بررسی کاریولوژیک گونه اهلی بز(کاپرا هیرکوس) به منظور تعیین کاریوتایپ بز نژاد رائینی با الگوی نواربندی G

محمدصادق ملک پور[1*]،مریم السادات جانانه[2]،لیلا روشنی[3]

چکیده:

دراین تحقیق ۴۵ راس ازبزهای نژاد رائینی مورد آزمایش قرارگرفتند. باسرنگ استریل، ۰/۴ میلی‌لیترخون از وریدوداج دامهای مورد آزمایش به ۵ میلی لیترمحیط کشت.$RPMI_{۱۶۴۰}$ انتقال داده وبه مدت۷۲ ساعت درانکوباتور کشت داده شدند.دراین بررسی کشت بافت کامل محیط خون انجام گرفت. لنفوسیت‌هایT توسط فیتوهم آگلوتینین نوع M وادار‌به تقسیم شده ودرساعت۷۰با۲۰۰ میکرولیترکلشی‌سین درمرحله متافازمیتوز متوقف گردیدند.برای تهیه لام نمونه‌هاتحت تیمارمحلول هیپوتونیک کلریدپتاسیم قرارگرفته،سپس بامحلول فیکساتیوکارنوی تثبیت گردیدند.ازسوسپانسیون سلولی برروی لام گسترش کروموزومی تهیه گردید.برای نواربندی، لامها ۴۸ ساعت در آون۶۰-۵۶ درجه سلسیوس قرارگرفته وبا آنزیم پروتئولیتیک تریپسین موردهضم آنزیمی قرارگرفته وبا محلول رنگ گیمسارنگ آمیزی شدند.سپس با میکروسکوپ متصل به رایانه مورد بررسی قرارگرفته و از گسترشهای کروموزومی عکس تهیه گردید. بزنژادرائینی دارای عدد کروموزومی۶۰=2n می باشد.تمام کرووزوم‌های بزهای مورد مطالعه ازنوع آکروسنتریک اند. در این روش سانترومرها رنگ نگرفتند و ناحیه سانترومری بصورت تیغه صاف از انتهای دیگرکروموزوم قابل شناسائی است و با یک نوارتیره مشاهده می شود. هیچ‌گونه ناهنجاری ساختاری وعددی در کاریوتایپ دامها مشاهده نگردید.کاریوتایپ بزها در دوجنس نر و ماده و با توجه به شاخص سانترومری آنها تنظیم گردیده است.

کلمات کلیدی: بزرائینی ، کاریوتایپ و نواربندی G.

---

۱ –عضوهیات علمی دانشگاه آزاداسلامی واحدشوشتر

۲-دانشجوی دکتری دامپزشکی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر

۳-دانشجوی دکتری دامپزشکی،دانشگاه آزاد اسلامی واحدشوشتر

مقدمه

بزهای تولید کننده کرک درایران حدود۵ میلیون راس ازبین ۲۵/۷ میلیون راس جمعیت بز ایران تخمین زده می‌شود واکثراًدراستانهای کرمان,جنوب خراسان,سیستان و بلوچستان ویزد پرورش داده می‌شود. این نژاد در ایران به رنگهای مختلف سفید, قرمز, قهوه‌ای روشن و تیره و سیاه یافت می‌شود و ایران جزء ۳ کشور اصلی پرورش دهنده این بز به شمار می‌آید (۲).درسال ۱۹۶۹ گوستاوسون طی مقاله‌ای وجود جابجایی کروموزومی در گله‌های گاو شیری کشور سوئد را گزارش نمود و در آن به تاثیر این ناهنجاری در تولید شیر و باروری گاوها اشاره نمود(۸).

با ارائه این مقاله در آن سالها نقش سیتوژنتیک در شناسایی ناهنجاری‌های کروموزومی و تاثیر آن بر تولید و صفات اقتصادی آشکار گردید و از آنجا که تنها روش شناسایی ناهنجاری کروموزومی روشهای سیتوژنتیکی است مطالعات مشابهی در زمینه اصلاح نژاد دام‌ها و شناسایی ناهنجاری‌های موثر بر تولید و صفات اقتصادی دامهای اهلی آغاز گردید (۸). از سال ۱۹۸۰ به بعد دیگر ناهنجاری‌های کروموزومی نظیر تریزومی, جابجایی, واژگونی, حذف و مضاعف شدن کروموزوم‌ها طی مقالات متعددی گزارش گردید(۹و۷و۶و۵)

موادوروشها

برای این طرح از نژادهای رائینی ،ابتدا از ۴۵ راس از دامها نمونه‌برداری انجام گرفت که بعدها تعداد نمونه‌ها به ۶۰ راس رسید. نمونه خون تحت شرایط استریل از وریدوداج بزها تهیه و پس از ثبت شماره گوش و جنس و نژاد دام بر روی ونوجکت‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند. خون دامهای مورد آزمایش به ۵ میلی لیترمحیط کش.$RPMI_{۱۶۴۰}$ انتقال داده وبه مدت۷۲ ساعت درانکوباتور کشت داده شدند.دراین بررسی کشت بافت کامل محیط خون انجام گرفت. لنفوسیت‌هایT توسط فیتوهم آگلوتینین نوع M وادارابه تقسیم شده ودرساعت۷۰با۲۰۰ میکرولیتر کلشی‌سین در مرحله متافاز میتوز متوقف گردیدند.برای تهیه لام نمونه‌ها تحت تیمار محلول هیپوتونیک کلرید پتاسیم قرارگرفته، سپس با محلول فیکساتیوکارنوی تثبیت گردیدند.ازسوسپانسیون سلولی برروی لام گسترش کروموزومی تهیه گردید.برای نواربندی، لامها ۴۸ ساعت در آون۶۰-۵۶ درجه سلسیوس قرارگرفته وبا آنزیم پروتئولیتیک تریپسین مورد هضم آنزیمی قرارگرفته وبا محلول رنگ گیمسارنگ آمیزی شدند.سپس با میکروسکوپ متصل به رایانه مورد بررسی قرارگرفته و از گسترشهای کروموزومی عکس تهیه گردید. بزنژادرائینی دارای عدد کروموزومی۶۰=2n می باشند.

نتایج

برای کشت سلولهای بافت کامل خون محیطی از روش رونی و زپولسکی استفاده شد ولی متاسفانه جواب مناسبی بدست نیامد و گسترشهای کروموزومی مطلوب بر روی لام مشاهده نشدند(۷و۵). سپس با تغییراتی در روش مذکور وبااستفاده ازروش کلایوتهیه گسترش های متافازی مقدورگردید(۷).در جدول شماره (۱) شاخص سانترومر, طول بازوی کوچک, طول بازوی بزرگ و طول کل کروموزوم برای تمام کروموزومها گردآوری شده است. در جدول شماره (۱) نحوه محاسبه شاخص سانترمر برای هر کروموزوم مشخص می‌گردد. کاریوتایپ‌های بدست آمده با کاریوتایپ‌های گزارش شده توسط براردینووبانچ مقایسه شدند(۵).تعداد کروموزوم‌هادرگونه اهلی بز۶۰=2n عددمی‌باشد وتمام کروموزوم‌ها اکروسنتریک می‌باشند و تفاوتی بین نژادهادرگزارشات مورد مطالعه مشاهده نگردید.

کاریوتایپ بز رائینی

بزرائینی دارای عددکروموزومی ۶۰= 2n می باشد.۲۹جفت از کروموزوم ها اتوزوم ویک جفت کروموزوم جنسی است. تمام کروموزوم های اتوزوم آکروسانتریک می باشند.در بین دو کروموزوم جنسی، کروموزوم x بلندترین کروموزوم متاسانتریک وکروموزوم y کوچکترین کروموزوم متاسانتریک کاریوتایپ بز می باشد.شکل های ۵،۶،۷،۸ بزرائینی نر وماده به همراه کاریوتایپ رانشان می دهد.

بحث

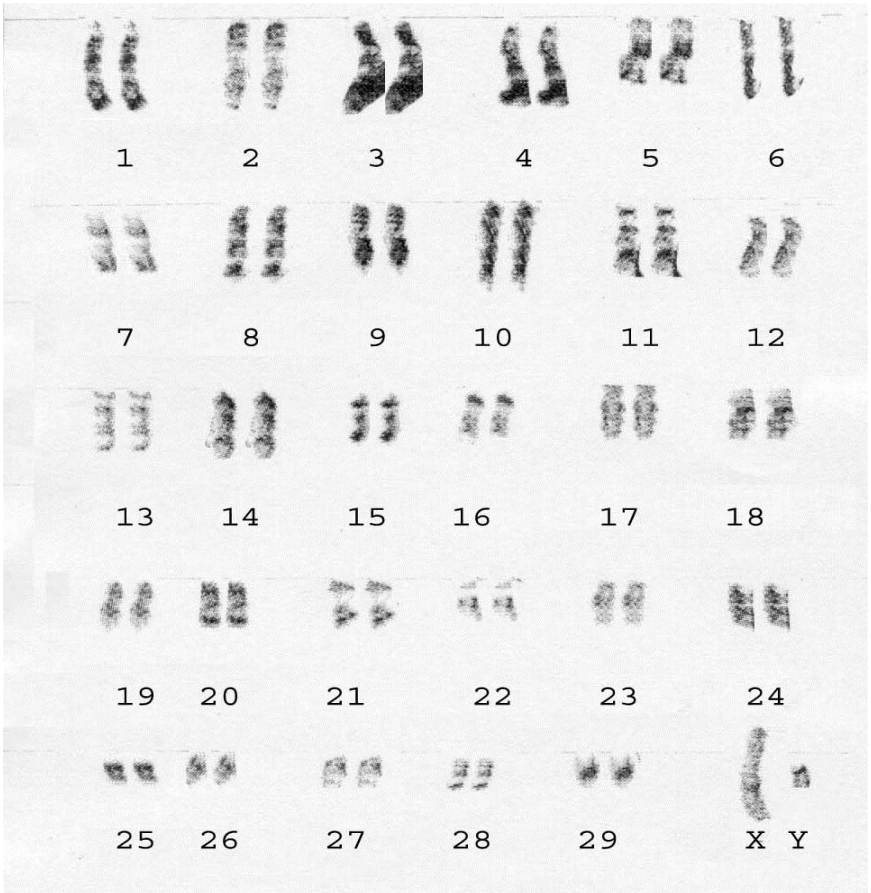
پس از تهیه لامهای متافازی مناسب و به تعداد کافی نوبت به نوارېندی آنها رسید. در تمام مقالات براین نکته تاکید شده که لامهای تازه تهیه شده در نوارېندی خوب جواب نمی‌دهند و باید مدتی را پشت‌سر بگذارند. این مسئله از این نظر حائز اهمیت است که لام‌ها در مدتی که در شرائط آزمایشگاه نگهداری می‌شوند, آبگیری و کاملاً با شرائط آزمایشگاه نظیر دما و رطوبت متعادل می‌گردند و لذا روشهای نوارېندی برروی آنها خوب جواب می‌دهد. روش دیگر بدین‌ترتیب است که لام‌ها بمدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۶۰-۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شوند و در طی این مدت لامها کاملاً خشک می‌گردند.برای اطمینان کامل از جواب بدست آمده, از هر دو روش استفاده شد. از ۲۰ لام تهیه شده ده عدد آنها در شرائط آزمایشگاه بمدت یک‌هفته نگهداری شدند و ده عدد دیگر به انکوباتور ۶۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. اختلاف قابل توجهی بین لامها در این بررسی با دو روش مذکور مشاهده نشد. سپس روش نوارېندی طبق روش کامنیگ, بانچ و براردینو (۲۱) اعمال گردید. در این بررسی با مقایسه روشهای ارائه شده و ادغام این روشها و اعمال روشی آزمون و خطا و نیز گزارش آقای هرکی‌نژاد که بر روی نژادهای گوسفند اهلی کار کرده بودند (۹) برای رنگ‌آمیزی معمولی از رنگ ده درصد و برای نوارېندی از رنگ ۵

درصد گیمسا استفاده گردید. نکته حائز اهمیت در این آزمایش غلظت آنزیم تریپسین بود که تا مدتی جواب مناسب را دربر نداشت. براساس دستورالعمل کارخانه سازنده, آنزیم پروتئولیتیک تریپسین به نسبت ۲۵۰ : ۱ بکار می‌رود.با اعمال این نسبت بصورت غلظت ۰/۰۵ درصد آنزیم تریپسین بود جوابهای خوبی بدست نیامد و بنظر می‌رسید که کروموزومها اصلاً نواربندی نشده‌اند و این احتمال داده شد که شاید زمان برای تاثیر آنزیم کافی نبوده است, بنابراین زمان از دو دقیقه تا ۴/۵ دقیقه افزایش داده شد. نتایج کاملاً برعکس بود یعنی این‌بار کروموزوم‌ها بسیار باریک شده و از کناره‌ها به شدت خورده شده بودند, لذا آزمایشها قطع و با روش آزمون و خطا غلظت و زمان مناسب برای آنزیم تریپسین پی‌گیری گردید. تا اینکه بهترین زمان برای آنزیم ۳۰ ثانیه و بهترین غلظت ۰/۵ درصد بود, یعنی زمان تاثیر آنزیم از ۳ دقیقه به ۳۰ ثانیه کاهش داده و غلظت از ۰/۰۵ درصد به ۰/۵ درصد افزایش داده شد.جوابها قابل قبول بود, لذا بقیه لامها را با این روش نواربندی نموده و سپس با لامل و چسب انتلال دائمی گردیدند.

جدول ۱. شماره کروموزوم (N) , بازوی کوتاه (p) , بازوی بلند (q) طول کروموزوم (p+q) و شاخص سانترومر (CI) .

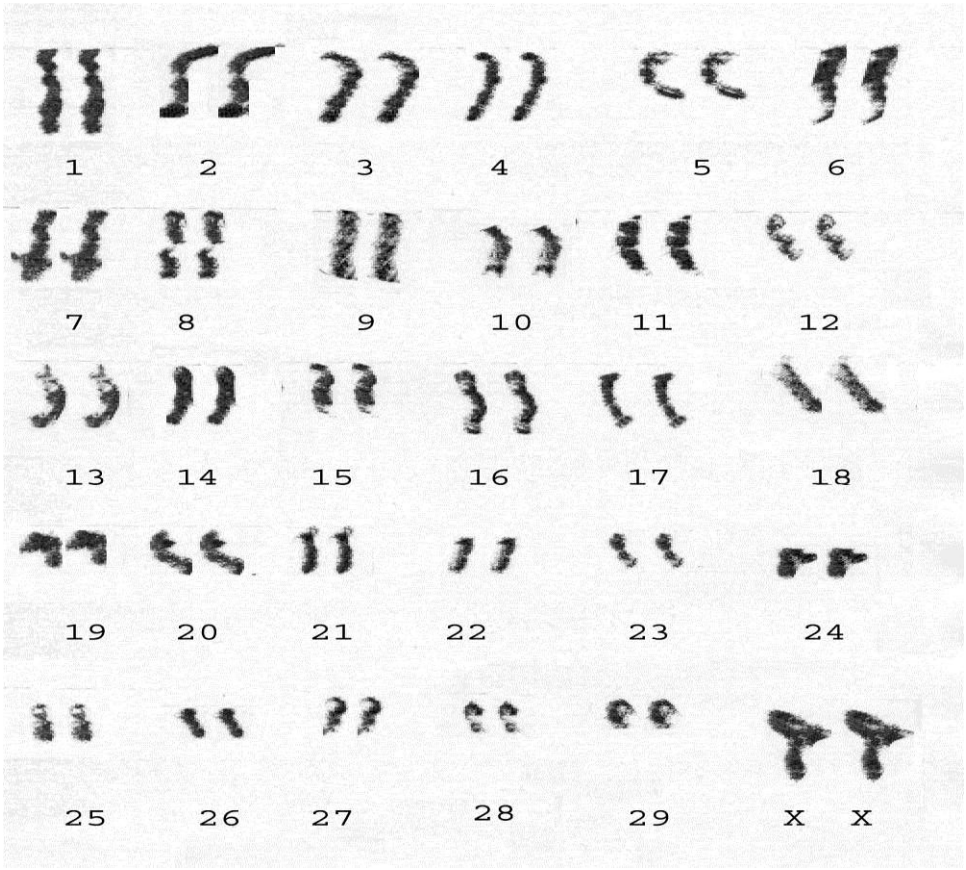
N	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	
p(mm)	/۸۱ ۱۱	/۱۱ ۱۱	/۸۳ ۱۰	/۲۸ ۱۰	/۲۶ ۹	/۱۶ ۹	/۷۹ ۸	/۵۱ ۸	۸/۲	/۵۸ ۷	/۱۱ ۷	/۷۵ ۶	/۱۸ ۶	/۷۱ ۵	۵/۶	
q(mm)	/۱۹ ۱۴	/۸۹ ۱۳	/۱۷ ۱۴	/۷۲ ۱۳	/۷۴ ۱۲	/۸۴ ۱۲	/۷۱ ۱۲	/۴۹ ۱۲	/۳ ۱۲	/۹۲ ۱۱	/۳۹ ۱۱	/۲۵ ۱۱	/۸۲ ۱۰	/۲۹ ۱۰	/۹ ۱۰	
p+q(mm)	۲۶	۲۵	۲۵	۲۴	۲۲	۲۲	/۵ ۲۱	۲۱	/۵ ۲۰	/۵ ۱۹	/۵ ۱۸	۱۸	۱۷	۱۶	/۵ ۱۶	
CI(%)	/۴۵ ۴۵	/۴۴ ۴۴	/۴۳ ۴۳	/۸۵ ۴۲	/۱۰ ۴۲	/۶۶ ۴۱	/۹۰ ۴۰	/۵۴ ۴۰	۴۰	/۸۸ ۳۸	/۴۶ ۳۸	/۵ ۳۷	/۳۶ ۳۶	/۷۱ ۳۵	۳۵	
N	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	x	y
p(mm)	/۲۱ ۵	/۶۶ ۴	/۱۳ ۴	/۸۴ ۳	/۵۲ ۳	/۱۴ ۳	/۱۳ ۳	/۷۵ ۲	/۱۱ ۲	/۷۱ ۱	/۳۴ ۱	/۲۷ ۱	۱	۱	/۶ ۱۲	/۶۷ ۰
q(mm)	/۷۹ ۹	/۳۴ ۹	/۸۷ ۸	/۶۶ ۸	/۴۸ ۸	/۴۸ ۷	/۳۷ ۸	/۲۵ ۸	/۸۹ ۶	/۲۹ ۶	/۶۶ ۵	/۷۳ ۵	۵	۴	/۴ ۱۴	/۳۳ ۴
p+q(mm)	۱۵	۱۴	۱۳	/۵ ۱۲	۱۲	۱۱	/۵ ۱۱	۱۱	۹	۸	۷	۷	۶	۵	۲۷	۵
CI(%)	/۷۸ ۳۴	/۳۳ ۳۳	/۸۱ ۳۱	/۷۶ ۳۰	/۴۱ ۲۹	/۵۷ ۲۸	/۲۷ ۲۷	۲۵	/۵۲ ۲۱	/۴۲ ۲۱	/۲۳ ۱۹	/۱۸ ۱۸	/۶۶ ۱۶	/۵۸ ۱۴	/۶۶ ۴۶	/۵۱ ۱۳

شکل ۱. بز نر ، نژاد رائینی



شکل ۲. کاریوتایپ بز نر، نژاد رائینی (۵۸ xy) با نواربندی G

شکل ۳. بز ماده، نژاد رائینی



شکل ۴. کاریوتایپ بز ماده، نژاد رائینی (۵۸ xy) با نواربندی G

منابع :

۱- حسین پورفیضی،محمدعلی وپیرایش اسلامیان،جلیل.۱۳۷۶.تکنیکهای سیتوژنتیک انسانی(ترجمه).انتشارات عمیدی.تبریز

۲- سعادت‌نوری،منوچهر.۱۳۶۲.پرورش دامهای شیری بزوگاومیش.چاپ اول.انتـشارات اشرفی.تهران.

۳- ناظرعدل،کامبیز.۱۳۶۶.نژادها،نگهداری وناهنجاری‌های ارثی دربز.چاپ اول.دانشگاه تبریز

۴- هرکی‌نژاد،محمدطاهر.۱۳۷۸.مطالعه سیتوژنتیکی گوسفندان قزل،مغانی وآرخارمرینوس، بررسی کاریوتایپ باالگوی نواربندیG. پایان‌نامه کارشناسی ارشد.دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

٥.Berardino,D.Di.,Ronne,M.,Burguete,I.,Lioi,M.B.,Taibi,L.,Matassino,D.andDi,Berardino,D.١٩٨٧.R-Banding Pattern of the rometaphase chromosmes of the goat. Journal of Heredity.Vol.٧٨:٢٢٥-٢٣٠

٦.Burguete,Berardino,D. Di,Lioi,M.B,Taibi,L.,and Matassino,D.١٩٨٧.Cytogenetic observations on a Robertsonian translocation in Saanen.Genet.Sel.Evol.Vol.١٩(٤): ٣٩١-٣٩

٧.Clive,R.E.,Holnam.١٩٨٩.Cytogenetics of Animal.CAB International.UK

٨.Gustavsson, I.١٩٧٩.Distrbution and effect of the ١/٢٩ Robertsonian translocation in cattle. J. Dairy.Sci.٦٢:٨٢٥-٨٣٥

٩.Hayes,H.,Petite,E.١٩٩١.Comparison of RBG-banded karioyape of cattle,sheep and goat.Genetics-Selection-Evolution.٢٣:suplement١:١٤٤-١٤٨

١٠.Schnedle and Czaker, R.١٩٧٤.Centromeric heterochromatin and comparison of G-banding in cattle, goat and sheep chromosome (Bovidae).Cytogenetcs-Cellgenetics.١٣:٢٤٦-٢٥٥