیت طیور به علت عدم حضور اندام جنسی خارجی می‌باشد. در شترمرغ به علت هم اندازه بودن اندام جنسی نر و ماده تا سه ماهگی تعیین جنسیت از طریق بررسی کلوآک غیر ممکن است.

پیش از توسعه دانش مولکولی، لاپاراسکوپی- اندوسکوپی و تعیین کاریوتیپ بهترین روش‌های تعیین جنسیت پرندگان در کشورهای توسعه یافته بوده است. تعیین کاریوتیپ معمولاً روش خوبی برای تعیین جنسیت پرندگان می‌باشد، اما تفاوت کم کروموزوم‌های Z و W شترمرغ استفاده از این روش در شترمرغ را غیر عملی کرده است (۴).

با ابداع روش PCR، تکنیک‌های مولکولی برای تعیین جنسیت در گونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. تعیین جنسیت در سطح DNA، به لحاظ سرعت و دقت بیشتر و دارا بودن هزینه کمتر می‌تواند روش جایگزین خوبی برای روشهای متداول قدیمی باشد. معمولاً برای تعیین جنسیت مولکولی پرندگان از ژن CHD[۵] استفاده می‌شود. چون اندازه اینترون ژن‌های CHDZ و CHDW شترمرغ مساوی است از این ژن نمی توان در تعیین جنسیت شترمرغ استفاده نمود در عوض پیشنهاد شده است که از تکثیر قطعه ای از DNA که بر روی کروموزوم W قرار دارد و بنابراین فقط مختص جنس ماده شترمرغ است برای تعیین جنسیت این پرنده در سنین پایین استفاده شود (۲). تاکنون تحقیقات متفاوتی راجع به تعیین جنسیت شترمرغ با کمک نشانگرهای ملکولی صورت گرفته است که از جمله می‌توان به بررسی مالاگو و همکاران (۶)، اشاره کرد، در این تحقیق آزمایشات با چندین گروه آغازگر مختلف صورت گرفت و در نهایت مجموعه

۲،۱ و۴- به ترتیب استادیار، دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
(* نویسنده مسئول: Email: Alipanah.masoud@gmail.com)
۳- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان

5 - Chromo-helicase-DNA binding gene

آغازگر SS/OSM برای تعیین جنسیت شترمرغ مناسب تشخیص داده شد، همچنین در تحقیق دیگری ترکیبی از آغازگرهای SS, OSFES و VIAS-OS14 برای تشخیص جنسیت بکاربرده شد (۷). این تحقیق به منظور تعیین جنسیت شترمرغ در سنین پایین به کمک روش PCR انجام گرفت.

مواد و روش ها

نمونه گیری و استخراج DNA

در این طرح برای بهینه کردن شرایط PCR بر روی قطعه DNA مختص افراد ماده، در ابتدا از تعداد ۵ قطعه شترمرغ نر و ۵ قطعه شترمرغ ماده بالغ که جنسیت آن ها مشخص بود، نمونه خون گرفته شد. سپس برای تست این روش در جوجه ها از تعداد ۲۰ قطعه جوجه شترمرغ چند روزه که جنسیت آن ها نا مشخص بود نمونه گیری شد. نمونه گیری از مزرعه شترمرغ پژوهشکده دامهای خاص دانشگاه زابل انجام شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون با روش اصلاح شده فنل-کلروفورم-ایزوآمیل الکل (۵)، و روش گوانیدین تیوسیانات (کیت DIAtom) (۱)، انجام شد. پس از استخراج DNA عمل شستشوی الکلی برای تمام نمونه‌های DNA استخراج شده صورت گرفت (۶). غلظت و کیفیت نمونه‌های DNA بدست آمده با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. نمونه ها سپس بر روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و کمیت و کیفیت نمونه ها مورد بررسی قرار گرفت.

انتخاب آغازگرها

توالی آغازگرهای مورد استفاده بر اساس تحقیق Malago و همکاران (۷)، انتخاب شد که قطعه ای به طول ۴۳۲ جفت باز از ناحیه اختصاصی مربوط به جنس ماده (Female specific region) بر روی کروموزوم W را تکثیر می‌کند. این قطعه در شترمرغ ماده موجود است و قابل تکثیر می‌باشد ولی در جنس نر وجود ندارد.

توالی پرایمر استفاده شده (OSFES):

Forward primer: 5´_AGCAGAATTGCTGAGTAAAC_3´

Reverse primer: 5´_ACAGAGGTTAAAAAACCACC_3´

چون آنالیز نمونه ها بر اساس وجود یا عدم وجود باند است، برای کنترل انجام PCR از پرایمر VIAS-OS14 (۱۰)، که یک ناحیه میکروساتلایت با طول ۲۴۵-۲۰۹ جفت باز را در تمام نمونه ها تکثیر می‌کند استفاده شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز

واکنش زنجیره ای پلیمراز مولتی پلکس[1] به کمک کیت PCR universal (شرکت ژن فن آوران) که حاوی Master Mix، PCR Diluent و PCR Oil می‌باشد به روش استاندارد انجام شد. غلظت نهایی مواد در حجم ۲۰ میکرولیتر واکنش عبارت بودند از: ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۲/۵ میلی مول کلرید منیزیم و بافر استاندارد، ۱- ۰/۵ میکرومول مخلوط پرایمرها و ۵۰۰- ۵۰ نانوگرم DNA.

واکنش زنجیره ای پلیمراز با برنامه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient) انجام شد. برنامه حرارتی واکنش زنجیره ای پلیمراز عبارت بود از: واسرشته سازی اولیه بمدت ۷۵ ثانیه، ۳۰ سیکل شامل: ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه جهت واسرشت سازی DNA، ۵۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه جهت اتصال پرایمر ها و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت یک دقیقه جهت سنتز، بسط نهائی بمدت ۳ دقیقه.

الکتروفورز

جهت مشاهده محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز از ژل آگارز ۱/۸ درصد و ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۲ ساعت استفاده شد. رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید انجام شد و قطعه تکثیر شده در طول موج ۲۲۰ نانومترمشاهده شد و عمل عکس برداری با دستگاه UV Doc صورت گرفت.

دوازده ماه پس از نمونه گیری از شترمرغ ها به منظور تست نتایج بدست آمده، با مراجعه مجدد به مزرعه پرورش شترمرغ، جنسیت جوجه شترمرغ‌های مورد آزمایش که در آن زمان یک ساله شده بودند توسط رنگ پر و بال مشخص شد.

نتایج و بحث

نتایج ما نشان داد که غلظت و کیفیت DNAهای استخراج شده با روش کیت دیاتوم نسبت به DNAهای استخراج شده با روش فنل- کلروفورم- ایزوآمیل الکل بیشتر بود. شستشوی الکلی باعث پایین آمدن و از بین رفتن آلودگی ها در DNAهای استخراجی و در نتیجه سبب بهبود کیفیت آنها شد، اما غلظت DNA استخراجی را کاهش داد. تمام نمونه‌های DNA استخراج شده برای انجام واکنشهای PCR مناسب بودند. سایر محققین برای استخراج DNA از نمونه‌های خون استفاده کرده اند (۹ و ۱۰).

واکنش زنجیره ای پلیمراز با موفقیت انجام شد و قطعه ۴۳۲ جفت بازی مورد نظر در نمونه‌های مربوط به جنس ماده بدون قطعه غیر اختصاصی تکثیر شد (شکل ۱). تحقیقات دیگر بر اساس استفاده

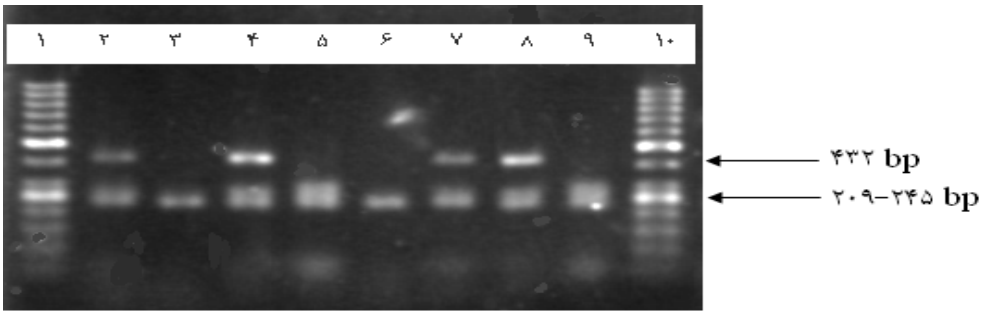
1 - Multiplex PCR

از آغازگرهای طراحی شده در بخش‌های دیگر کروموزوم W قطعاتی با طول متفاوت را تکثیر می‌کند (۵)، که در اکثر آنها طول قطعه تکثیر شده کمتر از ۳۰۰ جفت باز است که امکان اشتباه در تعیین جنسیت را بوجود می‌آورد. همچنین توسط پرایمر VIAS_OS14 ناحیه میکروساتلایت مورد نظر در تمامی نمونه ها تکثیر شد که نشان دهنده انجام PCR در تمامی نمونه ها می‌باشد (شکل ۱). بدلیل شفافیت و وضوح ناحیه تکثیر شده تعیین جنسیت به آسانی و با دقت کامل انجام شد و با مقایسه نتایج آزمایشگاهی با نتایج حاصل از مشاهده جوجه ها در یک سالگی مشخص شد که این روش دارای دقت ۱۰۰ درصد در تعیین جنسیت می‌باشد. نتایج سایر محققین نیز کارائی بالای روش‌های ملکولی در تعیین جنسیت را مورد تائید قرار می‌دهد (۵ و ۷).

هزینه تعیین جنسیت برای جوجه شترمرغ ها با استفاده از روش PCR نسبت به سایر روش ها اقتصادی تر بود. بنابراین، با توجه به اهمیت زیاد تعیین جنسیت جوجه در چند روزگی، این روش روشی کاملاً دقیق و مقرون به صرفه در تعیین جنسیت شترمرغ در بدو تولد می‌باشد. آزمون بکار رفته در تحقیق حاضر قابلیت تجاری شدن و تبدیل شدن به کیت را دارد و از آن می‌توان در صنعت پرورش شترمرغ استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم می‌دانیم از آقای مهندس قزاق کارشناس محترم پژوهشکده دامهای خاص دانشگاه زابل و آقای مهندس وهابی کارشناس محترم پژوهشکده زیست فن آوری دانشگاه زابل بدلیل مساعدتهای فراوان تقدیر و تشکر نمائیم.



شکل ۱- تست تعیین جنسیت شترمرغ با استفاده از Multiplex PCR توسط پرایمرهای OSFES و VIAS-OS14 روی ژل ۱/۸ درصد آگاروز.

ستون ها۱و ۱۰: مارکر وزنی (M50 bp)، ستون ها ۲، ۴، ۷ و ۸: نمونه‌های مربوط به شترمرغ‌های ماده، ستون ها ۳، ۵، ۶ و ۹: نمونه‌های مربوط به شترمرغ‌های نر

منابع

1- Bello, N., and A. Sanchez. 1999. The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Mol. Ecology. 8(4): 667-669.
2- Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-van Dillen, and J, Van Der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. Journal of Clinical Microbiology. 28:495–503.
3- Cerit, H., and K. Avanus. 2007. Sex identification in avian species using DNA typing methods. Worlds Poultry Science Journal. 63:91-97.
4- Griffiths, R., and K. Orr. 1999. The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. Molecular Ecology. 8: 671-674.
5- Huynen, H., C. D. Millar, and D. M. Lambert. 2002. A DNA test to sex ratite birds. Molecular Ecology. 11:851-856.
6- Malago, W., H. M. Franco, E. Matheucci, A. Medaglia, and F. H. Silva. 2002. Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. BMC Biotechnology. 2:19-25.
7- Malago, W., A. Medaglia, A. E. Matheucci, and F. Henriquei-silva. 2005. New PCR multiplexes for sex typing of ostriches. Braz. J. Biol. 65(4): 743-745.
8- Ogawa, A., K. Murrata, A. E. Matheucci, and F. Henriquei-silva. 2005. New PCR multiplexes for sex typing of ostriches. Braz. J. Biol. 65: 743-745.
9- Reynolds, S. J., G. R. Martin, L. L. Wallace, C. P. Wearn, and J. Hughes. 2008. Sexing snooty terns on Ascension Island from morph metric measurements. Journal of Zoology. 274:2-8.
10- Ward, W. K., McPartlian, H. C., Mathews, M. E., Robinson, N. A. 1998. Ostrich microsatellite polymorphism at the VIAS-OS4, VIAS-OS8, VIAS-OS14, VIAS-OS22 and VIAS-OS29 loci. Animal Genetics. 29: 331.