

سیتوژنتیک و کاربرد آن در مطالعات آبزیان

حبیب‌اله گندمکار^۱، ابوالحسن راستیان نسب^۱، سجاد نظری^{۱*}

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

*sajadnazari13@googlemail.com

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۴

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۴

چکیده

سیتوژنتیک، علم مطالعه ساختمان کروموزوم‌ها می‌باشد. در این علم کروموزوم‌ها با استفاده از تکنیک‌های باندینگ (نوارگذاری) و یا شیوه‌های سیتوژنتیک مولکولی مورد تحلیل و بررسی قرار می‌گیرند. این علم، شاخه‌ای از ژنتیک است که با مطالعه ساختار و ترکیب کروموزومی یک سلول مرتبط بوده و شامل آنالیز معمول کروموزوم‌های نواربندی G شده و سایر تکنیک‌های باندینگ و نیز سیتوژنتیک مولکولی شامل FISH و CGH است. در این مقاله گزارشی از بررسی‌های انجام شده و کاربرد سیتوژنتیک در آبزیان از جمله آبزیان زینتی مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: سیتوژنتیک، آبزیان، کروموزوم، ژنتیک، تکنیک نواربندی.

مقدمه

در سال‌های اخیر مطالعه کروموزوم‌های ماهیان و دیگر موجودات آبی بخش فعالی از تحقیقات ژنتیکی را در کشور به خود اختصاص داده است (Kalbasi *et al.*, 2006; Pourkazemi *et al.*, 2010; Khoshkholgh *et al.*, 2015). مطالعه کاربیلوژیکی اطلاعات پایه‌ای از لحاظ تعداد، اندازه و مورفولوژی کروموزوم‌ها را ارائه می‌دهد. همچنین می‌توان از نتایج آن برای اثبات موفقیت تکنیک‌های دستکاری کروموزومی، از جمله القاء پلی پلوئیدی و در صورت وجود کروموزوم‌های جنسی برای ماده‌زایی، نر‌زایی و تولید دورگه‌های درون و بین گونه‌ای، مطالعه سیتوژنتیکی ماهیان استفاده نمود (Iturra *et al.*, 2001; Brinn *et al.*, 2004; Benzaquem *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2009; Nazari *et al.*, 2009).

افزایش ضریب میتوز (Mitotic Index) به منظور به دست آوردن تعداد پلاک‌های متافازی (Metaphase plate) بیشتر و در نتیجه انتخاب بهترین نمونه برای بررسی کاربیلوژیکی موجودات نقش مهمی در مطالعات سیتوژنتیکی دارد (Baruffaldi *et al.*, 1992; Perazzo *et al.*, 2010). در سال‌های اخیر محققین از مواد مختلفی برای افزایش ضریب میتوز استفاده نموده‌اند، از جمله می‌توان به استفاده از کلرید کلسیم (CaCl_2) و کلرید کبالت (CoCl_2) (Cocchi & Baruffaldi, 1989)، فنیل هیدرازین (Phenylhydrazin) (Cocchi & Baruffaldi, 1989)، فیتوهموگلوبینین (PHA) (Fan and Fox, 1990; Pourkazemi *et al.*, 2010; Nazari *et al.*, 2011)، یا آنتی‌ژن‌های باکتریایی یا قارچی (Molina, 2001) اشاره نمود.

سیتوژنتیک

سیتوژنتیک علم مطالعه کروموزوم‌ها و بیماری‌های وابسته که بواسطه ناهنجاری در تعداد و یا ساختار کروموزوم‌ها ایجاد می‌شده است. بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی مربوط به ناهنجاری در تعداد و یا ساختار کروموزوم‌ها است، بنابراین بیماری‌های ژنتیکی شامل ناهنجاری‌های تعدادی^۱ یا ساختاری^۲ است. که این ناهنجاری‌ها در میتوژنتیک هم شناسایی می‌شوند و هم مورد بحث قرار می‌گیرند (حسینی و کلباسی، ۱۳۸۱). علم سیتوژنتیک در سال ۱۹۵۹ با شناسایی بیماری سندرم دادن (مونگولیسیم یا ترنو ۲۱) آغاز شد. در سال ۱۹۷۰ روش‌ها یا تکنیک‌های نواریندی^۳ روی کار آمد. تکنیک‌های نواریندی، تکنیک‌های هستند که بعد از اینکه از بیماران کاربیلوژی تهیه شد، کروموزوم‌ها را رنگ می‌کنند که بعد از رنگ آمیزی این کروموزوم‌ها الگویی خواهند داشت که در آن یک

حالت باند باند شکل خواهد گرفت که به این حالت نواریندی گفته می‌شود. انواع مختلفی از روش‌های نواریندی وجود دارد. کاربیلوژی پایه سیتوژنتیک قدیم^۴ است و امروزه از تکنیک FISH (Fluorescent in situ Hybridization) استفاده می‌کنند.

تعریف کروموزوم

واژه کروموزم به مفهوم جسم رنگی برای نامیدن رشته‌های رنگ پذیر و قابل مشاهده با میکروسکوپ‌های نوری به کار می‌رود که از همانندسازی و نیز بهم پیچیدگی و تابیدگی هر رشته کروماتین اینترفازی در سلول‌های یوکاریوتی تا رسیدن به ضخامت ۱۰۰۰ تا ۱۴۰۰ نانومتر ایجاد می‌شود (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶؛ Demirok and Unlu, 2001). در پروکاریوت‌ها نیز ماده ژنتیکی اغلب به حالت یک کروموزوم متراکم می‌شود. در برخی باکتری‌ها علاوه بر کروموزوم اصلی که اغلب ژن‌ها را شامل می‌شود، کروموزوم کوچک دیگری که به طور معمول آن را پلاسمید می‌نامند، قابل تشخیص است گرچه تعداد کمی از ژن‌ها بر روی پلاسمید قرار دارند. یک ساختار پیچیده که درون هسته سلول واقع است و از DNA، پروتئین‌های هیستون و غیر هیستون تشکیل شده است که این ترکیبات فشرده می‌شوند و یک واحد تیپیک را ایجاد می‌کنند. اما از آنجا که در بیشتر موارد ژن‌های مقاومت به آنتی-بیوتیک‌ها بر روی آن جایگزین شده‌اند، از نظر پایداری و بقای نسل باکتری اهمیت زیادی دارد. کروماتین در ساختمان کروموزوم به شکل لوپ دیده می‌شود. لوپ‌ها توسط پروتئین‌های اتصال به DNA که مناطق خاصی از DNA را تشخیص می‌دهند، پابرجا می‌ماند. سپس در نهایت مراحل پیچ خوردگی نواریایی را که در کروموزوم‌های متافازی دیده می‌شود ایجاد می‌کند. هر تیپ کروموزومی یک نوع نواریندی اختصاصی را در ارتباط با نوع رنگ-آمیزی نشان می‌دهد. این رنگ‌آمیزی‌ها منجر به مشخص شدن تعداد و خصوصیات کروموزوم‌های هر گونه از موجودات زنده می‌گردد. که این خصوصیات تعدادی و مورفولوژیک کروموزوم‌ها را کاربیلوژی می‌نامند (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶).

سانترومتر

سانتروم محل اتصال ۲ بازوی کروموزوم است. در حقیقت سانتروم نقطه‌ای است که بر اساس آن کروموزوم را به دو بازوی کوچک (p) و بزرگ (q) تقسیم می‌کنند، عمل سانتروم در طول تقسیم سلولی متغیر می‌باشد.

¹ Numeral² Structural³ banding⁴ Conventional cytogenetic

تلومر

به انتهای کروموزومها تلومر گفته می شود.

وظایف تلومرها

۱- محکم چسباندن انتهای کروموزومها و حفاظت از تمامیت آنها برای جلوگیری از آسیب دیدن کروموزومها، چرا که سلول پر از آنزیمهای مربوط به DNA می باشد که می تواند موجب تخریب کروموزومها شوند.

۲- بعضی از سلولها مثل سلولهای سرطانی یا سلولهای بنیادی (stem cells) آنزیمی بنام تلومراز دارند که باعث افزایش طول توالیهای تکرار شونده در انتهای کروموزومها می شود.

۳- به تلومرها ساعت بیولوژیک نیز گفته می شود، چون هر سلول یک نیمه عمر دارد و هر سلول بیش از چند بار نمی تواند تقسیم در هر بار تقسیم تعدادی از تکرارهای کروموزومی خود را از دست می دهد؛ چون سلول وقتی شروع به همانندسازی می کند، نمی تواند دقیقاً از انتهای کروموزوم شروع کرده و کل کروموزوم را همانندسازی کند. لذا در هر بار تقسیم مقداری از توالی انتها بیش از دست می رود پس در هر دور تقسیم طول کروموزوم کوتاه تر می شود تا یک حد خاص این کوتاه شدن برای سلول قابل تحمل است بعد از اینکه به ژن ها رسید و این توالیهای تکراری شونده تمام شد سلول می میرد برای همین به آن ساعت بیولوژیک می گویند. پس این تلومرها در پیری و مرگ سلولها حائز اهمیت هستند.

برای بررسی کروموزوم در سیتونیک ابتدا باید کروموزومها را طبقه بندی نمود، باید دید کروموزومها چه تعداد، چه اندازه و چه شکلی دارند و بر همین اساس نیز آنها را طبقه بندی می کنند.

بر اساس موقعیت قرارگیری سانترومر کروموزومها به ۳ دسته: acrocentric, metacentric, Sub metacentric طبقه بندی می شوند.

در metacentric ها، سانترومر تقریباً وسط کروموزوم و کمی متمایل به بالا است. در acrocentric ها، سانترومر تقریباً در انتهای کروموزوم است یعنی نزدیک به تلومر، در sub metacentric: سانترومر به طرف انتها حرکت می کند و میل به انتها دارد. Acrocentric ها در انتهای خود ماهواره^۱ دارند که در حقیقت نقاطی هستند که محل تجمع ژنهای rRNA یا RNA ریبوزومی است و تعداد کپیهای آن هم زیاد است (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶).

نحوه تهیه گسترش کروموزومی و کاریوتیپ

برای اینکه کاریوتیپ تهیه کنند ابتدا به موجود آبی ترکیبی به نام Phytohemagglutinin (این ترکیب القا کننده میتوز می باشد) تزریق می کنند. تحت تاثیر این ماده لنفوسیت های خون محیطی

شروع به تقسیم شدن می کنند، حدود ۱۰ ساعت در دمای محیط این عمل را انجام می دهند. سپس ترکیباتی نظیر کلسمید^۲ یا کلشی سین^۳ (متداول) یا به آبی تزریق می کنند. این ترکیبات از تشکیل دوک تقسیم جلوگیری می کنند، در صورت عدم تشکیل رشته های دوک، سلول تقسیم شده و کروموزومها متراکم گردیده و متافاز انجام می گیرد؛ اما دوک تقسیمی در دسترس نیست، لذا کروموزومها در همان مرحله متافاز متوقف می شوند. به این ترتیب ترکیب کلشی سین نگه داشتن کروموزومها را در متافاز انجام می دهد (Foresti et al., 1993).

پس از متوقف شدن کروموزومها، یک محلول نمکی هیپوتونیک^۴ به سلول اضافه می کنند. محلول هیپوتونیک، محلولی است که باعث آماس سلول می شود. به طور کلی محلولها به ۳ دسته هیپرتونیک، هیپوتونیک و ایزوتونیک تقسیم می شوند. ایزوتونیک محلولی است که دقیقاً مانند سلول باشد، هیپرتونیک مقدار نمک بیشتر و آب کمتری را داراست و هیپوتونیک آب زیاد و نمک کمتری دارد. اگر سلول دارد محیط یک محیط هیپوتونیک شود سلول آماس می کند. اما این عمل باید بگونه ای صورت بگیرد که سلول نترکد و تنها آماس داشته باشد. بعد با ترکیبی از متانول و استیک اسید سلول را فیکس می کنیم. در محیطی که ثابت باشد، آنزیم ها کار نمی کنند لذا تثبیت خواهد شد. بعد سلولها را با قطره چکان برداشته و از ارتفاع ۲۰ الی ۳۰ سانتی متری این سلولها را که آماس کرده و آماده ترکیدن هستند و در مرحله متافاز نیز هستند رها و در نتیجه کروموزومها روی لام پخش می شوند. سپس لام را رنگ آمیزی می کنند. بسته به نوع رنگ آمیزی کارهای متفاوتی را می توان روی آن انجام داد (Hartley and Horne, 1985).

بعد از رنگ آمیزی کروموزومها آنها را زیر میکروسکوپ مشاهده می کنند. در این حالت یک ناحیه دایره واری زیر میکروسکوپ دیده می شود که کروموزومها در آن پخش شده اند و رنگ گرفته اند. برای انجام فعالیت های سیتوژنتیکی فرد مسئول باید ساعتها زیر میکروسکوپ را نگاه کند تا بتواند یک کروموزوم اضافه، یک ناهنجاری و یا یک ریزکروموزوم را پیدا کند. اما در صورت نیاز به یک ریکورد باید از صفحه میکروسکوپ عکس بگیریم. به این ترتیب یک دوربین روی میکروسکوپ سوار می شود و یک عکس گرفته و سپس از عکس پرینت می گیرند و کروموزومها شمرده می شوند. در نهایت آنها را بر اساس شکل و محل سانترومر جدا و شماره گذاری می نمایند. سپس آنها را به صورت تک تک روی یک برگه می چسبانند و از آن یک کپی تهیه می کنند و به این صورت کاریوتیپ تهیه می شود. شکل ۱ نمونه ای از گسترش کروموزومی ماهی سیم سفید را پس از رنگ آمیزی به روش رنگ آمیزی گیمسا نشان

² colcemid

³ colchicin

⁴ hypotonic

¹ satellite

۴۰۰ باند به ازای یک ژنومها پلوئید وجود خواهد داشت. هر باند برابر با ۱۰-۵ مگا باز (Mega base) است. در تکنیک‌های با کیفیت بالا تا ۸۰۰ باند در هر هاپلوئید دیده می‌شود که کروموزومها را در مرحله پروفاز متوقف می‌کنند. برای این منظور از متوتروکسات استفاده می‌شود. در G banding نوارهای تیره فاقد ژن بوده و یا از لحاظ ژنی فقیر هستند. در این روش رنگ‌آمیزی به کروموزومها ظاهر نواربندی دارند؛ چرا که رنگ گیمسا فقط DNA را در محل غنی از باز A و T رنگ‌آمیزی می‌کند.

مناطق از کروموزوم که در G banding تیره دیده می‌شوند، در اواخر مرحله S از چرخه سلولی همانندسازی کرده و حاوی کروماتین فشرده‌تری می‌باشند. در حالی که مناطق روشن‌تر به طور معمول در اوایل مرحله S همانندسازی کرده و کروماتین کم‌تر فشرده شده‌ای داشته و غنی از ژن هستند (غنی از بازهای G و C نیز می‌باشند).

Q-Banding: شبیه G است و برای شناسایی چند شکلی‌ها (Polymorphisms) یا استفاده می‌شود. این روش نیازمند میکروسکوپ فلئورسانت است.

R-Banding: برای تشخیص ناهنجاری‌های کروموزوم X به کار می‌رود. در این روش کروموزومها را پیش از رنگ‌آمیزی، گرما می‌دهند و در آن جای باندهای تیره و روشن عوض می‌شود. R-Banding برعکس G-Banding است، که در آن کروموزومها را حرارت داده و تحت تاثیر حرارتی که داده می‌شود، الگوی نواربندی کروموزومها برعکس می‌شود.

ISCN: موسسه ISCN، موسسه‌ای است که وظیفه نام‌گذاری و تعیین کدهایی برای نقاط خاصی بین کروموزومها را بر عهده دارد. بازوی کوتاه را با حرف p نمایش می‌دهند و بازوی بلند را با حرف q. مثلا xq یعنی بازوی بلند کروموزوم X در ISCN برای کروموزومها، region را ناحیه تعریف می‌کنند، در هر بازویی، تعداد خاصی ناحیه وجود دارد در هر ناحیه، باند ها قرار می‌گیرند. در برخی از کروموزومها، علاوه بر باندها، sub band ها نیز وجود دارند، به این مناطق کد داده می‌شود. برای مثال بازوی بلند کروموزوم X، ناحیه ۱. band ۲- و sub band ۳- (xq1.2.3)

شماره‌گذاری مناطق کروموزوم به این صورت است که شماره‌های کم‌تر نزدیک‌تر به سانترومر هستند و شماره‌های بیشتر در راس کروموزوم و دور از سانترومر قرار می‌گیرند (Esmaeili and Piravar, 2006). در این روش از اختصاراتی برای اصطلاحات استفاده می‌شود که هر کدام نشان‌دهنده یک حالت خاص است (جدول ۱).

می‌دهد. امروزه نرم‌افزارها همه‌ی این کارها را انجام می‌دهند و فایل را برای ما آماده می‌کنند. پس از آماده شدن کاریوتیپ به دنبال کروموزومهای جنسی و ناهنجاری تری زومی و ... می‌توان گشت. در زمان افتادن سلولها بر روی لام می‌توان بسیاری از کارهای آزمایشگاهی و تشخیصی را روی کروموزومها انجام داد.



شکل ۱: گسترش کروموزومی به روش رنگ آمیزی گیمسا در ماهی سیم سفید از خانواده کپورماهیان (اقتباس از Pourkazemi et al., 2010)

نواربندی کروموزومها

روش‌های رنگ‌آمیزی برای شناسایی کروموزومها به کار می‌رود. انواع رنگ‌آمیزی‌ها به شرح زیر می‌باشند:

G banding (Giemsa)
Q banding (Quinacrine)
R banding (Renerse)
Centromeric (Teterochromatine) (C banding)
G-banding: شایع‌ترین و معمول‌ترین روش رنگ‌آمیزی کروموزومها می‌باشد. در این روش کروموزومها را با Trypsin مواجه می‌کنند که موجب دناتوره شدن پروتئین‌ها می‌شود. رنگ Giemsa کروموزومها را به صورت نوارهای تیره و روشن رنگ خواهد کرد.

C-Banding: برای تشخیص سانترومر (نواحی هتروکروماتین) استفاده می‌شود. نواحی هتروکروماتینی دارای توالی‌های تکرار شونده هستند. در این روش فیبرهای کروماتین بسیار فشرده شده، سپس کروموزومها در معرض اسید و آلکالین قرار می‌گیرند و پس از آن C-Banding انجام می‌گیرد.

F-diagram: بعد از روی کار آمدن G-banding و مشخص شدن الگوها، یک قانون تعیین و بیان گردید که هر کروموزوم شکل خاص و الگوی نواربندی مخصوص به خود را دارد و این بصورت یک اصل درآمده است به این ترتیب که برای تعیین شماره هر کروموزوم شکل، نواربندی آن را با الگوی مقرر شده مقایسه می‌کنند و شماره کروموزوم را تعیین می‌نمایند.

جدول ۱: اختصارات برای اصطلاحات متداول

اختصار	اصطلاح	اختصار	اصطلاح
der	Derivative مشتق از کروموزوم دیگر	del	Deletion (حذف)
dup	۲ برابر شدگی duplication	dic	dicentric
h	Hetro chromatic	fra	نقاط شکننده fragile site
ins	قرار گیری در داخل چیزی: insernal	i	isochromosome
mat	Maternal origin	inv	Inversion درجه وارونگی
q	Long arm	p	بازوی کوتاه short arm
t	جابجایی: translocation	r	ring

سازمان دهندگان هستگی (NORs)

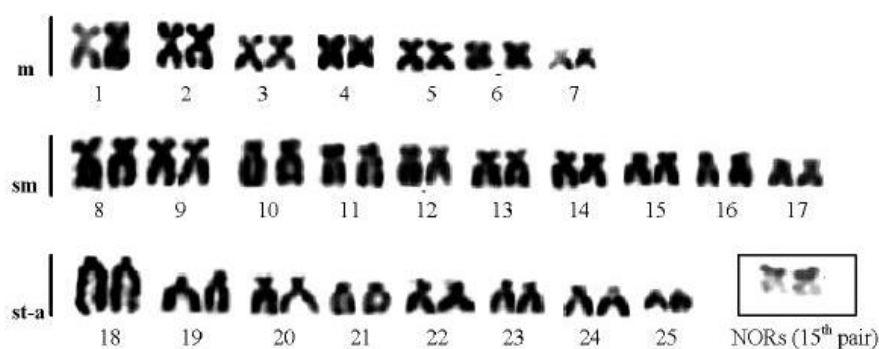
این نواحی فرورفتگی های ثانویه ای هستند که دارای ژن های رمزدار کننده RNA های ریبوزومی جز rRNA5S می باشند و در تشکیل هستک دخالت دارند. پدیدار شدن فرورفتگی ثانویه به دلیل رونویسی بسیار فعال ژن های RNA های ریبوزومی است که آنها را از فرورفتگی های اولیه مشخص می سازد. در انسان سازمان دهندگان هستگی در فرورفتگی های ثانویه کروموزوم های ۱۳ و ۱۴ و ۱۵ و ۲۱ و ۲۲ قرار دارند که همه از کروموزوم های آکروسانتريک و دارای ماهواره هستند. شکل ۲ کاربوتیپ ماهی کولی (*Alburnus filipii*) را نشان می دهد. در این گونه مناطق سازماندهی هستگی روی یک زوج کروموزوم ساب متاسنتريک قرار گرفته اند (شکل ۲).

R = گاهی کروموزوم ها انتهایشان (Telomere) را از دست می دهند و دو انتهای آن بهم متصل می شوند که به آنها کروموزوم های حلقوی گفته می شود.

46,xx,del (5p) که به این صورت خوانده می شود: این کاربوتیپ مربوط به یک ژن با ۴۶ کروموزوم است، که یک deletion یا حذف بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۵ وی رخ داده است.

علامت «:» برای جدا کردن شماره ی کروموزوم (chromosome number)، کروموزوم های جنسی (chromosome sex) به کار می رود. علامت «;» زمانی که translocation و تغییرات کروموزومی بین کروموزوم ها باشد، این علامت استفاده می شود.

برای مثال: 46,xx,t(2;4) (q21;q21)



شکل ۲: کاربوتیپ ماهی کولی *Alburnus filipii* به روش رنگ آمیزی ساده و باندینگ NORs (اقتباس از Nazari et al., 2009)

می تواند با مواد فلئورسنت (که در FISH از آن استفاده می شود) صورت می گیرد (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶). در گذشته از ترکیبات رادیواکتیو برای این کار استفاده می کردند فرضاً برای بازوی بلند کروموزوم X یک پروب طراحی می شود که دقیقاً مکمل آن است؛ مثلاً یک قطعه ۱۰۰۰۰ نوکلئوتیدی را با رنگ فلئورسنت نشان دار کرده اند حال اگر این پروب را روی یک لام کاربوتیپ اضافه

در سیتوژنیک مولکولی یا جدید بر اساس تکنیک های هیبریدیزاسیون hybridization از probe یا نشانگر استفاده می کنند.

پروپ^۱: به توالی های خاص نوکلئوتیدی گفته می شود که مکمل یک نقطه خاص از DNA است و نشان دار می باشد. نشان دار کردن

^۱ Probe

نمی‌توان به وسیله کاریوتیپینگ تشخیص داد اما با FISH قابل تشخیص می‌باشند:

Micro deletion: ریز حذف‌ها، حذف‌های کوتاه با طول کم
Complex Translocation: جابه‌جایی‌هایی که خیلی پیچیده هستند (Xie et al., 2010). به علاوه با این روش تغییرهای جهشی جدید تشخیص داده می‌شوند. همچنین برای یافتن ناهنجاری‌ها، مقایسه محتویات یک DNA نرمال و جمعیت سلول‌های توموری کاربرد دارد. لازم به ذکر است FISH در مدت زمان کمی انجام می‌گیرد، اما کاریوتیپینگ نیازمند مدت زمان طولانی در حدود ۱ هفته است. FISH هم می‌تواند متافازی باشد (یعنی روی لام کاریوتیپینگ انجام می‌گیرد) و هم می‌تواند اینترفازی بوده و در این حالت نیازی به تقسیم سلول نبوده و این عملیات می‌تواند روی کروماتین هم انجام گیرد.

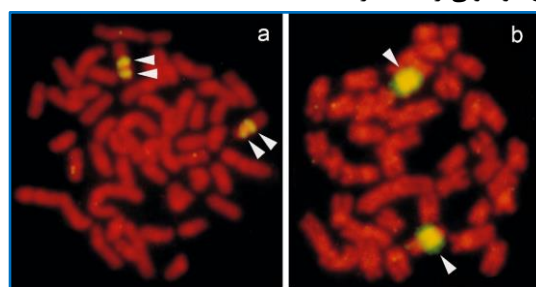
پروب‌ها

- می‌توانند برای سانترومرها اختصاصی باشد و برای تشخیص aneuploidy در متافاز و اینترفاز به کار می‌رود
- می‌توانند برای یک کروموزوم تهیه شوند؛ مثل spectral karyotyping و تغییرات ساختاری کروموزوم‌ها در متافاز را مشخص می‌کند.
- می‌توانند برای یک ژن خاص اختصاصی با unique باشند، یعنی برای تشخیص یک gene خاص در مواردی مثل deletion (حذف) یا amplification (تکثیر) به کار روند.
- برای متصل شدن به ناحیه sub telomeric و یا شناسایی حذف‌ها و باز آرایه‌های sub telomeric به کار می‌روند.
- وقتی FISH برای یک سلول به کار می‌رود، ممکن است موارد زیر مشاهده شود:
- اگر ۲ نقطه روشن در هسته سلول مشاهده شود: سلول دیپلوئید
- اگر بیش از ۲ نقطه روشن مشاهده شود مثلاً ۳ نقطه: insertion or Trisomy
- اگر کم‌تر از ۲ نقطه روشن (۱ نقطه) مشاهده شود: deletion یا Monoamy

منابع

حسینی، و.، کلباسی، م.، ۱۳۸۱. مطالعه کاریولوژیک ماهی انجک (*Scizothorax zarudnyi*) در منطقه زهک استان سیستان و بلوچستان. مجله علوم دریایی ایران. دوره دوم، شماره اول. زمستان ۸۱. ص ۲۱-۱۳.

کنیم، پروب به نقطه‌ای که مکمل خودش است متصل می‌شود و چون به رنگ فلئورسنت متصل است در زیر میکروسکوپ فلئورسنت از خود نور تابش می‌کند، پس به راحتی می‌توان کروموزوم را زیر میکروسکوپ تشخیص داد (شکل ۳). در این روش نه تنها می‌توان تشخیص داد که تعداد کروموزوم‌ها تغییر یافته است، بلکه می‌توان تشخیص داد که برای یک قطعه از ژن، مونوزومی رخ داده یا حذف ژنی اتفاق افتاده است. مضاعف شدگی FISH هیبریدی‌زاسیون فلئورسنت در جا (روی خود کروموزوم) اتفاق می‌افتد. این روش کمی پر هزینه است ولی روز به روز هزینه‌های آن کمتر شده و بیشتر در دسترس قرار می‌گیرد. این روش به خاطر نقطه ضعف‌هایی که کاریوتیپینگ دارد، مورد توجه است (Zhang et al., 2005; Perazzo et al., 2010). کاریوتیپینگ فقط در سلول‌های زنده و سلول‌های در حال تقسیم انجام می‌گیرد اما در مورد FISH لزومی به زنده بودن سلول نمی‌باشد. شکل ۳ کروموزوم‌های ماهیان کاراسیده را نشان می‌دهد که با استفاده از روش مولکولی رنگ آمیزی شده‌اند.



شکل ۳: رنگ آمیزی به شیوه مولکولی در ماهیان خانواده کاراسیده از ماهیان زینتی (اقتباس از Souza et al., 2008)

تغییر در تلومرها

مراحل FISH (procedure)

پروب اختصاصی یک نقطه خاص در کروموزوم آماده و نشان‌دار می‌شود و به آن نقطه متصل می‌شود. یک کار جالب که در این فرایند انجام می‌دهند به نام Spectral Karyotyping (SKY) یعنی برای همه کروموزوم‌ها پروب درست می‌کنند اما با رنگ‌های فلئورسنت مختلف. به این ترتیب اگر زیر میکروسکوپ نگاه کنیم، هر کروموزوم به یک رنگ دیده خواهد شد (سوانسون و همکاران، ۱۳۷۶).

کاربردهای FISH

از جمله کاربردهای این روش می‌توان به تشخیص ناهنجاری‌های تعدادی و ساختاری کروموزوم‌ها، تشخیص ناهنجاری‌های غیر قابل تشخیص با کاریوتیپ، حذف‌های نادیدنی با میکروسکوپ، تغییر حالت‌های طبیعی (Interphase FISH) aneuploidies و ... اشاره کرد. باید توجه داشت که موارد زیر را

¹ Rearrangements

- Kalbasi, M.R., Dorafshan, S., Tavakolian, T., Khazab, M., Abdolhay, H., 2006. Karyological analysis of endangered Caspian salmon, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). Aquaculture research. vol 37. No.13.22..
- Khoshkholgh, M.R., Alavi, A., Nazari, S., 2015. Karyotypic characterization of the pike (*Esox lucius*) from the south Caspian Sea basin. *Iranian Journal of Animal Biosystematics* (IJAB), 11(1), 43-49.
- Molina, W.F., 2001. An alternated method of mitotic stimulation in fish cytogenetic. *Chromosome science*, 5(1): 149-152.
- Nazari, S., Pourkazemi, M., Porto, J.I.R., 2009. Comparative cytogenetic analysis of two Iranian cyprinids *Alburnoides bipunctatus* and *Alburnus filippii* (Cypriniformes: Cyprinidae), with cytotaxonomic considerations. *Iranian Journal of Animal Biosystematics* (IJAB). Vol.5, No.2, 23-32.
- Nazari, S., Pourkazemi, M., Porto, J.I.R., 2011. Chromosome description and localization of Nucleolus Organizing Regions by Ag-staining Technique in *Alburnus filippii* (Cyprinidae, Cypriniformes) of the south Caspian Sea Basin, Guilan, Iran. *Iranian Journal of fisheries science* Vol 10, No 2. 352-356.
- Perazzo, G., Noletto, R.B., Vicari, M.R., Machado, P.C., Gava, A., Cestari, M.M., 2010. Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme Southern Brazil. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21 (3): 509-515.
- Pourkazemi, M., Nazari, S., Bakhshalizade, S., 2010. Karyotype analysis in the white Bream (*Blicca bjoerkna*) from north coast of Iran. *Iranian Journal of fisheries science*. Vol. 9. No. 3.454-463.
- Souza, IL., Santos-Silva, LK., Venere, P.C., Moreira-Filho O., 2008. Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. *Micron* 39 (7): 1036-1041.
- Xie, S., Khan, N., Ramanna, M.S., Niu, L., Marasek-Ciolakowska, A., Arens, P., van, Tuyl. J.M., 2010. An assessment of chromosomal rearrangements in neopolyploids of *Lilium* hybrids. *Genome* 53:439-446
- Zhang, D., Yang, Q., Bao, W., Zhang, Y., Han, B., Xue, Y., Cheng, Z., 2005. Molecular cytogenetic characterization of the *Antirrhinum majus* genome. *Genetics* 169:325-335.
- سوانسون، ک.، مرتز، ت.، یانگ، و.، ۱۳۷۶. سیتوزنتیک، کروموزوم در حال تقسیم توارث و تکامل؛ ترجمه احمدیان تهرانی، پ. انتشارات دانشگاه تهران. ۷۲۰ صفحه.
- Baruffaldi, A., lanzare, V., Cucchi, C., 1992. Utilization of Phytohemagglutinin (PHA) for in vivo karyological studies in teleost fish. *Cytobios*.70:49-52.
- Benzaquem, D.C., Feldberg, E., Porto, J.I.R., Gross, M.C., Zuanon, J.A.S., 2008. Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (perciformes, cichlidae). *Genetics and Molecular Biology* 31(1): 250-255.
- Brinn, M.N.A., Porto, J.I.R., Feldberg, E., 2004. Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (perciformes, cichlidae) in the amazon. *Hereditas* 141 (3): 252-257.
- Cucchi, C. and Baruffaldi, A., 1989. A simple in vivo method for increasing mitoses in teleost fish. *Cytobios*, 60: 165-169.
- Demirok, N.K., Unlu, E., 2001. Karyotypes of cyprinid fish *Capoeta trutta* and *Capeta capoeta umbla* (Cyprinidae) from the Tigris River. *Turk.J.Zool.*(25):389-393.
- Esmaili, H.R., Piravar, Z., 2006. Karyotype of Persian chub, *Petroleuciscus persidis* (Coad, 1981) (Actinopterygii: cyprinidae) from southern Iran. *Turk.Zool.*(30):137-139
- Fan, Z., Fox, D., 1990. A new method for fish chromosome preparation. *Journal of Fish Biology* 37:553-561.
- Foresti, F., Oliveira, C., Almeida- Toledo, L.F., 1993. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicines. *Experientia*. Vol.49 (9): 810-813.
- Gross, M.C., Schneider, C.H., Valente, G.T, Porto, J.I.R., Martins, C., Feldberg, E. 2009. Comparative Cytogenetic Analysis of the Genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal Characteristics of Retrotransposons and Minor Ribosomal DNA. *Cytogenetic and Genome Research* 127 (1): 43-53.
- Hartley, S.E., Horne, M.T., 1985. Cytogenetic techniques in fish genetics. *Journal of Fish Biology*, Vol. 26(5). 575-582.
- Iturra, P., Lam, N., De la Fuente, M., Vergara, N., 2001. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and Coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica* 111: 125-131.