تعیین کاریوتیپ جمعیت کبک ایرانی با استفاده از آنالیزسیتوژنتیکی

افشین بابک *[۱]، سیروس امیری‌نیا [۲]، علی اکبر قره‌داغی [۳]، نیما ایلا [۱]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، اصلاح دام دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، کرج، ایران
۲. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، بخش بیو تکنولوژی
۳. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، بخش ژنتیک

* **مسؤول مکاتبات:** افشین بابک، تهران- جنت آباد شمالی- بهارستان ۲۲- پلاک ۶- واحد ۷- کد پستی:۱۴۷۷۹۴۳۴۸۶، تلفن تماس: ۴۴۸۴۸۲۱۵-۰۲۱، همراه: ۰۹۱۹۰۷۳۷۵۲۳، پست الکترونیکی: fshnbabak@yahoo.com
محل انجام تحقیق: ایستگاه تحقیقات طیور و آزمایشگاه مرکزی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۶

چکیده

خزانه ژنی کبک ایرانی (Persian chukar) تاکنون دست نخورده باقی‌مانده و با سایر گونه‌های کبک مخلوط نگردیده است. اطلاعات ناچیزی از ویژگی‌های ژنتیکی این گونه وجود دارد؛ اگر چه اهمیت آن به عنوان یک پرنده مورد شکار، زیاد بوده و تلاش‌هایی نیز جهت پرورش متراکم آن به عمل آمده است. در تحقیق حاضر، این گونه، از نظر ویژگی‌های سیتوژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. با مطالعه بیش از ۳۰ پلاک متافازی، تعداد کروموزوم‌ها ۹۶ عدد به دست آمد که از این تعداد، ۱۸جفت کروموزوم در تمام پراکنش‌ها ثابت و قابل سنجش بود و بقیه از نوع میکروکروموزوم بودند که تعداد ۳۰ جفت تخمین زده شد. لذا فرمول کروموزومی کبک ایرانی به‌صورت میکروکروموزوم NF=24, 2n=12m+8a+16t+60 تعیین گردید. بنظر می‌رسد که تعداد میکروکروموزوم‌ها شاخص قابل اعتمادی برای تعیین نوع گونه نباشد. کاریوگرام و ایدیوگرام پرنده نیز بر مبنای نوع و اندازه کروموزوم-ها، اندازه بازوها و محل سانترومر تهیه شد.

واژه‌های کلیدی: کبک ایرانی، سیتوژنتیک، پلاک متافازی، کاریوگرام، ایدیوگرام

مقدمه

مطالعه کاریوتیپ پرندگان، به علت وجود میکروکروموزوم‌ها که بارزترین ویژگی سیتوژنتیکی پرندگان است، همواره با مشکل رو به رو بوده است، زیرا تعیین شکل و تعداد دقیق این کروموزوم‌ها کار دشواری است (۳). در تمامی پرندگانی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، می‌توان کروموزوم‌ها را از نظر اندازه، در دو طبقه مشخص قرار داد: ماکروکروموزوم‌ها که اندازه بین ۴ تا ۸ میکرون دارند و میکروکروموزوم‌ها که اندازه کمتر از ۲ میکرون دارند و در بسیاری موارد، زمانی که توسط میکروسکوپ نوری مطالعه می‌شوند، محل سانترومر قابل تشخیص و تعیین نیست و به صورت نقطه به نظر می‌رسند و بر مبنای اندازه‌شان در کاریوتیپ ظاهر می‌شوند (۳،۴،۵). مشخصه کاریوتیپ پرندگان عدد دیپلوئید نسبتاً بالای آن‌ها است. عدد کروموزومی 2n در اغلب گونه‌ها بین ۷۶ تا ۸۲ است که معمولاً ۶۰ تا ۶۴ عدد آن‌ها را میکروکروموزوم‌ها تشکیل می‌دهند (۶). خصوصیت دیگری که در تمامی پرندگان وجود دارد، ساختار کروموزوم‌های جنسی است؛ به‌طوری که در جنس ماده کروموزوم-های جنسی غیرهمانند هستند (برخلاف پستانداران) و از دو کروموزوم z و w تشکیل می‌شوند، در حالی-

که در نرها، کروموزوم‌ها همانند و مرکب از دو کروموزوم Z هستند (۷).

روش‌های متفاوتی برای تهیه گسترش کروموزومی پرندگان، به کار گرفته می‌شود. یکی، روش *in vitro* مانند قبیل کشت پالپ پر، بافت خون و مغز استخوان در محیط‌های کشت است که معمولاً زمان‌بر است و بیشتر برای مطالعات تخصصی کروموزوم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، دیگری روش ساده‌تر *in vivo* است که تیمار کلشی‌سین و نمونه-گیری مستقیم از پالپ پر یا مغز استخوان از داخل بدن را شامل می‌شود و با صرف زمانی کمتر، قابل اجرا است. استفاده از روش‌های مختلف بستگی به گونه مورد مطالعه، امکانات آزمایشگاهی، میزان دقت و هدف نهایی دارد (۱،۲،۸).

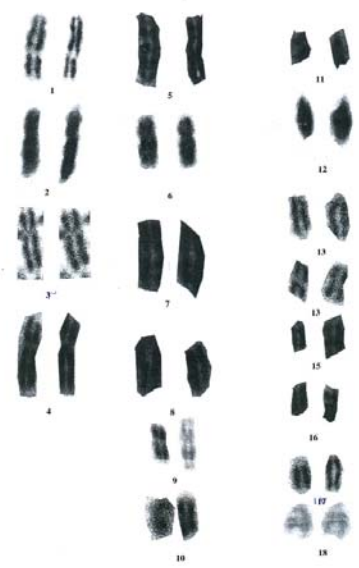
محافظت ژنتیکی و مطالعه تنوع زیستی پرندگان، مستلزم آگاهی اولیه از اطلاعات سیتوژنتیک آنها است. همچنین، کاریولوژی پرندگان، ابراز مفیدی جهت تشخیص سیستم تعیین جنسیت، تعیین جمعیت‌های متفاوت، شناخت گونه‌های هیبرید و تعیین گونه یا زیرگونه پرندگان است (۲،۱). از آن-جایی که این امر در ایران کمتر مورد توجه قرار گرفته است، در این تحقیق تلاش شده کاریوتیپ کبک ایرانی ارائه گردد تا به عنوان الگویی جهت مطالعات مشابه سیتوژنتیکی روی سایر پرندگان، مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس دانسته‌ها، نتایج به دست آمده بر روی کبک ایرانی، برای نخستین بار گزارش می‌شود.

مواد و روش‌ها

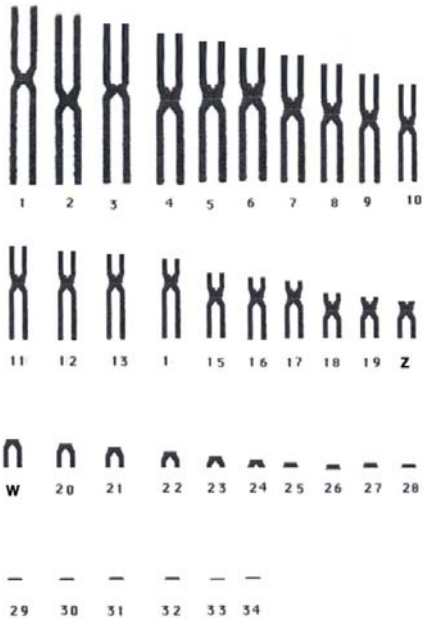
در این تحقیق، از خون کامل برای تهیه گسترش‌های کروموزومی استفاده شد. محیط کشت کامل که حاوی کلیهٔ فاکتورهای رشد، مواد مغذی و میتوژن و pH و سیستم بافری نیز در آن تنظیم شده شامل RPMI 1640+L-Glutamine، سرم جنین گوساله (FCS)، فیتو هموگلوتینین (PHA)، پنی‌سیلین و استرپتومایسین است.

پس از خون‌گیری از ورید زیر بال پرندگان، خون داخل سرنگ‌ها، به تیوب‌های ۱/۵ سی‌سی حاوی ۰/۴ اِ دی تی ای ۰/۵ نرمال اضافه و به خوبی تکان داده شد، تا از ایجاد لخته جلوگیری شود (۹). برای حفظ شرایط استریل، عمل کشت، با دقت و زیر هود لامینار انجام گرفت. حدود ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت کامل درون ظرف کشت ریخته شد. به هر یک، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر خون اضافه گردید. سپس، مخلوط حاصل به انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی-گراد منتقل شد. مدت کشت ۷۱ ساعت بود. سپس، ظروف کشت از انکوباتور خارج شده و کلشی‌سین ۰/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به آن‌ها اضافه گردید (۱۰،۹) و به مدت یک ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. محتویات ظروف، کشت و با حدود ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. پس از این مرحله، مایع-رویی به وسیله پی‌پت پاستور از رسوب جدا گردید. به رسوب باقی‌مانده، ۷ میلی‌لیتر محلول کلرور پتاسیم ۰/۰۷۵ مولار ۳۷ درجه سانتی‌گراد اضافه شد. نمونه‌ها برای حدود ۲۰ الی ۲۵ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه قرار داده شدند. پس از پایان تیمار، لوله‌های حاوی نمونه، در دستگاه سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. پس از خارج کردن فاز مایع از لوله‌های حاوی رسوب سلولی، محلول تثبیت کننده که مخلوطی از متانل و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳ به ۱ بود، به آن‌ها اضافه گردید. پس از اضافه کردن محلول تثبیت کننده، نمونه‌ها سانتریفوژ شد. سپس محلول‌رویی، از رسوب جدا گردید. محلول تثبیت کننده، به آرامی به نمونه‌ها اضافه و در ادامه، با همان شرایط قبلی، سانتریفوژ گردید. این فرآیند، حداقل یک بار دیگر تکرار شد. مایع‌رویی که کاملاً شفاف و بی‌رنگ شده بود. به طور کامل، از لوله خارج شد و رسوب حاوی سلول‌های متورم شده، در حجم ۲ میلی‌لیتر فیکساتیو Carnoy برای یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۳). با یک پی‌پت یا سمپلر به میزان ۵ تا ۱۰ میکرولیتر از رسوب حاوی سلول، برداشته و از فاصلهٔ ۱۵ الی ۲۰ سانتی‌متری روی لام، چکانده شد. سپس حدود ۳۰ دقیقه، در دمای محیط و به مدت کوتاه نیز در اسید استیک قرار گرفت.پس از آن، رنگ‌آمیزی ساده به مدت ۱۰ الی ۲۰ دقیقه با محلول انجام شد. مطالعه تک تک لام‌ها، توسط میکروسکوپ نوری انجام گرفت

و گسترش کروموزومی مناسب انتخاب شده، با درشت‌نمایی × ۱۰۰۰ عکس‌برداری شدند. سلول‌هایی که نسبت به سایر سلول‌ها از جهات فاز تقسیم سلولی، پخش کروموزومی و کاریوتیپ نمودن مناسب‌تر بودند، انتخاب شدند. برای کاریوتیپ نمودن، حداقل ۳۰ مجموعه کروموزومی متافازی مورد بررسی قرار گرفت (۱۹-۱۳).



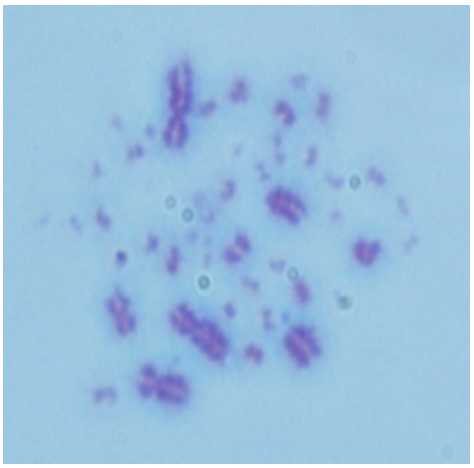
تصویر ۱ - کاریوگرام کبک ایرانی.



تصویر ۲ - ایدیوگرام کبک ایرانی.

نتایج و بحث

تعداد زیادی از گسترش‌های کروموزومی (حدود ۳۰ پلاک متافازی) توسط میکروسکوپ نوری مورد شمارش قرار گرفت. تعداد کروموزوم‌ها بین ۹۰ تا ۱۰۰ عدد متغیر بود و شمار زیادی از آن‌ها را میکروکروموزم تشکیل می‌داد (تصاویر ۱، ۲ و ۳).



تصویر ۳ - گسترش متافاز کروموزومی میتوزی کبک ایرانی.

Derjusheva و همکاران در سال ۲۰۰۱، به تهیه و مطالعه کروموزومی سهره جنگلی (*Fringilla coelebs*) پرداختند و تعداد کروموزوم‌های آن را ۸۰ تعیین کردند که تعداد زیادی را میکروکروموزوم‌ها تشکیل می‌دادند (۲۰).

فرمول کروموزومی در کبک ایرانی به صورت (NF=24, 2n=12m+8a+16t+30) بود. رنگ‌آمیزی ویژه کروموزوم‌ها برای ماکروکروموزوم‌ها در متافاز کبک ایرانی، با کبک پاقرمز (*Alectoris rufa*) و مرغ، هیچ‌گونه نوترکیبی کروموزومی را نشان نداد (۲۱). نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی کروموزومی مشابه مطالعات قبلی انجام شده روی بلدرچین ژاپنی بود اما با نتایج به دست آمده از یافته‌های مرغ شاخدار و چند گونه قرقاول تفاوت داشت (۲۱،۲۲). این تحقیق با مطالعاتی که روی کبک پاقرمز انجام شده بود، از نظر تعداد کروموزوم‌ها هم‌خوانی داشت، اما از نظر نوع (متاسنتریک، ساب متاسنتریک، اکروسنتریک و تلوسنتریک) دارای تفاوت قابل

ملاحظه‌ای بود (۲۳). در تحقیق اخیر، ۱۸ جفت ماکروکروموزوم (۶ جفت متاسنتریک، ۴ جفت آکروسنتریک و ۸ جفت تلوسنتریک) و ۳۰ جفت میکروکروموزوم برای کبک ایرانی شناسایی شد، در حالی‌که در تحقیق Arruga، ۳ جفت ساب متاسنتریک، ۳ جفت آکروسنتریک و ۱۲ جفت تلوسنتریک به همراه ۳۰ جفت میکروکروموزوم شناسایی گردید. همچنین، در مقایسه با مطالعات Lemakova که روی قرقاول و کبک صخره‌ای (*Alectoris graeca*) انجام گرفته و تعداد کروموزوم‌های آن‌ها ۸۰ عدد بدست آمده بود، تفاوت داشت (۲۴).

در مطالعات Kassai، هومولوژی کروموزومی بین *Gallus gallus domesticus* و کبک پاقرمز مطرح شده بود که در تحقیق اخیر مورد تایید قرار گرفت (۲۱).

نتیجه‌گیری

تعیین تعداد کروموزوم‌ها، انواع آن‌ها از نظر مرفولوژی و تعیین کاریوتیپ کبک ایرانی که برای اولین بار انجام گرفته، با در اختیار نهادن اطلاعات سیتولوژیک با ارزش در ارتباط با این‌گونه و استفاده از آن به عنوان ابزاری مفید و ارزشمند جهت تشخیص جمعیت، تعیین جمعیت‌های مختلف، شناسایی هیبریدهای احتمالی و تعیین زیر گونه‌های احتمالی، بسیار سودمند خواهد بود. این مطالعه می‌تواند به عنوان الگویی جهت مطالعات مشابه سیتوژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

با تشکر فراوان از جناب آقایان مهندس محمدحسین بنابازی، علی جوانروح و حسین عمرانی اعضای هیأت علمی بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، جناب آقای مهندس نعمت‌اله اسدی، سرپرست بخش بیوتکنولوژی آزمایشگاه مرکزی و جناب آقای دکتر سید احمد میرهادی، مدیریت آزمایشگاه مرکزی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور که خالصانه این تحقیق را مورد حمایت قرار دادند و نیز با سپاس فراوان از جناب آقای دکتر ابوالقاسم لواف، مدیریت محترم گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج که همواره از حمایت و پشتیبانی بی‌دریغ شان برخوردار بوده‌ام.

منابع مورد استفاده

۱. کلباسی،م. ،ت. اربابی. ۱۳۸۳.بررسی ساختار سیتوژنتیکی چرخ ریسک بزرگ ماده در پارک جنگلی نور، ص ۱۱-۶ .

۲. قلیچی‌پور، ز. ۱۳۶۶. بررسی تغییرات بین گونه‌ای الکتریس چوکار در رشته کوه‌های البرز و زاگرس، ص۹۱ .

3. Fillon, V., 1998. The chicken as a model to study microchromosomes in birds. Genet Sel Evol 30: 209-219.
4. Burt, D. W. C., Bruely, I. C., Dunn, C. T., Jones, A., Ramage, A. S., Law, D. R., Morrice, I. R., Paton, J., Smith, D., Windsor, A., Sazanov, R., Fries, D., 1999. The dynamics of chromosome evolution in birds and mammals. Nature 402: 411-3.
5. Harrison, P. H., Schwarzacher, T., 2000. Preparation of chromosome spreads. Molecular Cytogenetics Research Group.
6. Ebied, A. M., Hassan, H. A., Abu Almauty, A. H., Yassen, A. E., 2005. Karyotypic characterization of ten species of birds. Cytologia 70: 181-195.
7. Mazuno, S., Macgregor, H. C., 1998. The zw lamb rush chromosomes of birds, a unique opportunity to look at the molecular cytogenetics of sex chromosomes. Cytogenet Cell Genet 80: 149-157.
8. Brown, B., 1993. Hematology: principles and procedures. Sixth Edition 101.
9. Retrieved January 14, 2011, from http://www.arizonanatural.com/Product information/finished_products/EDTA.
10. Retrieved January 19, 2011, From http://www.medicine net. Com/colchisine,colcrys.
11. Retrieved January 9, 2011, from http://www.drugs.com/pro/colcrys.html.
12. Puchtler H., Warldrop, F. S., Conner, H. M., Terry, M. S., 1968. Carnoy fixation: practical and theoretical Considerations. Histochemistry 16: 361-371.
13. Belterman, R. M. R., Boer, L. E. M., 1990. A Miscellaneoas Collection of bird Karyotypes. Genetica 83: 17-29.

14. Christidis, L., 1998. Karyotype analysis in birds (in cytogenetic of animals, Clive R.E. Halnan ed. Cambrian printers, UK: 125-132.
15. Retrieved April 18. 2011, from http:www.americanmastervrech.com.
16. Deny, W., Tsao, S. W., Lucas, J. N., Leung, C. S., Cheung, A. L. M., 2003. A new method for improving metaphase chromosome spreading. Cytometry Parta 51: 46-51.
17. Nogeira, D. M., Souza, L. M., Goldsmidt, B. C. P., Silva, C. P., Mansores, D. W., 2006. The karyotype of the critically endangered lear`s macaw. Anodorhynchus (Aves, psittaciformes). Leari Bonaparte 1856 Genetics and molecular Biology 29: 154-165.
18. Owen, J. J. T., 1965. Karyotype studied in *Gallus domesticus chromosoma* Chromosoma 16:601-60.
19. Waldrigues A., Ferrar, I., 1982. Karyotypic study of cuculiform. Brasil Genet 1: 121-129.
20. Derjusheva, S, A. Kurganova,A. Saiti Fatdinova, E. Gaginskaya. E., 2001. Karyotype analysis of fringilla coelebs (Aves, Passeriformes) using fluoro-chrom staining, Agnor and fish Biological Institute of Saint Petersburg Univevsity, Saint petersburg, 198504 Russia.
21. Kassai, F., C. Garcia, M. V. Arruga, M. B. Ferguson, S., 2003. Chromosome homology between chicken (Gallus gallus domesticus) and the red-legged partridge (Alectoris rufa): evidence of the occurance of a neocenteromere during evolution. Cytogenetic and Genome Research.vol. 102. No. 14
22. Musa, H. H., Li, B. C., Chen, G. H., Lanyasunya, T. P., Xu, Q., Bao, W. B., 2005. Karyotype and banding patterns of chicken breeds. International Journal of Poultry Science 4: 741-744.
23. Arruga, M. V., Tejedor, M. T., Villarroel, M. R., Heriz, Ferreira, A. E., Abenia, F. J., 1996. Genetic studies of *Alectoris rufa* and *A. graeca* in Spain. Arch Zootech 45: 339-344.
24. Lemakova, S., 1984. Typing and number of chromosomes in the common pheasant and rock partridge. Pub med Gov 29: 107-1.