بررسی سیتوژنتیکی گاومیش بومی خوزستان با الگوی نواربندی G

محمدصادق ملک‌پور [۱*]، مسعود سلطانی‌الوار [۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۳

چکیده

به منظور بررسی سیتوژنتیکی گاومیش بومی خوزستان از ۲۰۰ راس گاومیش نر و ماده خون گیری به عمل آمد. مقدار ۷ میلی لیتر بافت کامل خون در محیط کشت RPMI1640 به همراه میتوژن فیتوهماگلوتینین نوع A به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. در ساعت ۷۲ با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر کلشی سین به محیط کشت، تقسیم سلولی در مرحله متافاز میتوز متوقف گردید. با استفاده از روش سامنر استخراج سلولهای سفید انجام گرفت، سپس از کروموزومها بر روی لام گسترش تهیه گردید. رنگ آمیزی و نوار بندی با روش سامنر انجام گرفت وگسترشهای سلولی به دست آمده با حرارت و چسب انتلان تثبیت گردیدند. از لامها، فتو میکروگراف تهیه و با بزرگنمائی ۲۰۰ ، شاخص سانترومر و طول نسبی کروموزومها اندازه گیری شد. بررسی نشان داد که تعداد کروموزومهای گاومیش خوزستان ۲n=۵۰ است.از میان ۲۴ جفت کروموزوم غیر جنسی، ۵ جفت ساب متاسانتریک و ۱۹ جفت دیگر آکروسانتریک بودند. کروموزوم شماره ۱ با طول نسبی ۰/۰۱۷۸ ± ۶/۷۲ بلندترین کروموزوم می باشد. کروموزوم X با طول نسبی ۰/۰۵۶± ۶/۲۵ بلندترین آکروسانتریک وکروموزوم Y کوچکترین آکروسانتریک با طول نسبی ۰۱۶/ ±۱/۸۷۲ بود.

واژگان کلیدی: سیتوژنتیک، گاومیش، کاریوتیپ، نواربندی G

مقدمه

گاومیش در استان خوزستان جایگاه ویژه‌ای دارد و از نظر تولید، مقاومت به شرایط سخت محیط، صرفه اقتصادی و احتیاجات نگهداری و بازدهی مصرف علوفه خشبی نسبت به دیگر دامها بسیار حائز اهمیت است. با اینکه به جز خوزستان این دام در مناطق دیگری نظیر آذربایجان شرقی و غربی، سیستان و مناطق معدودی در جنوب کشور پرورش می‌یابد، اما مطالعات اندکی در زمینه ژنتیک و اصلاح برروی آن انجام گرفته است. نگهداری گاومیش نیاز به جایگاه صنعتی ندارد و بطور معمول در حاشیه شهرها و در کنار رودخانه‌ها نگهداری می شود. بسیاری از منابع گیاهی اطراف رودخانه نظیر نیزارها وگیاهان خشبی که برای دیگر دامها قابل استفاده نیست، منبع غذائی مفیدی برای این دام بشمار می رود. مهمترین نیاز گاومیش وجود آب فراوان است که خوشبختانه استان خوزستان ازاین بابت غنی است (۲،۵). گاومیش دارای نژادهای گوناگونی است اما دو نوع عمده آن گاومیش رودخانه‌ای و گاومیش باتلاقی است. از آنجا که از نظر ظاهر نژادها بسیار به هم شبیه‌اند، لذا مطالعات ژنتیکی وسیتوژنتیکی

۱- مربی، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر، شوشتر، ایران.

۲-استادیار، گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر، شوشتر، ایران.

*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: m.malekpoor@iau-shoushtar.ac.ir

می‌تواند در برنامه‌ریزی‌های اصلاحی و دو رگ‌گیری بین نژادهای مطلوب کمک شایانی بنماید (۵،۱).

اهمیت مطالعات ژنتیکی در دو سطح سلولی و مولکولی برروی دامهای بومی کشور بسیار بدیهی است. مطالعات ژنتیکی برای هرگونه برنامه‌ریزی جهت طبقه‌بندی و تمایز و شناسائی نژادهای بومی و معرفی آنها بعنوان دامهای مستعد از نظر ارزشهای فنوتیپی و ژنوتیپی الزامی است. اکثر کشورهای پیشرفته و صنعتی، کار شناسائی و معرفی گونه‌ها و نژادهای حیوانی خود را با بررسی کاریوتایپ در سطح گسترده و در نیمه دوم قرن بیستم انجام دادند، بطوری که کاریوتایپ اکثر نژادهای خالص خارجی مشخص شده است. با یک الگوی نواربندی مشخص نواحی و بندهای کروموزومها تعیین گردیده است. طی کنفرانسهای متعدد انجام شده نواربندیG (روش رنگ آمیزی اصلی برای ایجاد کاریوتایپهای مرجع در میان انواع گونه پستانداران) به عنوان یک الگوی استاندارد انتخاب شد(٦،۳). پس از آن پیشرفتهای بزرگی در سطح مولکولی یعنی شناسائی ژنها نیز به آن افزوده شد، بطوری که در هر نژاد تعداد کروموزومها، نوع آنها، بندها و نواحی آنها و ژنهای کشف شده و جای آنها بر روی کروموزومها نیز انجام گرفت. حال اگر بخواهیم از نتایج تحقیقات انجام شده در این کشورها در جهت ارتقاء کمی وکیفی دامهای بومی استفاده کنیم باید یک زمینه تحقیق داشته باشیم. مطالعات سیتوژنتیکی و بررسی کاریوتایپ با مشخص کردن تعداد دقیق کروموزومها برای هر نژاد و شناسائی بندها و نواحی هر کروموزوم با استفاده از الگوی نواربندیG این زمینه را فراهم می کند. سپس می‌توان از تحقیقات انجام شده در سطح مولکولی و سلولی در جهت بهبود ژنتیکی و اصلاح نژاد گام برداشت.

مواد و روش کار

جهت مطالعه از ۲۰۰ راس گاومیش استان خوزستان نمونه خونی تهیه شد. بدین ترتیب که پس از تهیه لوله‌های خلا دار، لوله‌ها درون یک جعبه استریل قرار گرفتند و با خونگیری از ورید وداج نمونه خونی تهیه گردید. از دامهای نر و ماده نمونه‌های جداگانه تهیه و شماره گذاری شدند. بعد از نمونه‌گیری، نمونه های خون به آزمایشگاه ارسال شد. در آزمایشگاه پس از تهیه محیط کشت، به ۷ میلی لیتر محیط کشت، ۷ میلی‌لیتر خون کامل افزوده و۷۲ ساعت در انکوباتور کشت داده شدند. بعد از ۷۲ ساعت به محیط کشت ۲۰۰ میکرولیتر کلشی سین افزوده شد که طی آن تقسیم میتوز متوقف گردید. با محلول هیپوتونیک محیط کشت تیمار گردید که این موجب تورم و ترکیدن گلبول های قرمز خون شد. سپس با محلول فیکساتیو کارنوی طی چند مرحله گلبولهای سفید خون جدا و در معرض هوا خشک شده و با روش اسکواش بر روی لام از آنها گسترش کروموزومی تهیه گردید(۱۰،۷). برای نواربندی G از هضم آنزیمی تریپسین استفاده شد و با گیمسای ۵٪ رنگ آمیزی شدند. بعد از رنگ آمیزی و تثبیت کروموزومها از آنها فتومیکروگراف تهیه شد(۹،۱۱). برای کارهای گرافیکی از نرم افزار فتوشاپ استفاده شد. پس از آن از گرافهای بدست آمده آیدیوگرام(شاخص هویت یک گونه) تهیه شد که این مرحله به صورت دستی انجام گرفت و برای این منظور از شاخص کروموزوم و شاخص سانترومر استفاده شد که بدین صورت کاریوتایپ مربوطه بدست آمد.

نتایج

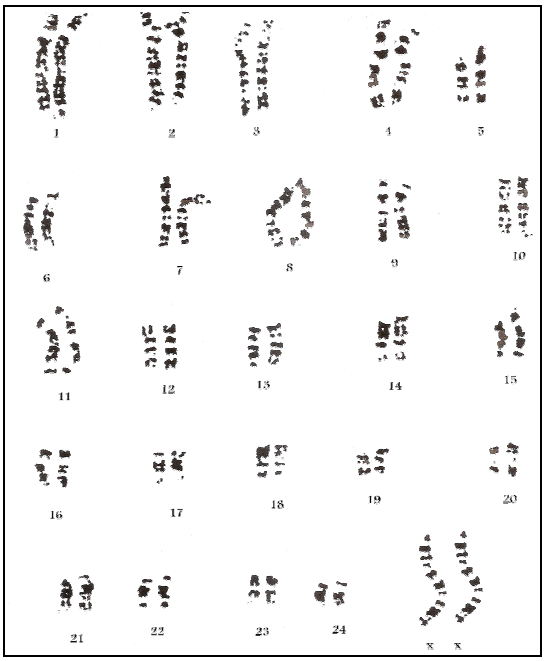
برای تهیه کاریوتایپ محاسبه شاخص سانترومر انجام شد و کروموزومها به ترتیب از بزرگ به کوچک مرتب شده و شماره‌گذاری شدند(۱۰،٦،۳). سپس تعداد باندهای روی بازوهای کوچک و بزرگ شمارش شد و برای تمام کروموزومها تعداد آنها مشخص گردید (جدول ۱).

طبق بررسیهای انجام شده کاریوتیپ گاومیش ماده دارای ۲n=۵۰ است (شکل۱) و ۲٤ جفت آن کروموزوم

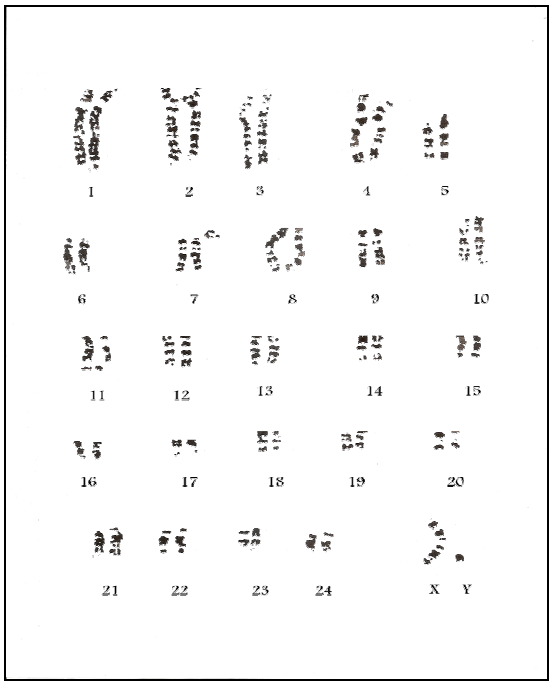
غیرجنسی و یک جفت کروموزوم جنسی X است که با طول نسبی ۰۵۶/ ± ۶/۲۵ درصد بلندترین کروموزوم آکروسانتریک می‌باشد. از ۲٤ جفت کروموزوم غیر جنسی ۵ جفت ساب متاسانتریک و ۱۹ جفت دیگر آکروسانتریک هستند. همچنین با بررسیهای انجام شده کاریوتیپ گاومیش نر نیز دارای ۲n=۵۰ می باشد(شکل ۲). در این بررسی ۲٤ جفت کروموزوم غیرجنسی که ۵ جفت آن ساب متاسنتریک و ۱۹ جفت دیگر آکروسنتریک بودند مشاهده گردید. کروموزوم جنسی X با طول ۰۵٦/ ± ٦/۲۵ بلندترین کروموزوم آکروسنتریک می باشد و کروموزوم جنسی Y کوچکترین آکروسنتریک با طول نسبی ۱٦/ ± ۱/۸۷۲ می باشد.

جدول ۱- تعداد باندها دربازوهای کوتاه(p)،بلند(q) درهرکروموزوم(N)

N	p	q	N	p	q
۱	۴	۱۱	۱۴	–	۴
۲	۴	۹	۱۵	–	۷
۳	۵	۸	۱۶	–	۸
۴	۳	۸	۱۷	–	۶
۵	۴	۶	۱۸	–	۵
۶	–	۱۱	۱۹	–	۶
۷	–	۹	۲۰	–	۵
۸	–	۸	۲۱	–	۳
۹	–	۱۰	۲۲	–	۴
۱۰	–	۷	۲۳	–	۵
۱۱	–	۹	۲۴	–	۴
۱۲	–	۹	X	–	۶
۱۳	–	۵	Y	–	۱۲



شکل ۱- کاریوتایپ گاومیش ماده ۱



شکل ۲- کاریوتایپ گاومیش نر

بحث

کاریوتایپ های بدست آمده با کاریوتایپ‌های گزارش شده توسط Sumner در سال۱۹۹۰ مقایسه گردیده‌اند. تعداد کروموزوم‌ها در گونه اهلی گاومیش۲n=۵۰ عدد می‌باشد. کروموزومهای شماره ۱

تا ۵ متاسنتریک وکروموزومهای ٦ تا ٢٤ اکروسنتریک می‌باشند. تفاوتی بین نژادها در گزارشات مورد مطالعه مشاهده نگردید. به گزارش Safdar در سال ۲۰۰٦ سانترومر در گونه اهلی گوسفند با روش نواربندی G رنگ نپذیرفتند. در این بررسی نیز سانترومر در نژادهای مورد مطالعه با روش نواربندی G رنگ نگرفت. از آنجائیکه به گزارش Pour azari در سال ۲۰۰٤ سانترومر کروموزوم‌های انسان با روش نواربندی G رنگ می‌پذیرد. نتیجه می‌گیریم که سانترومر گونه‌های گاو و گاومیش بر خلاف سانترومر کروموزوم‌های انسان است و این تفاوت از نظر ساختاری به ترکیب نوکلوتیدهای زنجیره DNA در این نواحی بر می‌گردد که در گونه‌های گاو و گاومیش نواحی سانترومری مانند گوسفند دارای ۲۰۰ نژاد شناخته شده است. این گونه دارای ۲۰۰ کاریوتایپ نیز می‌باشد که با مقایسه و بررسی این کاریوتایپ‌ها برای گونه اهلی یک آیدیوگرام ارائه گردیده است (٦).

تشکر و قدردانی

انجام این طرح با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر و همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر محقق گردیده است. دراینجا از زحمات این معاونت تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

۱- ارزانی، ا . (۱۳۷۵): راهنمای آزمایشگاه ژنتیک سیتوژنتیک. چاپ اول. نشر ارکان. اصفهان . صفحات ۳٤-۳۲

۲- پورفیضی، م. اسلامیان، ج.(۱۳۷٦):تکنیکهای سیتوژنتیک انسانی .چاپ اول. انتشارات عمیدی. تبریز. صفحات ٦٤-٦۰

۳- هرکی‌نژاد، م .ط .(۱۳۷۸): مطالعه سیتوژنتیکی گوسفندان قزل، مغانی و آرخارمرینوس با الگوی نواربندی G. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز:۸۹-۸۱

٤- معماریان ، م. پرواربندی گاو وگاومیش.(۱۳۸۳): چاپ اول .انتشارات موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی.صفحات ٤٥-٤۱

۵- ملک پور، م . ص .(۱۳۸۱): مطالعه سیتوژنتیکی بز های رائینی، بومی و آمیخته های آنها با الگوی نواربندی G . پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.صفحات ۵۵-٤۰.

6- Berardino , D. D., Ronne , M. ,Burguete , I.,(1987): R Banding Pattern of the metaphase chromosomes of the goat. Journal of Heredity. 78: 225-230.

7- Hayes , H., Petite , E., (1991): Comparision of RBG banded kariotype of cattle , sheep and goat. Genetics Selection Evolution.23(1): 144-148.

8- Iannuzzi , L., Dimeo , G.P., Perucatti , A., Ferrara , L., (1990) : The High Resolution G-Banding and Randing Pattern in Chromosomes of River Buffalo (BubalusBubalisL).Hereditas: 112:209-215.

9- Iannuzzi , L. , Dimeo , G.P.,(2009): Water Buffalo in : cockettne and kolec , Editores .Genome mapping a genomic in DomesticAnimal. BerlinHerdelberg, Germany: springer-verlag .pp : 220-224.

10- Pour Azadi , M., Ahmadi , G..(2004): Breeding of buffaloes in west Azerbaijan of Iran. Heredity. 23:535-53

11- Safdar, A.Z., Ahmad,G .,(2006): studies on the karyotype of the Nile river Buffalo .veterinary .y. 21 (2): 72-76.

12- Sumner,A.,(1990):Chromosome Banding. Cambridge university press. London U.K .pp:80-82.