



کاریوتیپ کروموزومی برخی از جمعیت های سگ بومی ایران

محبوبه علیزاده^۱، علی اکبر مسعودی^{۲*}، رسول واعظ ترشیزی^۳

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، ^۲استادیار و ^۳دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۰۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۰۶

چکیده

امروزه بررسی کاریوتیپ حیوانات اهلی به منظور آگاهی از ساختار ژنتیکی آنها اهمیت زیادی دارد. در مطالعه حاضر برای آگاهی از ساختار کروموزومی برخی از جمعیت های سگ بومی ایران، خون تازه از سگ های کردی، سرابی و بومی استان البرز استحصال شد. نمونه های خون در محیط کشت کامل به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. پس از انجام مراحل فوق و تهیه گسترش کروموزومی، کاریوتیپ نمونه ها مشخص شد و معیارهایی مانند شاخص سانترومر، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، طول کل کروموزوم، نسبت بازوها و طول نسبی کروموزوم ها بررسی و آنالیز گردید. نتایج حاصل نشان می دهد که سگ های بومی مطالعه شده دارای ۷۸ کروموزوم بوده که از این تعداد ۳۸ جفت کروموزوم اتوزوم آکروسنتریک در هر دو جنس، یک جفت کروموزوم جنسی متاستریک (X) در حیوانات ماده و یک کروموزوم جنسی متاستریک (X) و یک کروموزوم متاستریک (Y) در جنس نر می باشد. میانگین طول نسبی کروموزوم های اتوزومی در نمونه های مطالعه شده دارای دامنه ای از ۱/۱۳ تا ۴/۸۹ میکرومتر در نرها و ۱/۱ تا ۵/۲۱ میکرومتر در ماده ها بود. تجزیه واریانس داده های کروموزومی نشان داد که در حیوانات مختلف اختلاف معنی داری در پارامترهای کروموزومی وجود دارد. همچنین شاخص تقارن کاریوتیپی نشان دهنده نا متقارن بودن کروموزوم های جمعیت های مذکور و پیشرفته تر بودن تکامل کروموزومی این حیوان نسبت به هم خانواده هایش می باشد.

کلید واژه: سگ، کاریوتیپ، محیط کشت، ایران

مقدمه

در حیوانات مورد مطالعه نشان می‌دهد. تفاوت در شکل کروموزوم‌ها و تقارن کاریوتیپی از عوامل مهم در مطالعه تکامل است (Safarnejad and Kosravinasab, 2011). وجود تفاوت‌ها و شباهت‌های کاریوتیپی موجودات مختلف ناشی از روابط تکاملی آنها است. در اکثر موارد تعداد کروموزوم‌ها با درجه اختصاصی شدن گونه‌ها ارتباط دارد. به طوری که گونه‌های با درجه اختصاصی شدن بالاتر، دارای کروموزوم‌های کوچکتر هستند (Swanson and Merz, 1981). وجود اختلاف معنی دار بین گونه‌های یک جنس از نظر طول کروموزوم، نقش تغییرات کمی DNA را در روند گونه‌زایی نشان می‌دهد، و این اختلافات می‌تواند حاکی از تغییرات سازشی موجودات با محیط باشد. از آنجایی که کاریوتیپ حاصل از جمعیت‌های سگسانان تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر مقدار و توزیع هتروکروماتین دارد بنابراین اندازه، تعداد و شکل کروموزوم‌ها از فاکتورهای مهم در بررسی تکامل است (Switonski et al., 2003). شناسایی و ردیف کردن کروموزوم‌ها پیش‌نیازی اساسی برای نقشه‌های ژنومی مؤثر برای هر موجودی است، که این اطلاعات برای شناسایی شباهت‌ها و تفاوت‌های کروموزومی، بازآرایی کروموزوم‌ها در سلول‌های سرطانی و جایگاه مارکرهای ژنتیکی روی کروموزوم‌های مفید می‌باشد (Schubert et al., 1984; Rommel et al., 1988; Breen et al., 2001).

سگ اهلی متعلق به خانواده *canidae* می‌باشد که حدود ۵۰ تا ۶۰ میلیون سال قبل، از راسته گوشتخواران منشعب شده است (Breen, 2008). در داخل این خانواده انشعابات تکاملی از یک جد مشترک در حدود ۷ تا ۱۰ میلیون سال قبل گزارش شده است (Wayne, 1993; Breen, 2008). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که این خانواده به دو گروه بزرگ شامل سگسانان مشابه روباه و یا مشابه سگ، تقسیم شده است (Breen, 2008). مطالعات سیتوژنتیک ۳۴ گونه موجود در خانواده *canidae* نشان داد که تنوع قابل ملاحظه‌ای در شمار کروموزومی و مورفولوژی آنها وجود دارد. ساختار کاریوتیپ در خانواده *canidae* دامنه‌ای از $2n=34$ در روباه قرمز تا $2n=78$ در سگسانان گرگ‌مانند از جمله سگ اهلی متفاوت است (Wayne, 1993; Breen, 2008). کاریوتیپ سگسانان با شمار کروموزومی پایین‌تر حاوی اتوزوم‌های با دو بازو است، در حالی که اتوزوم‌ها در سگسانان گرگ‌مانند همه آکروسنتریک^۱ هستند. بنابراین به نظر می‌رسد این خانواده تحت تأثیر میزان نسبتاً بالایی از تکامل کاریوتیپی بوده و یک فرصت مناسب برای استفاده از آنها در مباحث تکامل سیتوژنتیکی و ارزیابی تکامل کروموزومی پدید می‌آورد (Breen, 2008). گروه‌بندی کروموزوم‌های یک فرد بر اساس تعداد، اندازه، شکل و سایر ویژگی‌های تیپیک کروموزومی اطلاعات ژنتیکی زیادی را

^۱ - Acrocentric

کروموزوم‌ها شده است (Breen, 2008; Breen *et al.*, 2001). در ادامه Selden *et al.* (1975)، کاریوتیپ G بندینگ را برای سگ ارائه کردند و پس از آن به دنبال تلاش‌های فراوان منجر به ایجاد کاریوتیپ کامل و قابل اعتماد با استفاده از بسیاری از روش‌های بندینگ شدند (Breen *et al.*, 2001). مشخص شده است که برای تعدادی از کروموزوم‌های اتوزوم، الگوی بانندی به تنهایی برای توصیف کاریوتیپ کاملی از سگ کافی نمی باشد. بنابراین برای یکنواختی توصیف کروموزوم‌ها، کمیته‌ای برای استاندارد کردن کاریوتیپ سگ اهلی در اوایل دهه ۱۹۹۰ تحت نظارت Dog Map Workshop تاسیس شده است. این کمیته نامگذاری خاصی برای کاریوتیپ سگ بیان کرد که در عرصه بین‌المللی پذیرفته شد. با استفاده از کاریوتیپ معمولی امکان شناسایی کروموزوم‌های ۱ تا ۲۱ سگ وجود دارد، اما باید توجه داشت که یک کاریوتیپ کامل استاندارد نیازمند استفاده از سیتوزنتیک مولکولی است (Switonski *et al.*, 1996). همزمان Langford *et al.* (1966) از جریان متغیر با تفکیک بالا^۳ برای مرتب سازی کروموزوم‌های سگ استفاده کردند. با استفاده از این مجموعه شناساگرهای رنگی کروموزوم، محققان موفق به نامگذاری جامعی برای کروموزوم‌های ۲۱ تا ۳۸ (CFA21-38) سگ‌ها شدند (Breen, 2008; Breen *et al.*, 1998). سیستم شماره گذاری کروموزوم‌ها که توسط کمیته پیشنهاد شده بود،

با این حال برای سال‌های طولانیست که به سیتوزنتیک سگ اهلی توجهی نشده است، که این امر تا حد زیادی ناشی از مشکل بودن شناسایی کروموزوم‌ها، به علت حضور شمار دیپلوئیدی بالا $2n=78$ و تشابه در اندازه واگرایی باندها در بسیاری از اتوزوم‌های کوچکتر است (Breen *et al.*, 2001). شمار کروموزوم در سگ برای اولین بار با مطالعه میتوزی سلول‌ها توسط Minouchi (1928) آشکار شد، و بعداً با استفاده از کشت لنفوسیت‌های محیطی توسط Gustavsson (1964) مورد مطالعه قرار گرفت (Breen *et al.*, 2001; Breen, 2008). کاریوتیپ سگ‌های مطالعه شده شامل ۳۸ جفت کروموزوم آکروستریک، یک کروموزوم ساب‌متاستریک^۱ بزرگ X و یک کروموزوم متاستریک^۲ کوچک Y است (Breen, 2008; Topashka-Ancheve *et al.*, 2009). بر اساس اطلاعات توالی ژنوم، بزرگترین کروموزوم اتوزومی سگ، طولی در حدود ۱۲۵ مگا جفت باز دارد، که مشابه کروموزوم ۱۲ انسان است. با این حال ۵ کروموزوم بزرگ سگ، از کروموزوم ۱۸ انسان کوچکتر هستند (Breen, 2008). کاهش تدریجی در اندازه کاریوتیپ منجر به شناسایی جفت کروموزوم‌های همولوگ شده است. برای تعدادی از گونه‌های پستاندار، توسعه تکنیک‌های رنگ آمیزی و مشاهده کروموزوم به سرعت در اوایل دهه ۱۹۷۰ فراهم شده است که منجر به شناسایی جفت کروموزوم‌های همولوگ و توسعه نامگذاری و شماره‌گذاری استاندارد

^۱- Submetacentric

^۲- Metacentric

^۳ - High-Resolution Bivariate Flow

جنس نر و یک نمونه جنس ماده) و سگ بومی البرز (یک نمونه جنس نر و یک نمونه جنس ماده) در لوله های ونوجکت حاوی هپارین جمع آوری و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. سپس به هر نمونه ۵ میلی لیتر محیط کشت کامل اضافه و مخلوط شد. برای کشت سلولی، نمونه ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. حدود ۱ تا ۱/۵ ساعت قبل از برداشت مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلشیسین به محیط کشت اضافه شد و دوباره لوله های کشت شده به انکوباتور منتقل شده و تا ۷۲ ساعت نگهداری شدند. بعد از تاثیر کلشیسین، نمونه های خون از انکوباتور برداشته شده و به لوله های سانتریفیوژ منتقل شدند. لوله ها در دور ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع بالایی دور ریخته شده و محلول هیپوتون به هر یک از نمونه های باقیمانده اضافه شده و ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از آن محلول سوسپانسیون در دور ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی بیرون ریخته شد. در مرحله بعدی سلول ها با اضافه شدن محلول فیکساتور و سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰ تثبیت شدند. این مرحله چندین بار تکرار می شود تا رنگ محلول سفید شود. در نهایت محلول حاصل به دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان تهیه گسترش منتقل شد. پس از تهیه گسترش و خشک شدن لام ها در هوای آزاد، رنگ آمیزی معمولی با محلول ۱۰ درصد گیمسا انجام شد.

توسط انجمن بین المللی ژنتیک دام (ASG) در سال ۲۰۰۰ تأیید شد. با این حال باید گفت که با وجود معرفی ابزارهای پیچیده برای شناسایی کروموزومها، هنوز از کاربوتیپ به منظور شناسایی کروموزومها در سگ استفاده می شود (Breen, 2008). ایران با دارا بودن تنوع بالایی از سگ های بومی و با قرار گرفتن در مسیر جاده ابریشم که در حقیقت منطقه حد واسط مهاجرت این موجود از مناطق آسیایی به اروپایی می باشد، می تواند در مطالعات تکمیلی تکامل این گونه حائز اهمیت باشد. این در حالی است که هیچگونه مطالعه سیتوژنتیکی از اکوتیپ های سگ های کشور در دسترس نمی باشد. لذا مطالعه حاضر جهت آگاهی از وضعیت کاربوتیپی برخی از این جمعیت های بومی کشور (جمعیت سرابی، کردی و بومی البرز) اجرا شده است.

مواد و روش ها

مواد لازم برای انجام کاربوتایپ، شامل محیط کشت و مکمل های محیط کشت می باشد. در این تحقیق از محیط کشت RPMI1640 استفاده شده است. مکمل های محیط کشت شامل میتوزن فیتوهمانگلوآنتینین، آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین، هپارین و سرم جنین گاوی بود. کارهای اجرایی این تحقیق در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. جهت انجام کاربوتیپ حدود ۲ تا ۳ میلی - لیتر خون با ۵ تکرار از جمعیت های سگ سرابی (یک نمونه جنس نر)، سگ کردی (یک نمونه

نتایج و بحث

با مطالعه کاربوتیپ کروموزومی نمونه هایی از جمعیت های سرابی، کردی و بومی البرز تعداد کل کروموزوم ها $2n=78$ مشاهده شد، که ترکیبی از ۳۸ جفت اتوزوم با کاهش تدریجی در اندازه و یک کروموزوم جنسی بود. در کاربوتیپ سگ کردی ماده میانگین طول بزرگترین و کوتاه ترین کروموزوم این حیوان به ترتیب $4/57$ میکرومتر مربوط به کروموزوم شماره ۱ و $0/98$ میکرومتر مربوط به کروموزوم ۳۸ بدست آمد (شکل ۱ و ۲). در کاربوتیپ سگ کردی نر میانگین طول بزرگترین و کوتاه ترین کروموزوم این حیوان به ترتیب $3/91$ میکرومتر مربوط به کروموزوم X و $0/66$ میکرومتر مربوط به کروموزوم Y بود (شکل ۳ و ۴).

کاربوتیپ سگ سرابی میانگین طول بزرگترین و کوتاه ترین کروموزوم این حیوان را به ترتیب $4/76$ مربوط به کروموزوم X و $0/79$ مربوط به کروموزوم Y منتسب کرد (شکل ۵ و ۶).

میانگین طول بزرگترین و کوتاه ترین کروموزوم سگ بومی البرز جنس نر به ترتیب $5/85$ مربوط به کروموزوم X و $0/96$ مربوط به کروموزوم Y می باشد (شکل ۷ و ۸). همچنین میانگین طول بزرگترین و کوتاه ترین کروموزوم جنس ماده این جمعیت به ترتیب $4/66$ مربوط به کروموزوم یک و $0/96$ در کروموزوم ۳۸ می باشد (شکل ۹ و ۱۰).

برای مطالعه گسترش های کروموزومی از میکروسکوپ نوری استفاده شد. بررسی ها ابتدا با بزرگنمایی ۱۰ شروع و پس از پیدا کردن پلیت های متافازی از بزرگ نمایی ۴۰ و در نهایت ۱۰۰ با روغن ایمرسیون استفاده شد. برای پی بردن به تعداد کروموزوم های هر یک از اکوتیپ ها، در هر لام چندین پلیت شمارش شد و پس از مطالعه چندین لام تعداد دقیق کروموزوم ها مشخص گردید. از نرم افزار Micro Measure 3.5 جهت آنالیز کاربوتیپ تصاویر حاصل استفاده گردید

(<http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>). برای بررسی کروموزوم ها از پارامترهای شاخص سانترومر (S%)، طول بازوی بلند (L)، طول بازوی کوتاه (S)، طول کل کروموزوم (TL)، نسبت طول بازوی کوتاه به بازوی بلند کروموزوم (r-value)، نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه کروموزوم (AR) و طول نسبی کروموزوم ها (RL) استفاده شد. داده ها در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه واریانس گردیدند. همچنین فرمول کاربوتیپی همه حیوانات بر اساس روش *Levan et al.* (1964)، محاسبه شد. برای سنجش تقارن کاربوتیپی از شاخص های TF% (درصد شکل کلی کاربوتیپ) و S% (شاخص تقارن) استفاده شد (Huziwara., 1962; Forni-Martins et al., 1994).

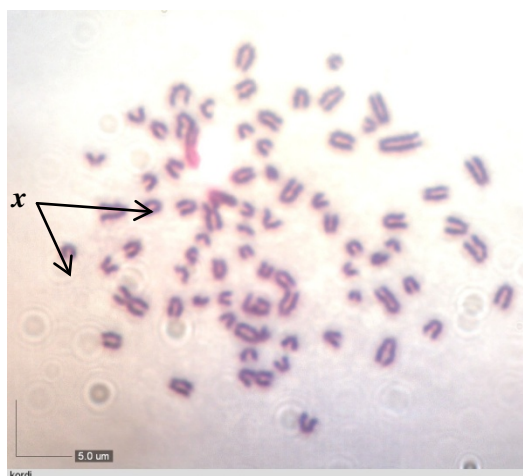
$$TF\% = \frac{\text{مجموع طول بازوهای کوتاه يك كاربوتیپ}}{\text{مجموع طول كل کروموزومهای يك كاربوتیپ}}$$

$$S\% = \frac{\text{طول کوتاه ترین کروموزوم كاربوتیپ}}{\text{طول بلند ترین کروموزوم كاربوتیپ}}$$

Kachare *et al.*, 2009; Lightner, 2009; احتمالاً (Breen, 2008; Horsting *et al.*, 1999 شمار دیپلوئیدی بالا در اثر شکست سانترومری در طول تکامل ایجاد شده است، و این شکست سانترومری باعث ایجاد تعداد زیادی کروموزوم با اندازه‌های کوچک شده است. مورفولوژی آکروستریک کروموزوم‌های اتوزومی و متاستریک کروموزوم‌های جنسی سگ‌های مطالعه حاضر، مشابه مورفولوژی کروموزوم‌های سگسانان در مطالعات دیگر می‌باشد (Kachare *et al.*, 2009; Topashka-Ancheva *et al.*, 2009)، که مورفولوژی آکروستریک کروموزوم‌ها نشان دهنده فرار گرفتن این حیوان در تکامل کاربوتیپی بالاست.

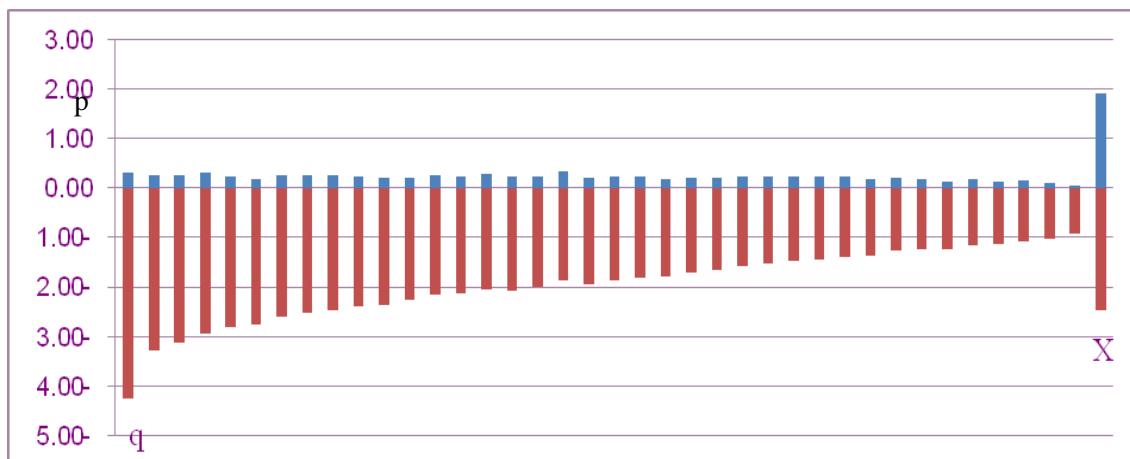
خلاصه اطلاعات کروموزومی مربوط به همه حیوانات در جدول ۱ آورده شده است. همه کروموزوم‌های اتوزومی دارای مورفولوژی آکروستریک و یک بازو بودند. کروموزوم جنسی X متاستریک، دارای دو بازو و از نظر اندازه مشابه بزرگترین کروموزوم اتوزوم بود، بنابراین تعداد کل بازوها ۸۰ عدد می‌باشد. کروموزوم Y کوچکترین کروموزوم و متاستریک می‌باشد. بلندترین طول کل کروموزوم مربوط به سگ بومی البرز (نر) و کوتاه‌ترین طول کروموزوم مربوط به سگ کردی (نر) بود.

شمار کروموزوم‌های دیپلوئید برای سگ‌های بررسی شده در تحقیق حاضر $2n=78$ بود که مشابه نتایج دیگر مطالعات است (Nie *et al.*, 2012; Topashka-Ancheva *et al.*, 2009;



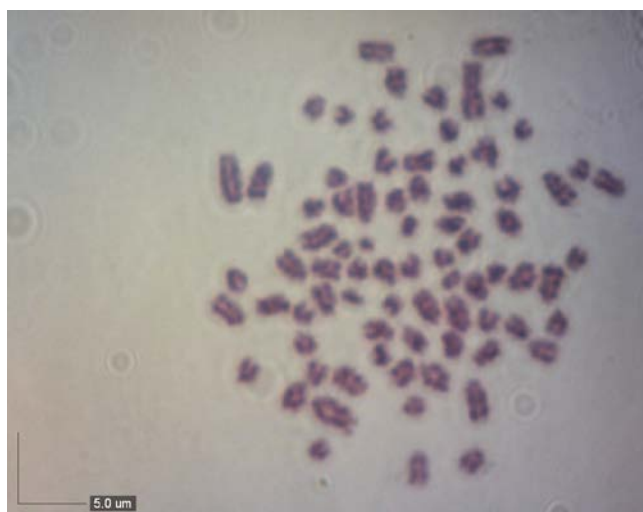
شکل ۱- کاربوتیپ سگ کردی (جنس ماده) با مقیاس $5\mu\text{m}$.

Figure 1- Karyotype of the Kurd ecotype (female).



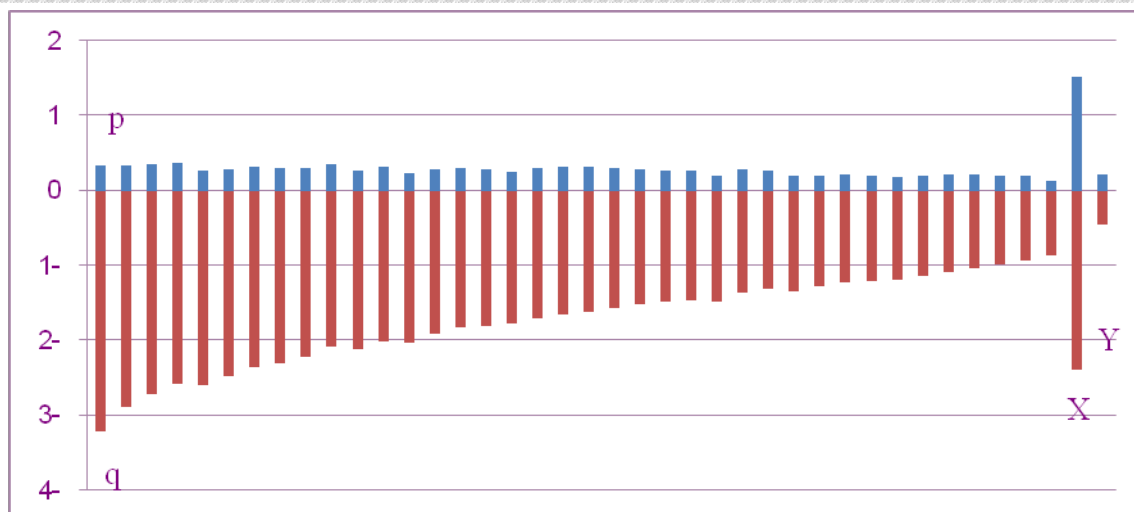
شکل ۲- ایدیوگرام سگ کردی (جنس ماده). کروموزوم ها بر اساس اندازه از بزرگ به کوچک ردیف شده اند و بخش بالایی نشان دهنده بازوی کوتاه و بخش پایینی نشان دهنده بازوی بلند کروموزوم ها می باشد. آخرین کروموزوم، کروموزوم جنسی X است.

Figure 2- Ideogram of the Kurd ecotype (female). Chromosomes subsequently aligned according to the size. The upper and lower part of the ideogram indicates the short and long arm of the chromosomes, respectively. The last one indicates as X chromosome.



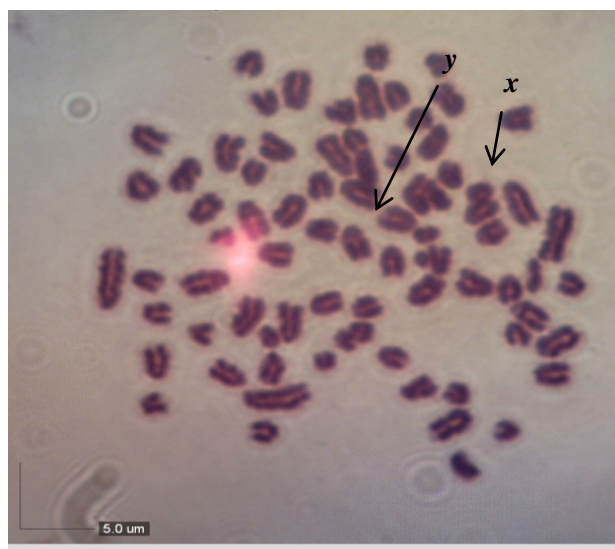
شکل ۳- کاریوتیپ سگ کردی (جنس نر) با مقیاس $5.0\mu\text{m}$.

Figure 3- Karyotype of the Kurd ecotype (male).



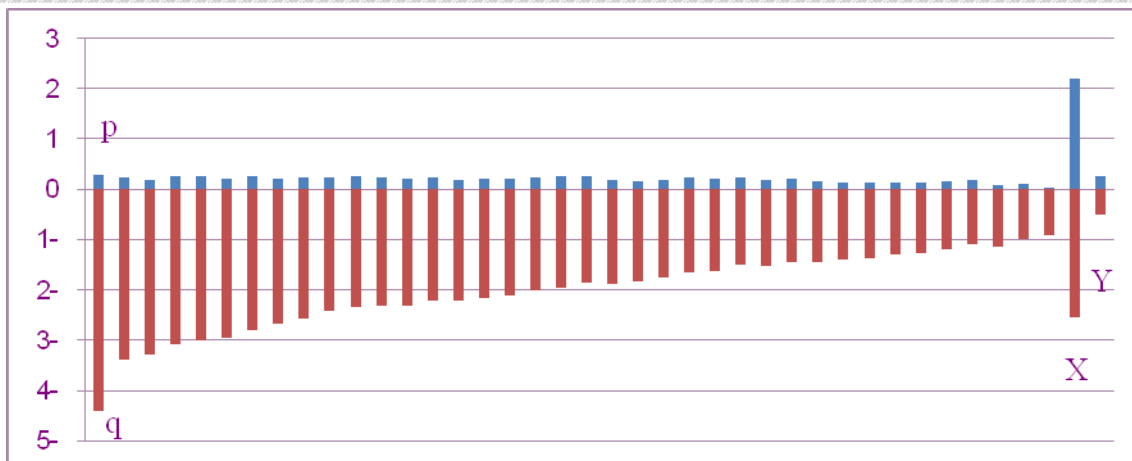
شکل ۴- ایدیوگرام سگ کرد (جنس نر). در این شکل کروموزوم ها بر اساس اندازه از بزرگ به کوچک ردیف شده اند و بخش بالایی نشان دهنده بازوی کوتاه و بخش پایینی نشان دهنده بازوی بلند کروموزوم ها می باشد. دو کروموزوم انتها به ترتیب کروموزوم جنسی X و Y است.

Figure 4- Ideogram of the Kurd ecotype (male). Chromosomes subsequently aligned according to the size. The upper and lower part of the ideogram indicates the short and long arm of the chromosomes, respectively. Two end chromosomes are X and Y chromosomes, respectively.



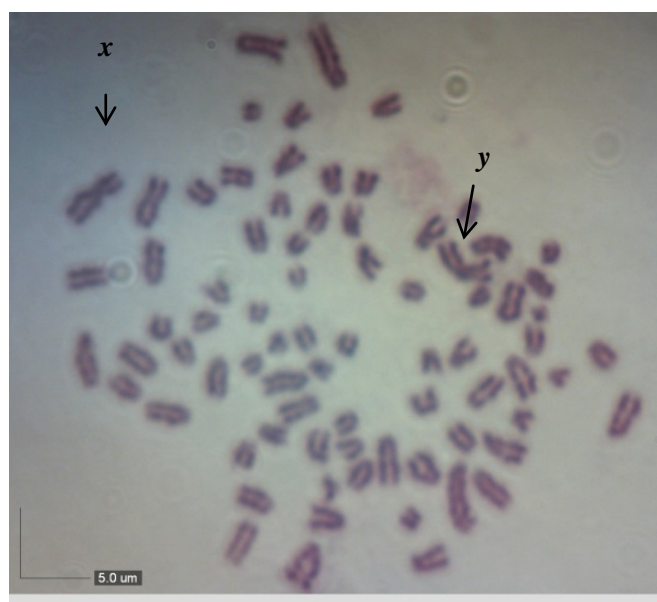
شکل ۵- کاریوتیپ سگ سرابی (جنس نر) با مقیاس $5.0\mu\text{m}$.

Figure 5- Karyotype of the Sarabi ecotype (male).



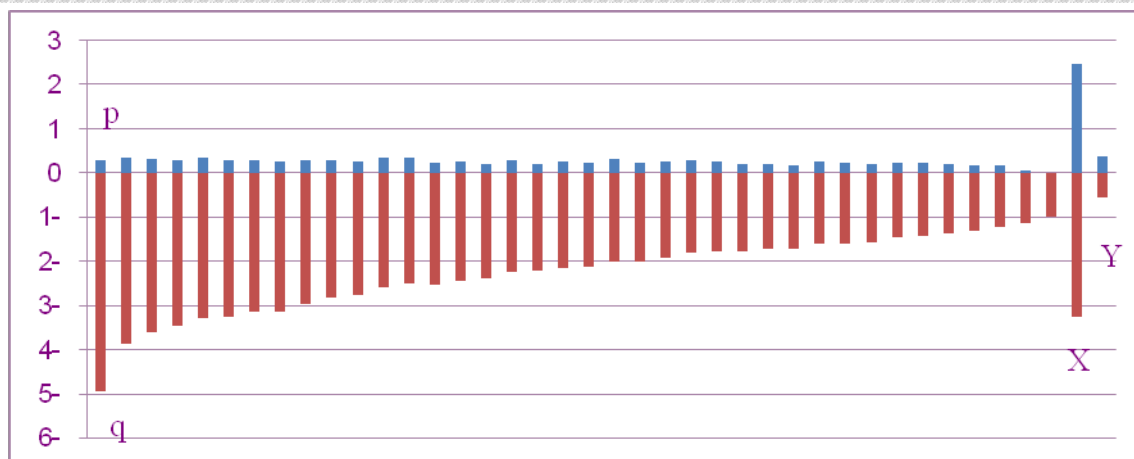
شکل ۶- ایدیوگرام سگ سرابی (جنس نر). در این شکل کروموزوم ها بر اساس اندازه از بزرگ به کوچک ردیف شده اند و بخش بالایی نشان دهنده بازوی کوتاه و بخش پایینی نشان دهنده بازوی بلند کروموزوم ها می باشد. دو کروموزوم انتها به ترتیب کروموزوم جنسی X و Y است.

Figure 6- Ideogram of the Sarabi ecotype (male). Chromosomes subsequently aligned according to the size. The upper and lower part of the ideogram indicates the short and long arm of the chromosomes, respectively. X and Y chromosomes marked in the figure.



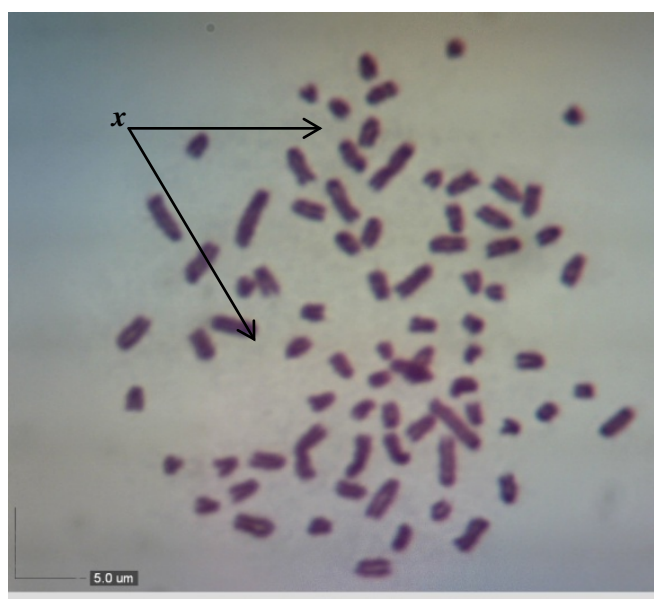
شکل ۷- کاریوتیپ سگ بومی البرز (جنس نر) با مقیاس $5\mu\text{m}$.

Figure 7- Karyotype of the Alborz sample (male).



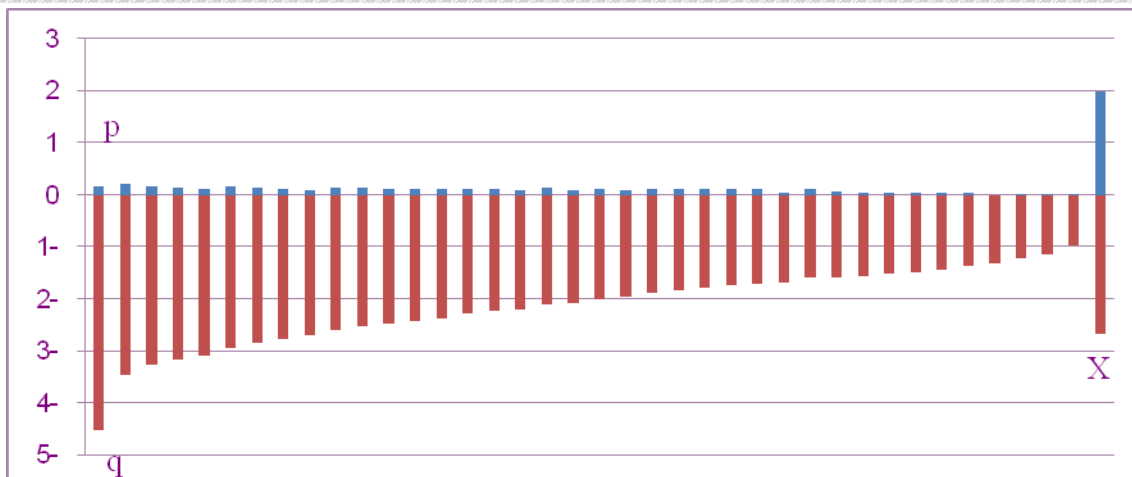
شکل ۸- ایدیوگرام سگ بومی البرز (جنس نر). در این شکل کروموزوم ها بر اساس اندازه از بزرگ به کوچک ردیف شده اند و بخش بالایی نشان دهنده بازوی کوتاه و بخش پایینی نشان دهنده بازوی بلند کروموزوم ها می باشد. دو کروموزوم انتها به ترتیب کروموزوم جنسی X و Y است.

Figure 8- Ideogram of the Alborz sample (male). Chromosomes subsequently aligned according to the size. The upper and lower part of the ideogram indicates the short and long arm of the chromosomes, respectively. Two end chromosomes are X and Y chromosomes, respectively.



شکل ۹- کاریوتیپ سگ بومی البرز (جنس ماده) با مقیاس $5.0\mu\text{m}$.

Figure 9- Karyotype of the Alborz sample (female).



شکل ۱۰- ایدیوگرام سگ بومی البرز (جنس ماده). در این شکل کروموزوم ها بر اساس اندازه از بزرگ به کوچک ردیف شده اند و بخش بالایی نشان دهنده بازوی کوتاه و بخش پایینی نشان دهنده بازوی بلند کروموزوم ها می باشد. آخرین کروموزوم، کروموزوم جنسی X است.

Figure 10- Ideogram of the Alborz sample (female). Chromosomes subsequently aligned according to the size. The upper and lower part of the ideogram indicates the short and long arm of the chromosomes, respectively. The last one indicates as X chromosome.

مطالعه حاضر است. اما میانگین طول نسبی کروموزوم Y در سگهای بومی ایران در مقایسه با نژاد Karwani کمتر بود که می تواند به دلیل خطای اندازه گیری (به علت کوچک بودن بسیار زیاد این کروموزوم) و یا متفاوت بودن طول این کروموزوم در متافازهای مختلف باشد که جای تامل دارد، چرا که کروموزومها در طی مراحل مختلف متافازی دارای اندازه های متفاوتی هستند و می تواند باعث دستیابی به نتایج متفاوتی گردد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۲ آورده شده است. این نتایج نشان می دهد که بین جمعیتها (کردی، سرابی و بومی البرز) و جنس-ها برای ویژگی های نسبت بازوها (AR)، درصد شکل کلی کروموزوم (F%) و r-value اختلاف معنی داری وجود دارد.

میانگین طول نسبی کروموزومهای اتوزومی در پنج سگ بومی ایران دارای دامنه ای از $1/13$ تا $4/89$ میکرومتر در نرها و $1/1$ تا $5/21$ میکرومتر در مادهها بود. میانگین طول نسبی کروموزوم X و Y از $5/58$ تا $0/87$ میکرومتر در نرها و $5/95$ میکرومتر در مادهها متغیر بود (جدول ۱). در مطالعه Kachare *et al.* (2009) میانگین طول نسبی کروموزومهای اتوزومی نژاد Karwani دارای دامنه ای از $1/29$ تا $5/45$ میکرومتر در نرها و $1/46$ تا $5/23$ میکرومتر در مادهها بود که مشابه اطلاعات بدست آمده در این خصوص برای سگهای بومی ایران است. همچنین میانگین طول نسبی کروموزوم X و Y، در مطالعه فوق $5/46$ و $1/26$ میکرومتر در نرها و $5/34$ در مادهها بود. میانگین طول نسبی برای کروموزوم X نیز مشابه اطلاعات بدست آمده در

جدول ۱- خلاصه اطلاعات کروموزومی برای حیوانات مورد مطالعه.

Table 1- The average data on all chromosomes of the samples.

س نر males			جنس ماده females			شماره کروموزوم No. chromosome
TL	AR	rl	TL	AR	rl	
4.46±0.79	13.43±3.52	4.89±0.43	4.61±0.06	19.93±10.21	5.21±0.04	1
3.67±0.46	10.69±2.54	4.25±0.10	3.6±0.09	14.4±3.32	4.06±0.02	2
3.45±0.36	12.05±5.53	3.8±0.01	3.38±0.026	16.24±6.15	3.82±0.05	3
3.32±0.35	11.09±1.00	3.85±0.04	3.27±0.04	14.73±7.89	3.69±0.037	4
3.23±0.35	10.47±0.55	3.56±0.05	3.12±0.11	18.1±9.58	3.52±0.05	5
3.13±0.35	11.32±2.81	3.63±0.06	3.02±0.13	16.11±1.35	3.4±0.07	6
3.03±0.33	9.22±1.91	3.34±0.03	2.92±0.10	14.45±7.03	3.29±0.04	7
2.93±0.34	10.13±2.25	3.39±0.05	2.83±0.07	15.64±8.37	3.19±0.01	8
2.82±0.30	8.81±1.58	3.11±0.01	2.75±0.05	17.87±12.04	3.1±0.008	9
2.71±0.29	8.78±1.24	3.14±0.03	2.67±0.06	14.05±6.82	3.01±0.007	10
2.63±0.25	8.68±0.82	2.9±0.04	2.61±0.07	14.04±4.71	2.95±0.01	11
2.58±0.24	8.81±0.38	2.99±0.02	2.53±0.07	16.14±8.25	2.85±0.02	12
2.51±0.24	9.32±1.42	2.77±0.02	2.47±0.08	13.2±8.94	2.79±0.03	13
2.44±0.23	9.72±1.65	2.83±0.02	2.42±0.08	14.66±7.66	2.73±0.03	14
2.48±0.23	8.96±1.97	2.63±0.02	2.36±0.04	13.71±8.94	2.66±0.01	15
2.32±0.21	8.98±0.98	2.7±0.06	2.31±0.03	14.17±7.66	2.61±0.02	16
2.27±0.21	8.53±1.37	2.5±0.058	2.26±0.04	14.34±8.70	2.55±0.008	17
2.21±0.19	8.85±1.33	2.57±0.06	2.22±0.038	10.69±4.89	2.5±0.01	18
2.17±0.18	7.53±0.14	2.4±0.06	2.16±0.01	14.63±8.08	2.44±0.03	19
2.12±0.18	7.81±0.14	2.46±0.03	2.11±0.02	11.9±5.87	2.39±0.02	20
2.06±0.19	8.87±1.50	2.27±0.02	2.05±0.002	13.59±9.23	2.32±0.04	21
2.00±0.18	8.45±2.08	2.33±0.02	1.98±0.009	12.43±5.10	2.23±0.03	22
1.95±0.18	7.92±1.24	2.15±0.02	1.93±0.02	11.78±5.04	2.18±0.01	23
1.9±0.17	7.47±0.35	2.2±0.02	1.86±0.02	11.99±5.87	2.1±0.02	24
1.84±0.16	7.44±0.37	2.04±0.03	1.82±0.03	10.91±5.14	2.05±0.01	25
1.78±0.17	7.51±0.26	2.06±0.04	1.78±0.03	11.01±5.49	2.01±0.007	26
1.72±0.15	8.33±1.21	1.9±0.04	1.72±0.015	19.37±17.04	1.94±0.02	27
1.67±0.14	8.91±1.63	1.94±0.04	1.68±0.01	10.72±4.81	1.89±0.02	28
1.63±0.15	7.81±0.56	1.8±0.02	1.64±0.01	14.56±10.28	1.85±0.02	29
1.58±0.15	8.19±1.26	1.84±0.02	1.58±0.04	18.28±14.18	1.78±0.01	30
1.53±0.14	8.77±1.84	1.69±0.04	1.52±0.05	21.03±19.37	1.71±0.02	31
1.48±0.13	8.83±1.01	1.72±0.04	1.48±0.06	19.52±16.12	1.67±0.02	32
1.44±0.13	8.08±1.51	1.59±0.05	1.42±0.07	19.52±15.95	1.6±0.04	33
1.39±0.11	7.98±1.23	1.61±0.06	1.37±0.05	17.02±13.74	1.55±0.02	34
1.32±0.09	8.3±1.41	1.46±0.07	1.3±0.02	127.63±169.8	1.46±0.01	35
1.25±0.07	10.07±4.53	1.45±0.07	1.24±0.06	32.41±35.65	1.4±0.02	36
1.14±0.03	15.56±13.24	1.26±0.10	1.15±0.015	28.08±28.17	1.3±0.01	37
0.97±0.03	24.03±14.48	1.13±0.14	0.97±0.009	46.31±48.24	1.1±0.035	38
4.84±0.98	1.33±0.21	5.58±0.55	4.52±0.19	1.31±0.05	5.09±0.1	X
0.79±0.12	1.61±0.23	0.87±0.05				Y
S%=4.85	TF%=11.96	CV%=223.8	S%=10.3	TF%=9.27	CV%=248.9	

بلند (L)، طول بازوی کوچک (S) و طول نسبی کروموزوم (RL) در دو جنس اختلاف معنی داری نشان ندادند. لذا می توان بیان کرد که این جمعیت ها از لحاظ تعدادی از ویژگی های کروموزومی تنوع مطلوبی را نشان می دهند. تنوع کاریوتیپی می تواند منشاء ایجاد تنوع ژنتیکی شود.

همچنین پارامترهای طول بازوی بلند (L)، طول کل کروموزوم (TL) در سه جمعیت و پارامترهای طول بازوی کوچک (S) در دو جنس اختلاف معنی داری نشان دادند. پارامترهای دیگر اعم از طول بازوی کوچک (S) و طول نسبی کروموزوم ها در بین سه جمعیت، و طول بازوی جدول ۲- تجزیه واریانس پارامترهای کروموزومی.

Table 2- ANOVA analysis of the data on all chromosomes of the samples.

Ms							منبع تغییرات	
F%	RL	r-value	AR	TL	L	S	df	Source of change
0.576**	0.002 _{ns}	0.217**	137800.11**	7.75**	11.55**	0.114 ^{ns}	2	جمعیت Population
1.028	0.719 _{ns}	0.531**	196305.32**	0.003 ^{ns}	1.80 ^{ns}	0.933**	1	جنس Sex
0.118	0.946	0.019	3181.13	0.935	0.702	0.102	985	خطا Error
							989	کل Total

*، ** اختلاف معنی دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪، ^{ns} غیر معنی دار

*، ** significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ^{ns} no significant difference

همه نمونه ها پایین بود که نشان دهنده عدم تقارن کاریوتیپی برای این حیوانات است (جدول ۱). با توجه به اینکه همه کروموزوم های اتوزومی مشاهده شده در این مطالعه آکروستریک بودند، نامتقارن بودن کاریوتیپ کروموزومی قابل توجهی می باشد. از شاخص تقارن (S%) نیز برای بررسی وضعیت تقارن استفاده می کنند (Gennur et al. 1988). هر چه مقدار این شاخص به سمت مقادیر کمتر از ۱۰۰٪ میل کند، نشان دهنده اختلاف بیشتر کروموزوم ها از نظر طول می باشد. شاخص تقارن برای نمونه های مطالعه شده دارای مقادیر پایینی است (جدول ۱)، که نشان می دهد

همچنین فرمول کاریوتیپی همه حیوانات بر اساس روش Levan et al. (1964)، برای حیوانات ماده و نر به ترتیب $76a+XX$ و $76a+XY$ تعیین شد. همانطوریکه در بخش مواد و روش ها ذکر گردید، برای سنجش تقارن کاریوتیپی از درصد شکل کلی کاریوتیپ و شاخص تقارن استفاده شد. از آماره شکل کلی کاریوتیپ می توان برای دسته بندی کاریوتیپ استفاده نمود. هنگامی که ارزش عددی این شاخص به ۵۰٪ برسد، نشان دهنده قرار گرفتن سانترومرها در وسط کروموزوم ها است. در این مطالعه شاخص درصد شکل کلی کاریوتیپ برای

گرفته است. در این بررسی مشخص شد که تعداد کروموزوم‌های سگ‌های بومی ایران مشابه دیگر مطالعات انجام گرفته روی سگ‌ها $2n=78$ است که دارای بیشترین شمار دیپلوئید در خانواده *Canidae* می‌باشد. مورفولوژی کروموزوم‌های اتوزومی آکروستریک و در کروموزوم‌های جنسی متاستریک بود. هیچ نوع اختلال کروموزومی از نظر تعداد و ناهنجاری‌های مشابه OY، OX و XXY در این سگ‌ها مشاهده نشد که می‌توان گفت کاریوتیپ سگ اهلی خیلی پایدار است و چند شکلی در مورد شمار و ساختار آن مشاهده نمی‌شود. از طرفی به علت کوچک بودن بیش از اندازه کروموزوم‌های سگ‌سانان و برای درک دقیقتر از ساختار سیتو ژنتیکی (کروموزومی) سگ‌های بومی ایران، انجام الگوبندی کروموزومی (الگو بندی G) در مطالعات تکمیلی امری ضروری به نظر می‌رسد.

کروموزوم‌های این حیوانات از نظر طول اختلاف دارند. بنابراین نتایج بدست آمده از دو شاخص درصد کلی کاریوتیپ و شاخص تقارن هر دو مؤید این مطلب است که کاریوتیپ سگ‌های بومی ایران نامتقارن است. نسبت کروموزوم‌های دارای نسبت بازوهای (AR) بزرگتر از ۲ در بین کروموزوم‌ها $97/43$ درصد و نسبت طول کوچکترین کروموزوم به بزرگترین کروموزوم تقریباً یک به چهار بود، بنابراین بر اساس دسته‌بندی Stebbins (1971) کاریوتیپ کروموزومی نمونه‌های مورد مطالعه در گروه $3C$ قرار گرفت. این روش، روش مناسبی برای شناخت جایگاه کاریوتیپ گونه‌ها از لحاظ تکاملی است هر چه از کلاس A به کلاس C نزدیکتر شویم کاریوتیپ نامتقارن‌تر و گونه پیشرفته‌تر می‌شود (Stebbins, 1971). با توجه به قرار گرفتن کاریوتیپ نمونه‌های مورد مطالعه در کلاس $3C$ می‌توان گفت که این حیوان دستخوش حوادث تکاملی زیادی قرار

منابع

- Breen M, Reimann N, Bosma AA, Landon, D, Zijlstra S., Bartnitzke S, Switonski M, Long SE, de Haan NA, Binns MM, Bullerdiek J, Langford CF (1998). Standardisation of the chromosome nos. 22- 38 of the dog (*Canis familiaris*) with the use of chromosome painting probes; Proceedings of the 13th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals; Budapest.
- Breen M, Switonski M, Binns M M (2001). Cytogenetic and physical chromosome maps. Chapter 11 in Genetics of the Dog. Ruvinsky and Sampson- eds. CAB International, Oxon, U.K.
- Breen M (2008). Canine cytogenetics – from band to basepair. Cytogenetic and genome Research 120: 50-60.
- Forni-Matins, E. R., Franchi-Tanibata, M . and Cardelli-De-Lucena, A. (1994). Karyotype of species of *Sesbania* scope. Cytologia 59: 13-18.
- Gennur MN, Habib AF, Kadapa G (1988). Karyomorphological studies of nine Asiatic cotton I. karyotypic analysis of species and races of Asiatic cottons based on chromatin content. Cytologia 53: 79-106.

- Gustavsson I (1964). The chromosomes of the dog. *Hereditas* 51:187-189.
- Horsting N, Wohlsein P, Reimann N, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Nolte I (1999). Cytogenetic analysis of three oropharyngeal malignant melanomas in dogs. *Research Veterinary Science* 67:149–151.
- Huziwaru, Y. (1962). Karyotype analysis in some genera of Compositae. VII, Further studies on the chromosome of *Aster*. *American Journal of Botany* 49: 116-119.
- Kachare RW, Kanadkhedkar HL, Pawar DH, Adgale AA, Shaikh SH, Katkade BS, Umriker UD (2009). Chromosome architecture, G banding studies and media comparison for lymphocyte culture of karwani dogs. *Journal of Bombay Veterinary College* 17: 5-7.
- Langford CF, Fischer PE, Binns MM, Holmes NG, Carter NP (1996). Chromosome-specific paints from a higher resolution flow karyotype of the dog. *Chromosome Research* 4:115–123.
- Levan A, Fredga K, Sandberg A (1964). Nomenclature for centromeric position parameter of dispersion index that serves as an adjunct to karyotype asymmetry. *Journal of Bioresources* 17:179-182.
- Lightner JK (2009). Karyotypic and allelic diversity within the canid baramin (canidae). *Journal of Creation* 23 94-98.
- Minouchi O (1928). The spermatogenesis of the dog, with special reference to meiosis. *Japanese Journal of Zoology* 1: 255-268
- Nie W, Wang J, Su W, Wang D, Tanomtong A, Perelman P L, Graphodatsky A S, Yang F (2012). Chromosomal rearrangement and karyotype evolution in carnivores revealed by chromosome painting. *Heredity* 108: 17-27
- Rommel B, Hutter K J, Bullerdiek J, Bartnitzke S, Goertler K, Schloot W (1988). Identification of flow-sorted chromosomes by G-Banding and *In situ* hybridization. *Cytometry* 9: 504-507.
- Safarnejad A, Kosravinasab Z (2011). Cytogenetic study of *cuminum setifolium* (BOISS) kospol as a medicinal plant. *International Journal of Science and Nature* 2: 105-109.
- Schubert I, Reiger R, Dobel P (1984). G and/or C-banding in plant chromosomes? *Journal of Cell Science* 71: 111-120.
- Selden JR, Moorhead PS, Oehlert ML, Patterson DF (1975). The Giemsa banding pattern of the canine karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetics* 15: 380–387.
- Stebbins GL (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold publisher. London. UK.
- Swanson C P, Merz T (1981). *Cytogenetics: the Chromosome in division inheritance and evaluation*, 2nd ed. Prentice-Hall, Boston.
- Switonski M, Reimann N, Bosma A A, Long S, Bartnitzke S, Pienkowska A, Moreno-Milan MM, Fischer P (1996). Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. Committee for the Standardized Karyotype of the Dog (*Canis familiaris*). *Chromosome Research* 4:306–309.
- Switonski M, Rogalska-Niznik N, Szczerbal M, Baer M (2003). Chromosome polymorphism and karyotype evolution of four canids: the dog, red fox, arctic fox and raccoon dog. *Caryologia* 56: 375-385.
- Topashka-Ancheva M, Gerasimova TS, Dinchev V, Dimitrov K (2009). Karyological data about the Bulgarian native dog breed 'karakachan dog'. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 23:136-139.

Karyotype analysis of some Iranian native dog population

Alizadeh M.¹, Masoudi A.A.*², Vaez Torshizi R.³

¹MSc student, ² Assistant Professor and ³ Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran

Abstract

Today, Karyotyping studies are important to understand the genetic structure of animals. In the current research to evaluate the chromosomal structure of some Iranian native dogs, blood samples were collected from the Kurdi, Sarabi and samples of Alborz province. Blood samples were cultured in defined medium for 72 h at 37 °C. Then the cell divisions were stopped at metaphase stage and chromosomal specimens were prepared for karyotype analysis. Next, centromeric index, total length of chromosome, chromosomal arm ratios and relative length of chromosomes were analyzed and the ideograms were created. The results indicated that the dog genomes contain 78 chromosomes including 38 acrocentric pairs in each sex, a pair of metacentric X in males and females and one metacentric Y chromosome in males. The average relative length of the autosomal chromosomes ranges from 1.13 to 4.89 μm in males and 1.10 to 5.21 μm in females. The ANOVA of the chromosomal data indicated that significant ($P \leq 0.05$) differences in chromosomal parameters were observed in animals. The results indicate a bias of chromosome asymmetry in animals which could be related to evolutions of the canine chromosomal structures.

Key words: *dog, karyotype, medium, Iran.*

* Corresponding Author: Masoudi A.A.

Tel: 09193650768

Email: masoudia@modares.ac.ir



مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

