مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۳، ۲۵۵-۲۴۹
Original Article
Journal of Veterinary Research. 68,3: 249-255, 2013

بررسی کاریوتیپ و نوار بندی Ag-NOR کروموزوم‌های ماهی جنگجوی سیامی (*Betta splendens*)

فرهاد امینی[1*] ارغوان سادات سکوت[2]
۱) گروه بهداشت و تغذیه دام و طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۱۴ بهمن ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۲۵ اردیبهشت ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: ماهی جنگجوی سیامی در سال ۱۹۰۹، *Betta splendens*, Regan یک ماهی آب شیرین بومی مناطق جنوب شرق آسیا می‌باشد که امروزه در ایران استفاده از آن به عنوان ماهی زینتی متداول شده است. **هدف:** هدف از انجام این مطالعه، تعیین کاریوتیپ این ماهی به روش *in vivo* و نوار بندی Ag-NOR کروموزوم‌های آن بوده است. **روش کار:** گسترش‌های کروموزومی به دو روش چکاندن و له کردن برروی لام سرد از بافت‌های خونساز شامل قسمت قدامی کلیه و طحال و همچنین آبشش و بیضه تهیه و به روش رنگ‌آمیزی گیمسا مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، جهت بررسی نوارهای (Nucleolus Organizing Regions) NOR از رنگ‌آمیزی نیترات نقره بافت‌های خونساز استفاده شد. **نتایج:** به طور کلی گسترش‌های کروموزومی حاصل از بافت‌های خونساز نسبت به آبشش و بیضه، نتایج بهتری را به همراه داشت. عدد کروموزومی در سلول‌های دیپلوئید در این گونه ماهی ۲n=۴۲ و در سلول‌های هاپلوئید آن n=۲۱ و عدد بازویی آن FN=۶۸ شمارش گردید. ۴ جفت نوار مناطق سازمان دهنده هستک (NORs) در گسترش کروموزومی مشاهده گردید. فرمول کروموزومی در این ماهی مشتمل بر ۱ جفت کروموزوم متاسنتریک، ۳ جفت ساب متاسنتریک، ۹ جفت ساب تلوسنتریک (آکروسنتریک) و ۸ جفت تلوسنتریک می‌باشد. فرمول کروموزومی در هر دو جنس نر و ماده مشابه بود اما از نظر بررسی کاریوتیپی، کروموزوم جفت ۱۷ در دو جنس هترومورفیک بود و احتمال آن وجود دارد این جفت کروموزومی، کروموزوم‌های جنسی باشند. **نتیجه‌گیری نهایی:** تعداد کروموزوم‌ها (۲n) مشابه اما فرمول و تعداد بازوهای کروموزمی (FN) در این بررسی متفاوت از مطالعات پیشین می‌باشد. همچنین وجود یک جفت کروموزوم متاسنتریک (جفت ۱) و یک جفت کروموزوم هترومورفیک (جفت ۱۷) در دو جنس برای اولین بار در این گونه گزارش می‌شود. در صورتی که کروموزوم‌های جفت ۱۷ کروموزوم‌های جنسی باشند، این گونه ماهی احتمالاً در دستگاه تعیین جنسیت WZ قرار گرفته که در آن جنس ماده هتروگامتیک (WZ) و جنس نر هوموگامتیک (ZZ) است.

واژه‌های کلیدی: ماهی جنگجوی سیامی، *Betta splendens*، کروموزوم، کاریوتیپ، نوار بندی Ag-NOR

مقدمه

مطالعات کروموزومی ماهیان در سطح جهان به طور محدودی انجام پذیرفته است به طوری که از ۳۰/۰۰۰-۲۵/۰۰۰ گونه ماهی، اطلاعات کاریولوژیک در مورد کمتر از ۳۵۰۰ گونه از آنها موجود می‌باشد (۱). کاریوتیپ تصویری از مجموعه کامل کروموزومی یک فرد یا یک گونه است که ویژگی‌های کروموزوم‌ها را از نظر شکل و اندازه و تعداد دیپلوئید مشخص می‌کند. به طور کلی، کاریوتیپ از ویژگی‌های گونه‌ای می‌باشد، زیرا در گونه‌های عالی تر از قبیل پستانداران فرمول کروموزومی افراد متعلق به یک گونه اساساً ثابت است. در حالی که در گونه‌های پست تر از جمله ماهیان ممکن است در تعداد و انواع کروموزوم‌های افراد متعلق به یک گونه تنوع دیده شود(۱). آنالیز کاریوتیپ در مشخص کردن روابط تکاملی گونه‌های متعلق به یک گروه مشابه یا گروه‌های وابسته ی نزدیک، می‌تواند مفید باشد. در حقیقت، پی بردن به روابط درون گونه‌ای، بدون داشتن اطلاعات کاریوتیپی مناسب، به طور کامل امکان پذیر نمی باشد. اگرچه تاکنون بررسی کاریوتیپ ماهی‌ها به عنوان ابزار اصلی در مطالعات تکاملی بوده و کاربرد کمتری در مدیریت ذخایر و کنترل آنها داشته است، اما در گونه‌های پرورشی این اطلاعات می تواند در ایجاد ذخایر برتر ژنتیکی از راه اصلاح نژاد و بیوتکنولوژی مفید واقع گردد(۱۴).

ماهی جنگجوی سیامی (*Betta splendens*)، یکی از ماهیان زینتی معروف جهان می‌باشد که طی سال‌های اخیر در ایران نیز رواج یافته است. این ماهی، بومی آب‌های جنوب شرق آسیا به خصوص تایلند می‌باشد. جنس نر آن از زیبایی خاصی برخوردار بوده به طوری که غالباً این ماهی با فنوتیپ‌های جنس نر آن شناخته می‌شود. با وجود گسترش چشمگیر این ماهی در صنعت ماهیان زینتی ایران، تاکنون هیچگونه مطالعه‌ی کروموزومی برروی آن انجام نشده است. علاوه بر آن، تفاوت‌های احتمالی کاریوتیپ درمیان دو جنس نر و ماده این گونه هنوز مشخص نگردیده است. در این بررسی علاوه بر تهیه گسترش‌های کروموزمی استاندارد و کاریوتایپینگ هر دو جنس نر و ماده این گونه، نسبت به نوار بندی Ag-NOR کروموزوم‌های آن نیز اقدام گردید. نوار بندی Ag-NOR آشکار کننده مناطق سازمان دهنده هستک‌ها (Nucleolus Organizing Regions) برروی کروموزوم‌ها می‌باشد و تشخیص این نواحی و همخوانی تعداد آنها

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۶۰ -۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: famini@ut.ac.ir

با تعداد هستک‌ها از نظر سیتوژنتیکی دارای اهمیت می‌باشد. دلیل این امر این است که هدف این روش یافتن مکان ژن‌هایی است که در ساخت ریبوزوم(RNA ریبوزومی S ۱۸ و S ۲۸) دخالت دارند. NORها باعث بروز یافتن ژن‌های متعددی شده و بیش از هر ناحیه کروموزومی دیگر از پروتئین‌های غیرهیستونی تشکیل می‌شوند. با احیاء شدن نقره آلی به وسیله این پروتئین‌ها است که رنگ نقره تیره شده و نوارهای تیره خاصی بر روی کروموزوم ایجاد می‌گردد (۴،۱۳).

مواد و روش کار

این مطالعه بر روی ۱۰ عدد ماهی جنگجوی سیامی، شامل ۵ عدد نر و ۵ عدد ماده، انجام گرفت. ماهیان نر در جایگاه‌های انفرادی و ماهی‌های ماده به صورت گروهی در شرایط مناسب آکواریومی در دمای ^{o}C ۲۶-۲۵ به مدت یک هفته نگهداری و با غذای مناسب تغذیه گردیدند. به منظور متوقف نمودن تقسیمات سلولی در مرحله‌ی متافازی از دو روش *invivo* یعنی تزریق داخل صفاقی کلچی سین و غوطه‌ور سازی در حمام کلچی سین استفاده شد. میزان دوز تزریقی کلچی سین در ماهیان ۰/۱۵mg-۰/۱۰ به ازای هر گرم وزن بدن بود (۱۰). تزریق‌ها بر روی ۵ ماهی نر و ۳ ماهی ماده انجام گرفت. پس از تزریق با سرنگ انسولین، ماهی به یک جایگاه انفرادی منتقل شده و با هوادهی و تامین دمای ^{o}C ۲۷-۲۶ با بخاری آکواریومی، به مدت ۳ الی ۴ ساعت دوره‌ی انکوباسیون طی گردید. همچنین بر روی ۲ عدد ماهی ماده به دلیل کوچک بودن به روش غوطه ور سازی در حمام کلچی سین عمل شد. در این روشی حمام کلچی سین ۰/۰۱٪ تهیه گردید و ماهی تحت شرایط هوادهی در دمای ^{o}C ۲۷-۲۶، به مدت ۳-۲ ساعت در آن قرار داده شد.

در هر دو روش پس از سپری شدن دوره‌ی انکوباسیون، ماهی را از آب خارج و به روش انسانی معدوم و بافت‌های مورد نظر جدا گردیدند. کمان‌های آبششی هر دو طرف جدا شده، علاوه بر آن بافت‌های طحال و قسمت قدامی کلیه و نیز بافت بیضه در ماهیان نر برداشت شدند. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه درون محلول هیپوتونیک کلرید پتاسیم (KCl) ۰/۰۷۵mol قرار گرفتند. در این مدت، بافت‌های نرم چندین مرتبه پیپتینگ شدند. پس از این مرحله نمونه‌ها، بجز بافت آبشش، به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی را دور ریخته و با محلول کارنوی سرد و تازه تهیه شده، مخلوط ۳v:۱v اسید استیک گلاسیال: متانول، جایگزین گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه درون یخچال قرار داده، سپس خارج نموده و مجدداً سانتریفوژ کرده و محلول جدید کارنوی جایگزین شد. این مراحل ۴ مرتبه تکرار شد. در هر مرحله محلول تازه و سرد کارنوی تهیه می‌شد (۱۰).

لام‌های میکروسکوپی پیش از تهیه گسترش کروموزومی به مدت ۳۰ دقیقه درون محلول دترجنت جوشانده و سپس چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند. پس از آن لام‌ها را به دقت خشک کرده و سپس جهت تهیه گسترش درون فریزر ^{o}C ۱۸- نگهداری شدند.

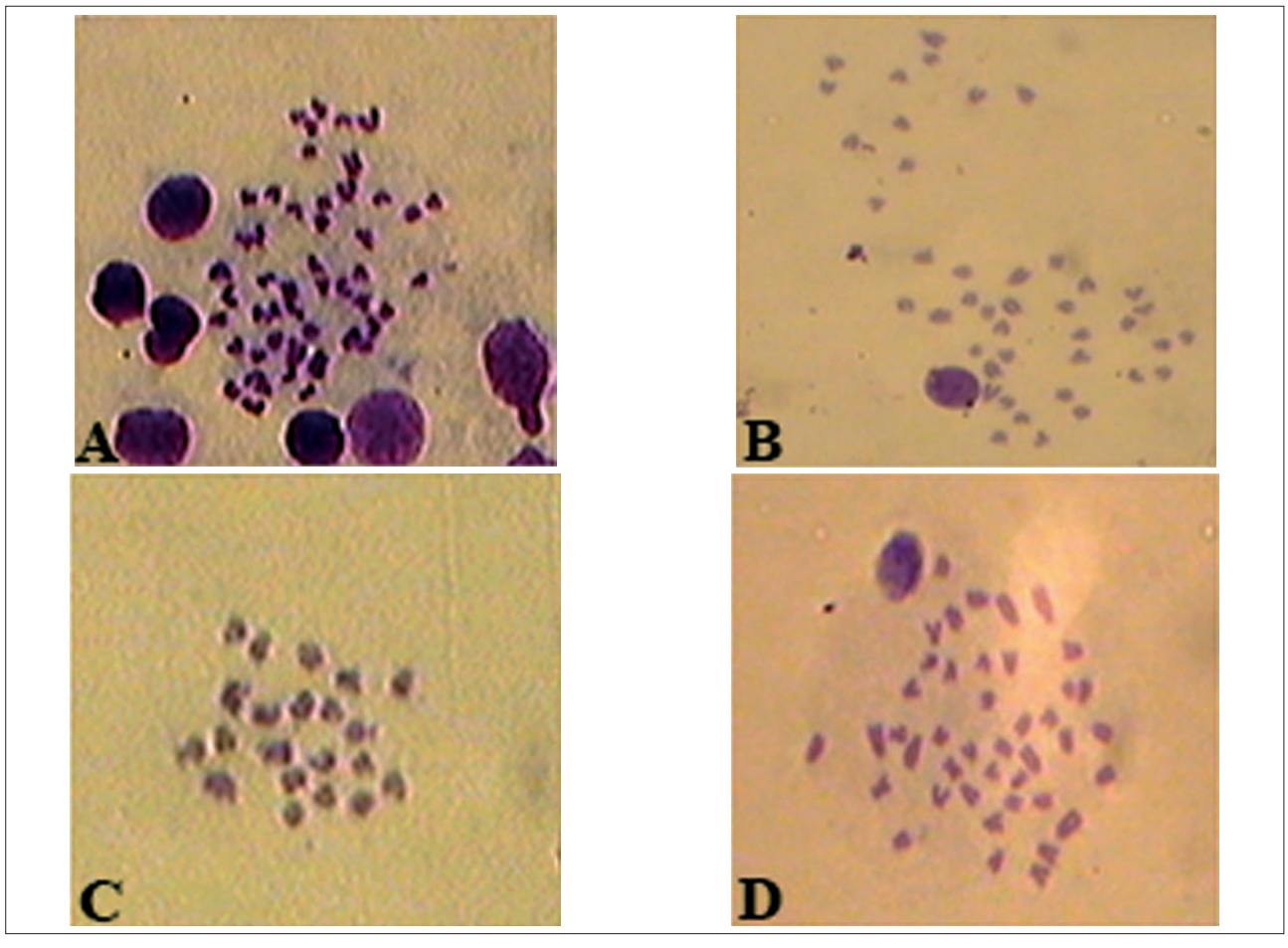
برای تهیه گسترش به روش چکاندن، چند میکرولیتر از سوسپانسون سلولی با پیپت برداشت شده و از فاصله‌ی ۴۰cm-۳۰ بر روی لام سرد به تعداد ۳ قطره با فواصل منظم چکانده شد(۴). در روش له کردن نیز بافت آبششی به صورت مهرزدن بر روی لام سرد که در بالا توضیح داده شد فشار داده و سپس برداشته می‌شدند (۱۰). در این روش‌ها دقت می‌شد که گسترش‌ها با هم همپوشانی نداشته باشند. سپس لام‌ها در دمای آزمایشگاه خشک و بعدبه مدت ۶۰-۵۰ دقیقه درون رنگ گیمسای ۲۵٪ قرار داده شدند. بعد از رنگ‌آمیزی، لام‌ها چندین مرتبه با آب مقطر شستشو گردید و در دمای محیط خشک شدند.

رنگ‌آمیزی اختصاصی نیترات نقره بر اساس دو روش Howell & Black در سال ۱۹۸۰ (۷) و Hayes & Dutrillaux در سال ۲۰۰۰(۵) انجام گرفت. بر اساس روش اول، پس از تهیه گسترش و خشک شدن، بر روی هر لام ۱ قطره محلول ژلاتین ۵۰٪ و ۲ قطره محلول نیترات نقره ۵۰٪ ریخته و لام‌ها را در ۳ حالت دمایی - زمانی متفاوت (یعنی دمای ^{o}C ۷۰ به مدت ۸ و ۶۰ دقیقه در محفظه مرطوب، و دمای محیط به مدت ۴۰ دقیقه در محفظه خشک) قرار داده شدند. پس از آن لام‌ها با آب مقطر شستشو شده و در گیمسا ۱۰٪ به مدت ۵ دقیقه مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفتند. در روش دوم، لام‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در بافر بورات (pH=۹/۲) قرار داده و پس از شستشو و خشک کردن، ۲ قطره از محلول نیترات نقره ۵۰٪ بر روی لام قرار داده و سپس در دمای ^{o}C ۷۰ به مدت یک ساعت در محفظه مرطوب قرار داده شدند و مانند روش قبل با گیمسا رنگ‌آمیزی شد.

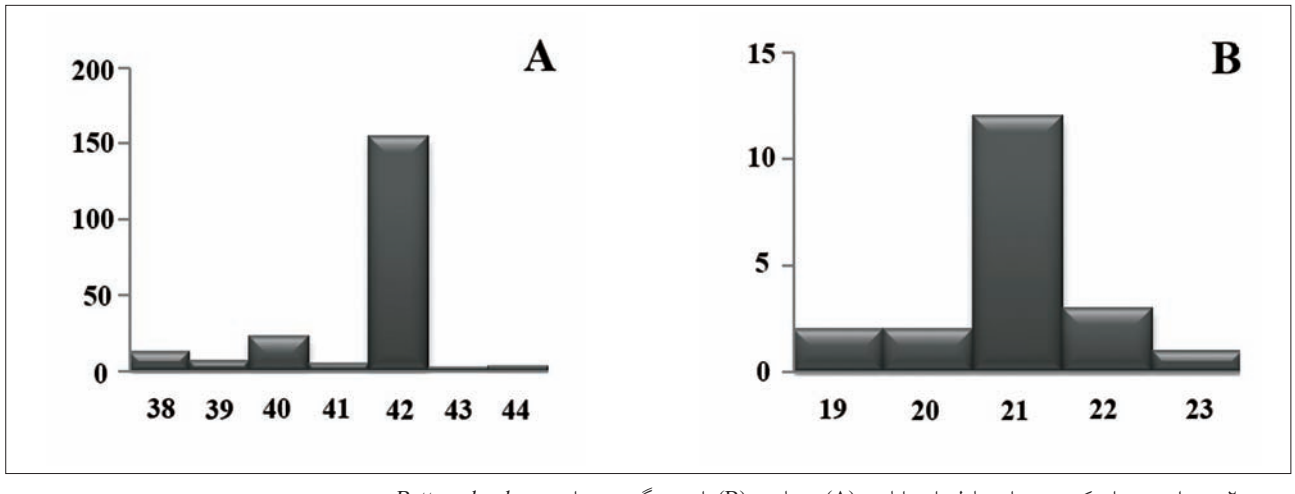
تمامی لام‌ها با فتومیکروسکوپ Novel با بزرگ نمایی (۱۰۰۰x) با نور طبیعی مورد بررسی و عکس‌برداری قرار گرفتند. همچنین جهت تهیه کاریوتیپ از نرم‌افزار Photoshop 8.0 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 استفاده شد.

نتایج

بافت‌ها و روش‌های مختلف تهیه گسترش‌های کروموزومی نتایج متفاوتی را به دنبال داشتند. در میان بافت‌های خونساز، آبشش و بیضه، مشاهده گردید که از بافت خونساز گسترش‌های کروموزومی بهتری حاصل شد. بافت آبششی از نظر کیفیت در درجه دوم قرار داشت. بافت بیضه نیز به علت حضور اسپرم‌ها جهت تهیه گسترش مناسب نبود. در مقایسه دو روش چکاندن و له کردن نیز روش چکاندن نتایج مناسب تری بدست داد. علاوه بر این، جهت رنگ‌آمیزی با گیمسا، بهترین غلظت ۲۵٪ و بهترین زمان ۵۰ دقیقه بود. نمونه‌هایی که به مدت ۲۴ ساعت تا یک هفته در فیکساتیو ماندند، پلاک‌های متافازی بسیار مناسبی به دست دادند، به طوری که کروموزوم‌ها در آنها کاملاً مشخص و بازوها باز بودند. همچنین رنگ پذیری این نمونه‌ها بسیار مناسب بود (تصویر ۱).



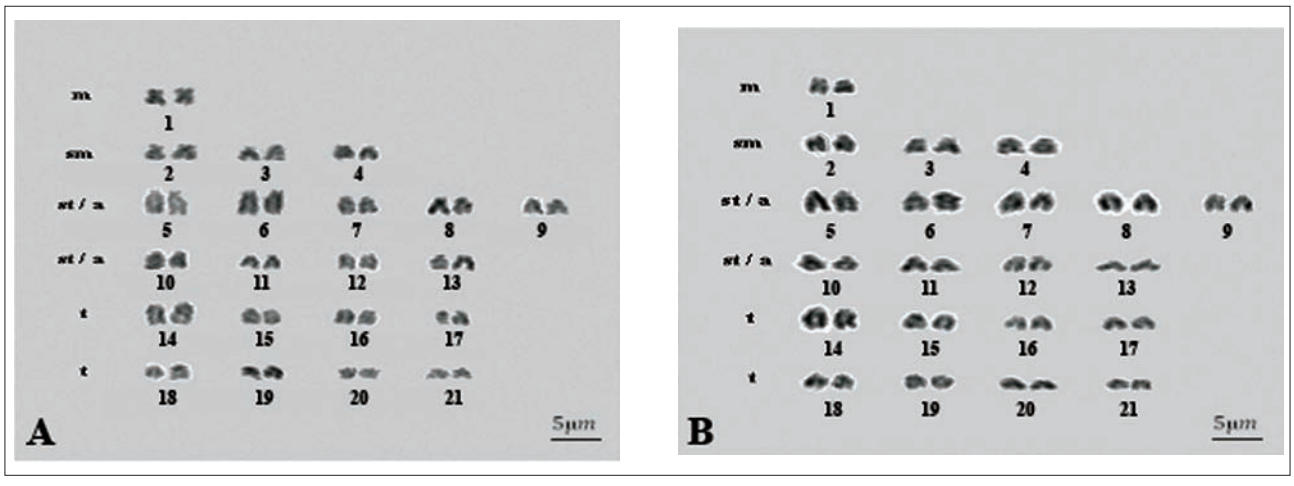
تصویر ۱. گسترش دیپلوئید بافت آبشش (A)، گسترش دیپلوئید بافت خونساز (B) گسترش هاپلوئید بافت بیضه (C)، و گسترش دیپلوئید بافت خونساز در فیکساتیو به مدت یک هفته (D) بدست آمده از ماهی جنگجوی سیامی، *Betta splendens* (بزرگنمایی ۱۰۰۰x).



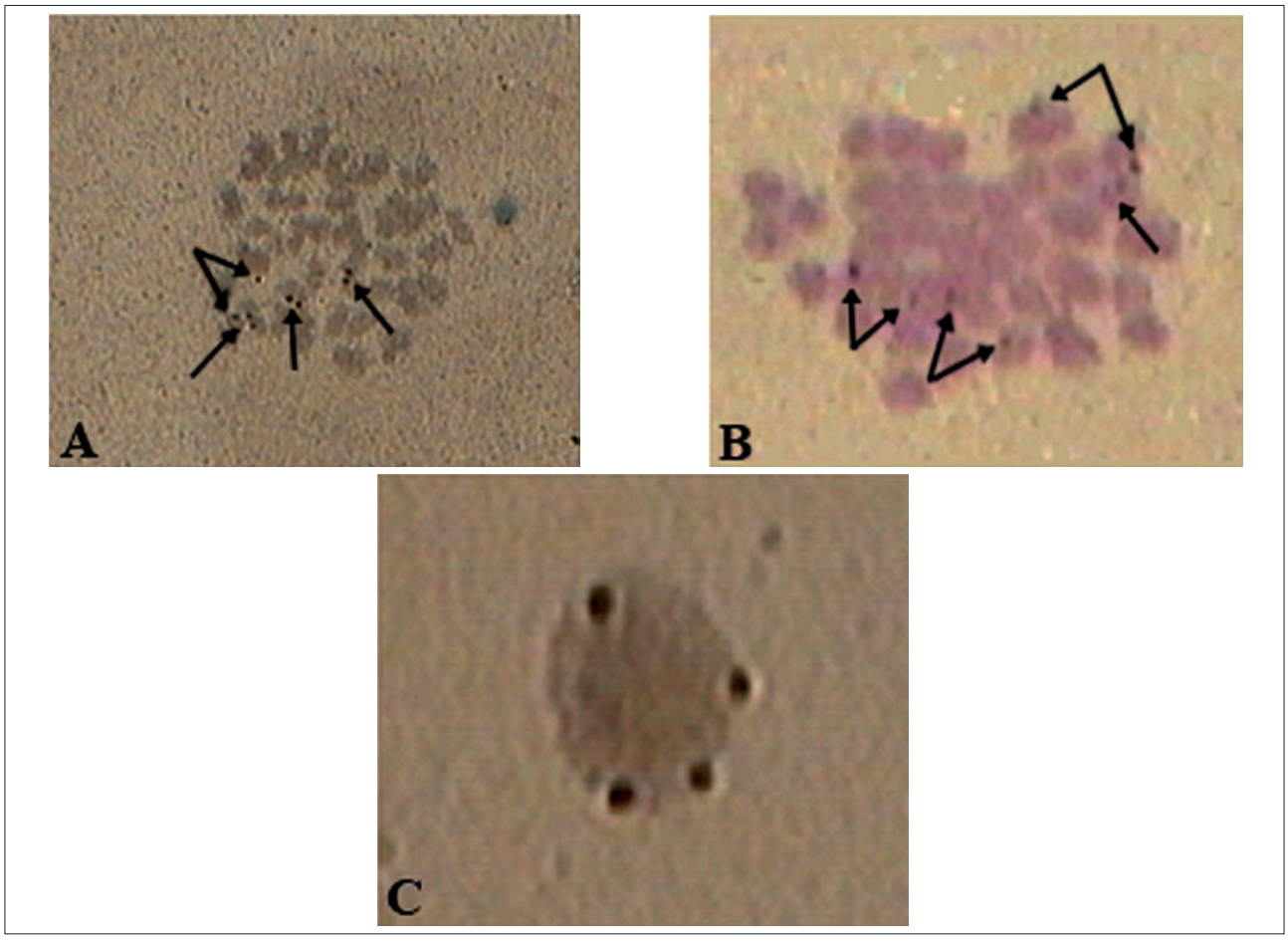
تصویر ۲. نمودار عدد نمایی کروموزوم‌های سلول‌های هاپلوئید (A) و دیپلوئید (B) ماهی جنگجوی سیامی، *Betta splendens*.

در این بررسی بالغ بر ۱۰۰ لام تهیه شد که در آنها ۲۵۴ پلاک متافازی قابل شمارش مشاهده گردید. در ۲۳۴ سلول دیپلوئید تعداد کروموزوم‌ها در دامنه‌ی ۴۴-۳۸=2n قرار داشتند که عدد نمایی آن ۴۲=2n بود و از تعداد ۲۰ سلول هاپلوئید شمارش شده، عدد نمایی کروموزوم‌های آنها ۲۱=n بود (تصویر ۲).

در این مطالعه کاریوتیپ و فرمول کروموزومی بر اساس گروه بندی Levan و همکاران در سال ۱۹۶۴ (۸) برابر با ۱ جفت کروموزوم متاسنتریک، ۳ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک، ۹ جفت کروموزوم ساب تلوسنتریک



تصویر ۳. کاریوتیپ جنس ماده (A) و کاریوتیپ جنس نر (B) ماهی جنگجوی سیامی، *Betta splendens* به اختلاف شکل کروموزوم‌های جفت ۱۷ در دو جنس توجه نمایید.



تصویر ۴. چهار جفت نوار NOR (پیکان‌ها) بدست آمده به روش‌های (A) Howell & Black (1980) و (B) Hayes & Dutrillaux (2000)، مرتبط با حداکثر چهار هستک مشاهده شده در سلول‌های دیپلوئید (C) ماهی جنگجوی سیامی، *Betta splendens* می‌باشند (بزرگنمایی عکس‌های A و B، ۱۰۰۰x و عکس C، ۴۰۰x).

(آکروسنتریک) و ۸ جفت کروموزوم تلوسنتریک تعیین گردید. بر این اساس، یک جفت کروموزوم متاسنتریک برای اولین بار در این گونه ماهی گزارش می‌گردد. این فرمول در هر دو جنس مشابه است اما کروموزوم جفت ۱۷ در جنس ماده هترومورفیک بوده و احتمال آن وجود دارد که این کروموزوم‌های هترومورفیک کروموزوم‌های جنسی باشند. همچنین در این مطالعه بر اساس Cruz و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۲)، کروموزوم‌های متاسنتریک، ساب متاسنتریک، و ساب تلوسنتریک (آکروسنتریک) دو بازویی و کروموزوم‌های تلوسنتریک، تک بازویی در نظر گرفته شد، که بر

این اساس عدد بازویی برای این ماهی برابر با FN=۶۸ محاسبه گردید.

تعداد نوارهای NOR در این مطالعه ۴ جفت یافت شد. اگرچه در هر دو روش این تعداد مشاهده گردید اما روش Howell & Black در سال ۱۹۸۰ در دمای $70^{o}C$ و مدت زمان ۸ دقیقه نتایج بهتری را در برداشت. به نظر می‌رسد این دما و زمان، شرایط مناسبی را برای تأثیرپذیری کروموزوم‌ها از رنگ نیترات نقره فراهم کرده و نوارهای پررنگ، بزرگ و قابل تشخیص را ایجاد می‌کند. در روش Hayes & Dutrillaux در سال ۲۰۰۰ اگرچه تعداد نوارهای به دست آمده با روش قبل برابر است اما آنها بسیار ریز و کمرنگ بودند. این تعداد NOR با حداکثر تعداد هستک‌های مشاهده شده در یک سلول واحد تطبیق داشت (تصویر ۴).

بحث

Betta splendens تنها گونه از جنس *Betta* می‌باشد که تاکنون در دنیا از نظر ژنتیک سلولی مورد بررسی قرار گرفته است. این ماهی جز راسته Perciformes و خانواده Ospheronemidae می‌باشد که اکثر ماهیان مربوط به این راسته و خانواده، به ترتیب عدد دیپلوییید کروموزومی ۴۸-۴۴ و ۴۸-۴۲ را نشان می‌دهند. اولین بررسی کروموزومی در گونه *Betta splendens* توسط Hinegardner and Rosen در سال ۱۹۷۲ انجام گرفت که در آن تنها عدد کروموزومی این ماهی مشخص گردید که برابر ۲n=۴۲ بود (۶). پس از آن کاریوتیپ این گونه برای اولین بار توسط Ratanatham and Patinawin در سال ۱۹۷۹ مورد بررسی قرار گرفت که عدد کروموزومی برابر ۴۲ و فرمول کروموزومی آن شامل ۷ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک و ۱۴ جفت ساب تلوسنتریک/آکروسنتریک و عدد بازویی آن برابر ۵۶ بود (۹). پس از آن، علاوه بر تعیین کاریوتیپ، اولین نواربندی NOR بروی این ماهی انجام گرفت. عدد دیپلوییدی ۴۲ به دست آمد و فرمول کروموزومی آن برابر ۶ جفت ساب متاسنتریک، ۷ جفت ساب تلوسنتریک و ۸ جفت آکروسنتریک بود. در این مطالعه عدد کروموزومی برابر با ۵۴ بوده و نوارهای NOR فقط بر روی ۲ جفت کروموزوم مشاهده گردید (۳). وسعت و محل NOR می‌تواند حاکی از تکامل هر کروموزوم باشد. به طور عادی بیشتر ماهیان در مجموعه کروموزومی خود فقط یک جفت NOR کوچک دارند. وجود بیش از دو NOR در برخی از ماهیان ممکن است در اثر جابجایی کروموزومی (ترانس لوکاسیون) بین کروموزوم حاوی NOR و یک کروموزوم دیگر باشد (۱۳). همچنین، در تمام مطالعات ذکر شده به دلیل اینکه تنها یک جنس مورد بررسی کروموزومی قرار گرفته است کروموزوم‌های هتروموفیک جنسی گزارش نشده‌اند.

در مطالعه‌ی حاضر، بنابر انتظار عدد دیپلوییید کروموزومی این گونه ماهی برابر ۴۲ در سلول‌های سوماتیک و عدد هاپلوییید آن برابر ۲۱ در سلول‌های جنسی به دست آمد. در این تحقیق فرمول کروموزومی شامل: ۱ جفت کروموزوم متاسنتریک، ۳ جفت ساب متاسنتریک، ۹ جفت ساب تلوسنتریک/آکروسنتریک و ۸ جفت کروموزوم تلوسنتریک را تشخیص داده شد که وجود یک جفت کروموزوم متاسنتریک برای نخستین بار در این گونه گزارش می‌شود. عدد بازویی آن نیز براساس Cruz و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۲)، ۶۸ محاسبه گردید. تعداد نوارهای NOR به دست آمده برابر با ۴ جفت می‌باشد. با در نظر گرفتن این دو یافته و مقایسه‌ی آن با مطالعات پیشین، اختلاف مشاهده می‌شود که احتمال آن وجود دارد این حالت به دلیل وجود سیتوتیپ‌های مختلف در این گونه ماهی باشد. وقوع همزمان سیتوتیپ‌های مختلف در ماهیان خانواده کاراسیده (۱۱) و موژیلیده (۱۲) نیز گزارش شده است.

در مقایسه کاریوتیپ دو جنس نر و ماده ماهی جنگجوی سیامی، کروموزوم جفت ۱۷ در جنس ماده هتروموفیک بوده که این حالت در جنس نر مشاهده نشد. بنابراین یافته، احتمال آن وجود دارد که این گونه ماهی از نظر تعیین جنسیت در دستگاه WZ قرار داشته باشد که بر اساس آن، جنس ماده هتروگامتیک (WZ) و جنس نر هوموگامتیک (ZZ) می‌باشد (۱۴). تایید این فرضیه نیازمند مطالعات بیشتر است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از شورای پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت تصویب طرح پایان نامه دانشجویی نویسنده دوم تشکر به عمل می‌آورند.

References

1. Arai, R. (2011) Fish Karyotypes, A Checklist. Springer. Belin. Germany.
2. Cruz, V., Shimabukuro-Dias, C., Oliveira, C., Foresti, F. (2011) Karyotype description and evidence of multiple sex chromosome system X1X1X2X2/ X1X2Y in *Potamotrygon motoro* and *P. falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Brazil. Neotrop Ichthyol. 9: 201-208.
3. Furgala-Selezniow, G., Dorota, F.B., Malgorzata, J., Slawomir, K., Andrzej, M. (2008) Note on the karyotype and NOR location of Siamese fighting fish *Betta splendens* (Perciformes, Osphronemidae). Caryologia. 61: 349-353.
4. Gold, J.R, Li, Y.C., Shipley, N.S., Power, P.K. (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. J Fish Biol. 37: 563-575.

5. Hayes, H., Dutrillaux, B. (2000) Staining of nucleolar organizer regions NOR. In: Techniques in Animal Cytogenetics. Popescue, P., Hayes, H., Dutrillaux, B. (eds.). Springer, Berlin-Germany. p. 65-68.
6. Hinegardner, R., Rosen, D.E. (1972) Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. Am Nat. 106: 621-644.
7. Howell, W.M., Black, D.A. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. Experientia. 36: 1014-1015.
8. Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas. 52: 201-220.
9. Ratanatham, S., Patinawin, S. (1979) Cytogenetic studies of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan). J Sci Soc Thailand. 5: 17-26.
10. Rivlin, K., Rachlin, J.W., Dale, G. (1985) A simple method for the preparation of fish chromosomes applicable to field work, teaching and banding. J Fish Biol. 26: 267-272.
11. Rossotti dos Santos, A., Rubert, M., Giuliano-Caetano., Dias, A.L. (2012) Sympatric occurrence of four cytotypes and one extra chromosome in *Bryconamericus ecai* (Characidae): 18S rDNA polymorphism and heterochromatin composition. Hereditas. 149: 24-33.
12. Sola, L., Gurnang, E., Mannarelli, M.E., Rossi, A.R. (2007) Chromosomal evolution in Mugilidae, Mugilomorpha: an overview. In: Fish Cytogenetics. Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G. (eds.). Science Publishers, Enfield, USA. p.165-194.
13. Supiwong, W., Tanomtong, A., Kenthao, A., Seetapan, K., Kaewsri, S., Sanoamuang, L. (2010) Standardized karyotype of the three-spot gourami, *Trichogaster trichopterus* (Perciformes, Belontidae) from Thailand by conventional and Ag-NOR staining technique. Nucleus. 53: 103-107.
14. Tave, D. (1993) Genetics for Fish Hatchery Managers. AVI Books. New York, USA.

Karyotyping and chromosomal Ag-NOR banding of Siamese fighting fish (*Betta splendens*)

Amini, F.[1*], Sokoot, A.S.[2]

[1]*Department of Animal and Poultry Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 2 February 2013 , Accepted 14 May 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Siamese fighting fish (Betta splendens, Regan, 1909) is a freshwater fish native to southeast Asia that has attracted considerable attention in Iran as an ornamental fish. **OBJECTIVES:** The purpose of this research was karyotyping of this fish by in vivo method as well as its Ag-NOR chromosomal banding. **METHODS:** Chromosomal spreads were obtained from hematopoietic (head kidney and spleen), gill and testicular tissues by splash and squash (stamping) methods on cold slides, which were then stained by 25% Giemsa. In addition, sequential staining nucleolus organizer regions (NORs) were performed by Ag-NO3 staining. **RESULTS:** Chromosome number in diploid and haploid cells in this species were counted 2n=42 and n=21, respectively. Fundamental number was NF=68.4 pairs of NORs which were found in methaphase plates. Chromosomal formula consisted of 1 pair of metacentric, 3 pairs of submetacentric, 9 pairs of subtelocentric (acrocentric) and 8 pairs of telocentric chromosomes. The chromosomal formula was similar in both sexes, however, comparing male and female karyotypes, the chromosome pair number 17 was heteromorphic. **CONCLUSIONS:** In this study, the number of chromosomes (2n) was similar but chromosomal formula and arm number (FN) were different from those in the previous studies. Metacentric chromosomes (pair 1) and presence of a pair of heteromorphic chromosomes in the two sexes (pair 17) are reported in this species for the first time. In the case that chromosomes pair 17 are sex chromosomes, a WZ sex determination system can be suggested for this species where females are heterogametic (WZ) and males are homogametic (ZZ) sexes.

Key words: Siamese fighting fish, *Betta splendens*, chromosome, karyotype, NOR-banding

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Diploid spread from gill tissue (A), Diploid spread from hemapoietic tissue (B), Haploid spread from testis tissue and diploid spread from hemapoietic tissue after fixation for a week (D) obtained from Siamese fighting fish, *Betta splendens* (1000X).

Figure 2. Graph showing modal chromosomal numbers of Haploid (A) and diploid (B) cells of Siamese fighting fish, *Betta splendens*.

Figure 3. Female (A) and male (B) karyotypes of Siamese fighting fish, *Betta splendens*. Note the difference between chromosomes pair 17 of the two sexes.

Figure 4. Four pairs of NOR bands (arrows) obtained by (A) Howell & Black (1980) and (B) Hayes & Dutrillaux (2000) methods, which correspond to (C) the maximum number of four nucleoli observed in diploid cells of Siamese fighting fish, *Betta splendens*. (Magnitudes: A and B, 1000X, and C, 400X).

***Corresponding author's email: famini@ut.ac.ir, Tel: 021-61117160, Fax: 021-66933222**