مجله محیط شناسی، شماره ۳۴، بهار ۱۳۸۳، صفحه ۶۹-۶۵

تنـــوع درون گونـــه ای کبک معمولـــی درالبرز و زاگرس

مهندس زهرا قلیچی پور *

چکیده

کبک معمولی *(Alectoris chukar)* یکی از مهم ترین پرندگان قابل شکار ایران است که با توجه به خصوصیات زیستگاهی خـود که شامل نواحی خشک و نیمه خشک می شود، در ایران از دامنه پراکنش وسـیعی برخـوردار اسـت. طـی تحقیقـی کـه در سـالهای ۷۶-۱۳۷۴ انجام شد، ۱۷ نمونه از مناطق مختلف زاگرس و البرز جمع آوری شده و از نظر کروموزومی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی کاریوتیپ نمونه های مختلف نشان دادند که عدد کروموزومی کبک ۷۲ است و کروموزوم شماره ۵ کروموزوم جنسی Z است که در نرها یک جفت و در ماده ها به صورت منفرد مشاهده می شود، کروموزوم W نیز کروموزوم کوچکی اسـت کـه احتمـال مـی رود از نظر اندازه در ردیف کروموزوم های شماره ۷ یا ۸ قرار بگیرد. پیشنهاد می شود برای تعیین خصوصیات کروموزومی این پرنده مطالعات دقیـق تـری بر روی نمونه های مناطق مطالعاتی بیشتر انجام پذیرد.

کلید واژه

توصیف کروموزومی، کبک معمولی *(Alectoris chukar)*، خصوصیات زیستگاهی، البرز، زاگرس، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۲/۱۱/۲۰

* عضو هیات علمی دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم سبزوار.

سرآغاز

به عنوان اولین گام، در برنامه ریزی هرگونه طرح مدیریتی، می باید موضوع مورد مدیریت کاملاً شناسایی گشته و دانسته های کافی در خصوص آن وجود داشته باشد. طرح های مدیریتی و حفاظتی حیات وحش نیز از این قاعده مستثنی نیستند. به این مفهوم که برای پی ریزی چنین طرحهایی در مورد هر جانور خاص، فراهم بودن اطلاعات منسجم و در حد کفایت درباره آن الزامی است. این اطلاعات، دربرگیرنده نکات اساسی در زمینه خصوصیات زیست شناختی، بوم شناختی و نیز آرایه شناختی آن می گردد. یکی از اولین مراحل شناسایی یک جانور، آگاهی از جایگاه دقیق آن در رده بندی است که جهت انجام فعالیت های حفاظتی و بخصوص حفاظت ژنتیکی ضروری است و از اولین گام های این مرحله نیز می توان به شناسایی و توصیف کروموزومی آن اشاره کرد. در این تحقیق، کبک *(Alectoris chukar)* به عنوان یکی از آشناترین پرندگان بومی کشور برای شناسایی خصوصیات کروموزومی مورد بررسی قرار گرفته است. این پرنده متعلق به جنس "Alectoris" از زیر خانواده "Phasianinae" است. این زیر خانواده متعلق به خانواده قرقاول (Phasianidae) است که در راسته ماکیان سانان (Galliforms) قرار دارد.

مطالعه کاریوتیپ پرندگان به علت وجود میکروکروموزوم ها[1] معمولاً با مشکل مواجه بوده و تعیین شکل و تعداد دقیق این کروموزوم ها دشوار است (Owen, 1965). وجود میکروکروموزوم ها بارزترین خصوصیت کاریوتیپ پرندگان است. در تمام پرندگانی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته اند می توان کروموزوم ها را از نظر اندازه در دو طبقه مشخص قرار داد: ماکروکروموزوم ها[2] که معمولاً اندازه ای بین ۴ میکرومتر تا ۸ میکرومتر دارند و از نظر ریخت شناسی کاملاً قابل مطالعه اند و میکروکروموزوم ها که معمولاً اندازه ای کمتر از ۲ میکرومتر دارند و در بسیاری موارد زمانی که توسط میکروسکوپ نوری مطالعه می شوند به صورت نقطه به نظر می رسند (Christidis, 1989). در گذشته اعتقاد بر این بود که میکروکروموزوم ها، کروموزوم های واقعی نیستند (John & Hewitt, 1966 و Owen, 1965). اما مطالعات بعدی نشان داد که هیچ تفاوتی در ساختمان و رفتار بین کروموزوم های خرد و کلان وجود ندارد (Owen, 1965). در گونه هایی مانند طوطی *(Agapornis roseicollis)* (Christidis, 1989) و سارگپه (John and Hewitt, 1966) بین میکروکروموزوم ها و ماکروکروموزوم ها از نظر اندازه، مرز بارزی وجود دارد، در حالی که در گونه های نظیر پرستوی دم شمشیری *(Hirundapus cadacoutus)* (Christidis, 1989) و جغد سفید (John and Hewitt, 1966) کاهش اندازه از بزرگترین به کوچکترین عنصر، تدریجی است.

مشخصه دوم کاریوتیپ پرندگان، عدد دیپلوئید نسبتاً بالای آنهاست که از ۴۰ در چاخ لق *(Burhinus oedicimus)* تا ۱۲۶ در هدهد *(Upupa epops)* نوسان دارد. عدد کروموزومی (2 n) در اغلب گونه ها بین ۷۶ تا ۸۲ است. تعداد میکروکروموزوم ها بین ۶۰ تا ۶۴ است، اگرچه می تواند از ۸ در برخی از شاهین شکلان تا بیش از ۱۰۰ در نوعی ماهیخورک *(Alcedo ozureas)* متغیر باشد. به طور کلی یک کاریوتیپ شاخص پرندگان از ۷ تا ۸ جفت ماکروکروموزوم و ۳۰ تا ۳۲ جفت میکروکروموزوم تشکیل شده که عدد دیپلوئید (2 n) آن بین ۷۴ تا ۸۰ کروموزوم است.

مشخصه ثابت سومی که در تمام پرندگان وجود دارد ساختار کروموزوم های جنسی است. در ماده ها کروموزوم های جنسی غیرهمانند و مرکب از دو کروموزوم Z و W هستند، در حالی که در نرها کروموزوم های جنسی همانند و مرکب از دو کروموزوم Z می باشند (Christidis, 1989). در بین گونه های مختلف حتی گونه های متعلق به یک جنس تغییرات چشمگیری در اندازه و شکل کروموزوم W مشاهده می شود این کروموزوم ممکن است یک میکروکروموزوم یا ماکروکروموزوم باشد که الگوی نواربندی G متفاوتی در گونه های مختلف نشان می دهد (Christidis, 1989).

با وجود انتشار وسیع کبک در مناطق مختلف جهان و با وجود اینکه کاریوتیپ تعداد زیادی از ماکیان سانان در دنیا تهیه و بررسی شده است، نگارنده در مراجعه به منابع متعدد خارجی و داخلی موردی دال بر تهیه کاریوتیپ کبک یا تعیین عدد کروموزومی (2 n) این پرنده نیافته است. بنابراین با کمی تردید می توان ادعا کرد نتایج این تحقیق اولین مورد گزارش عدد و خصوصیات کروموزومی این پرنده است.

مواد و روش ها

برای تهیه کاریوتیپ پرندگان روشهای مختلفی وجود دارد که مزایا و معایبی نسبت به یکدیگر دارند. معمولاً امکانات آزمایشگاهی موجود، یا نوع نواربندی که در انتهای کار انجام خواهد شد روش مورد استفاده را مشخص می کند. کاریوتیپ را می توان به وسیله نمونه گیری مستقیم از یک بافت در حال رشد یا فعال میتوزی و یا روش های استاندارد کشت بافت تهیه کرد (مجیدی، ۱۳۷۳). در این بررسی برای

بدست آوردن کاریوتیپ کبک از روش «استفاده از مغز استخوان در داخل بدن» استفاده شد. انجام این روش علاوه بر اینکه به امکانات آزمایشگاهی گسترده و مجهز نیازی ندارد آسان و سریع است و در صورتی که در ترکیب مواد دقت کافی مبذول شود و درجه حرارت و رطوبت محیط به حد کافی باشد نتایج خوبی ارائه می دهد. گسترش کروموزومی حاصل چه برای نواربندی C، یا برای نواربندی G مناسب است. تزریق کلشی سین به پرنده در حقیقت یک محیط کشت طبیعی در بدن جانور برای ما فراهم می آورد و بنابراین نیازی به فراهم آوردن شرایط استریل برای کشت وجود ندارد. تنها ایراد عمده به آن این است که به کارگیری آن مستلزم کشتن پرنده مورد آزمایش است و به همین دلیل از آن برای گونه هایی که از نظر تعداد در محدودیت می‌باشند یا در انواع رده های تهدید قرار دارند، نمی توان استفاده کرد. این روش‌را علی آبادیان (۱۳۷۳) برای تهیه کاریوتیپ خرگوش و موش (پایکا) به کار برد و برای تهیه کاریوتیپ کبک نیز با برخی تغییرات، نتیجه مثبتی داشت. مجموعاً ۱۷ پرنده که از مناطق مختلف رشته کوههای زاگرس و البرز جمع‌آوری‌شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد لازم

- محلول کلشی سین (۵ میلی گرم کلشی سین + ۲۰ میلی گرم محلول سرم فیزیولوژی ۹×۱۰۰۰)
- محلول کلرور پتاسیم (۰/۵۶ گرم کلرور پتاسیم + ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر فاقد یون منیزیم و کلسیم)
- تثبیت کننده (مخلوط اسید استیک گلاسیال ۹۶٪ و متانول مرک با ترکیب حجمی ۳:۱)
- تامپون فسفات (۱/۶۴ گرم NaH_2Po_4 + ۲/۰۶ گرم Na_2HPO_9 در یک لیتر آب مقطر) (pH =۶/۸)
- تثبیت کننده مقدماتی (مخلوط اسید استیک گلاسیال، متانول و کلروفورم با ترکیب حجمی ۱: ۶ : ۳)
- گیمسای ۴٪ (۴ میلی لیتر گیمسای خالص + ۹۶ میلی لیتر تامپون فسفات).

روش کار

۱- اندازه گیری پرنده

۲- تزریق ۰/۰۱ سی سی محلول کلشی سین به زیر پوست شکم

۳- آزاد گذاشتن پرنده به مدت ۱۰۵ تا ۱۲۰ دقیقه (دقت شود در صورتی که زمان تاثیر کلشی سین از این حد افزایش یابد کروموزوم های به دست آمده بیش از حد متراکم و کروماتیدهای آنها از هم جدا می شوند).

۴- طی این مدت ۱۶ سی سی محلول کلرورپتاسیم (KCl) در درون بوته چینی در اتو ۳۸ درجه سانتیگراد گذاشته می شود.

۵- استخوان ران پرنده کاملاً از گوشت تمیز شده؛ دو سر انتهایی آن قیچی می شود و در محلول کلرورپتاسیم قرار می گیرد و مغز استخوان موجود در آن داخل محلول تخلیه می شود. مخلوط کلرورپتاسیم و مغز استخوان با پر و خالی کردن های متناوب سرنگ به صورت مخلوطی همگن در می آید.

۶- مخلوط در سه لوله آزمایش تقسیم می شود و لوله ها در انکوباتور ۳۸ درجه سانتیگراد قرار می گیرند.

۷- پس از گذشت ۱۵ دقیقه، اولین لوله برای سانتریفوژ از انکوباتور خارج شده و محتویات لوله دوم بعد از ۲۰ دقیقه و لوله سوم بعد از ۲۵ دقیقه سانتریفوژ می شود. این تنوع زمانی به دلیل ایجاد تأثیر مناسب محلول هیپوتونیک (کلرورسدیم) بر سلول های مغز استخوان است، چون سلول ها در اثر قرار گرفتن در این محلول متورم می شوند.

۸- هر لوله پس از پایان زمان لازم انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفوژ می شود.

۹- قسمت رویی لوله ها به کمک پی پت پاستور مکیده و دور ریخته می شود. به رسوبات باقیمانده در ته هر لوله، ۵ سی سی تثبیت کننده مقدماتی اضافه می گردد. مخلوط حاصل به وسیله پی پت پاستور همگن می شود. لوله ها باید ۱۰ دقیقه در هوای آزاد باقی بمانند.

۱۰- لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفوژ می شوند.

۱۱- قسمت رویی لوله ها دور ریخته شده و به رسوبات باقیمانده در ته هر لوله ۱/۵ تا ۲ سی سی تثبیت کننده اضافه می گردد. مخلوط حاصل به وسیله پی پت پاستور همگن می شود. لوله ها ۲۰ دقیقه در هوای آزاد می مانند؛ در این مدت محتویات آنها به وسیله پی پت مخلوط می شود (در صورت تمایل و برای سهولت کار، در این مرحله می توان محتویات لوله ها را در یک یا دو لوله مخلوط کرد).

۱۲- لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفوژ می شوند.

۱۳- محلول رویی لوله ها دور ریخته می شود و به رسوبات باقیمانده

در ته لوله ۵ سی سی تثبیت کننده اضافه شده با پی پت پاستور خوب هم زده می شود.

۱۴- لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفوژ می شوند.

۱۵و ۱۶- مرحله ۱۳ و ۱۴ تکرار می شود.

۱۷- محلول رویی لوله ها دور ریخته شده و به رسوبات باقیمانده در ته هر لوله ۲-۱ سی سی تثبیت کننده اضافه می شود؛ با پی پت پاستور بخوبی مخلوط می گردد. در این مرحله محلول آماده لام گیری است ولی ترجیح دارد برای امتحان نتیجه کار چند لام تهیه کرد و به بقیه محلول ۲ تا ۳ سی سی تثبیت کننده اضافه نموده و حدود ۲۴ ساعت آن را در یخچال نگهداری کرد و پس از آن اقدام به لام گیری نمود. در این زمان نیز قبل از لام گیری باید یک مرحله سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ انجام شود. پس از آن محلول رویی دور ریخته شده و به رسوبات باقیمانده چند سی سی تثبیت کننده اضافه می گردد. حجم تثبیت کننده ای که در مرحله لام گیری به رسوبات اضافه می شود با توجه به نتیجه مشاهده شده در لام های آزمایشی قابل تغییر است. در صورتی که مشاهده شود سلول ها متراکم اند تثبیت کننده ای با حجم بیشتر اضافه می شود و در صورتی که سلول ها پراکنده باشند بعد از آخرین مرحله سانتریفوژ، که پس از آن لام گیری انجام می شود، حجم کمتری تثبیت کننده به رسوبات اضافه می گردد.

۱۸- لام ها باید قبل از استفاده به مدت چند ساعت در الکل اتیلیک قرار گیرند؛ پس از آن توسط آب مقطر آب کشی شده و بعد از اینکه در هوای آزاد خشک شدند به صورت عمودی در فریزر چیده شوند تا به اندازه کافی سرد گردند. برای به دست آوردن نتیجه مناسب تر تعدادی لام پس از آب کشی به وسیله آب مقطر در یک ظرف تمیز مملو از آب مقطر قرار گرفته و به مدت یک تا دو ساعت در یخچال قرار می گیرند تا خوب سرد شوند. می توان با گرفتن چند لام آزمایشی مشخص نمود که لام های فریز شده نتیجه بهتری ارائه می دهند یا لام هایی که در آب سرد قرار دارند. سرد کردن لام ها به سبب به وجود آوردن اختلاف دما بین سطح سلول ها و سطح لام است؛ این اختلاف دما باعث ترکیدن سلول ها می شود.

۱۹- لام را به صورت مورب در یک دست گرفته و با دست دیگر به وسیله پی پت پاستور چند قطره از محتویات لوله روی آن چکانده می شود. دقت شود فاصله دو دست در حداکثر میزان ممکن باشد.

۲۰- لام ها پس از خشک شدن آماده رنگ آمیزی هستند. بهتر است رنگ آمیزی یک روز پس از لام گیری انجام شود.

۲۱- روی لام ها توسط گیمسای ۴٪ پوشانده شده و یا درون سبد گیمسا قرار می گیرند. بعد از ۱۵ تا ۲۰ دقیقه لام ها با آب مقطر فاقد یون کلسیم و منیزیم شسته شده و در هوای آزاد خشک می شوند.

۲۲- در این مرحله لام ها آماده مطالعه با میکروسکوپ می باشند. در این بررسی لام ها توسط فتومیکروسکوپ Olympus-BH-2 مطالعه شدند و عکس ها نیز توسط همین میکروسکوپ گرفته شد.

بحث و نتیجه گیری روی یافته ها

۱- شمارش کروموزومی

چنانکه قبلاً نیز اشاره شد تعیین دقیق تعداد و شکل کروموزوم های پرندگان به دلیل وجود میکروکروموزوم ها کار چندان آسانی نیست. به همین دلیل ممکن است در سلول های مختلف شمارش های متفاوت انجام شود. در این تحقیق سعی شد تا حد امکان گسترش های کروموزومی مناسب تر مورد بررسی قرار گیرند تا نتایج مشابه حاصل شود، ولی با وجود این به علت حضور میکروکروموزوم ها، شمارش های متعددی انجام شد. به دلیل باز نشدن سلول ها از مجموع ۱۷ نمونه در چهار مورد شمارش و بررسی ممکن نگردید. نتیجه شمارش های انجام شده بر روی ۲۴۸ سلول باز شده در جدول شماره (۱) ارائه شده است.

از آنجا که با وجود تلاش بسیار، دستیابی به کاریوتیپ استاندارد کبک و عدد کروموزومی این پرنده در هیچ یک از منابع داخلی و خارجی ممکن نگردید، در وهله اول به نظر می رسد منطقی ترین راه این است که شمارشی که حداکثر فراوانی را در بین شمارش های انجام شده دارد به عنوان عدد 2n کبک در نظر گرفته شود. در جدول شماره (۱) در ۳۹ سلول، تعداد کروموزوم های شمارش شده برابر با ۶۶ است. بنابراین در صورتی که نمای[۳] شمارش ها در نظر باشد باید ۶۶ را به عنوان عدد کروموزومی کبک پذیرفت. از طرفی عدد ۷۲ تنها در ۹ سلول شمارش شده که جزو بهترین گسترش های کروموزومی تهیه شده بوده اند؛ در حقیقت ضریب اطمینان شمارش در این سلول ها بسیار بالاست. بنابراین با کمی تردید می توان گفت عدد کروموزومی کبک برابر ۷۲ است.

جدول شماره (۱): تعداد کروموزوم های شمارش شده (n ۲) در سلول های مختلف

تعداد کروموزوم / جنس	۴۰	۴۲	۴۴	۴۶	۴۸	۵۰	۵۲	۵۴	۵۶	۵۸	۶۰	۶۲	۶۴	۶۶	۶۸	۷۰	۷۲	۷۴	۷۶	جمع
نر	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۶	۳	۸	۱۸	۱۳	۱۰	۲۶	۳۱	۱۶	۶	۵	۲	۱	۱۴۶
ماده	۲	۰	۲	۱	۲	۴	۱۲	۷	۶	۹	۱۰	۶	۱۱	۸	۱۰	۱	۴	۵	۲	۱۰۲
جمع	۲	۰	۲	۱	۲	۵	۱۸	۱۰	۱۴	۲۷	۲۳	۱۶	۳۷	۳۹	۲۶	۷	۹	۷	۳	۲۴۸

۲- ریخت شناسی کروموزوم ها

از مجموع ۷۲ کروموزوم کبک، تعیین شکل دقیق ۶ جفت کروموزوم با میکروسکوپ نوری کاملاً ممکن است. مشخصات این ۶ جفت کروموزوم در جدول شماره (۲) درج شده است. شایان ذکر است این مشخصات میانگین اندازه گیری های انجام شده بر روی ۳۰ عکس می باشد.

طول نسبی هر کروموزوم از تقسیم طول کل آن بر مجموع طول های کروموزوم های ژنوم مورد نظر به دست می آید.

کروموزوم شماره (۵) کروموزوم جنسی Z است که در نرها یک جفت و در ماده ها به صورت منفرد مشاهده می شود. کروموزوم W کروموزوم کوچکی است و احتمال می رود از نظر اندازه در ردیف کروموزوم های شماره ۷ یا ۸ قرار بگیرد و آکروسنتریک باشد.

شاخص سانترومتریک از رابطه زیر حاصل می شود:

$$\text{شاخص سانترومریک} = \frac{\text{طول بازوی کوتاه هر کروموزوم}}{\text{طول کل هر کروموزوم}} \times ۱۰۰$$

جدول شماره (۲): مشخصات ریخت شناسی کروموزوم های شماره یک تا شش کبک

شماره کروموزوم	شکل	شاخص سانترومریک	طول نسبی
۱	ساب متاسنتریک	۳۷/۷۴	۲۸/۴۳
۲	ساب متاسنتریک	۳۸/۰۳	۲۱/۵۳
۳	آکروسنتریک	۰	۱۵/۸۱
۴	آکروسنتریک	۰	۱۳/۳۴
۵(جنسی)	متاسنتریک	۵۰	۱۱/۷۷
۶	آکروسنتریک	۰	۸/۷۴

یادداشت ها

1. Micro chromosomes
2. Macro chromosomes
3. Mode

منابع مورد استفاده

علی آبادیان. منصور. ۱۳۷۳. مطالعه تغییرات درون گونه ای پایکا *(Ochotona rufuscens)* در استان خراسان. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس.

مجیدی. علیرضا. ۱۳۷۳. شناسایی و توصیف کروموزومی چند گروه نژادی مرغان بومی ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

Christidis, L. 1985. Rapid producer for obtaining chromosomes preparation from birds. The Auk. 102: 892-893.

Christidis, L. 1989. Karyotypic analysis in bird. In: Cytogenetices of Animals. Halnan, R. E. (ed). C. A. B. International:125-133.

John, B. and Hewitt, G. M. 1966. Karyotype stability and DNA variability in the Acrididae. Choromosoma 20: 155-172.

Owen, J. J. T. 1965. Karyotype studies on Gallus Domesticus. Chromosoma 16: 601-608.