

بررسی کارپولوژیکی گاو میش بومی استان آذربایجان (*Bubalus bubalis*)

● محمود خضاب، عضو هیأت علمی مؤسسه رازی

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۷۹

مقدمه

در رده بندی جانورشناسی گونه گاو میش به راسته سم داران و زیر راسته زوج سمان و دسته نشخوارکنندگان و خانواده تهی شاخان و زیرخانواده Bovini تعلق دارد. در مورد فیولوژی گاو میش های ایرانی اطلاعات زیادی در دسترس نیست ولی با توجه به شباهت های گاو میش نژاد خوزستانی با نژادهای هندی (نیلی و مورا) گفته می شود که گاو میش های ایرانی از اخلاف گاو میش های هندی هستند که از مرزهای شرقی وارد ایران شده اند (۱). در نیمه شرقی آسیا، گاو میش های باتلاقی را به عنوان حیوانات باربر در مزارع برنج به کار می گیرند. در حالی که گاو میش های رودخانه ای به عنوان دام های شیری، در بسیاری از کشورها مثل هندوستان، پاکستان، ایران، مصر و کشورهای مدیترانه گسترش دارند (۳). اولین جفت کروموزوم های گاو میش باتلاقی متاسانتریک و بزرگتر از کروموزوم های گاو میش رودخانه ای در نژاد مورو بوده است. کاربوتیپ کروموزومی گاو میش های ترکیه و گاو میش های جنوب شرقی اروپا شباهت دقیقی به گاو میش های مورو دارند (۱۲). اکثر کشورهای جنوب شرقی آسیا از جمله فیلیپین، مالزی، اندونزی و ویتنام به منظور دستیابی به تولید شیر بیشتر دست به کراس بریدینگ گاو میش های باتلاقی بومی خود با گاو میش های نژاد مورو زداند. این گاو میش های هیبریدی دارای $2n = 49$ کروموزوم شده اند (۱۰).

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 52 PP:2-4

Karyological study of Azarbayjan native buffalo (*Bubalus bubalis*)

By: Mahmood Khazab (Ph. D); Genetic unit, Razi Research Institute.

For the karyotype determination of Azarbayjanian native buffalo, peripheral blood lymphocyte culture method was used in male and female buffaloes. The diploid model number of chromosomes showed $2n=50$, out of which 24 pairs are autosomes. First five large pairs are submetacentric and the rest of other 19 pairs are in telocentric position. Two sex chromosomes are telocentric too. The X chromosome is the largest telocentric in metaphase cells and the Y chromosome is also in telocentric group. G-band technique was used for adequate chromosome identification.

Key words: Buffalo, Azarbayjan, Chromosome, Karyotype, G-banding

چکیده

بررسی سیتوژنتیکی و مطالعات کروموزومی جنس های نر و ماده گاو میش های بومی استان آذربایجان غربی به وسیله تهیه گسترش های متافازی حاصل از کشت لنفوسیتی نمونه های خونی اخذ شده از گاو میش های مرکز اصلاح نژاد گاو میش شمال غرب کشور واقع در منطقه جبل شهرستان ارومیه انجام شد. این بررسی معلوم کرد که تعداد دیپلوئید کروموزومها در گاو میش آذربایجانی $2n=50$ می باشد که از تعداد ۲۴ جفت کروموزومهای اتوزومی، ۵ جفت کروموزوم اول، ساب متاسانتریک و تمامی ۱۹ جفت کروموزوم اتوزومی دیگر تلوسانتریک بودند. کروموزومهای جنسی از نوع تلوسانتریک بوده و کروموزوم X بزرگترین کروموزوم تلوسانتریک بود. کروموزوم Y نیز جزء کروموزومهای تلوسانتریک تعیین گردید. ضمناً برای شناسایی دقیق تر کروموزومها و مطالعات بعدی از نوار بندی G استفاده شد.

کلمات کلیدی: گاو میش، آذربایجان، کروموزوم، کاربوتیپ، نوار بندی G

جدول شماره ۱- پلی مورفیسم کروموزومی در برخی از نژادهای گاو میش ها

ردیف	نام	گونه	تعداد کروموزوم	محققین و سال انتشار
۱	گاو میش رودخانه ای در شمال هند	Riverine buffalo	۴۸	Dutt, M. and Bhattacharya (۹)
۲	گاو میش رودخانه ای در کارناتا کای جنوبی هند	Riverine buffalo	۵۰	Chandra, et al (۶)
۳	گاو میش آفریقایی	Syncerus caffer	۵۲	Ulbrich, F. (۱۷)
۴	گاو میش کنگوی آفریقا	Syncerus caffer	۵۴	Bidhar, et al (۵)
۵	گاو میش روسی	-	۵۶	Pkakadze, G. (۱۳)
۶	گاو میش باتلاقی	Buffalo swamp	۴۸	Fisher, H. (۱۵)
۷	گاو میش رودخانه ای	Riverine buffalo	۵۰	Fisher, H. (۱۵)
۸	گاو میش ایتالیایی	Campagna buffalo	۵۰	De Girolama, A. (۸)
۹	گاو میش مصری	Bubalus bubalis	۵۰	Cribiv, E. and obeldah, A. (۷)

ضرورت انجام مطالعات کروموزومی

در دهه اخیر کاربرد روش انتقال جنین در جهان رایج گردیده است و از طرفی ناهنجاری‌های کروموزومی مثل پلی‌پلوئیدی، شکستگی، گسیختگی کروموزوم‌ها و انواع سندرم‌های کروموزومی مانند ترانس‌لوکاسیون روبرتسونی در دامها مشاهده گردیده است (۸). بدین ترتیب می‌توان از مطالعات سیتوژنتیکی در ارزیابی ناهنجاری‌های کروموزومی و حتی تعیین جنسیت پیش از انتقال جنین بهره برد.

تلاش متخصصین علوم سیتوژنتیک دامی تنها به زمینه‌های کاربویولوژی محدود نمی‌گردد بلکه مطالعات سیتوژنتیکی می‌تواند ابزاری مفید در راستای افزایش تولید مثل و افزایش تولیدات دامی از طریق اصلاح نژاد باشد (۹).

با استفاده از تحقیقات سیتوژنتیک و انجام کاربویوتایپ می‌توان به تشابه کروموزومی (همولوژی) بین دامهایی مانند گاومیش، گاو و گوسفندان پی برد. تحقیقات انجام یافته روی کروموزومهای نواربندی شده در گاومیش‌های باتالاقی استرالیا، شباهتهایی میان باندهای کروموزومی این گاومیش با کروموزومهای گاو و گوسفند پیدا شده است (۱۳).

با توجه به اینکه مرکز اصلاح نژاد گاومیش شمال غرب کشور از متولیان بهبود نژادی گاومیش در منطقه آذربایجان و شمال غرب کشور و تنها مرکز تولیدکننده اسپرم گاومیش می‌باشد، لزوم تأسیس آزمایشگاه سیتوژنتیک در این مرکز و مراکز دیگر جهت انجام مطالعات کروموزومی ضروری به نظر می‌رسد با تأسیس چنین مراکزی کلیه گاومیش‌های نر مولد اسپرم که به عنوان جایگزین سازی وارد خط تولید می‌شوند قبلاً از لحاظ ژنتیکی و سیتوژنتیکی مورد ارزیابی قرار گرفته و در صورت وجود نقص کروموزومی از اسپرم آنها در تلقیح مصنوعی جلوگیری به عمل خواهد آمد و ضمناً از گاومیش‌های ماده دارای نقص ژنتیکی در خط تولید گوساله نیز استفاده نخواهد شد.

مواد و روش‌ها

برای تهیه گسترش متافازی از ۵۰ راس گاومیش نر و ماده مرکز اصلاح نژاد گاومیش شمالغرب واقع در منطقه جبل شهرستان ارومیه نمونه خون وریدی با لوله‌های خلاء‌دار اخذ گردید و نمونه در دمای مناسب و شرایط استریل به آزمایشگاه ژنتیک مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی منتقل شد. برای انجام کشت، نمونه خون کامل به میزان یک میلی‌لیتر به محیط کشت RPMI - 1640 حاوی ۲۰٪ سرم جنین گوساله (FCS) اضافه گردید سپس به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر میتوزن فیتوهماکلوتینین (PHA) به هر یک از محیطها اضافه شد. تمام مراحل انجام گرفته در داخل هود لامین ایبر و در شرایط استریل و در کنار شعله انجام گرفت سپس نمونه‌های کشت در آنکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. به منظور متوقف نمودن تقسیمات سلولی در مرحله متافاز، حدود ۳ ساعت قبل از برداشت از محلول کلشی‌سین (Gibco) ۰/۰۰۴٪ به آنها اضافه شد و دوباره در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد آنکوباتور قرار گرفت تا دوره آنکوباسیون کامل شود و بعد

از طی این دوره نمونه‌های کشت شده جداگانه در لوله سانتیفریوژ به مدت ۷ دقیقه با دور ۱۰۰۰ rpm در دقیقه سانتیفریوژ شد و مایع رو توسط پیپت تخلیه شده و حدود ۶ میلی‌لیتر از محلول ۳۷ درجه سانتیگراد کلرید پتاسیم (۰/۷۵ KCL/مولار) به آن اضافه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۱۲-۲۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و برای دوم سانتیفریوژ و مایع رویی تخلیه گردید. جهت ثبوت از محل (۱ به ۳) اسیداستیک و متانول استفاده شد. بعد از ۳۰ دقیقه محلول حاصل دوباره سانتیفریوژ شده و دوباره فیکسانو اضافه گردید این کار آنقدر ادامه پیدا کرد تا محلول شفاف شد سپس به تعداد مورد نیاز لام تهیه گردید. گسترشها با رنگ گیمسای ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد (۱۵). جهت عکس‌برداری از گسترش‌های متافازی مناسب بافیلم ایل‌فورد با حساسیت 100 ASO= عکس تهیه گردیده و کاربویوتایپ شدند (شکل ۱ و ۲).

از روش‌های G-band جهت شناسایی دقیق کروموزومها استفاده شد (۱۱، ۱۴). لامهایی که از زمان تهیه آنها ۱۳ تا ۱۵ روز گذشته بود به مدت ۱۵ ثانیه در

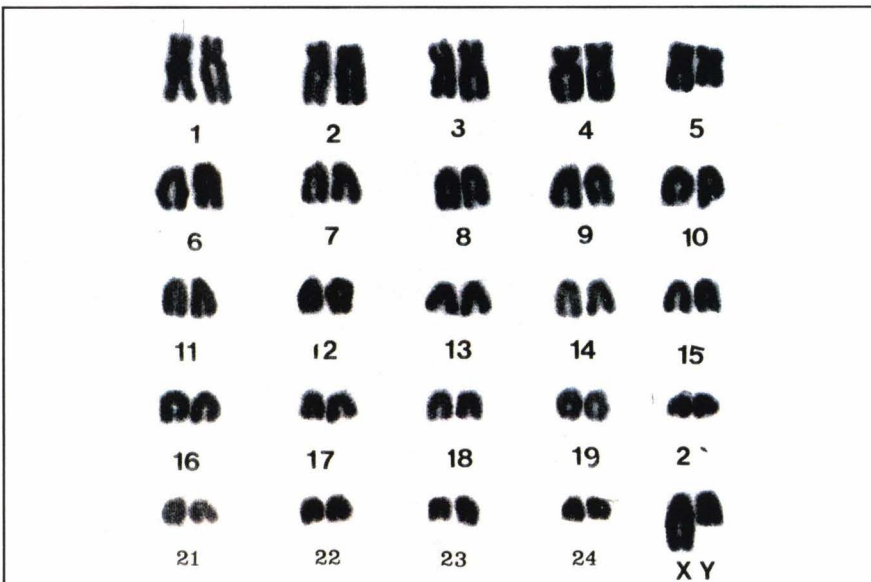
محلول تریسین ۵٪ قرار گرفتند و سپس با محلول بافر فسفات خنک (PBS) به خوبی شستشو داده شده و در معرض هوا خشک شدند. سپس از گسترش‌های متافازی دارای کیفیت بالاتر با روش پیش گفته شده با بزرگنمایی ۱۰۰ عکس گرفته شد (شکل ۳).

نتایج

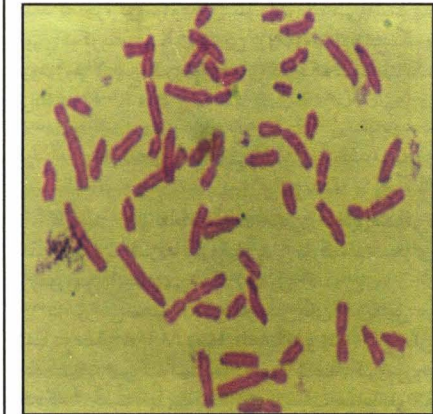
پس از تهیه مجموعه‌های کروموزومی متافازی و تعیین کاربویوتایپ دو جنس نر و ماده گاومیش بومی استان آذربایجان غربی به کمک نواریسندی G و کاربویوتایپ ساده و مقایسه آن با کارهای سایر محققین نتایج زیر حاصل گردید.

۱- تعداد کروموزومهای گاومیش آذربایجان غربی منطبق بر نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده در مورد گاومیش‌های هند و پاکستان و مصر بوده و حاوی ۵۰=۲n عدد کروموزوم می‌باشد.

۲- از میان ۲۵ جفت کروموزوم، ۲۴ جفت از آنها را اتوزومها و ۱ جفت را کروموزومهای جنسی تشکیل می‌دادند که همولوگ‌های هر کروموزوم اتوزومی با روش نواریسندی G مشخص شد.



شکل ۱- کاربویوتایپ گاومیش نر بومی آذربایجان غربی



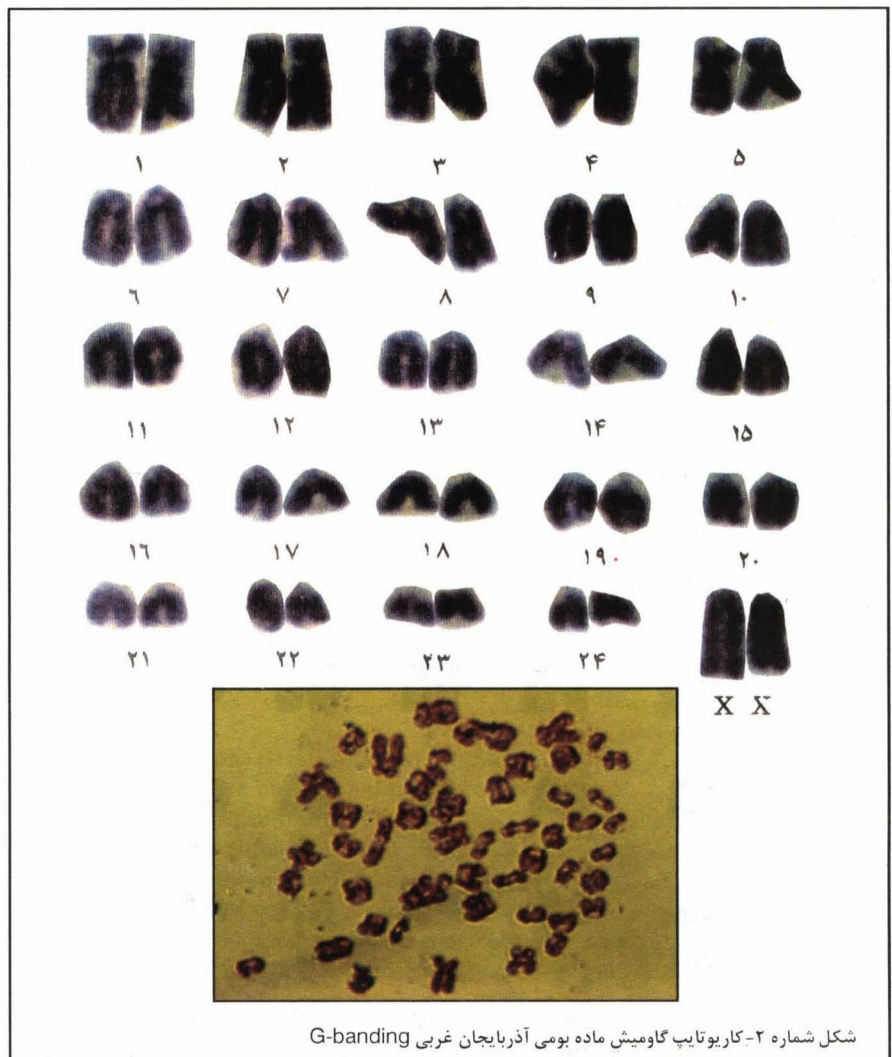
بومی جنوب ایران اندکی متفاوت بوده و ۵ جفت اول از کروموزوم‌های به دست آمده در این گاو میش‌ها (*Bubalus bubalis*) ساب متاسانتريک هستند (شکل ۱ و ۲)، در حالی که گاو میش‌های جنوب ایران دارای یک جفت کروموزوم متاسانتريک در ۵ جفت اول هستند که توسط دکتر خاوری گزارش شده است (۲).

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری مرکز اصلاح نژاد گاو میش شمال غرب کشور در شهرستان ارومیه و همچنین جناب آقای دکتر حیات غیبی که در طی انجام این پروژه ما را صمیمانه یاری دادند قدر دانی می‌گردد. در ضمن از پرسنل بخش ژنتیک موسسه تحقیقات و سرم‌سازی رازی و آقای آرمین اسکندری از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه کمال سپاس را دارم.

منابع مورد استفاده

- ۱- ایوانو الکسیو، الگو، ۱۹۸۵. گزارش در مورد گاو میش و گاو میش‌داریهای آذربایجان غربی و اصلاح نژاد، انتشارات جهاد سازندگی استان آ.غ- ترجمه مهندس صادقی.
- ۲- خاوری خراسانی، هوشنگ، ۱۳۶۶. بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی در دامهای ایران، مجله دانشکده دامپزشکی تهران، دوره ۴۴، صفحات ۴۳ الی ۵۵.
- ۳- سعادت نوری، منوچهر، ۱۳۶۲. پرورش دامهای شیری، بز و گاو میش صفحه ۱۹۵-۲۴۵.
- 4- Benjamin B.R. & Sahai T., 1982. Livestock Adviser, 7 (10): 5.
- 5- Bidhar G.G., Pattnaik G.R., Rao P.K. and Parto B.N., 1986. Buffalo Bulletin, 5(3) : 54
- 6- Chandra H.S., Thouapel A.T. and Philips M., 1976. 15 th Intr. cong. of genetic Moscow. 21-30 Aug. 78.
- 7- Cribiv E.P. and Obeldah A., 1978. Annels de Genetique et al selection. Animal, 10(2):271.
- 8- De Girolama, 1957. Acte Biol., 29: 323.
- 9- Dutt, M.K. and Bhattacharya P., 1952. Nature (Iond). 170:1129.
- 10- Fisher H., 1971. Z. Tierzucht. Zucht. Biol. 88 : 215.
- 11- Halnan C.R.E., 1989. Animal cytogenetics. (C.B.A Internation).
- 12 - Have. W.C.D and Elizabeth H.S., 1979. Cytogenetic in animal reproduction. C.A.B International.
- 13- Pkakadze G. 1939., A cad. Sci USSR, 24: 194.
- 14- Seaberigh, M. 1971. A rapid banding techninque for human chromosomes, Lancet ii, 971-972.
- 15- Toll G.H. and Halnan Cr.E., 1976. Canadian J. of genetic and cytology. 18(2):302.
- 16- Ulbrich F. and Fischer H., 1968. Z. Tierzucht. Zucht. Biol. 85:119.



شکل شماره ۲- کاربوتایپ گاو میش ماده بومی آذربایجان غربی G-banding

۳- تعداد ۵ جفت کروموزوم‌های اتوزومی یعنی کروموزوم‌های ۱ و ۲ و ۳ و ۴ و ۵ ساب متاسانتريک بوده و بقیه آنها تلوسانتريک می‌باشند.

۴- کروموزوم‌های جنسی به تفکیک مشاهده شدند که جزء کروموزوم‌های تلوسانتريک می‌باشند به طوری که کروموزوم X بزرگترین کروموزوم تلوسانتريک و کروموزوم Y جزء کروموزوم‌های کوچک تلوسانتريک می‌باشد.

بحث

گاو میش‌ها از نقاط مختلف جهان (آسیای شرقی، هندوستان، آفریقا و اروپا) پلی مورفیسم مجزای کروموزومی را نشان می‌دهند (جدول ۱).

در بررسی سیتوژنتیکی گاو میش‌های آفریقایی در کنیا در سال ۱۹۶۸ توسط Fisher و Ulbrich نشان داده شد که این گاو میش‌ها دارای ۵۴ عدد کروموزوم بوده که ۴ جفت آنها متاسانتريک یا ساب متاسانتريک بوده و ۲۳ جفت آنها نیز تلوسانتريک می‌باشند (۱۶).

از طرف دیگر گاو میش‌های کنگو دارای ۵۴

کروموزوم‌های گونه مصری (*Bubalus bubalis*) دارای ۵۰ کروموزوم می‌باشند (۷) که از لحاظ تعدادی شبیه به گاو میش‌های آذربایجان غربی در این مطالعه می‌باشند.

تعداد کروموزوم‌های گاو میش‌های رودخانه‌ای شمال هندوستان ۴۸ عدد تعیین شده است (۶)، در صورتی که گاو میش‌های ایالت جنوب کارناتای هندوستان دارای ۵۰ کروموزوم هستند (۵) که از لحاظ تعداد کروموزومی شباهت زیادی با گاو میش‌های مورد مطالعه از آذربایجان غربی در این مقاله دارد. نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتیجه کاربوتایپ گاوهای