

مقایسه فاسیولا هیاتیکا و فاسیولا ژیکانتیکا از لحاظ خصوصیات کاربوتیپی

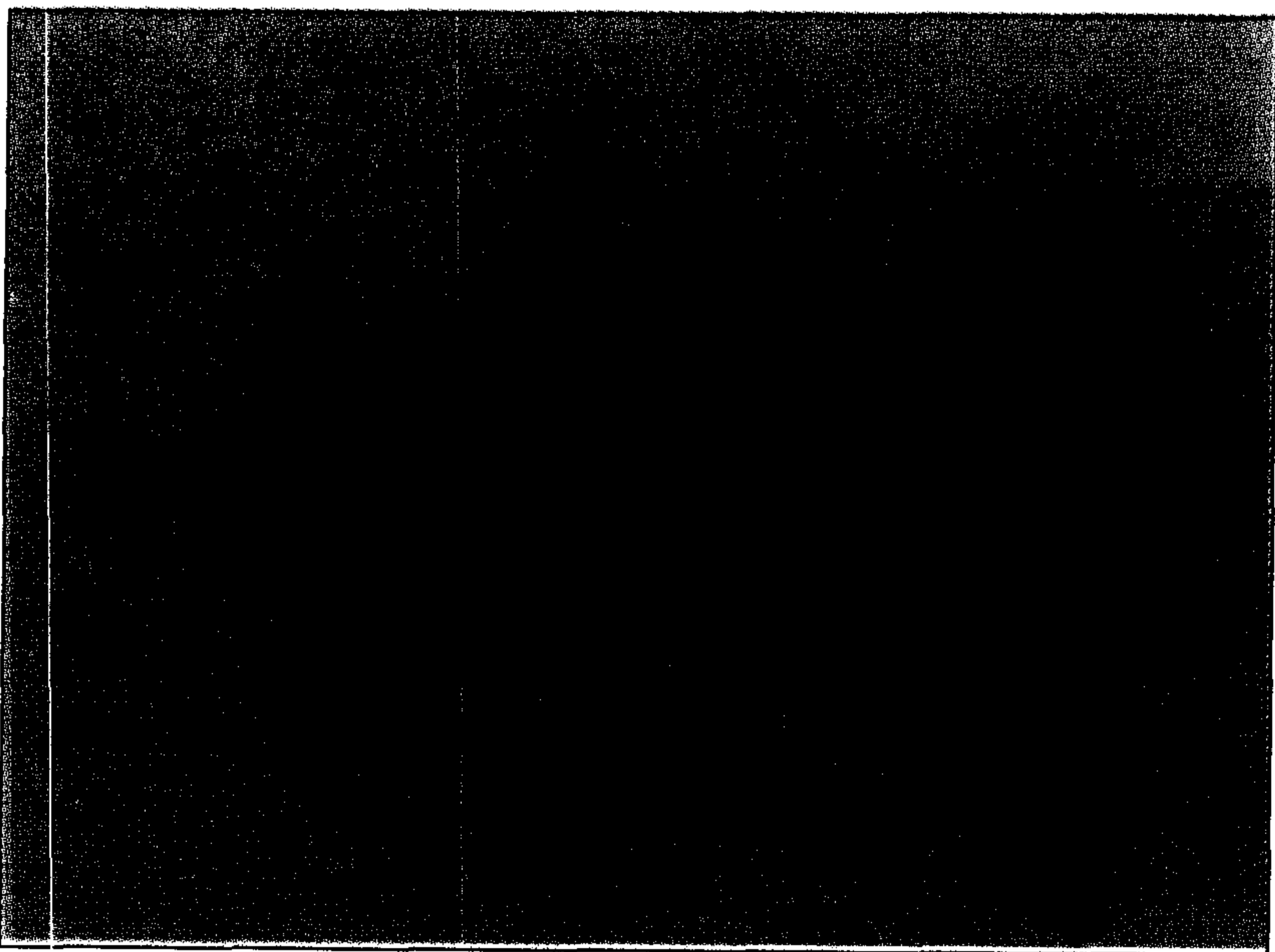
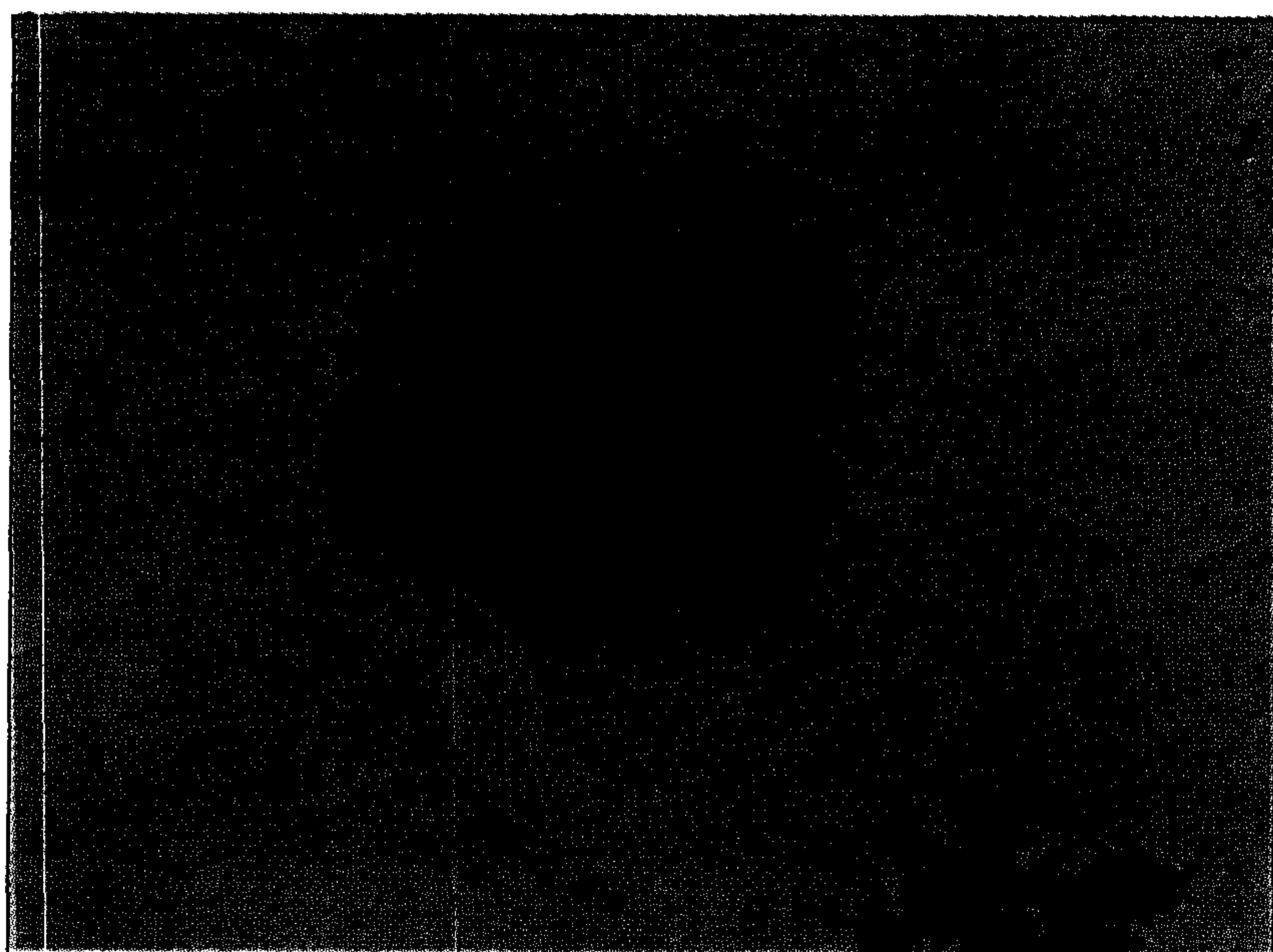
دکتر عبدالحسین دلیمی اصل^۱ دکتر غلامرضا معتمدی^۲ دکتر محمود خضاب^۳

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۱، ۹۶-۹۳، (۱۳۸۰)

مواد و روش کار

ابتدا کبد آلوده به فاسیولا از کشتارگاه زیاران و کرج جمع‌آوری و به آزمایشگاه انگل‌شناسی مؤسسه رازی منتقل گردید. سپس تعداد ۲۰۰ عدد کرم بالغ را از کبد جدا کرده، پس از شستشوی انگل با سرم فیزیولوژی، گونه انگل مورد شناسایی قرار گرفت. سپس انگل به مدت ۲۰ الی ۲۴ ساعت در محلول کل‌شی‌سین قرار داده شد. پس از این مدت بافت‌های بیضه و تخمدان انگل را جدا نموده و از آنها سوسپانسیون سلولی تهیه گردید. در مرحله بعد با استفاده از محلول هیپوتونیک سلولها را ترکانده و با محلول کارنوی فیکس گردید. دو قطره از سوسپانسیون فیکس شده را بر روی لام ریخته و در دمای آزمایشگاه خشک کرده، سپس با گیمسای ۵ درصد رنگ‌آمیزی انجام شد. در خاتمه به کمک میکروسکوپ نوری مراحل مختلف سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. اندازه‌گیری کروموزومها با استفاده از خط‌کش میکرومتری و به کمک میکروسکوپ نوری صورت گرفت و میانگین و انحراف معیار کروموزومها، محاسبه و با هم مقایسه گردید.

در این مطالعه ابتدا ۲۰۰ نمونه از انگلهای فاسیولا هیاتیکا و فاسیولا ژیکانتیکا از کبد آلوده گوسفندان جدا گردید، پس از شستشو و تهیه سوسپانسیون سلولی، از سلولهای جنسی آنها با روش Air-dry گسترش کروموزومی تهیه شد، پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا، کروموزومهای دو گونه انگل از لحاظ کاربوتیپی مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده اسپرما توسیتها به صورت روزت هشت تایی و اووسیتها به صورت انفرادی مشاهده شدند اسپرما نیز به صورت واضح و مشخص بودند. تعداد کروموزومها در مرحله متافاز در اسپرما توسیتها و اووسیتها در حالت دیپلوئید (2n=20) قابل رؤیت بودند. در مجموعه کروموزومهای انگل، یک جفت کروموزوم بزرگ، سه جفت کروموزوم متوسط و ۶ جفت کروموزوم کوچک دیده می‌شد. هیچ اختلاف معنی‌داری بین کروموزومهای دو گونه انگل از لحاظ شکل، اندازه و خصوصیات کاربوتیپی و همچنین اسپرما توسیتها و اووسیتهای آنها مشاهده نشد. واژه‌های کلیدی: فاسیولا هیاتیکا، فاسیولا ژیکانتیکا، کاربوتیپ، کروموزوم.



تصاویر ۱ و ۲ - روزت‌های اسپرما توسیت فاسیولا هیاتیکا و فاسیولا ژیکانتیکا.

پس از اختراع میکروسکوپ، تلاش برای جستجوی اجزای سلول و موجودات زنده کوچک مورد توجه محققین قرار گرفت. در حدود ۱۶۰ سال پیش، مفهوم «تئوری سلولی» که در مورد گیاهان و جانوران یکسان بود مطرح گردید. براساس این تئوری، سلول به عنوان واحد سازنده بافت‌های بدن شناسایی گردید. از آن تاریخ به بعد، مطالعه شکل سلول و متعاقب آن اجزای داخلی آن از قبیل هسته و اجزای دیگر (کروموزوم) آغاز شد. مطالعات بعدی جزئیات میتوز و پس از آن میوز را روش نمود و با تعیین خصوصیات ذاتی کروموزومها، مشخص شد که کروموزومها نه تنها در انتقال خصوصیات از نسلی به نسل دیگر نقش دارند بلکه در تمایز جنسی نیز نقش ایفا می‌نمایند. بعدها محل ژنها نیز بر روی کروموزومها تحت مطالعه قرار گرفت. در همین زمینه، عده‌ای از محققین به مطالعه سلول‌شناسی انگلها پرداختند. این نوع مطالعه توانست اطلاعات مفیدی در زمینه طبقه‌بندی و تکامل موجودات زنده فراهم نماید. اصولاً برای مطالعه ژنتیک جمعیت‌های طبیعی و اختلافات گونه‌ای در داخل یک جمعیت، اطلاعات کروموزومی بسیار مفید می‌باشد. برخی از دانشمندان معتقدند که با انجام کاربوتیپ می‌توان تاریخ تکامل موجوداتی که از نظر ژنتیکی به هم وابسته‌اند را تعیین نمود و ارتباط میان گونه‌های وابسته به یک مبدا مشترک را مشخص کرد. شناسایی انگل فاسیولا نیز از طریق مطالعه و تجزیه و تحلیل کروموزومی از سالها قبل به عنوان یک روش سیستماتیک مورد توجه قرار گرفت. از لحاظ تعداد کروموزوم و تفاوت خصوصیات کاربوتیپی فاسیولا هیاتیکای جمع‌آوری شده از نقاط مختلف جهان گزارشهای متعددی ارایه شده است. مطالعات انجام شده در مورد فاسیولا هیاتیکا توسط شابمن در سال ۱۹۰۵، تعداد را ۸ عدد، شلن برگ در سال ۱۹۱۱، ۱۲ عدد، در سال ۱۹۶۰، ۱۶ عدد و دهورن در سال ۱۹۱۱ و ساندرشن در سال ۱۹۵۳، ۲۰ عدد و بینویه در سال ۱۹۹۰، ۳۰ عدد گزارش نموده‌اند. در مورد انگل فاسیولا ژیکانتیکا نیز سریواستاوا و جها در سال ۱۹۶۴ تعداد کروموزومهای آن را ۱۶ عدد، ونکت-ردی و سابرامانیام در سال ۱۹۷۳ و بینویه در سال ۱۹۹۰، ۲۰ عدد گزارش نموده‌اند. در مطالعه حاضر سعی شده است خصوصیات کاربوتیپی دو گونه فاسیولا هیاتیکا و فاسیولا ژیکانتیکای موجود در ایران مورد مطالعه و مقایسه قرار گیرد.

۱) گروه آموزشی انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.

۲) بخش انگل‌شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، کرج - ایران.

۳) بخش ژنتیک مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، کرج - ایران.



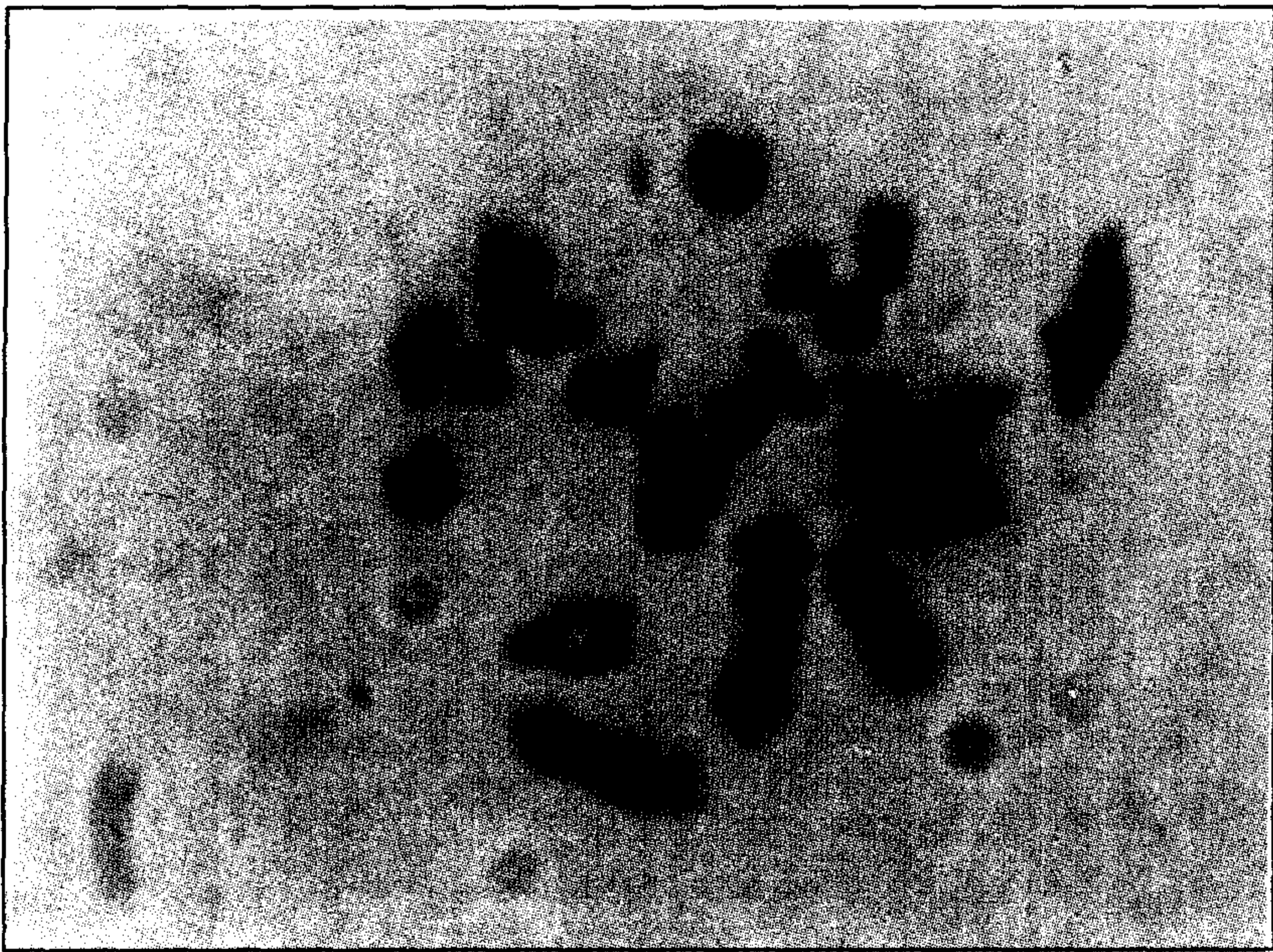


تصویر ۳

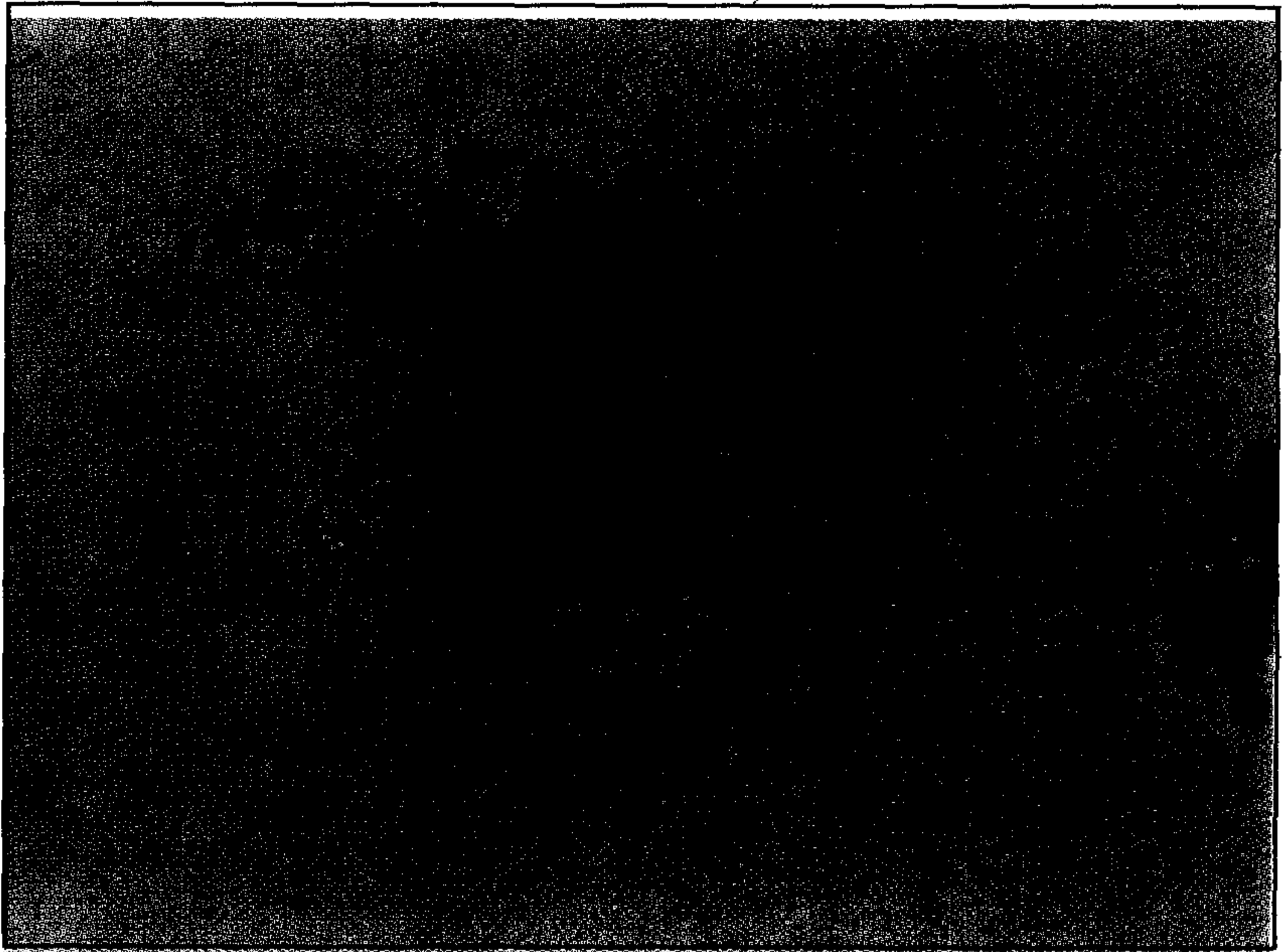


تصویر ۴

تصاویر ۳ و ۴ - کروموزوم‌های فاسیولا زیگانتیکا.



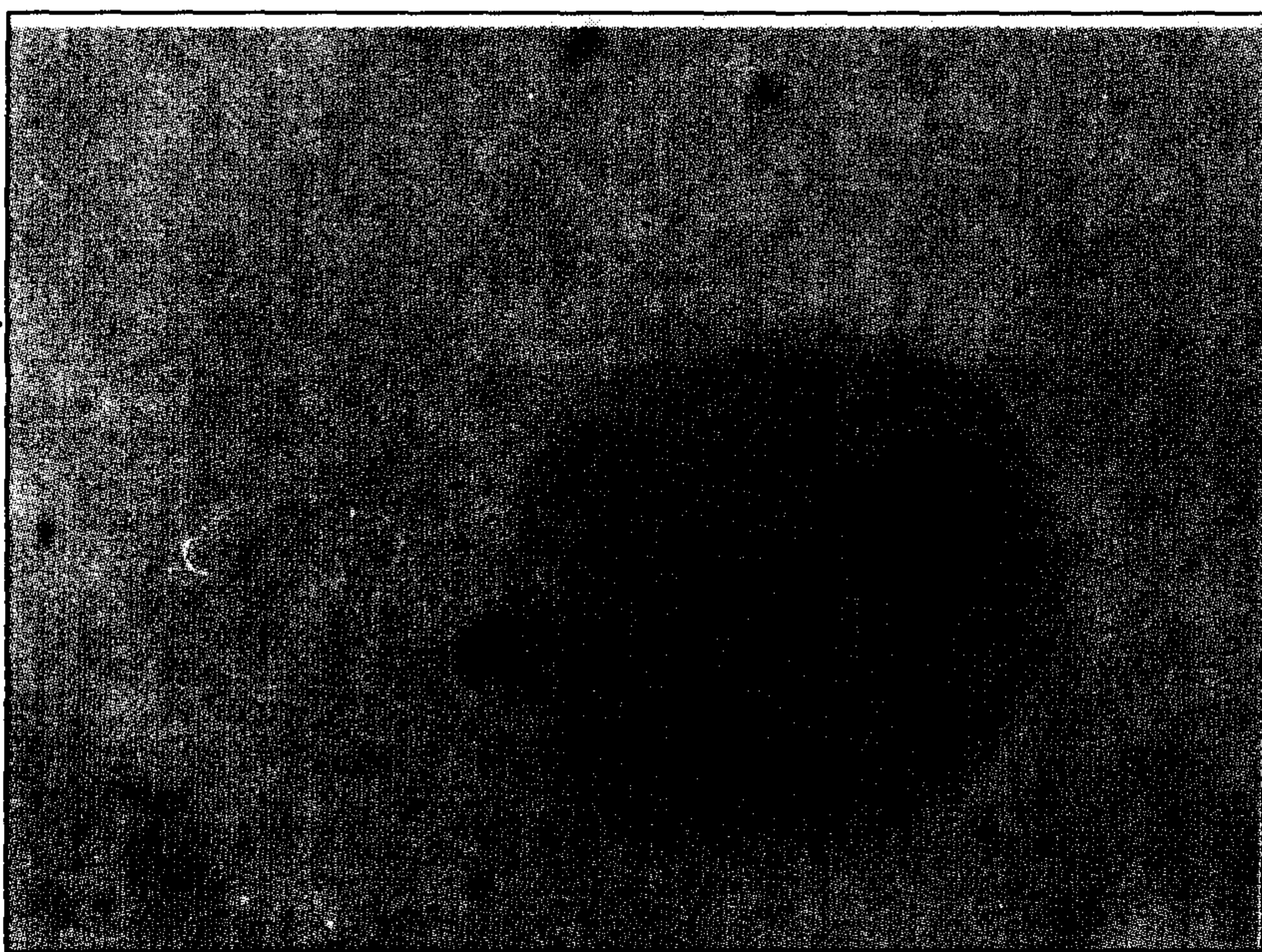
تصویر ۵



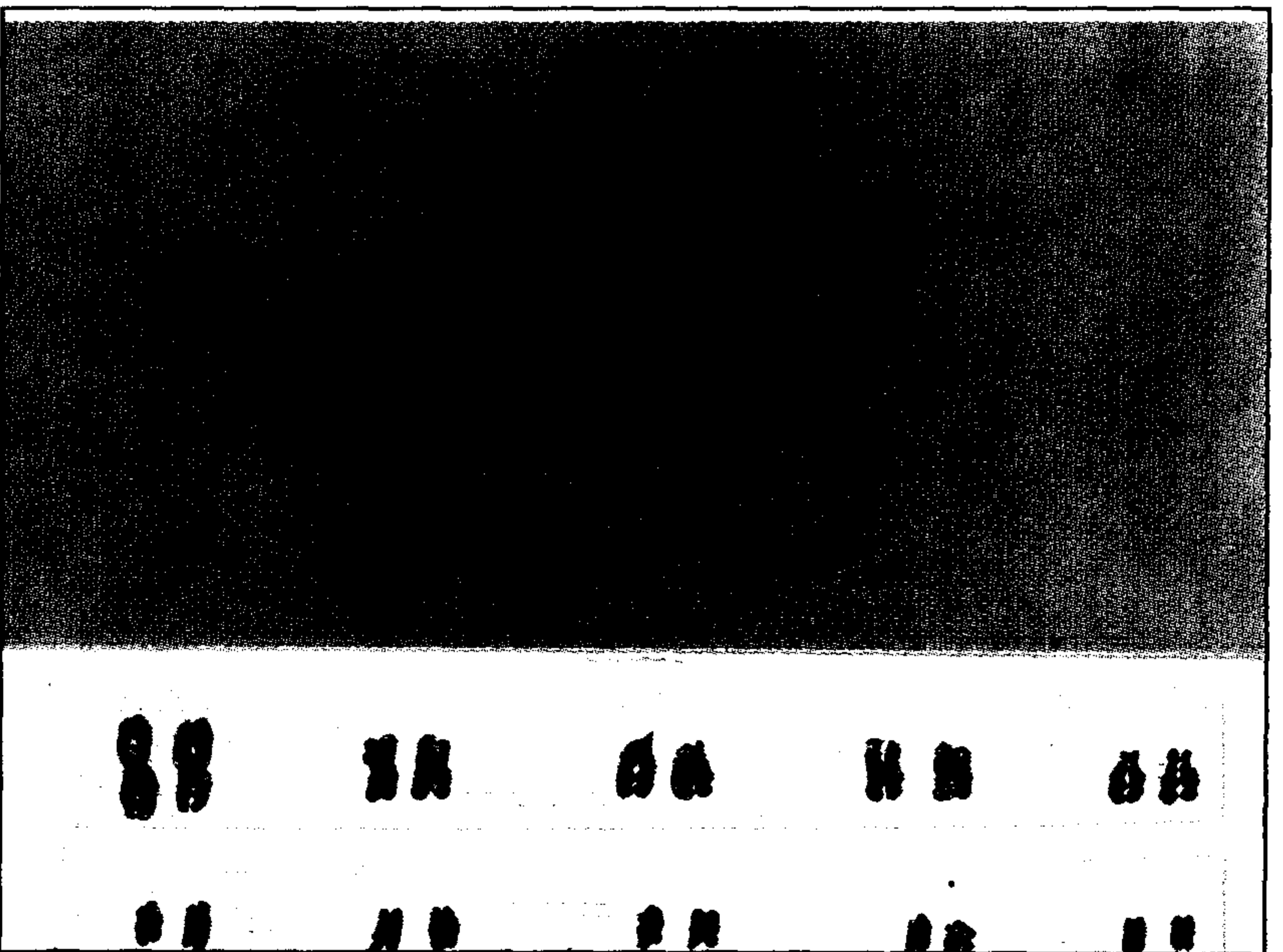
تصویر ۶

تصویر ۵ - کروموزوم‌های فاسیولا هپاتیکا.

تصویر ۶ - اواوسیت‌های فاسیولا هپاتیکا.



تصویر ۷



تصویر ۸

تصویر ۷ - اسپرم‌های فاسیولا هپاتیکا.

تصویر ۸ - آرایش کروموزوم‌های فاسیولا زیگانتیکا.



جدول ۱ - طول مطلق و طول نسبی کروموزوم‌های فاسیولا زیگانتیکا و فاسیولا هپاتیکا تحت مطالعه

فاسیولا هپاتیکا		فاسیولا زیگانتیکا		شماره کروموزوم
طول نسبی (درصد) انحراف معیار \pm میانگین	طول کروموزوم (میکرون) انحراف معیار \pm میانگین	طول نسبی کروموزوم (درصد) انحراف معیار \pm میانگین	طول کروموزوم (میکرون) انحراف معیار \pm میانگین	
۱۸/۹۰ \pm ۲/۰۱	۵/۷۵ \pm ۰/۶۳	۲۱/۲۱ \pm ۲/۶۱	۵/۹۵ \pm ۱/۰۳	۱
۱۴/۰۵ \pm ۱/۰۳	۴/۳۰ \pm ۰/۷۵	۱۴/۴۶ \pm ۱/۴۶	۴/۰۴ \pm ۰/۴۸	۲
۱۲/۹۵ \pm ۰/۸۷	۳/۹۵ \pm ۰/۵۵	۱۲/۲۷ \pm ۰/۸۶	۳/۳۸ \pm ۰/۳۹	۳
۱۰/۶۲ \pm ۰/۶۴	۳/۲۵ \pm ۰/۵۴	۱۰/۷۱ \pm ۱/۰۶	۲/۹۵ \pm ۰/۳۶	۴
۹/۶۴ \pm ۰/۶۵	۲/۹۵ \pm ۰/۴۹	۹/۶۸ \pm ۱/۳۸	۲/۴۷ \pm ۰/۲۵	۵
۸/۸۶ \pm ۰/۵۹	۲/۷۰ \pm ۰/۳۵	۸/۳۳ \pm ۱/۰۰	۲/۳۲ \pm ۰/۲۳	۶
۸/۰۰ \pm ۰/۹۴	۲/۴۵ \pm ۰/۴۳	۶/۹۹ \pm ۰/۶۳	۱/۹۵ \pm ۰/۱۵	۷
۷/۰۴ \pm ۱/۰۸	۲/۱۵ \pm ۰/۴۱	۶/۷۳ \pm ۰/۸۵	۱/۸۸ \pm ۰/۲۶	۸
۵/۳۲ \pm ۰/۹۸	۱/۶۵ \pm ۰/۴۷	۵/۷۱ \pm ۱/۱۰	۱/۶۱ \pm ۰/۳۷	۹
۴/۵۱ \pm ۱/۰۴	۱/۴۰ \pm ۰/۴۶	۴/۹۰ \pm ۰/۸۳	۱/۴۶ \pm ۰/۳۵	۱۰

ساکاگاشی وینه طی سالهای ۱۹۷۷، ۱۹۷۸ و ۱۹۷۹ و همچنین ساکاگاشی و کازانو در سال ۱۹۷۹ و ساکاگاشی و همکاران در سال ۱۹۸۰ که با جمع‌آوری انگل فاسیولا هپاتیکا از نقاط مختلف جهان مانند استرالیا، انگلیس، هند، پاکستان، پرتوریکو و انجام کاریوتیپینگ، انگل مذکور را مورد مطالعه قرار داده‌اند مطابقت دارد.

References

1. Dehorne, H. Recherches sur la division de la cellule. Arch. Zool. Exp. et. gen. 9, 2-171, (1911).
2. Govaert, J. Etude cytologique et cytochimique des cellules de la lignee germinative chez *Fasciola hepatica*. Exp. Parasit., 9, 141-158, (1960).
3. Sakaguchi, Y. and Ueno, H. Chromosomes of liver fluke, *Fasciola hepatica* from Australia. Chromosome Inform., Serv., 23, 14, (1977).
4. Sakaguchi, Y. and Ueno, H. Studies on the chromosome of helminths (10), Karyotype of *Fasciola hepatica* from England, Jap. J. Parasit., 27, (Suppl.), 77 (in Japanese), (1978).
5. Sakaguchi, Y. and Ueno, H. Studies on the chromosome of helminths (13), Chromosome and gametogenesis of *Fasciola gigantica* from Hawaii. Jap. J. Parasit., 28, (Suppl) 72 (in Japanese), (1979).
6. Sakaguchi, Y. and Kusano, M. Studies on the chromosome of helminths (15), Karyotype of *Fasciola hepatica* obtained from cattle in the USA, Jap. J. Parasit., 28, (Supple). 106, (in Japanese), (1979).
7. Sakaguchi, Y., Kusano, M., Hirai, H. and Terasaki, K. Studies on the chromosome of helminths (18), Chromosomes and spermatogenesis of *Fasciola spp.* and *F. hepatica*

نتایج

در مطالعه سلولهای جنسی فاسیولا در طی مراحل اسپرماتوگونی و اووگونی، اسپرماتوسیت‌ها به صورت روزت هشت‌تایی و اووسیت‌ها به صورت انفرادی مشاهده شدند. اسپرم‌های انگل به خوبی در سطح گسترش قابل رؤیت بودند. به علاوه در لامهای مورد مطالعه کروماتیدهای غیرطبیعی و تغییرشکل یافته نیز وجود داشت.

تعداد ۲۰ کروموزوم در مرحله متافاز اسپرماتوسیت‌ها و اووسیت‌ها در حالت دیپلوئید ($2n=20$) مشاهده شد. در کاریوتیپ انگل یک جفت کروموزوم بزرگ، سه جفت کروموزوم متوسط و ۶ جفت کروموزوم کوچک مشاهده گردیدند. شکل و اندازه کروموزوم‌ها در تصاویر ۱ تا ۸ و جدول ۱ دیده می‌شود. هیچ اختلاف معنی‌دار کاریوتیپی بین دو گونه انگل و همچنین در اسپرماتوسیت و اووسیت‌های آنها مشاهده نشد.

بحث

این بررسی وجود $2n=20$ کروموزوم در گونه‌های فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا زیگانتیکا را نشان داد که این نتیجه با نتایج برخی از محققان مانند ساندرسن در سال ۱۹۵۳ و ونکتردی در سال ۱۹۷۳ مطابقت دارد. از طرفی دیگر بن‌ویه در سال ۱۹۹۰ ادعا نموده‌اند که فاسیولا هپاتیکا معمولاً تری‌پلوئید ($3n=30$) و فاسیولا زیگانتیکا دیپلوئید ($2n=20$) هستند ولی در مطالعه حاضر هیچ تفاوت معنی‌داری بین شکل، تعداد و اندازه کروموزوم‌ها و همچنین خصوصیات کاریوتیپی این دو گونه انگل مشاهده نشد، لذا تمایز این دو گونه با روش اندازه‌گیری طول و مقایسه شکل کروموزوم‌ها کافی به نظر نمی‌رسد و حتماً بایستی از روشهای دیگر مطالعات کروموزومی از قبیل C-banding و یا روشهای ملکولی استفاده نمود.

گرچه برخی از محققین مانند کایانو در سال ۱۹۷۸ اعتقاد دارند که فاسیولا هپاتیکا به طریق بکرزایی تولیدمثل می‌کند. ولی در مطالعه حاضر، دیدن اسپرم در نمونه و فعال بودن آنها و پدیده سیناپس در اسپرماتوسیت‌ها و اووسیت‌های اولیه گواه این مطلب است که تشکیل تخم به طریق تولیدمثل جنسی صورت می‌گیرد و به صورت بکرزایی نیست. این نتیجه با نتایج به دست آمده توسط



- from Thailand, India Pakistan and Puerto-Rico, Jap. J. Parasit., 29, 31 (in Japanese), (1980).
8. Sanderson, A.R. Maturation and probable gynogenesis in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. Nature, 172, 110-112, (1953).
 9. Schellenberg, A. Ovogenese, eireifung und befruchtung von *Fasciola hepatica*. Zellforsch., 6, 443-483, (1911).
 10. Schubmann, W. Ueber die eibildung und embryovalententwicklung von *Fasciola hepatica* L., (Distomum hepaticum Betz). Zool. Jah. Abth. F. Anat. Ont., 221-571, (1905).
 11. Srivastava, M.D.L. and Jha, A.G. Structure and behaviour of the chromosomes of *Fasciola gigantica* Cobbold 1858, (Trematoda, Digenea: Fasciolidae). Proc. Nat. Acad. Sci. India. Ann. Numb., 125, (1964).
 12. Venkat Reddy, P. and Subramanyam, S. Chromosome studies in the liver fluke, *Fasciola gigantica* cobbold, 1856 from Andhra paradesh. Curr. Sci., 42, 228-291, (1973).
 13. Yin, H.Z. and Ye By Studies on the karyotypes of *Fasciola* spp. Chung Kuo Chi Sheng Chung Hsueh Yu Chi Sheng Chung Ping Tsa Chih, 8: 2, 124-126, (in Chinese), (1990).

Comparative study of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* karyotyping

Dalimi Asl, A.H.¹, Motemedi, Gh.², Khazab, M.²

¹Department of Parasitology, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modarres University, Tehran - Iran. ²Razi Institute of Sera and Vaccine Research, Karaj - Iran.

In the present work, 200 *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* were collected from sheep livers. After washing and preparing cell suspension from their genital organs, karyotyping study was carried out using air-drying and squashing methods. The results indicate, eight primary spermatocytes in rosette form of 20 diploid chromosomes as well as individual primary oocyte. The twenty chromosomes consist of one pair of large, three pairs of medium and six pairs of small size. No significant differences between spermatogonia and oogonia as well as length and shape of chromosomes of two species of *Fasciola* were observed.

Key words : *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, Karyotyping, Chromosomes.

