# مطالعه سیتوژنتیکی اسب نژاد کرد

• **غلامرضا وفایی سیاح**، عضو هیات علمی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر
• **رضا مهران نژاد**، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

**تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۳**

**E.mail: rmehrannezhad @ yahoo.com**

## چکیده

**اسب نژاد کرد یکی از نژادهای اصیل و بومی ایران است که اسبی پر نفس و پر استقامت بوده و در مقابل سرما و گرما مقاومت مناسبی دارد. بر طبق نوشته‌های قدیمی جهانگردان و مورخین از هرودوت گرفته تا تحقیقات معاصر پراکندگی اسب کرد در اقصی نقاط دنیا گزارش شده است. در بررسی حاضر برای تهیه گسترش‌های متافازی، نمونه خون از تعداد ۳۰ رأس جنس‌های نر و ماده اسبهای کرد تهیه شد. نمونه‌های خون جهت انجام کشت لنفوسیت با روش ( Short term culture) به آزمایشگاه منتقل و سپس اقدام به رنگ آمیزی، بررسی میکروسکوپی و عکسبرداری و تهیه کاریوتایپ از آنها گردید. در این بررسی معلوم شد که مجموعه کروموزومی در نژاد کرد ۶۴ = 2n است. کروموزومهای غیر جنسی (اتوزومی) شامل ۸ جفت کروموزوم متاسانتریک، ۵ جفت کروموزوم ساب متاسانتریک و ۱۸جفت کروموزوم تلوسانتریک است. کروموزوم جنسی x ساب متاسانتریک و کروموزوم جنسی y تلوسانتریک است. با استفاده از نواربندی Gکاریوتایپ کروموزوم‌ها انجام گردید. با نواربندی C نواحی هتروکروماتین در محل‌های سانترومری کروموزوم‌ها مشخص شد .نتایج حاصله نشان داد که اسب نژاد کرد، جزء گونه *(Equus caballus)* است.**

**کلمات کلیدی: اسب ،نژاد کرد، سیتوژنتیک، کروموزوم، کاریو تایپ، نواربندیG، نواربندی C**

**Pajouhesh & Sazandegi No 66 pp: 75-79**

**Cytogenetical study of Kurd horse**

*By: Gholamreza Vafaei Sayah, Basic Science Department, Veterinary Faculty, Abhar Islamic Azad University.*
*Reza Mehrannezhad, Urmia Azad University.*

In this study blood samples from 50 Kurd horses were obtained. For determining of chromosome compelements blood samples were used for metaphasic preparation by useing short term culture method. Provided chromosomes were studied by simple Gimsa staining and G-banding method and C-banding. In this study the diploid model of Kurd horse was 2n=64 and from the 31 pairs of autosomal chromosomes, 8 pairs were metacentric, 5 pairs were submetacentric and 18 pairs were telocentric. Chromosomal spreads were photographed and karyotyped. The X sex chromosome was submetacentric and the Y sex chromosome was telocentric.

**Key words**: Kurd horse, Chromosome, Karyotype, C. band, G. band

## مقدمه

اسب اهلی در طبقه بندی جانور شناسی متعلق به سلسله جانوران زیر سلسله مهره داران شاخه طناب داران، رده پستانداران ،دسته سم داران و پستانداران علفخوار راسته فردسمان، خانواده اکوئیده، جنس اکوئوس ( Equus ). و زیرگونه (*Equus caballus*) و زیر گونه (*E. caballus.caballus*) است. اسب نژاد کرد بومی استان آذربایجان غربی بوده و نیز در استانهای زنجان، کرمانشاه، ایلام، لرستان و کردستان نیز پراکنده است و از جمعیت خوبی برخوردار است این نژاد، اسبی قدرتمند و با استقامت، دارای عضلات قوی در گردن و کپل است و دست و پا و سم محکم و قوی دارد. اسب نژاد کرد برای مسیرهای صعب العبور و کوهستانی مناسب است و نیز برای انجام مسابقات چوگان در سطح دنیا جزء نژادهای برتر محسوب می شود. با توجه به اینکه روی اسب نژاد کرد تا به حال مطالعه سیتوژنتیکی انجام نشده، در تحقیق حاضر مطالعه کاریوتایپ و C باندینگ و G باندینگ مورد توجه قرار گرفت. (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۱)

## موارد و روش‌ها

برای تهیه گسترش‌های متافازی، از ۳۰ راس نژاد کرد (نر و ماده ) اخذ نمونه خون کامل از ورید وداج با لوله‌های خلأدار حاوی هپارین تهیه گردید. نمونه‌ها در شرایط استریل و در کنار کیسه یخ و در جعبه سرد به آزمایشگاه ژنتیک منتقل شده و سپس کشت نمونه‌های خون در آزمایشگاه انجام شد. برای این منظور ابتدا میزان ۱ میلی‌لیتر خون کامل به محیط کشت RPMI۱۶۴۰ که حاوی ۲۰٪ سرم جنین گوساله (F.C.S) است اضافه گردید . سپس ۰/۱ میلی‌لیتر میتوژن PHA به هر یک از محیطها اضافه شد, لازم به ذکر است که تمامی مراحل در شرایط استریل , زیر هود و در کنار شعله انجام پذیرفت. در پایان نمونه‌ها را در داخل انکوباتور ۰/۱۵ میلی‌لیتر دار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت قرار دادیم (۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱).

به منظور متوقف کردن تقسیمات سلولی در مرحله متافاز به نمونه‌های خون ، مقدار ۰/۱۵ میلی‌لیتر کلشی سین ( ۰/۰۰۴ درصد ) اضافه شد و دوباره در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت، بعد از طی دوره انکوباسیون, نمونه‌های کشت شده را جداگانه در لوله‌های سانتریفوژ استریل ریخته به مدت ۷ دقیقه با ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده و مایع رو توسط پی پت دور ریخته و حدود ۶ میلی‌لیتر از محلول ۳۷درجه سانتیگراد کلرید پتاسیم (۰/۰۷۵مولار) به آن اضافه گردید. سپس لوله‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداده و سپس بعد از زمان مورد نظر اقدام به سانتریفوژ نمونه‌ها نمودیم و مایع رو را تخلیه و در حدود ۵ میلی‌لیتر از محلول فیکساتیو (اسید استیک و متانول به نسبت ۱به ۳ به نمونه‌ها اضافه کردیم (۶، ۷، ۸، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵).

شستشوی سلولها با محلول فیکساتیو آنقدر انجام می گیرد که مایع موجود در لوله سانتریفوژ شفاف شود. سپس اقدام به تهیه لام نموده و با رنگ آمیزی گیمسا (با رنگ گیمسای ۱۰٪ ) اقدام به رنگ آمیزی لامها به مدت ۱۰ دقیقه نمودیم.

بعد از رنگ آمیزی به مطالعه لامهای تهیه شده در زیر میکروسکوپ اقدام نموده و با میکروسکوپ دوربین دار از گسترشهای مناسب با فیلم رنگی با حساسیت (ASA=۱۰۰) و فیلم سیاه و سفید با حساسیت (ASA=۵۰) عکس تهیه شد. بعد از ظهور عکسها اقدام به تهیه کاریوتایپ آنها گردید.

### روش نواربندی G

برای انجام نوار بندی G نکات زیر رعایت گردید.

۱ـ لامهای تازه تهیه شده را به مدت ۱۰ـ ۸ روز در دمای اتاق نگهداری نمودیم.

۲ـ لامهای مورد نظر را به مدت ۱۵ ثانیه درون محلول تریپسین ۰/۰۳ درصد در دمای ۲۱ـ ۱۸ درجه سانتیگراد قرار دادیم.

۳ـ لامها را با محلول بافر فسفات شستشو نمودیم ، بعد از خشک شدن لامها آنها را با رنگ گیمسای ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی نمودیم (۸، ۱۰، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۲، ۲۳).

### روش نواربندی C

لامها را در هوای آزمایشگاه خشک نموده بعد از گذشت ۱۴ـ۷ روز به مدت ۱ ساعت داخل محلول اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال در دمای ۴۵ـ۴۰ دقیقه داخل محلول هیدروکسید باریم ۵٪ ($Ba(OH)_2$) در دمای ۵۵ـ۵۰ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم. سپس لامها را چندین بار با آب شستشو می دهیم و در این مرحله چندین بار آب مقطر را عوض کردیم.

در پایان با رنگ گیمسای ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه لامها را رنگ آمیزی کردیم و سپس به مطالعه لامها پرداختیم ( ۷، ۸، ۲۰، ۲۱).

## نتایج

در بررسیهای انجام گرفته که حاصل کشت نمونه‌های خونی ۳۰ رأس اسب نژاد کرد بوده نتایج زیر حاصل گردید :

مجموعه کروموزومی کروموزوم‌های اسب نژاد کرد n=۶۴ ۲ کروموزوم تعیین گردید.

کروموزومهای اتوزومی در این نژاد شامل ۸ جفت کروموزوم متاسانتریک و ۱۵ جفت کروموزوم ساب متاسانتریک ۱۸ جفت کروموزوم تلوسانتریک بود. ( تصویر ۱ و ۲ )

کروموزوم جنسی x ساب متاسانتریک و کروموزوم جنسی y تلوسانتریک بود. در نوارببندی سانترومری نژاد کرد مشخص شد که این نژاد دارای میزان زیاد و برجسته هتروکروماتین در کروموزوم جنسی x است.

با نوارببندی G ,در نژاد کرد کروموزومهای همولوگ شناسائی و کاریوتایپ تهیه گردید ( تصاویر ۱، ۳، ۶).

در نوارببندی C، نواحی هتروکروماتین در محلهای سانترومری در کروموزومها بررسی گردید و مشخص شد که در نژاد کرد ، مقدار هتروکروماتین در کروموزوم شماره۱ کروموزوم جنسی x وخصوصاً کروموزوم جنسی y بطور مشخص زیادتر از کروموزومهای دیگر است و در کروموزومهای دیگر مقدار هتروکروماتین در نواحی سانترومری ناچیز بود ( تصاویر ۴ و ۵).

همچنین با نوارببندی C ، کروموزوم جنسی y در جنس نر مشخص شد( تصویر ۵ ).

## بحث

در سال ۱۹۵۹ روتفل و همکارانش ، در سال ۱۹۶۲، ساساکی و همکارانش , تروجیلو و همکارانش و اونو ، هر یک بطور جداگانه ، کاریوتایپ اسب اهلی را تهیه کردند و مجموعه کروموزومی اسب اهلی را بصورت زیر مشخص نمودند ، این مجموعه کروموزومی شامل:

۱۸زوج کروموزوم غیرجنسی آکروسانتریک۱۳ زوج کروموزوم غیر جنسی متاسانتریک یا ساب متاسانتریک و نیز کروموزوم جنسی x ساب متاسانتریک کروموزوم جنسی y آکروسانتریک کوچک است. در پژوهش انجام گرفته ، مجموعه کروموزومی بدست آمده در اسب نژاد کرد , توسط مطالعات قبلی تأئید می‌گردد.

نتایج حاصل در این پژوهش ثابت می کند که اسب نژاد کرد , متعلق به گونه *Equus caballus* و زیرگونه اسب اهلی یا *E. caballus caballus* است. چاندلی و همکارانش در سال ۱۹۷۵ و بوچلند و همکارانش و نیزهان و مایشو درسال ۱۹۷۶بطور جداگانه موفق به نواربندی G در اسب اهلی گردیدند و الگوی آن را تهیه نمودند. نتایج حاصله در این پژوهش با نتایج محققان قبلی مطابقت دارد با استفاده از نواربندی C کروموزوم جنسی y در جنس نر شناسائی شد.

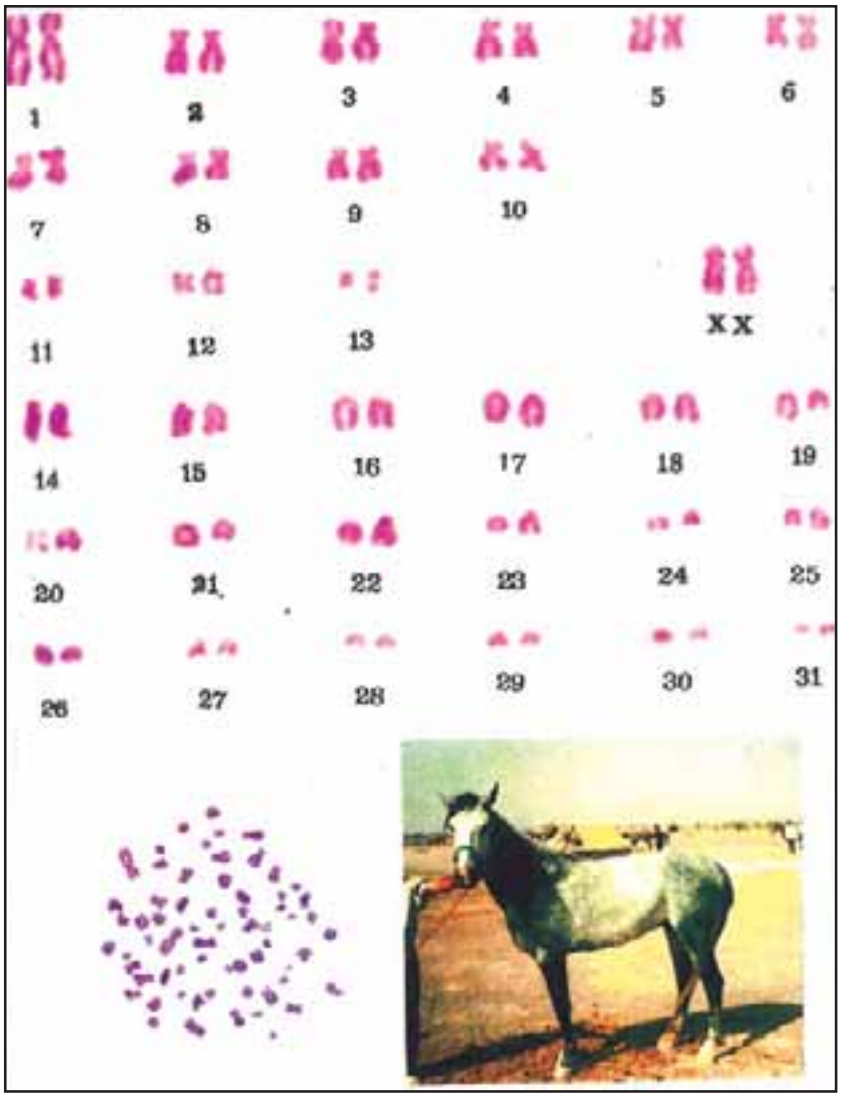
## پیشنهادات

۱ـ با توجه به اینکه استان آذربایجان غربی قطب دامپروری و کشاورزی در کشور محسوب می شود ، توجه بیشتر به امر اصلاح نژاد و به گزینی دامها و بهبود وضعیت دامپروری ضروری است.

۲ـ لزوم توجه به امر اسب داری و پرورش اسب با توجه به پراکندگی فراوان آن در نقاط مختلف استان ، شناسائی دقیق نژادها ، مشخص کردن تعداد دقیق اسبهای موجود و اصلاح نژاد آنها مورد تاکید است.

۳ـ توجه به مطالعات بنیادی و پایه ای در جهت بهبود امور پرورش اسب , از جمله مطالعات آناتومیکی ، فیزیولوژیکی و خون شناسی و خصوصاً ژنتیکی احساس می شود.

۴ـ با توجه به اینکه تکنیک‌های سیتوژنتیک در همه نقاط دنیا معمول است و از آنها در جهت تشخیص انواع ناباروریها و کم باروریها ، سقط جنین‌های مکرر ، تشخیص دو جنسیهای گوناگون و سایر ناهنجاری‌ها استفاده می شود. پیشنهاد می شود که از این تکنیک‌ها در مورد اسبهای منطقه



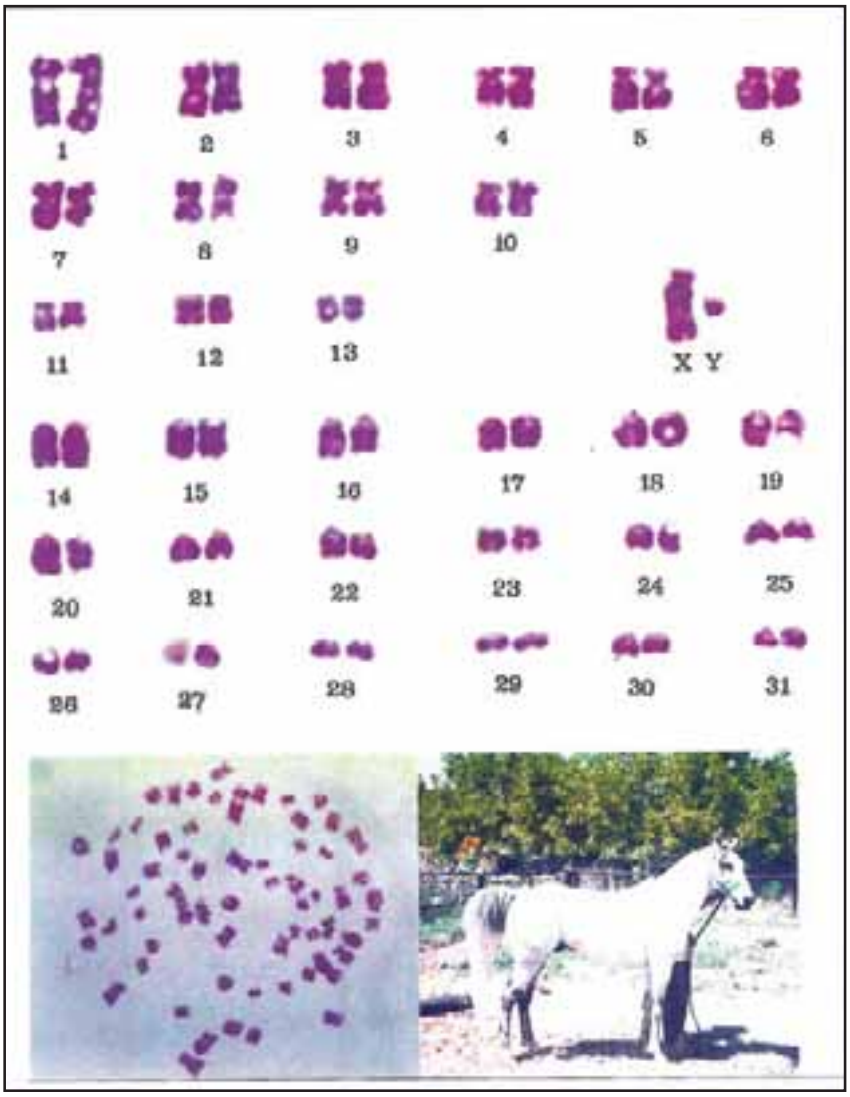

**تصویر ۱ ـ کاریوتایپ مادیان نژاد کرد ( ۶۴ = n۲ ) ( درشتنمایی ۱۰۰× )**

نیز استفاده شود که این خود نیازمند تأسیس یک آزمایشگاه رفرنس (مرجع) سیتوژنتیک با کادر مجرب است.

۵ـ پیشنهاد می شود ، آزمایشات سیتوژنتیک در سیلسی ماری که جهت جفت گیری استفاده می شوند، انجام پذیرد تا در صورت وجود هرگونه ناهنجاری‌های کروموزومی، هزینه‌های هنگفت صرف نگهداری آنها نگردد. همچنین انجام مطالعه کاریولوژیکی در مورد مادیانها و کره‌های تازه به دنیا آمده از اهمیت فراوان برخوردار است.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاریهای صمیمانه خانم لوئیز فیروز ، مهندس سهیل یوسف نیا ، آقای دکتر علی حسینی و آقای دکتر محمد تقی ابراهیم پور و دکتر حسین اسماعیل نعلبند کمال تشکر و قدردانی را دارم.




**تصویر ۲ـ کاریوتایپ اسب‌نژاد کرد ( ۶۴ = G-Band ) ( n۲ ) ( درشتنمایی ۱۰۰× )**

## منـابع مورد استفاده


۱ - اشموعیل، ۱۳۷۶. ناصر، اهمیت و منزلت اسب از دیدگاه احادیث، مجله دامدار، ویژه نامه اسب، سال چهارم، شماره ۵۲ ـ ۵۱

۲ - اشیدری، جهانگیر، ۱۳۴۷. اسب و فرهنگ ایران باستان و ارزش آن در سواری و پیکار و پهلوانی و داوری.

۳ - امامی، محمد تقی، ۱۳۱۷. پیدایش اسـب در ایران. پایان نامه دکترای دامپزشـکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران.

۴ - تاجبخش، حسن، ۱۳۷۲. تاریخ پزشکی و دامپزشکی ایران، انتشارات دانشگاه تهران.

۵ - دهقانپور، محمدحسـین،۱۳۷۶. اهمیت اسـب از دیدگاه ملی، دینی و تاریخی ماهنامه اسـب، سـال اول ، شماره سوم.

۶ - فتحـی قره قشـلاقی، مهدی، ۱۳۷۹. تقدیس اسـب در میـان ترکان، هفته نامه نوید آذربایجان، شـماره ۱۱۹.

۷ - معیـر، فریبـرز، ۱۳۷۵. نگاهی گذرا به واقعیت پرورش اسـب و نژادهای آن در ایران از گذشـته تاکنون، ماهنامه اسب، خرداد ماه، شماره ۴

۸ - مهران نـژاد، رضا، ۱۳۸۰. مطالعه سـیتوژنتیکی و کروموزومی اسـبهای بومی ایران، پایان نامه دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه ص.ص ۱۹ ـ ۲۵

9-Arqsmusen, B. and Hatt, F. B. 1982; Animal Genetics. R.C.R. Press, New Oelhi.

10-Darlington, C. D. and Lacour, L. F. 1976; The handing of chromosomes. George allen and Unwin Ltd.

11-Dnyansagar. V. R. 1986; A chromosomal aberration in Brown Swiss cattle.

12-Fechhiemer, N. S. 1979; Cytogenetic in animal Production, J. of dainy Science, Vol: 62, No: 5 (541-53).

13-Ford, C. E. Pollock, D. L. and Gustavsson, J. 1980; Proceeding of the first international conference for the standardization banded karyotypes at domestic animals. Hereditas 92: PP.; 142-162.

14-Gosden, J. R. 1994; Chromosome analysis protocols. Human press Totow – new Jersey.

15-Halnan, C. R. E.1989; Cytogenetics of animals C. A. B. International.

16-Have, W. C. D. and Elizabeth. H. S. 1979. Cytogenetic in animal reproduction. C. A. B.

17-Macgregor, H. C. and Rarley, J. 1988; Working with animal chromosomes, John Willey and sons.

18-Macgregor, H. C. 1993; An Introduction to Animal Cytogenetics, Chapman & Hall London.

19-Obe, G. and Basler, A. 1987. Cytogenetics Basis and applied aspects.

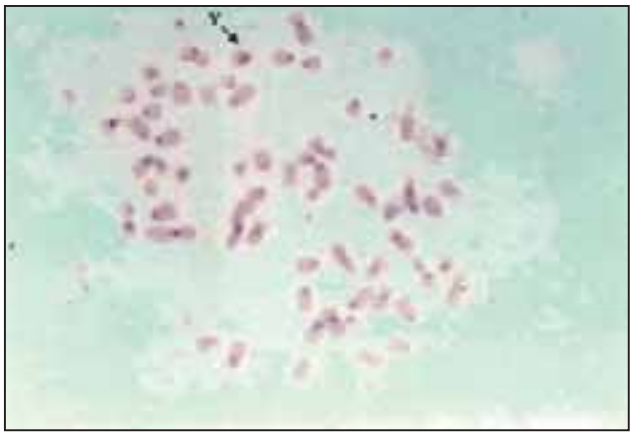
20-Pearson, P. L. and lawis, K. R. 1974. Chromosome today.

21-Schaeffer, S. J. 1980; Cytogenetics Plants, Animals, human. Springer, Verlag.

22-Sobti, R. C. 1991; Eukaryotic chromosomes. Pub. New Delhi.

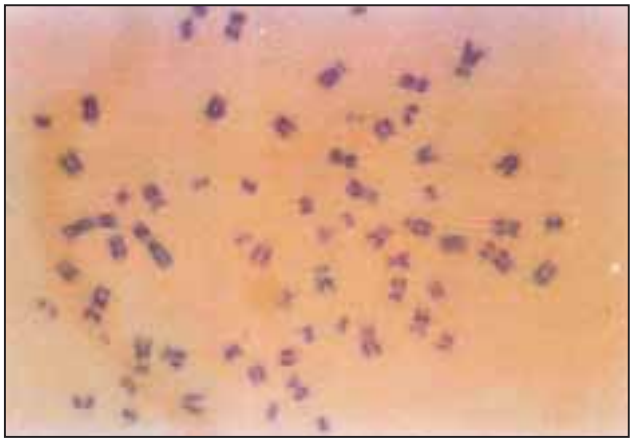
23-Sybenga, J. 1972; General cytogenetics, Amesterdam, North Holland Public co.

تصویر ۳ـ گسترش متافازی اسب نژاد کرد ( G.Band ) ( درشتنمایی ۱۰۰× )



تصویر ۵- گسترش متافازی اسب نژاد کرد ( C.Band ) (درشتنمایی ۱۰۰ ×)

تصویر ۴ـ گسترش متافازی اسب نژاد کرد ( C.Band ) ( درشتنمایی ۱۰۰× )



تصویر ۶ـ گسترش متافازی اسب نژاد کرد ( G.Band ) ( درشتنمایی ۱۰۰× )