Original Article

Genetic Relationship and the Possibility of Inter Species Breeding Between Domestic Sheep (Ovis Aries) and Wild Sheep (Ovis Orientalis Isphahanica)

M. Fazilati, Ph.D.[1]*, S.M. Hosseini, D.V.M.[2], F. Moulavi, B.Sc.[2], M. Hajian, M.Sc.[2]
M. Forouzanfar, Ph.D.[3], P. Abedi, B.Sc.[2], N. Nasiri, B.Sc.[4]
I. Salahshourifar, M.Sc.[2], M. H. Nasr-Esfahani, Ph.D.[2]*

1. Food Science Department, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology
2. Embryology Department, Royan Institute
3. Islamic Azad University, science and Research Campus
4. Group for Food and Drug Engineering Services, Institute of Tallaie Narges

*Corresponding Address: P.O.Box: 8415683111, Food Science Department, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
Email: mfazilati@yahoo.com

*Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Embryology Departemtn, Royan Institute, Tehran, Iran
Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

Abstract

Received: 24/Jan/2007, Accepted: 2/Jun/2007

Objective: Cloning an individual by transferring somatic nuclei into enucleated recipient oocytes has already been well established. This technology also offers new opportunities to restore threatened species with interspecies somatic cell nuclear transfer (SCNT). However, few mammalian species have been studied for their reproductive biology whereas huge differences have been observed between these species. This study evaluated the similarities and genetical relationship of germ lines and the reproductive biology between domestic (Ovis aries) and threatened wild sheep (Ovis orientalis isphahanica).

Materials and Methods: Six populations of wild and domestic sheep were sampled and analyzed for chromosome number, interbreeding capability and fecundity. Resulted hybrids (male or female) were investigated for survival, karyotyping and fertility.

Results: Both the domestic and wild sheep uniformly exhibited a 2n of 54 and were able to crossbreed and induce sustainable pregnancy into the counterpart species. The resultant hybrids (male or female) which were produced by either wild ram × domestic ewe or domestic ram × wild ewe had identical chromosome number (2n=54). Normal genital apparatuses and fertile conditions were observed in both types of adult hybrids.

Conclusion: The results indicated a very close generational relationship between the wild and domestic sheep species and also the possibility of domestic species to be used as an abundant genetic background for saving endangered wild sheep via SCNT.

Keywords: Nuclear Transfer, Interspecies Cloning, Hybrid, Wild Sheep, Karyotype

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 2, Summer 2007, Pages:119-128

بررسی قرابت ژنتیکی و امکان تولید مثلی بین گونه‌ای گوسفند اهلی (Ovis aries) و قوچ وحشی قمیشلو (Ovis orientalis Isphahanica)

محمد فضیلتی Ph.D.[۱*]، سیدمرتضی حسینی D.V.M.[۲]، فریبا مولوی B.Sc.[۲]، مهدی حاجیان M.Sc.[۲]، محسن فروزانفر Ph.D.[۳]، پروانه عابدی B.Sc.[۲]، نادر نصیری B.Sc.[۴]، ایمان سلحشوری فر M.Sc.[۲]، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.[۲*]

۱. دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، گروه صنایع غذایی
۲. پژوهشکده رویان، گروه جنین شناسی
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، گروه علوم پایه
۴. موسسه نرگس طلایی اصفهان، واحد خدمات مهندسی صنایع غذایی و دارویی

* آدرس مکاتبه: اصفهان، صندوق پستی: ۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، گروه صنایع غذایی
پست الکترونیک: Email: mfazilati@yahoo.com

* آدرس مکاتبه: اصفهان، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی
پست الکترونیک: Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۱۱/۴، پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۱۳

* **هدف:** بررسی شباهت‌ها و ارتباط ژنتیکی ژرم لاین و نیز بیولوژی تولیدمثلی گوسفند اهلی (Ovis aries) با گونه وحشی قمیشلو (Ovis orientalis Isphahanica) جهت انجام مطالعات پیشرفته‌تر از قبیل شبیه سازی بین گونه‌ای

* **مواد و روش‌ها:** شش گوسفند وحشی و اهلی انتخاب و از نظر تهیه بیوپسی و بررسی کاریوتیپ، توانایی جفت‌گیری و باروری بین گونه‌ای مطالعه شدند.

* **یافته‌ها:** گوسفندان وحشی و اهلی، جمعیت کروموزومی یکسان (۲n=۵۴) داشتند و قادر به جفت‌گیری و ایجاد آبستنی موفق در گونه متقابل بودند. هیبریدهای حاصله (نر وماده) از آمیزش قوچ وحشی، میش اهلی و نیز قوچ اهلی، میش وحشی جمعیت کروموزومی برابر با یکدیگر و والدین خود داشتند. ساختارهای تولیدمثلی و نیز باروری طبیعی در افراد بالغ هر دو نوع هیبرید ثبت شد.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصله بیانگر ارتباط دودمانی تنگاتنگ بین گونه‌های اهلی و وحشی مورد مطالعه است و امکان استفاده از پتانسیل تولیدمثلی گونه‌های اهلی در جهت حفظ خصوصیات ژنتیکی گوسفند وحشی قمیشلو از طریق شبیه‌سازی را قابل طرح می‌داند.

کلیدواژگان: انتقال هسته، شبیه‌سازی بین گونه‌ای، هیبرید، گوسفند وحشی قمیشلو، کاریوتیپ

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۲، تابستان ۸۶، صفحات: ۱۲۸-۱۱۹

مقدمه

جنس (genus) گوسفند (Ovis) که همه انواع گوسفند را در بر می‌گیرد از لحاظ تکاملی و سیستماتیک یکی از پیچیده‌ترین جنس‌های پستانداران را شامل می‌شود (۱). گوسفند وحشی در حال حاضر از اروپا تا نواحی استوایی و نیمه‌استوایی آسیای شرقی، ترکمنستان، هندوستان، آسیای مرکزی و سیبری به چشم می‌خورد. در آمریکای شمالی، گوسفند وحشی از آلاسکا تا مکزیکوی شمالی دیده می‌شود (۱، ۲). شاید بتوان گفت کشور ایران پیچیده‌ترین ناحیه تکامل گوسفند وحشی باشد (۱، ۳، ۴). گوسفند وحشی در سر تا سر ایران به جز نواحی جنگلی، علفزارها و بوته‌زارهای بلند وجود دارد. این حیوان معمولا چراگاه‌های باز و کوهستانی را ترجیح می‌دهد (۵، ۶).

محققان اولیه سه گونه گوسفند وحشی را در ایران شناسایی کرده‌اند (۶). محققان بعدی نیز به طور دقیقی نحوه گسترش سیستماتیک گوسفند وحشی را در بخش‌های شمالی ایران مشخص کرده‌اند (۱،۵، ۷). آنها وجود دو جمعیت گوسفند وحشی که از لحاظ سیتولوژیکی کاملا متفاوت و دارای جمعیت کروموزمی دیپلویید (۲n= ۵۸) در شمال ایران و (۲n= ۵۴) در شمال شرقی ایران هستند را نشان دادند. در رشته کوه‌های البرز در شمال ایران نیز یک ناحیه حاوی حیوانات دو رگه (hybrid) با تعداد کروموزم‌های نامتجانس (۵۵، ۵۶، ۵۷، ۵۸ و ۲n=۵۴) شناسایی شده است. در هیچ ناحیه شناخته شده دیگری این تنوع‌های فنوتیپی و کروموزمی وجود ندارد (۵، ۶).

بررسی‌های به عمل آمده در زمینه پراکندگی قوچ و میش وحشی در استان اصفهان بیانگر آن است که در ارتفاعات جنوب غربی و جنوب شرقی استان و بعضی ارتفاعات استان‌های مجاور، گونه‌ای از گوسفندان وحشی خاورمیانه، جنوب غربی آسیا و شبه جزیره آناتولی دیده می‌شود که نخستین بار در ۱۹۱۰ توسط ناسونو در جلد چهارم بولتن آکادمی علوم سنت پترزبورگ (لنینگراد فعلی)، با نام علمی Ovis orientalis Isphahanica معرفی شد. هرچند اطلاعات در زمینه قوچ و میش اصفهان بسیار محدود است، ولی هنوز قوچ و میش وحشی اصفهان به طور نامطمئن، به عنوان یک گونه تقریبا خالص با نام علمی یاد شده شناخته می‌شود (۸، ۹). مطالعات اصلی در این زمینه

توسط دکتر رائول والدز زیست‌شناس آمریکایی و استادیار دانشگاه ایالتی نیومکزیکو انجام گرفته است (۱).

پناهگاه حیوانات وحشی قمیشلو منطقه‌ای معتدل و مایل به گرم در ۴۵ کیلومتری شمال غربی اصفهان و بسیار نزدیک به نجف‌آباد است. وسعت این منطقه ۴۹۳۵۰ هکتار و همان منطقه‌ای است که ناسونو به آن اشاره داشته است. این پناهگاه یک منطقه نیمه صحرایی است که تعدادی از ارتفاعات منطقه و دشت‌های کوچک را در خود جای داده و اکثر پوشش گیاهی آن در ارتفاعات درمنه (Artemisia sp) و در دشت‌ها گون‌های صحرایی (Astragalus sp) است (۸، ۹).

از نظر محققان، گونه در معرض خطر، جمعیتی از یک موجود است که به دلیل تعداد اندک باقی‌مانده و نیز به خاطر مخاطرات موجود در زمینه تغییرات جوی و یا شکار بی‌رویه، در معرض نابودی است و یا اینکه میزان تولیدمثل آنها در مجموع کمتر از میزان مرگ و میر آنها است (۱۰، ۱۱).

قوچ و میش وحشی قمیشلو نیز مستثنا از این قاعده نیست به طوری که علی‌رغم تلاش مداوم محیط‌بانان و شکاربانان محیط زیست استان اصفهان، تعداد کلی آنها به سرعت در حال کاهش است. افزون بر این تغیرات مداوم جوی و کاهش متناوب میزان بارندگی باعث از بین رفتن پوشش‌های گیاهی منطقه و خود به نوعی دیگر سبب کاهش تعداد کلی آنها گردیده است . این روند به گونه است که سبب نگرانی مسئولین ذیربط شده و قوچ و میش قمیشلو اکنون در زمره گونه‌های در معرض تهدید (Threatened) قلمداد می‌شود (۱۰).

در واکنش به روند پرشتاب حذف ذخایر ژنتیکی حیات وحش، محققان در جستجوی روش‌های گوناگون مقابله با انقراض حیوانات مختلف و نیز حفظ تنوع ژنتیکی و زیستی بر آمده‌اند (۱۱، ۱۲). فناوری‌های کمک باروری (Assisted Reproductive Techniques: ART) از جمله انجماد اسپرم و تخمک (Sperm-Oocyte Cryoprotection)، تلقیح مصنوعی (Artificial Insemination: AI)، انتقال جنین (Embryo Transfer: ET) و لقاح آزمایشگاهی (*In Vitro* Fertilization: IVF) امکان تکثیر جمعیت‌های اندک و پراکنده گونه‌های در معرض خطر را فراهم می‌کند (۱۱،۱۳، ۱۴).

از سوی دیگر با تولد اولین پستاندار شبیه‌سازی شده – گوسفند دالی (Dolly) توسط سلول‌های کاملا تمایز یافته پستانی (۱۵) و متعاقب آن تولد سایر انواع پستانداران شبیه سازی شده (۱۸–۱۶)، تئوری‌های نوین در جهت استفاده از تکنولوژی انتقال هسته برای ابقای گونه‌های در معرض خطر نابودی قوت گرفته است (۱۹، ۲۰). مهمترین مشکل موجود در این زمینه نبود مقادیر کافی از اووسیت‌های گونه در معرض خطر است. از سوی دیگر استفاده از تکنیک‌های سوپر اوولاسیون (Super Ovulation) در معدود حیوانات ماده باقی مانده جهت تکثیر متریال ژنتیکی و تهیه تخمک بالغ شده طبیعی (*In-Vivo* Matured) گونه مدنظر، خود می‌تواند منجر به حذف آنها شود.

در همین راستا استفاده از پتانسیل ژنتیکی گونه‌های نزدیک به گونه در حال انقراض یکی از رهیافت‌های نوین غلبه بر کمبود مواد ژرم پلاسم ماده در جهت تحقق شبیه‌سازی گونه‌های نادر محسوب می‌شود (۲۳–۲۱). بدین ترتیب که با شناسایی گونه‌های نزدیک (از لحاظ مورفولوژی، تولید مثلی، ژنتیکی و هورمونی) از پتانسیل تخمدانی این گونه‌ها در جهت شبیه‌سازی گونه در معرض خطر استفاده می‌شود.

علیرغم تمام پیشرفت‌های صورت پذیرفته و نیز با وجود اینکه تکنیک‌هایART و شبیه‌سازی در حیوانات اهلی به صورت تقریبا روتین انجام می‌پذیرد ولی انجام آنها در حیوانات وحشی به دلیل محدودیت‌های موجود در زمینه شناخت دقیق سیستم تولید مثلی آنها چه از لحاظ فرم (آناتومی، مورفولوژی) و چه از لحاظ تخمک‌گذاری (مکانیسم تنظیم کننده تولید مثل موفق) به طور معمول عملی نیست (۲۴). لذا انجام مطالعات راهبردی اولیه در جهت بررسی و شناخت گونه‌های نزدیک از لحاظ تولیدمثلی به گونه‌های در معرض خطر می‌تواند در جهت فراهم‌سازی متریال تخمک سهل‌الوصول و مناسب برای انجام شبیه‌سازی بین گونه‌ای (Interspecies Cloning) با استفاده از سلول‌های سوماتیک گونه در معرض خطر نقش مهمی داشته باشد (۲۱).

با توجه به اهمیت قوچ وحشی قمیشلو به عنوان یک گونه با ارزش ملی در معرض تهدید، مطالعه پیش رو به عنوان یک بررسی مقدماتی در جهت شناسایی قرابت ژنتیکی و تولید مثلی قوچ وحشی قمیشلو با گوسفندان اهلی و نیز ارزیابی امکان استفاده عملی از پتانسیل ژنتیکی گوسفندان اهلی در جهت انجام پروژه‌های شبیه‌سازی قوچ وحشی قمیشلو انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده مطالعه حاضر به جز موارد مشخص شده از شرکت (Sigma St. Louis, Mo, USA) و محیط کشت از شرکت (Gibco Life Technologies, Rockville, MD, USA) خریداری شده است.

تهیه نمونه و کشت اولیه سلول‌ها

با هماهنگی اداره محیط زیست استان اصفهان ۳ نمونه قوچ و ۳ نمونه میش وحشی قمیشلو آماده و بیوپسی گوش آنها مطابق دستورالعمل Bunch و Foot (۶) تهیه شد. برای انجام بیوپسی، حیوانات مورد نظر ابتدا تحت تزریق داروی آرام‌بخش قرار گرفتند [Xylazine 2%: 0.15 ml/kg BW(IM)] و سپس ناحیه‌ای به مساحت ۳×۳ سانتی‌متر مربع از کنار گوش حیوان با استفاده از الکل ضدعفونی و موهای زاید آن چیده شد. سپس با استفاده از الکل ضدعفونی مجدد و با نرمال سالین ۰/۹درصد حاوی آنتی‌بیوتیک (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Streptomycin + ۲۰۰واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین) شستشو داده شد. آنگاه با استفاده از پانچ گوش مخصوص تست بروسلوز (انبرک با لبه برنده لوزی شکل) یک قطعه کوچک

۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر مربع از گوش حیوان بریده شد و درون محلول PBS^{-} (free Ca^{2+}&Mg^{2+}) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های یاد شده قرار گرفت. بر اساس روش کیرا و همکاران (۲۵) در آزمایشگاه بعد از چندین مرحله شستشو، نمونه‌ها درون PBS^{-} حاوی آنتی‌بیوتیک قرار داده شد و پس از جداسازی بخش‌های اپی‌درم و درم، بافت پیوندی باقی‌مانده با استفاده از اسکالپل در ابعاد ۱×۱ میلی‌متر مربع برش خورده، درون فلاسک کشت (۲۵ سانتی‌متر مربع :TPP) حاوی ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت (DMEM F-12+10% FCS) قرار داده شده و درون انکوباتور با شرایط ۳۸/۶ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ماکزیمم با ذکر شماره و جنس حیوان قرار داده شد. محیط کشت مورد نظر هر دو روز یک بار تعویض می‌شد و فلاسک‌ها از لحاظ میزان تکثیر سلول‌های فیبروبلاست مورد بررسی قرار می‌گرفت. قطعات بافتی پس از ۶ روز کشت از فلاسک خارج شد. تعویض محیط کشت تا زمانی که تراکم سلولی فلاسک‌های انکوبه شده به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید ادامه یافت. جهت جمع‌آوری نمونه بیوپسی از نمونه‌های گوسفندان اهلی، ابتدا ۳ گوسفند نر و ۳ گوسفند ماده افشاری به طور اتفاقی از دو دامپروری خریداری و سپس تمام مراحل کاملا مشابه با روش یاد شده انجام پذیرفت جز اینکه انجام مراحل آرام‌بخشی به دلیل خلق و خوی آرام گوسفندان اهلی انجام نپذیرفت.

پاساژ سلولی

بعد از اینکه تراکم سلولی فلاسک‌ها به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، محیط روی سلول‌ها به طور کامل تخلیه و با استفاده از PBS^{-} شستشو داده شدند. پس از تخلیه محیط رویی، مقدار ۲ میلی‌لیتر Trypsin-EDTA به فلاسک افزوده و به مدت ۳ دقیقه انکوبه می‌شد وسپس با افزودن محیط کشت (DMEM F-12+10%FCS) به فلاسک‌ها و انجام عمل پیپتینگ (pipetting) لایه سلولی جدا و به صورت سوسپانسیون سلولی آماده می‌شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد (g=۷۰۰)، و پس از حذف محیط رویی رسوب سلولی، مجددا در داخل محیط کشت به حالت سوسپانسیون در آمد. نمونه حاصله با استفاده از شمارش سلولی دانسیتومتری با لام نئوبار اندازه‌گیری و سپس در فلاسک‌های کشت جدید در غلظت سلولی ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار سلول در هر فلاسک برای پاساژ شماره ۱ کشت داده شدند. هر مورد انجام تریپسیناسیون و کشت مجدد سلولی یک پاساژ (passage) محسوب می‌شوند.

انجماد سلول‌های سوماتیک

پس از هر مورد پاساژ سلولی یک سوم سلول‌های تکثیر شده جهت ذخیره در تانک ازت استفاده می‌شد. برای انجماد سلول‌ها ابتدا طبق روش مذکور پاساژ سلولی، سوسپانسیون سلولی تهیه شده و پس از انجام سانتریفوژ و حذف محیط رویی ۱میلی‌لیتر محیط فریز (10% DMSO, 40% DMEM F-12, 50% FCS) به رسوب سلولی اضافه می‌شد و پس از انجام پیپتینگ، سوسپانسیون سلولی حاصل در کرایوتیوپ قرار گرفته و مشخصات کامل رده سلولی روی جداره کرایوتیوپ ثبت می‌شد. کرایوتیوپ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در تحت دمای ۷۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس جهت نگهداری طولانی مدت به تانک‌های حاوی ازت مایع منتقل می‌شدند.

خروج سلول‌ها پس از انجماد و انجام کشت سلولی

کرایوتیوپ مورد نظر از تانک ازت خارج و تا نیمه در بن ماری ۳۷درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه قرار داده می‌شد. سپس سوسپانسیون سلولی درون کرایوتیوپ به لوله سانتریفوژ حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت منتقل و در ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شد. پس از حذف محیط رویی و افزودن محیط کشت جدید و نیز انجام پیپتینگ رسوب سلولی، سلول‌های حاصله به درون یک فلاسک کشت حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط جدید منتقل می‌شد.

تهیه کاریوتیپ

تهیه کاریوتیپ، بر اساس روش انصاری و همکاران (۲۶) صورت گرفت. بر این اساس از هر نمونه فیبروبلاست یک فلاسک کشت (۷۵ سانتی‌متر مربع TPP) که حاوی تعداد اولیه ۴×۱۰^{۳}-۱×۱۰^{۴} سلول بود تهیه شد. سپس روز سوم تا پنجم بعد از کشت که سلول‌ها در فاز رشد بودند، مقدار (v/v) ۱/۱۰۰ از محلول کلسیمید (colcemid) با غلظت نهایی ۱×۱۰^{-۷} میلی‌متر به فلاسک کشت افزوده شد. ۶-۴ ساعت بعد از افزودن کلسیمید، محیط فلاسک به آرامی خارج و ۵ میلی‌لیتر از تریپسین ۰/۲۵درصد به آن افزوده و برای مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس با استفاده از سانتریفوژ (g=۷۰۰)، سلول‌های تحت درمان از محیط رویی حاوی تریپسین جداسازی و مجددا در ۵ میلی‌لیتر محیط هیپوتونیک برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۷درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند که بعد از افزودن حجم برابر از استیک متانول تازه سرد شده با یخ، سلول‌ها به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند (g=۷۰۰). پس از تخلیه محیط سوپرناتانت، سلول‌ها با استفاده از مقدار اندک استیک متانول تازه و سرد ورتکس و به مدت ۱۰ دقیقه دیگر روی یخ قرار داده شدند. بعد از انجام سانتریفوژ و جداسازی سوپرناتانت، سلول‌ها در ۰/۲ میلی‌لیتر استیک متانول تازه ورتکس شدند تا سوسپانسیون سلولی حاصل شود. یک قطره از این سوسپانسیون از فاصله ۳۰-۱۲ سانتی‌متر روی یک اسلاید سرد انداخته شد و با کج کردن اسلاید اجازه داده شد تا این قطره کاملا پخش شود و سپس به سرعت در بالای یک حمام آب جوشان خشک شد. این لام با رنگ Gimsa رنگ‌آمیزی و سپس در زیر میکروسکوپ بررسی می‌گردید و بهترین تصویر حاصله از نحوه گسترش کروموزوم‌ها تهیه شد.

انجام آمیزش بین گونه‌ای

آماده‌سازی قوچ و میش وحشی:

آمیزش بین گونه‌ای در بخش دامپروری موسسه نرگس طلایی انجام پذیرفت. با توجه به محدودیت بالای زمان جفت‌گیری طبیعی و آمادگی

بالای قوچ و میش وحشی در این زمان، انجام آمیزش بین گونه‌ای با توجه به بالاترین آمادگی جنسی گونه وحشی انجام پذیرفت. از سوی دیگر با توجه به اثرات نامطلوب مشاهده شده در مورد انجام هم‌زمان‌سازی با استفاده از تزریق هورمون‌های جنسی (Induced synchronization) در قوچ و میش وحشی و بر اساس تجربیات موفق موسسه نرگس طلایی، از روش‌های طبیعی استفاده از گیاهان کوهی محرک قوای جنسی قوچ و میش وحشی (Artemisia sp) و (Astragalus sp) استفاده شد. جهت تعدیل رفتاری گونه وحشی در مواجهه با گونه اهلی، حیوانات انتخاب شده (۶ میش و ۳ قوچ وحشی به جز حیوانات انتخاب شده جهت تهیه بیوپسی گوش) به مدت ۲ تا ۳ ماه قبل از موعد جفت‌گیری در مجاورت یکدیگر رها شدند.

آماده‌سازی قوچ و میش اهلی:

برای این کار ۶ میش و ۳ قوچ اهلی افشاری انتخاب شدند. با توجه به پروتکل‌های موجود (۶)، آماده‌سازی هورمونی میش اهلی ۱۵ روز قبل از زمان طبیعی جفت‌گیری گونه وحشی صورت پذیرفت. پس از مقیدسازی و ضدعفونی کردن محوطه اطراف کانال تولید مثلی، یک عدد اسفنج حاوی هورمون پروژسترون (۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر CIDR:Introvet®) با استفاده از اپلیکاتور مخصوص درون واژن حیوان قرار داده شد. ۱۰روز پس از گذاشتن CIDR، مقدار ۵۰۰ واحد بر میلی‌لیتر از داروی محرک رشد فولیکولی (Folligon®) در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به صورت عضلانی به حیوان تزریق و در روز ۱۲ مقدار ۱ میلی‌لیتر از داروی پروستا گلندین (PG:® Struplan) به صورت عضلانی تجویز و CIDR حاوی پروژسترون خارج شد. روز ۱۳ درمان (روز۱ فحلی) مقدار ۵ میلی‌لیتر از داروی HCG (Choloron®) تجویز شد. میش‌های اهلی و وحشی در محوطه‌های جداگانه نگهداری شدند.

انجام جفت‌گیری، القاء آبستنی و زایمان:

برای این منظور ۳ قوچ وحشی قمیشلو و۳ قوچ افشاری انتخاب و از ابتدای فصل جفت‌گیری (اواسط بهار) درون محوطه حصاربندی شده میش‌های اهلی و وحشی رها شدند و به صورت غیرمحسوس نحوه پذیرش و رفتار میش‌ها با قوچ‌ها تحت نظر گرفته شد. به محض مشاهده رفتار جفت‌گیری، شماره حیوان نر و ماده ثبت می‌شد. به دلیل حجم بالای توده دنبه میش‌های اهلی که مانع از جفت‌گیری قوچ‌های وحشی می‌شد، با استفاده از ست‌های مخصوص دنبه حیوان در حالت آویخته به سمت بالا نگه داشته می‌شد. همچنین جهت تعدیل رفتار تهاجمی قوچ‌های وحشی با میش‌های اهلی، قوچ‌های وحشی ابتدا در حضور ۱۰ میش ماده نگهداری و سپس در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. میش‌هایی که عمل جفت‌گیری را انجام داده بودند از روز ۱۵ تا ۲۵ بعد از جفت‌گیری از لحاظ جفت‌گیری مجدد تحت نظر قرار گرفتند و در صورت عدم جفت‌گیری مجدد در روز ۳۵ بعد از جفت‌گیری آبستن قلمداد می‌شدند.

میش‌ها با حاملگی بالا به طور مرتب مورد بررسی قرار می گرفتند و علایم حیوان از لحاظ انجام زایمان طبیعی بررسی می‌شد. در موارد شروع زایمان مراحل آن به طور کامل توسط دامپزشک متخصص کنترل می‌شد و تا زمانی که لزومی نداشت، مراحل کار به صورت طبیعی دنبال می‌شد. بره‌های متولد شده از لحاظ علایم طبیعی حیات، جنس، وزن، جثه و ظاهر مورفولوژی بررسی شده و نحوه پذیرش آنها توسط مادر و نحوه رشد و فعالیت بره‌ها تا ۱۵ ماهگی بررسی می‌شد.

مطالعه کاریوتیپ بره‌های متولد شده:

تست‌های کاریوتیپ مطابق روش‌های مذکور در مورد نمونه‌های بره‌ها نیز انجام پذیرفت.

آزمون باروری بره‌های متولد شده:

بررسی ظاهری ساختار بیضه‌ها و کانال تناسلی بره‌های نر و ماده انجام پذیرفت و ضمن نگهداری بره‌های حاصله به صورت طبیعی کنار مادران خود تمایل و توان تولید مثلی آنها در پایان سال اول بررسی شد.

یافته‌ها

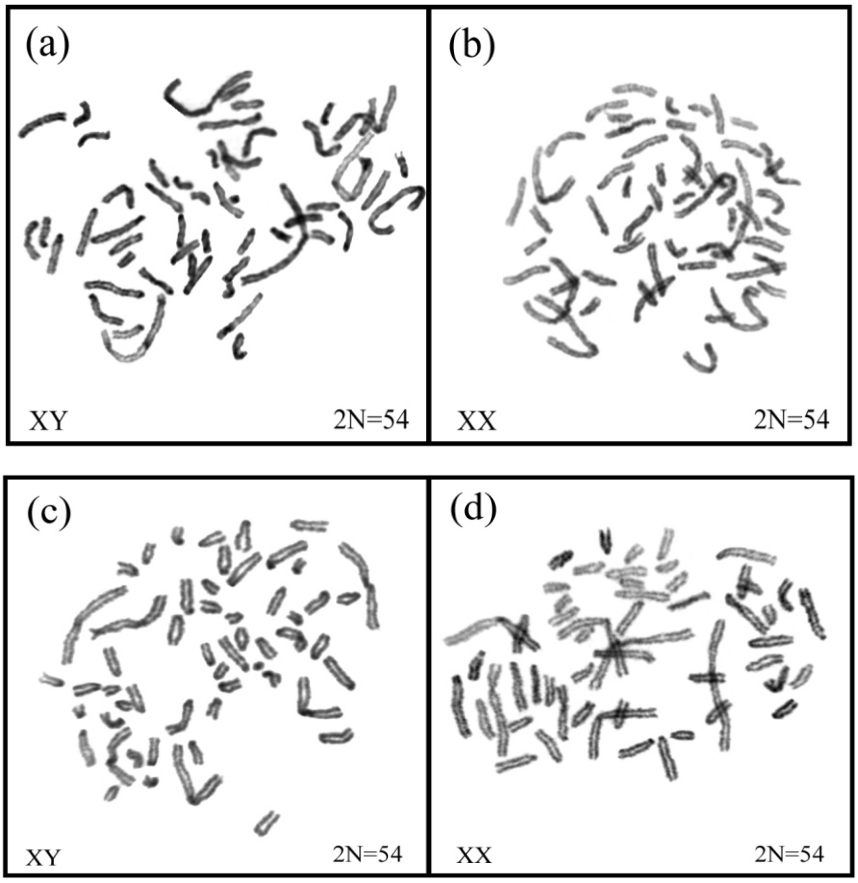
کشت سلول‌های فیبروبلاست و بررسی کاریوتیپ

تمام نمونه‌های فیبروبلاست حاصل ازبیوپسی دام‌های اهلی و وحشی به طور کامل تا پاساژ ۱۰-۷ قابلیت کشت داشتند. نمونه‌های هر پاساژ منجمد شده و توان بازگشت از انجماد و کشت مجدد آنها بررسی شد. قابلیت حیات (viability) سلول‌ها در پاساژهای مختلف گونه اهلی و وحشی به طور مشابه حدود ۹۰ تا ۹۵ درصد بود.

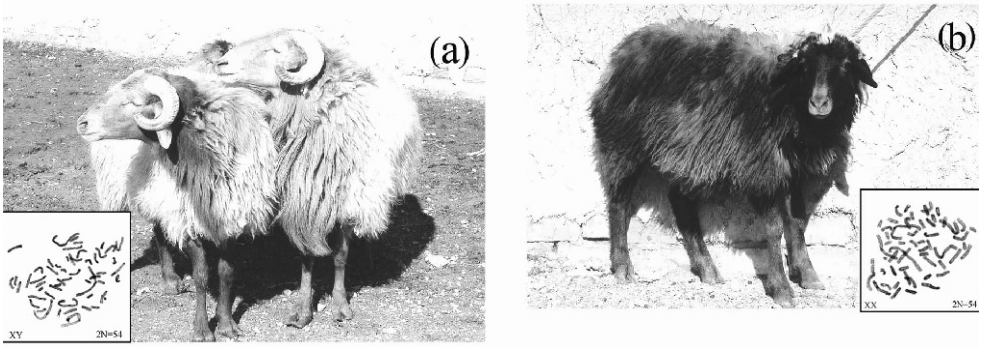
نتایج شمارش کروموزومی دیپلوئیدی (2n) در ۶ گوسفند نر و ماده قوچ و میش اهلی افشاری و ۶ قوچ و میش وحشی قمیشلو با استفاده از کشت سلول‌های فیبروبلاست گوش آنها به وضوح نشانگر آن بود که هر دو گونه گوسفند اهلی و وحشی در جنس نر و ماده آن دارای تعداد کروموزوم مساوی (۲n=۵۴) هستند. شکل ۱ نمای کاریوتیپی دیپلوئیدی (۲n=۵۴) جنس نر (a) و ماده (b) تهیه شده از کشت سلول‌های فیبروبلاست گوش گوسفندان نر وماده اهلی افشاری و شکل ۲ نتایج همین آزمون را در مورد گونه وحشی نشان می‌دهد.

شکل ۲ دو هیبرید نر ۱۶ ماهه حاصل از آمیزش بین گونه‌ای قوچ اهلی افشاری با میش وحشی قمیشلو(a) و یک هیبرید ماده حاصل از آمیزش بین گونه‌ای قوچ وحشی قمیشلو با میش اهلی افشاری (b) را به همراه نمای کاریوتیپی دیپلوئید (۲n=۵۴) هر دو نوع هیبرید که با استفاده از کشت سلول‌های فیبروبلاست گوش آنها به دست آمده نشان می‌دهد. لازم به ذکر است اگرچه دو نوع هیبرید حاصله در مجموع دارای شاخصه‌های مناسب رشد، تولید و نیز تولیدمثل بودند ولی از لحاظ رفتاری و نیز خلق و خوی وحشی با هم تفاوت داشتند. به گونه‌ای که هیبرید حاصل از آمیزش قوچ وحشی با میش اهلی در مجموع آرام‌تر از هیبرید حاصل از آمیزش قوچ اهلی با میش وحشی بود. جدول ۱ نتایج

شمارش کروموزومی دیپلوئیدی (۲n) در ۳ هیبرید نر و ماده حاصل از امتزاج قوچ اهلی با میش وحشی قمیشلو و ۴ هیبرید نر و ماده حاصل از آمیزش قوچ وحشی قمیشلو با میش اهلی که با استفاده از کشت سلول‌های فیبروبلاست گوش آنها انجام پذیرفت را به همراه درصد باروری حاصل از آمیزش ۶ میش اهلی و وحشی به ترتیب با ۲ قوچ وحشی و اهلی بیان می‌کند. از مجموع میش‌های اهلی و وحشی مورد مطالعه (۱۲میش)، ۵ مورد بازگشت مکرر به فحلی (سه مورد از میش‌های وحشی و دو مورد از میش‌های اهلی)، ۷ مورد آبستنی موفق (۴ مورد از میش اهلی و ۳ مورد از میش وحشی) که منجر به زایمان طبیعی گردید ثبت شد (شکل ۲).



شکل ۱: نمای کاریوتیپی دیپلوئیدی (۲n=۵۴) جنس نر (a) و ماده (b) گوسفندان اهلی افشاری (Ovis aries) و جنس نر (c) و ماده (d) گوسفندان وحشی که از کشت سلول‌های فیبروبلاست گوش تهیه شده است.



شکل ۲: دو هیبرید نر ۱۶ ماهه حاصل از آمیزش بین گونه‌ای قوچ اهلی افشاری با میش وحشی قمیشلو (a) و یک هیبرید ماده حاصل از آمیزش بین گونه‌ای قوچ وحشی قمیشلو با میش اهلی افشاری (b). نمای کاریوتیپی دیپلوئید (۲n=۵۴) هر دو نوع هیبرید که با استفاده از کشت سلول‌های فیبروبلاست گوش آنها به دست آمده نیز در کنار آنها به نمایش در آمده است.

جدول ۱: شمارش کروموزومی دیپلوئیدی (2n) در ۳ هیبرید نر و ماده حاصل از امتزاج قوچ اهلی با میش وحشی قمیشلو و ۴ هیبرید نر و ماده حاصل از آمیزش قوچ وحشی قمیشلو با میش اهلی که با استفاده از کشت سلول‌های فیبروبلاست گوش آنها انجام پذیرفت. درصد باروری براساس تعداد تولدهای زنده حاصل از آمیزش ۶ میش اهلی و وحشی به ترتیب با ۲ قوچ وحشی و اهلی بیان شده است.

نوع امتزاج	شماره هیبرید	جنس هیبرید	تعداد کروموزم	درصد باروری
قوچ وحشی × میش اهلی (۲) (۶)	۱	نر	۵۴	۶۶/۶ درصد
	۲	نر	۵۴	
	۳	نر	۵۴	
	۴	ماده	۵۴	
قوچ اهلی × میش وحشی (۲) (۶)	۱	نر	۵۴	۵۰ درصد
	۲	نر	۵۴	
	۳	ماده	۵۴	

علائم عمومی هیبریدها در بدو تولد رضایت بخش بود و به خوبی از مادران غیر هم‌گونه خود شیر می‌خوردند. همچنین علایم رشد آنها تا پایان دوره تحقیق طبیعی بود و ضمن بروز تمایل جفت‌گیری داخل و بین گونه‌ای ظواهر دستگاه تولیدمثلی آنها نیز طبیعی به نظر می‌رسید. شایان ذکر است ادامه روند نسل‌گیری از هیبریدهای حاصله در موسسه نرگس طلایی موید باروری کامل همه هیبریدها است.

بحث

انقراض یک گونه رخدادی طبیعی و غیرقابل برگشت در روند تکامل محسوب می‌شود. اما امروزه سرعت زیاد روند انقراض بسیار نگران کننده است. علل این مسئله فعالیت‌های انسان در زمینه تخریب چراگاه‌ها، شکار بی‌رویه و یا ایجاد رقابت با وارد کردن دام‌های اهلی به محل زندگی حیوانات وحشی گیاه‌خوار است.

در این راستا یکی از اهداف مهم حفاظت گونه‌های جانوری، نگهداری تنوع زیستی (biodiversity) است. چرا که حذف یک گونه خاص می‌تواند بر عملکرد کل اکوسیستم اثر بگذارد. یک گونه زمانی در معرض تهدید (Threatened) محسوب می‌شود که میزان زاد و ولد و تولید نتاج زنده و قادر به حیات آن در طی چند سال متوالی کمتر از تعداد مرگ و میر ناشی از عوامل طبیعی و یا عوامل بشری باشد (۱۰، ۱۱). بر این اساس استراتژی‌های گوناگون حفاظت چراگاه (Habitat Prservation)، محافظت و مراقبت از گونه در معرض خطر در زیستگاه (In situ conservation) ارائه گردیده است (۲۴).

با پیشرفت‌های حاصله در زمینه ART، امیدهای فراوانی در جهت تولید نتاج بیشتر از چند مولد برای تقویت گونه‌های در معرض خطر و نیز کاهش فاصله بین نسل‌ها به وجود آمده است (۲۷). از سوی دیگر گسترش تکنولوژی شبیه‌سازی، امکان استفاده از ذخایر ژنتیکی نگهداری شده در بانک‌های ذخیره ژنومی (Genome Resource Bank: GRB) در جهت بازگرداندن مجدد گونه‌های در حال انقراض را مطرح ساخته است. این فناوری امروزه در دنیا تحت عنوان Interspecies Cloning یا شبیه‌سازی بین گونه‌ای نامیده می‌شود (۲۱) به گونه‌ای که امروزه دانش ART و کلونینگ به طور وسیع در جهت حفظ گونه‌های نادر پستانداری با استفاده از پتانسیل تولیدمثلی گونه‌های نزدیک به آنها تلاش می‌کند (۲۸، ۲۹).

در همین راستا لیو و همکارانش (۳۱)، با استفاده از سلول‌های سوماتیک غیرزنده اخذ شده از دو گوسفند وحشی (Muflon) مرده و انجام انتقال هسته به درون تخمک‌های گوسفند اهلی توانستند این گونه در معرض خطر را مجددا حفظ کنند. جالب آنکه چن و همکارانش (۳۰) توانسته‌اند جنین ما قبل لانه‌گزینی (Blastocyst) پاندای بزرگ چین را با استفاده از تخمک‌های خرگوش در آزمایشگاه بازسازی کنند و این امید نیز وجود دارد که با انتقال آن به رحم یک گیرنده مناسب بتوان نسل در حال انقراض پاندا را نجات بخشید.

یکی از مشکلات اصلی در راستای استفاده از فناوری ART و به خصوص کلونینگ در این زمینه نبود دانش کافی از بیولوژی تولیدمثلی حیوانات وحشی و نیز پیدا کردن حیوانات اهلی و یا آزمایشگاهی است که از لحاظ ژنتیکی و تولیدمثلی به آنها نزدیکند. از میان بیش از ۴۰۰۰ گونه پستاندار موجود تنها کمتر از ۱۰۰ گونه به طور دقیقی از لحاظ جزییات بیولوژی تولیدمثلی بررسی شده‌اند که اکثر آنها نیز حیوانات مزرعه‌ای هستند (۲۴). متاسفانه دانش موجود در زمینه گونه‌های وحشی بسیار اندک است که همین دانش ناچیز نیز مبین تفاوت‌های چشمگیر موجود در زمینه فیزیولوژی، آناتومی و رفتاری آنها است. همچنین در حیوانات وحشی، رفتار اجتماعی و جنسی نقش مهمی در کاربرد تکنولوژی‌های تولیدمثلی ایفا می‌کند.

با توجه به اهمیت حیات وحش ایران و نیز مخاطرات جدی در زمینه تداوم بقای آنان، ایجاد بانک ژنوم سلولی این موجودات ضروری و اجتناب ناپذیر است. همچنین انجام بررسی جهت تعیین مشابهت‌های موجود بین قوچ وحشی قمیشلو وگوسفند اهلی می‌تواند راه‌گشای مطالعات بعدی باشد.

نتایج این مطالعه به روشنی بیانگر شباهت بسیار نزدیک ژنتیکی و تولیدمثلی دو گونه وحشی و اهلی گوسفند بررسی شده است. بدین ترتیب که نه تنها کاریوتیپ جنس نر و ماده هر دو گونه وحشی و اهلی به طور کاملا مشابه (2n=۵۴) است (شکل ۱) بلکه هیبریدهای نر و ماده حاصل از آمیزش بین گونه‌ای آنها نیز جمعیت کروموزومی برابر با یکدیگر و والدین وحشی و اهلی خود (2n=۵۴) را دارا هستند (جدول ۱ و شکل ۲) جالب توجه آنکه رشد طبیعی هیبریدهای حاصله (شکل ۲) به همراه قابلیت باروری طبیعی آنها در آمیزش با هر دو گونه وحشی و اهلی (ادامه این مطالعات در موسسه نرگس طلایی انجام پذیرفت) به روشنی بیانگر نزدیکی زیاد گونه وحشی و اهلی است. بر اساس مطالعات تبار شناسی و فیلوژنیک (Phylogenic) و نیز از آنجا که تعداد جمعیت کروموزومی هر دو گونه برابر است، احتمال اشتقاق این دو گونه در گذشته نه چندان دور بسیار منطقی به نظر می‌رسد. بر همین اساس والدز و همکارانش (۱) در بررسی مفصل خود بر روی نحوه

گسترش سیستماتیک گوسفندان با استفاده از آنالیزهای مورفولوژیک، کروموزومی و اطلاعات مربوط به ترانسفرین (Transferin) خون آنها اذعان داشتند که گوسفندان ایرانی در واقع یک نیمه گونه (semispecies) یا زیرگونه (subspecies) محسوب می‌شوند و به همین دلیل توان هیبریدیزاسیون آنها بالا است. این محققان معتقدند که جمعیت‌های گوسفندان وحشی اصفهان، لارستان، ارمنی و ارومیه‌ای جزء گوسفندان خالص (غیردورگه) اند. باتوجه به اینکه در سطح کشور گوسفندان دورگه (هیبرید) وحشی با تعداد کروموزم‌های کاملا غیرمتجانس (۵۸، ۵۷، ۵۶=2n) وجود دارد لذا به نظر می‌رسد درصورتی که بتوان نتایج آزمون کروموزومی این مطالعه را به تمام جمعیت قوچ‌های وحشی قمیشلو تعمیم داد (که به دلیل مطالعات قبلی و نیز انجام نمونه‌برداری تصادفی قطعی به نظر می‌رسد)، گونه وحشی قمیشلو از این آمیختگی‌های نژادی غیرطبیعی مصون مانده است و احتمال خلوص گونه‌ای آن منطقی به نظر می‌رسد. از دیگر سو نتایج آمیختگی گونه وحشی و اهلی حاصله در این مطالعه به صورت کاملا مشخص بیانگر آن است که اولا رفتارهای تولید مثل، ساختارهای تولیدمثل و خصوصیات تولیدمثل آنها در تشابه نزدیکی با یکدیگر بوده و ثانیا خصوصیات ژنتیکی دو گونه به نحوی است که امکان بهره‌گیری از پتانسیل تولیدمثلی هر دو گونه به طور متقابل وجود دارد. بدین ترتیب می‌توان گفت نه تنها اسپرم هر دو گونه توانایی لقاح، امتزاج و بیان ژنتیکی- فنوتیپی در اووسیت گونه مقابل را داراست بلکه، اووسیت هر دو گونه نیز به طور مشابه توان انجام تداخل اثر مناسب با ژنوم اسپرم گونه مقابل و تولید جنین قادر به حیات بارور را نیز دارند. اهمیت این مطالعه از آنجاست که در صورت جدی شدن تهدید نسل قوچ وحشی قمیشلو سه راهکار عملکردی در جهت ابقاء و یا حفظ اطلاعات ژنتیکی گونه مذکور وجود خواهد داشت:

۱. با بهره‌گیری از پتانسیل باروری میش‌های اهلی اقدام به تلقیح مصنوعی آنها با استفاده از اسپرم قوچ وحشی شده و طی چندین دوره انتخاب ژنتیکی، بر اساس شواهد ژنتیکی موجود از سلول‌های سوماتیک قوچ وحشی (که در تانک‌های انجماد نگهداری می‌شود) به سمت احیای گونه خالص قوچ وحشی حرکت کنیم.

۲. در صورت انقراض کامل گونه وحشی قمیشلو، با استفاده از پتانسیل شبیه‌سازی در کشور و نیز امکان بالای پاسخ‌دهی مناسب اووسیت میش اهلی به ژنوم سلول‌های سوماتیک قوچ وحشی، می‌توان با استفاده از سلول‌های سوماتیک نگهداری شده در تانک‌ها اقدام به تولید جنین‌های شبیه‌سازی شده نر وماده گونه وحشی کرد و با انتقال آنها به رحم میش‌های اهلی به احیاء این گونه ارزشمند پرداخت. نمونه این امر به تازگی درکشور ایتالیا در جهت احیاء گوسفند وحشی (muflon) انجام پذیرفت (۳۱). نتایج آزمون کروموزومی (شکل ۱) و نیز آمیزش بین گونه‌ای تحقیق حاضر (جدول ۱ و شکل ۲) به عنوان یک مطالعه مقدماتی بیانگر امکان استفاده از پتانسیل تخمدانی گوسفندان اهلی در راستای انجام شبیه‌سازی در گونه نادر قوچ وحشی است.

۳. حفظ پروفایل ژنتیکی قوچ وحشی قمیشلو در بانک ژنوم (GRB) می‌تواند حرکتی نو در جهت بهبود دانش عمومی از این گونه با ارزش باشد و نیز با ارائه آن در لیست جهانی، شاید بتوان درآینده راهکارهای نوینی جهت احیای مجدد نسل‌های منقرض حیوانات ایجاد کرد و در نهایت می‌توان تنوع‌های زیستی در جهان کنونی را ثبت کرد و گونه‌ای در خور به آیندگان نشان داد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه اخیر بیانگر ارتباط نزدیک ژنتیکی دو گونه گوسفند اهلی با گوسفند وحشی قمیشلو و امکان استفاده از پتانسیل تخمدانی گوسفندان اهلی در راستای انجام شبیه‌سازی در گونه نادر قوچ وحشی است. مطالعه اخیر در نوع خود یک حرکت نوین در جهت حفظ مشخصات ژنتیکی گونه‌های وحشی اقلیم ایران به شمار می‌رود که در صورت تداوم، چنانچه سایر آزمایش‌های پیشرفته ژنتیکی از قبیل (Restricted Fragment Length Polymorphism: RFLP) و بررسی تبارشناسی، تنوع، پراکندگی و نیز نوع ارتباط گونه‌های مناطق مختلف ایران انجام پذیرد می‌تواند راهبردی مناسب و عملکردی برای حفظ، ثبت و احیای تنوع گونه‌های کشورمان باشد.

تقدیر و تشکر

هزینه مطالعه حاضر از محل بودجه‌های تحقیقاتی اداره محیط زیست استان اصفهان و تجهیزات پژوهشکده رویان تامین شده است. مؤلفان این تحقیق ضمن درود به روان دکتر سعید کاظمی آشتیانی از زحمات وحمایت‌های بی‌شائبه آقای دکتر حمید گورابی رئیس پژوهشکده رویان، آقای دکتر عبدالحسین شاهوردی معاون پژوهشی پژوهشکده رویان و نیز آقای دکتر احمد وثوق قدردانی می‌کنند. همچنین مؤلفان از زحمات بی‌دریغ تمامی محیط‌بانان پرتلاش استان اصفهان به خصوص جناب آقای کاوه که وجود خویش را صرف نگاه بانی و احیای این سرمایه ملی کرده‌اند سپاسگزاری و صحت و سلامت آنان را از درگاه باریتعالی مسئلت می‌کنند.

References

1. Valdez R, Nadler CF, Bunch TD. Evolution of Wild Sheep in Iran. Evolution 1978; 32(1): 56-72

2. Zohary D, Tchernov E, Horwitz Lk. The role of unconscious selection in the domestication of sheep and goats. J of Zoology 1998; 245: 129-135

3. Valdez R. Fecundity of wild sheep (Ovis orientalis) in Iran. J of Mammalogy 1976; 57(4): 762-763

4. Nadler CF, Deutsch L, Lay DM. Isoenzymes comparisons of wild Iranian sheep (Ovis Linnaeus). Com Biochemi Physiol B 1976; 53(1): 123-125

5. Mohri M, Jannatabadi AA, Aslani MR. Studies on haemoglobin polymorphism of two breeds of Iranian

sheep and its relationship to concentrations of iron, copper, hemoglobin, haematocrit and RBC number. Vet Res Commun 2005; 29(4): 305-312
6. Bunch TD, Foote WC. Chromosomes, hemoglobins, and transferrins of Iranian domestic sheep. J Hered 1976; 67(3): 167-170
7. Lay DM, Nadler CF, Hassinger JD. The transferrins and hemoglobins of wild Iranian sheep (Ovis Linnaeus). Com Biochemi Physiol B 1971; 40(2): 521-529
8. Bayat H. Iranian Wild Sheep. Isfahan Wild Sheep. Documents provided by Isfahan Organization for Saving Endangered Species.
9. Scientific data of Isfahan Organization for Saving Endangered Species
10. Corley-Smith GE, Brandhorst BP. Preservation of Endangered Species and Populations. A Role for Genome Banking, Somatic Cell Cloning, and Androgenesis? Mol Reprod and Dev 1999; 53: 363-367.
11. Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. Reprod Nutr Dev 2000; 40: 493-504
12. Pimm SL, Russell GJ, Gittleman JL, Brooks TM. The Future of Biodiversity. Science 1995; 269: 347-350
13. Bainbridge DR, Jabbour HN. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity. A review, Vet Rec 1998; 143: 159-168
14. Holt WV, Pickard AR. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. Rev Reprod 1999; 4: 143-150
15. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997; 385: 810-813
16. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science, 1998; 282: 2095-2098
17. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature, 1998; 394: 369-374
18. Tian XC, Kubota C, Enright B, Yang X. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer – biological factors. Reprod Biol Endocrinol, 2003; 1: 98-104
19. White KL. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of Argali (Ovis ammon) nuclei into domestic sheep (Ovis aries) enucleated oocytes. Cloning 1999; 1(1): 47-54
20. Abul Hashem M, Bhandari DP, Kang SK, Lee BC. Cell cycle analysis and interspecies nuclear transfer of in vitro cultured skin fibroblasts of the Siberian tiger (Panthera tigris Altaica). Mol Reprod and Dev

2006; in press
21. Oh BC, Kim JT, Shin NS, Kwon SW, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Production of blastocysts after intergeneric nuclear transfer of goral (Naemorhedus goral) somatic cells into bovine oocytes. J Vet Med Sci 2006; 68(11): 1167
22. Li Y, Dai Y, Du W, Zhao C, Wang H, Wang L, Li R, Liu Y, Wan R, Li N. Cloned endangered species takin (Budorcas taxicolor) by inter-species nuclear transfer and comparison of the blastocyst development with yak (Bos grunniens) and bovine. Mol Reprod and Dev 2006; 73(2): 189
23. Murakami M, Otoi T, Wongsrikeao P, Agung B, Sambuu R, Suzuki T. Development of interspecies cloned embryos in yak and dog. Cloning and stem cells 2005; 7(2): 77-81
24. Lasley BL, Loskutoff NM, Anderson GB. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species. Theriogenology 1994; 41: 119-132
25. Keira Sm, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte LDS, Santos IAN. Experimental model for fibroblast culture. Acta Cir Bras Available on URL:http://www.scielo.br/acb.
26. Ansari HA, Bosma AA, Broad TE, Bunch TD, Long SE, Maher DW, Pearce PD, Popescu CP. Standard G-, Q-, and R-banded ideograms of the domestic sheep (Ovis aries): homology with cattle (Bos taurus). Report of the committee for the standardization of the sheep karyotype. Cytogenet Cell Genet. 1999; 87(1-2): 134-42
27. Balram S, Dragicevic S, Meredith T. A collaborative GIS method for integrating local and technical knowledge in establishing biodiversity conservation priorities. Biodiv and Cons 2004; 13(6): 1195-1208
28. Pukazhenthi BS, Wildt DE. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? Eprod Fertil and Dev 2003; 16(2): 23-46
29. Wen DC, Yang CX, Cheng Y, Li JS, Liu ZH, Sun QY, Zhang JX, Lei L, Wu YQ, Kou ZH, Chen DY. Comparison of developmental capacity for intra- and

interspecies cloned cat (Felis catus) embryos. Mole Reprod and Dev 2003; 66(1): 38-45
30. Thongphakdee A, Numchaisrika P, Omsongkram S, Chatdarong K, Kamolnorranath S, Dumnui S, Techakumphu M. In vitro development of Marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. Reprod in Dom Anim 2006; 41(3): 219
31. Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka Jr, Cappai P, Clinton M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-specific nuclear transfer using post-mortem somatic cells. Nat Biotechnol 2001; 19: 962-964