دراسة الهيئة الكروموسومية لطيور الدجاج المحلي واللكهورن الأبيض

إيمان حسن هادي الأنباري عيسى حسين المشهداني إسماعيل كاظم شبر

قسم الثروة الحيوانية، كلية الزراعة، جامعة بغداد وزارة العلوم والتكنولوجيا

الخلاصة

أجرى البحث في حقل الطـيور الداجـنة / قسم الثروة الحيوانـية كلية الزراعة جامعة بغداد وأكمل في مختبرات المواد الخطرة وبحـوث البيئة في وزارة العلوم والتكنولوجيا للمـدة من 2004/10/15 لغاية 2005/9/30 ونظرا لعدم وجود دراسات سـابقة في العراق حول موضوع طبعة النواة في الطيور الداجنة، فقد هدفت هذه الدراسة إلى وضع اللبنة الأولى في دراسـة طبعة النـواة في طيـور الدجاج المحلي ودجاج اللكهـورن الأبيض إذ استخدمت مجموعتين من الطيور ، دجاج محلى ولكهورن ابيض ، بعمر النضج الجنسي بعدد أربعة لكل منهما. لقحت طيور المجموعتين بمستضد (AG) لجرثومة *Staphyloccocus aureas (S.aureas)* مقتول بالفـورمالـين قد حضّـر لهذا الغرض.

وباستخدام تقانة زرع الخلايا اللمفاوية لتلك الطيور المحفزة حصلنا على صور لطبعة النواة لأنثى دجاج لكهورن مع كروموسومات في الطور الاستوائي لأنثى دجاج محلي رتبت حسب أطوالها أزواجا من الأول ولغاية الثامن ومن ضمنها الخامس كروموسوم الجنس.

المقدمة

إن التقدم العلمي الكبير الذي حصل في علم الوراثة،وبشكل خاص في حقل وراثة الخلية قد ارتبط بشكل مباشر بالاهتمام بالكروموسومات حول أهمية فصلها عزلها وتصبيغها فقد أوضح Rieger وآخرون، (1976) إن علم الوراثة يهتم بدراسة تركيب وتضاعف و استنساخ المادة الوراثية وتوريثها، أما الوراثة الخلوية فقد اهتمت بدراسة الخلايا من حيث وضيفتها، تطورها ، نتاجها وتوالدها، لذا أصبحت دراسة الكروموسوم إضافة إلى وضع طبعة النواة (Karyotype) أو الهيئة الكروموسومية من الأمور التي لابد من إجرائها.

لقد قدم مجال دراسة الكروموسومات الكثير من المعلومات إذ أشار البلداوي و آخرون ، (1987) إلى أن لخلايا أفراد النوع الواحد عدد ثابت من الكروموسومات يكون مختلفا أو مساويا لعدده في خلايا الأنواع الأخرى. كما أشار Musa و آخرون، (2005) إلى إن الكروموسومات داخل نواة الخلية الواحدة للنوع تكون بأشكال وأطوال مختلفة أو متشابه في الطول وفي موقع الجسم المركزي centromer وإنه لا يوجد ارتباط بين عدد الكروموسومات للنوع وحجم الكائن الحي ، من هنا تتضح أهمية إجراء هذه الدراسات على الطيور مثل أهميتها على اللبائن إلا

إن هناك بعض الصعوبات والمعوقات التي تعتبر عاملا محددا وغير مشجع لإكمالها، منها ما أشار لها Newcomer ، (1957) بوجود العدد الكبير من الكروموسومات المتباينة الحجم و الشكل وإن العدد الكثير من الكروموسومات الصغيرة يعد عائقا مباشرا أمام الوصول للعدد الفعلي لكروموسومات الطيور وأضاف إن للدجاج 2n =12 زوجا من الكروموسومات .

وتمكن Owen، (1962) من وضع العدد الصحيح لكروموسومات الدجاج وحددها 2n =39 متفاوتة في الطول بين 9 و0.2 مايكرون. ثم أضاف Fechheimer و Jaffe (1966) إن صعوبة تحضير الكروموسومات من الطيور وصعوبة توريثها يعتبر عاملا غير مشجع لدراستها هذا بالإضافة إلى وجود الطفيليات التي تتكاثر في الأوساط الزرعية المعدة للاستخدامات البحثية ثم استطاع Shoffner وآخرون، (1976) من وضع خطوات وطريقة للحصول على طبعة نواة لكروموسومات الدجاج *Gallus domesticus* صنفت فيها الكروموسومات حسب الحجم وقسمت إلى سبعة مجاميع اعتمادا على موضع السنترومير فيها كان الكروموسوم الأول والثاني وسطيا المرتكز في المجموعة الأولى، الكروموسوم الثالث نهائي السنترومير في المجموعة الثانية ،الرابع وهو شبه وسطى المرتكز في المجموعة الثالثة، أما المجموعة الرابعة فقد شملت على كروموسومى الجنس الذكرى و الأنثوي وهما وسطيا المرتكز، المجموعة الخامسة ويقع فيها الكروموسومان السادس والسابع وهما نهائيا المرتكز، السادسة تضم الكروموسومان الثامن والتاسع وسطيا المرتكز والمجموعة الأخيرة السابعة وهذه تشمل جميع الكروموسومات من الكروموسوم العاشر ولغاية الكروموسوم 39 وقد اتفق على إن هذه الكروموسومات صغيرة الحجم ولها سنترومير نهائي.

وأشارMiller و آخرون، (1971) إلى إن دراسة الكروموسومات في الدجاج تستغرق وقتا أطول من دراستها على اللبائن بالرغم من اعتماد تلك الدراسات على الكروموسومات الكبيرة الحجم فيها فقط والتي غالبا ما تكون محصورة بين الكروموسوم الأول و التاسع أو الأول والرابع عشر منها.

ثم أضاف Bloom ،(1981) إن كروموسومات الطيور بالإمكان الحصول عليها وتحضيرها في مراحل عمرية مختلفة من دورة حياة الطير و قد تكون بطريقة مباشرة يعتمد فيها على الأنسجة النامية مثل الأنسجة الجنينية، حويصلات الريش، نخاع العظم، غدة فابريشيا و التوثة (Thymus) أو غير مباشرة إذ تعتمد على زرع خلايا الدم اللمفاوية بوجود احد المشطرات الميوتجين مثل Pekeweed ومادة PHA.P (Phytohaemagglutinin.P) . كما أشار Sheldon و Nichols،(1981) إلى انه رغم امتلاك الدجاج 78 كروموسوم غير إن دراسات التحليلات الكروموسومية تتفاوت في إعتمادها على أعداد الكروموسومات الكبيرة

Macrochromosomes(Mac.) التي تتم دراستها فقد يكون إلى حد عدد 5، 9، 11 أو 16 من الكروموسومات بضمنها كروموسوم الجنس فيما إعتمدت الأنبا ر ي، (1999) في بحثها على الدجاج المحلي في العراق لدراسة عدد كروموسوماته من الأول إلى رقم عشره منها.

وقد أوضح Smith و آخرون، (2000) عند مقارنتهم لكروموسومات الطيور بين 6 أزواج من الكروموسومات الكبيرة (Mac.) مع 33 زوجا من الكروموسومات الصغيرة Microchromosome (Mic.) إن الأخيرة تكون فيها الكثافة الجينية أكثر شدة من الأولى إذ إنه باستخدام الخرائط الفيزيائية لارتباط الجينات بدراسة تتابع الدنا بالكلونة فقد اتضح إن الكروموسومات الصغيرة (. Mic) أكثر كثافة جينيا من الكبيرة (.Mac) بنسبة مرتين. وأضاف McPherson و آخرون ،(2002) عند وصفه لجينوم الدجاج إن هناك تباينا واسعا في قياسات أحجام كروموسومات الطيور على العكس من قياساتها في اللبائن، وإن كروموسوم رقم واحد في الدجاج يبلغ centi morgans(600 cM) يحتوي على 50-200 Mb (Morgan bas) في حين إن 30 من 38 كروموسوم تعتبر جسميه صغيرة وتتراوح أطوالها بين 5-20 Mb ويتم تحديدها وتميزها في الوقت الحاضر بتقنية التهجين الموضعي المتفلور Florescent InSitu Hybridization (FISH) .

ثم صنف Masabanda و آخرون ،(2004) كروموسومات الدج ـ اج إلى مجاميع، الأولى فيها الكروموسومات من 1 إلى 10 بضمنها كروموسوم ي الجنس Z, W يمكن تمييزها بطبعة النواة وهي (.Mac) والمجموعة الثانية تشمل الكروموسومات من 11 إلى 16 تضم أكبر الكروموسومات الصغيرة (.Mic) بضمنها كروموسوم 16 الحاوي على مواقع مولدات النوية Nuclear Organizer Regions (NOR) والمجموعة الثالثة ضمت الكروموسومات من 17 إلى 32 والتي تميز بالاستعانة بالمجاميع الارتباطية، أما المجموعة الرابعة فإنها تشمل الكروموسومات من 33 إلى 38 أي أنها ضمت اصغر الكروموسومات الصغيرة، وقد برّر Burt، (2005) إن التباين في أطوال كروموسومات الطيور يعتبر السبب في عدم تساوي جينوماتها وإنها تملك 38 زوج جسمي منها 5 كبيرة (.Mac) وهناك 5 متوسطة و 28 صغيرة (.Mic)، كما أضاف أن كل ذراع كروموسوم ي له عبور واحد على الأقل وإن للكروموسومات الكبيرة نسبة عالية من الاتحادات الجديدة.

ونظرا لعدم وجود دراسات سابقة اهتمت بهذا الموضوع لذا هدف هذا البحث إلى وضع طبعة النواة أو الهيئة الكروموسومية لكل من الدجاج المحلي واللكهورن الأبيض في العراق.

المواد وطرائق العمل

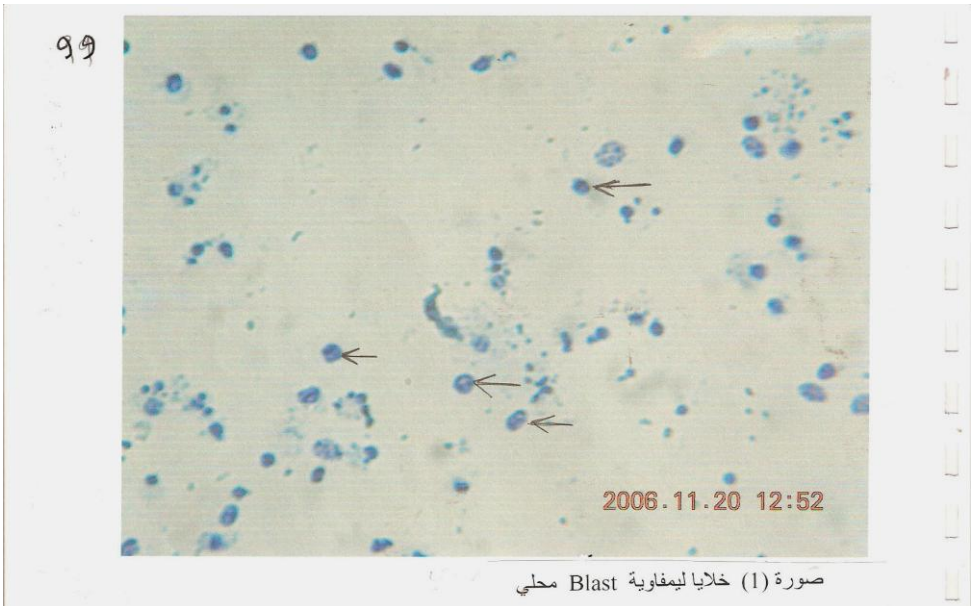
استخدمت جرثومة *Staphyloccocus aureas (S.aureas)*، حقنت في فأر لإدامة ضراوتها ثم سحب الدم من قلب الحيوان مباشرة وأكمل العمل حسب طريقة Mukker ،(1979) إذ تم استنباتها على أوساط زرعيه Macconky agar ، Nutrient agar و N. broth ورسّبت بالمنبذة بسرعة 5000 د/دقيقة لمدة ربع ساعة وأضيف للراسب مادة الفورمالين بنسبة 0.3 % لقتلها، بعدها حضن العالق لمدة 18 -24 ساعة وفصلت الجراثيم المقتولة بالمنبذة بسرعة 5000 د/دقيقة لمدة نصف ساعة وغسل عالق الخلايا الراسبة بالمحلول الملحي الفسلجي PBS(Phosphate buffer solution) ثم وعلى جهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجي 600 نانومتر وبقراءة 0.25 حصل منها على تركيز 3×10^8 جرثومة لكل مل، استخدم هذا التركيز لحقنه في مجموعتين من الطيور بعمر النضج الجنسي وهي إناث المحلي واللكهورن حقنت تحت الجلد في منطقة الرقبة بمقدار 5 مل / طير وبعد أسبوعين أعيد الحقن بالمستضد Ag لزيادة تحفيز توالد كريات الدم البيض اللمفاوية للحصول على طبعة النواة ومن ثم الكروموسومات من تلك الطيور من زرع خلاياها اللمفاوية، حيث سحب الدم من منطقة الوريد الجناحي وأكمل العمل حسب طريقة Bőyum،(1968) إذ مزج الدم المسحوب بالهيبارين الذي كان قد وضع في حقنة السحب ثم أضيف له نسبة 1:1 من محلول الملحي الفسلجي ومزج الاثنان معا ثم أضيف 4 مل من وسط عزل الخلايا اللمفاوية Lympho Separation Medium (LSM) في أنبوبة سيليكونية وأضيف لها الدم المخفف بصورة هادئة ومائلة حتى لا يمتزج الاثنان معا ثم وضع الأنبوب في جهاز النبذ المركزي المبرّد بسرعة 2000 دورة / الدقيقة لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 16-20 مئوية، بعده سحبت طبقة الخلايا اللمفاوية بماصة باستور نظيفة ثم غسلت بمادة Lympho Prip ثلاث مرات مع النبذ في كل مرة وأخيرا حصل على راسب الخلايا اللمفاوية في قعر الأنبوبة إذ تم زرعها حسب طريقة Christidis،(1972) والتي تضمنت إضافة 4 مل من مادة الوسط الزرعي RPMI 1640 مع 1 مل سيرم أجنة العجول (Fetal Calf Serum) مع 0.3 مل من PHA mutagen كمادة مشطرة و 0.7 مل مضاد حيوي، حضنت الأنابيب المزروعة في درجة 40° م ولمدة 71 ساعة إذ أضيف هنا 0.1 مل من 0.0001% محلول Colchicine وبعد ساعة أخرى من الحضن (72 ساعة وقت الحضن الكلي)، نبذت الأنابيب بالمنبذة بسرعة 1500 د/دقيقة لمدة عشر دقائق وأضيف لها محلول ناقص التوتر Hypotonic وأعيد الحضن لمدة 15 دقيقة وبعد نبذها بالمنبذة بسرعة 15000 د/دقيقة لمدة عشر دقائق أضيف لها المثبت Fixative وأعيد النبذ وكررت هذه العملية ثلاث مرات وهنا أصبحت الخلايا جاهزة للتقطير على السلايدات المحضرة مسبقا باستعمال ماصة باستور وبعد أن جففت

صبغت السلايدات بـ Gimasa stain وفحصت تحت المجهر الضوئي على العدسة 40X والزيتية وأخذت لها عدة لقطات وصور.

النتائج والمناقشة

يعد موضوع طبعة النواة (الكاريوتايب) في الطيور الداجنة من المواضيع الحديثة في العراق التي لم يتطرق لها من قبل بل أن هذه المواضيع يتم إجراؤها في بعض المراكز المتخصصة مثل المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة وبشكل دقيق للإنسان فقط في حالات تشخيص الأمراض الوراثية التي لها علاقة بالانحرافات الكروموسومية ، وبالإضافة إلى ما ذكر سابقا عن المعوقات والصعوبات التي تواجه إجراء مثل هذه الدراسات على الطيور الداجنة ألا أننا وعلى الرغم من هذا فقد تمكنا من الحصول على صور الكروموسومات من الخلايا اللمفاوية التي حفزت باستخدام المستضد *s. aureas* Ag المقتول بالفورمالين والصور 1 و 2 تظهر خلايا Blast لمفاوية محفزة الدجاج للمحلي واللكهورن على التوالي. ثم زرعت طبقة الخلايا اللمفاوية بعد أن فصلت من وسط الخلايا الحمر المترسبة وصلنا إلى مرحلة فصل الخلايا المزروعة وإضافة المواد المشار إليها آنفا في المواد وطريقة العمل منها حصلنا على الصور 3 و 4 والتي تظهر خلايا لمفاوية محفزة مزروعة للدجاج للمحلي واللكهورن.

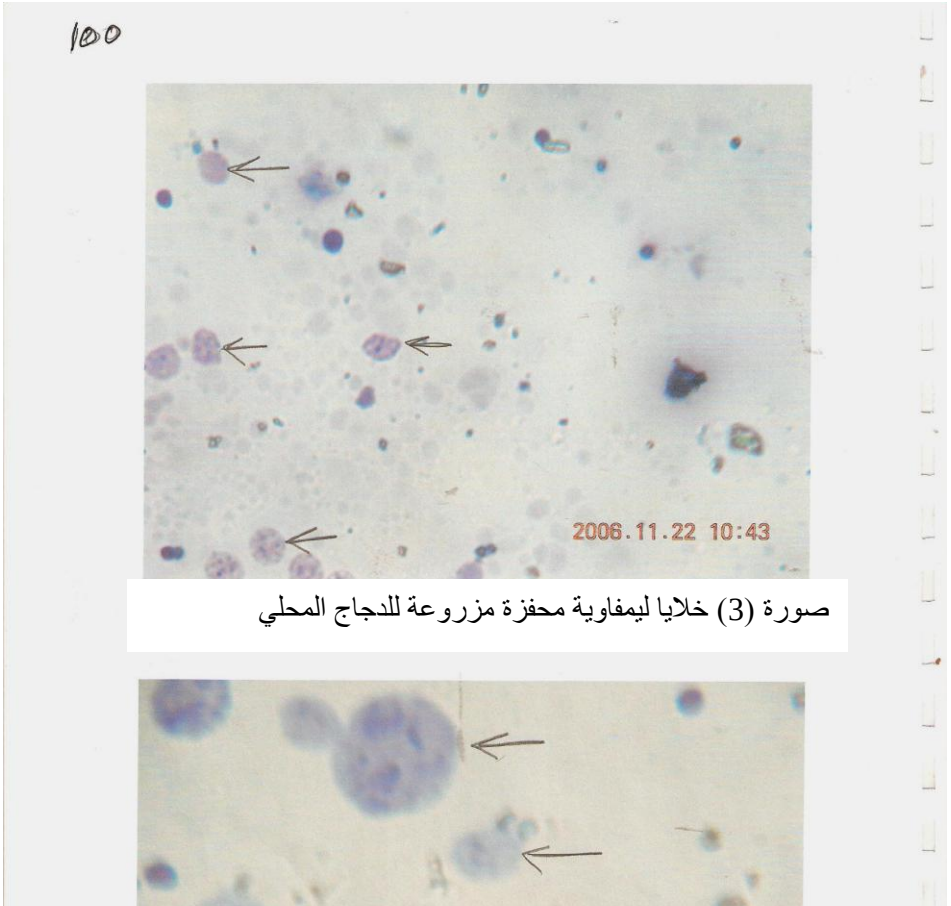
وعند الوصول إلى مرحلة تقطير المستخلص الحاوي على الخلايا لاحظنا وجود أنويه عدة في مراحل الانقسام الاعتيادي (الاستوائي) Metaphase تظهر فيها الكروموسومات بشكل واضح تم أخذ الصور لها وقطعت صور الكروموسومات وصفت أزواجا كل مع نظيره ورتبت من الكروموسوم الأول وحتى الثامن ومن ضمنها الكروموسوم الخامس (الجنسي) كما تظهر ذلك الصورة 5 ، كما حصلنا على طبعة نواة (Karyotype) لدجاج أنثى لكهورن الصورة 6 . وهنا نشير إلى أن الوصول لمرحلة الحصول على الكروموسومات أو طبعة نواة الطيور الداجنة (الدجاج) من خلال زرع الخلايا اللمفاوية بشكل خاص كما هو حاصل في هذه الدراسة فإنه يمكن اعتماد نتائج هذا البحث في الدراسات الخلوية اللاحقة التي تجرى على الدجاج.



صورة (1) خلايا ليمفاوية Blast محلي

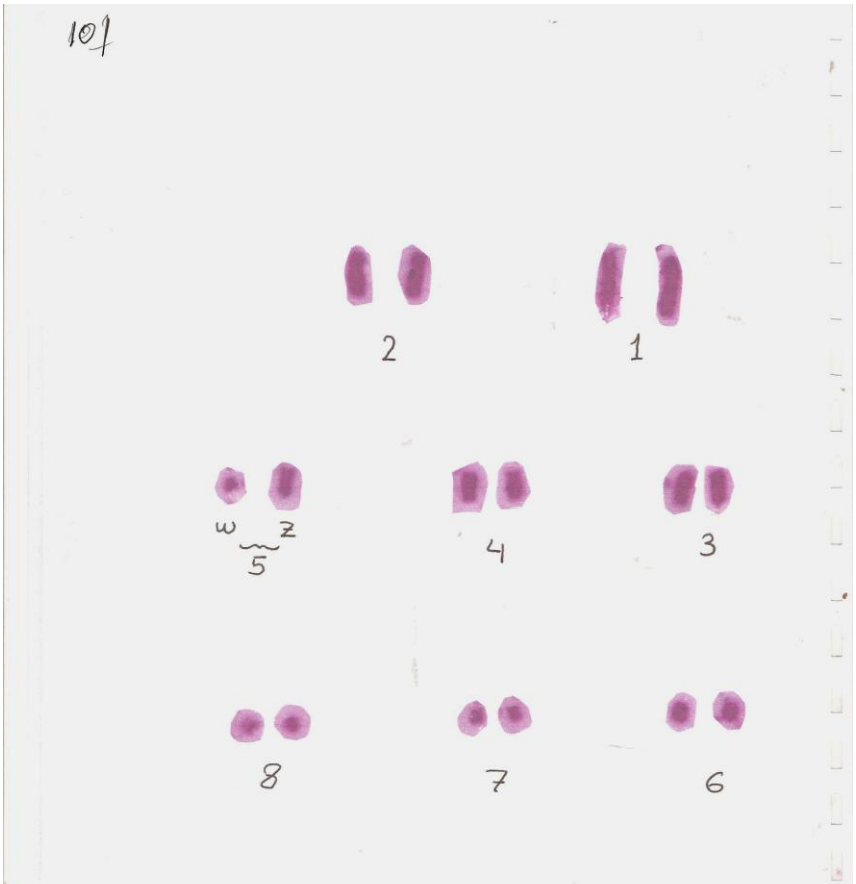
صورة (1) خلايا ليمفاوية للدجاج المحلي

صورة (2) خلايا ليمفاوية لدجاج اليكهورن



صورة (3) خلايا ليمفاوية محفزة مزروعة للدجاج المحلي

صورة (4) خلايا ليمفاوية محفزة مزروعة لدجاج اليكهورن



صورة (5) أزواج كروموسومات الدجاج المحلي من CH1 إلى CH8 بضمها كروموسوم الجنس CH5

صورة (6) الهيئة الكروموسومية لأنثى اليكهورن .

المصادر

البلداوي، عبد اللطيف فالح والراوي، عبد الرزاق عبد الحميد والعاني، هيثم جسام محمد 1987. الوراثة . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة بغداد.

الأنباري، إيمان حسن هادي 1999. تأثير أنواع من المركزات البروتينية في إحداث الطفرة على أجنة الدجاج المحلي، رسالة ماجستير . كلية الزراعة ، جامعة بغداد.

Bloom, S.E. 1981. Detection of Normal and Aberrant chromosomes in chicken embryos and tumer cells. *Poultry sci*. 60: 1325-1361.

Bőyum, A. 1968. Procedure for separation of lymphocytes. Scand. *J. Clin. Lab. Inves*: 21 suppl. 97-100.

Burt, D. W. 2005. Chicken Genome, Current status and future opportunities. *Genome Research*. 15: 1692 – 1698.

Christidis, L. 1972.A rapid procedure for obtaining chromosome preparations from birds.*The Auk* 102:No. 4.

Fechheimer, N. S. and W. P. Jaffe. 1966. Method for the display of avain chromosomes. *Nature* 211: 773-774.

Masabanda, J. S., D. W. Burt and K. G. Darren. 2004. Molecular cytogenetic definition of the chicken Genome: The first complete Avian Karyotype. *Genetics* 166: 1367 – 1373.

McPherson, J. D., Jerry Dodgson; K. Robb and P. Oliver. 2002. Proposal of sequence the Genome of the chicken. www.chickengenome.org

Miller, R. A.; N. N. S. Fechheimer and W. P. Jaffe. 1971. Chromosomes abnormalities in 16 to 18 hour chick embryos. *Cytogenetics*. 10: 121 – 136.

Mukker, T. K. S. 1979. Immunogenisty of chatropically extract protection antigene(s) origion against experimental pasteurllosis in mice. *J. cenerd Microb*. 113:P 37 – 43.

Musa, H. H., B. Li, C., G.H. Rher , TP Lanyasgya, Q. Xu, and W. B. Bao. 2005. Karyotype and Banding patterns of chicken breeds. *Int. J. Poultry Sci*. 4(10): 741 – 744.

Newcomer, E. H. 1957. The mitotic chromosome of the domestic fowl. *J. Herd*. 48: 227-237.

Owen, J. J. T. 1962. Karyotype studies on *Gallus domisticus*. *Chromosome* (Berl). 16: 601 – 608.

Rieger, R., A. M. Mechaelis and M. Green. 1976. *Glossary of genetics and cytogenetics. Classical and Molecular*. 4th ed. Springer. Berlin Heidelberg. New York.

Sheldon, S. and W. W. Nichols. 1981. Comparison of the patterns of chromosomal late replication. 11 chick embryo lung and kidney in vivo and in vitro. *Cytogenet Cell Genet*. 29: 51 – 59.

Shoffner, R. N.; A. Krishan; G. J. Haiden; R. K. Bammi and J. S. Otis. 1976. Avian chromosome methodology. *Poultry Sci*. 46: 333-344.

Smith, J., C. K. Bradley and T. R. Paton. 2000. Differences in gene density on chicken macro- chromosome and micro- chromosome. *Avian genet*. 2: 96 – 103.

Study the karyotype for local and white Leghorn Chickens

Eman H.AL-Anbari **E. H. AL-Mashhadani** **E. K. Shubber**

Animal Resources Dep. **Ministry of Science**

College of Agriculture **& Technology**

Baghdad University

ABSTRACT

This study was conducted at the Dept. of Animal Resources, College of Agriculture. University of Baghdad and completed at the laboratories of dangerous material and environmental research at the ministry of science and technology during the period from 15/10/2004 to 30/9/2005 to investigate the karyotype features of the Local and White Leghorn chickens, because there is no such studies about this subject in Iraq before, so four birds from each of Local and White Leghorn chickens at sexual maturity which were vaccinated with *staphylococcus aureus* (*S.aureas*) antigene killed by formalin prepared for this purpose were employed for this study.

By using lymphocyte leocus culture technique photographic karyotype pictures for Blast cell of female leghorn were obtained and pictures for chromosomes at Metaphase for local female were re-arranged according to their length from CH 1 to CH 8 including the Sex chromosomes CH 5.