التنميط النووي للحرذون النجمي باستخدام الزرع الخلوي للدم الكامل *Laudakia stellio* (Reptilia: Agamidae)

عروب المصري[1] و محمد ماهر قباقيبي[1] و عبد القادر رحمو[2]

[1] قسم علم الحياة الحيوانية ــ كلية العلوم ــ جامعة دمشق ــ سورية
[2] الهيئة العامة للتقانة الحيوية ــ دمشق ــ سورية

تاريخ الإيداع 2011/05/10
قبل للنشر في 2011/10/17

الملخّص

باستخدام الزرع الأولي primary cell culture لخلايا اللمفاويات الدموية المأخوذة من الحرذون *Laudakia stellio* أي دون التضحية بالحيوان من أجل دراسة النمط النووي وهي طريقة استخدمت للبشر سابقاً، بلغ عدد صبغيات النويع ست وثلاثين صبغياً 2n=36 وهي الصيغة الصبغية المضاعفة منها اثنا عشر زوجاً بأحجام كبيرة macrochromosomes وزوجان صغيرا الحجم microchromosomes وأربعة أزواج نقطيةdot chromosomes وبلغ العدد الأساسي FN= 64؛ مما يدل على أن هذا النمط قد يكون نوعاً مختلفاً عن الأنواع المدروسة سابقاً في مناطق أخرى.

الكلمات المفتاحية: زرع أولي، *Laudakia stellio*، خلايا الدم اللمفاوية، النمط النووي.

Karyotypes of *Laudakia stellio* (Reptilia: Agamidae) using whole blood cell culture

A.Almasri[(1)]; M. M. Kabakibi[(1)]; and A. Q. Rahmo[(2)]

[(1)] Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria
[(2)] National Commission for Biotechnology, Damascus, Syria

Received 10/05/2011
Accepted 17/10/2011

ABSTRACT

In the primary cell culture of lymphocytes derived from heart blood of *Laudakia stellio,* which is a method used in Humans before, the number of chromosomes were 2n=36 which is the diploide 12 pairs of them were macrochromosomes 2 pairs of them were microchromosomes and 4 pairs were dot chromosomes, fundamental number is FN=64 which might suggest that this could be a different species of the known well studied ones in other areas.

Key words: Primary cell culture, *Laudakia stellio,* Lymphocytes, karyotype.

المقدمة

تستطيع العديد من الخلايا الحيوانية، برعاية خاصة، أن تتحفز للنمو خارج أعضائها أو أنسجة أعضائها الأصلية.

يمكن زراعة الخلايا المعزولة أو الأنسجة أو الأعضاء في أوعية الزرع الخاصة عند حفظها في درجات حرارة محددة باستخدام حاضنة، وتزود بوسط زرع يحتوي على العناصر الغذائية وعوامل النمو المناسبة للخلية.

يعرف زرع الأعضاء والأنسجة والخلايا في المختبر بزرع الأنسجة، ويستخدم في العديد من مجالات العلوم.

يمثل العمل في الزرع الخلوي الأولي (وهو زرع لخلايا مأخوذة من أنسجة أحياء) تحدياً لأن النجاح ليس أكيداً. ويتطلب تأمين الشروط المناسبة التي تسمح بنمو خلايا متنوعة المصدر الحيواني والنسيجي وإنضاجها، والحصول على زرعات خلوية تنمو بشكل قابل للتكرار، وتوثيق هذا الإنجاز كله يتطلب كثيراً من العمل الشاق (Unchern 1999). زرعت العديد من أنواع الزواحف سابقاً كالأفعى من النوع *Natrix piscator* والتمساح من النوع *Crocodylus palustris* (Patel, Mangalipalli *et al.* 2009). أمّا من فصيلة Agamidae فقد زرعت خلايا النوع *Amphibolurus diemensis* (Stephenson 1966) والنوع *Tympanocryptis pinguicolla* (Ezaz, O'Meally *et al.* 2008) وغيرها من الأنواع. علماً أن تقانة زرع الخلايا استخدمت سابقاً في الضفادع (HUIYI 1980) وهي متبعة في التنميط النووي عند البشر.

يُظهر صف الزواحف تبايناً واضحاً في حجم الجينوم genome عموماً وطول الصبغيات وتركيبها. إذْ يبدو التركيب الأساسي لدنا السلاحف مشابهاً لدنا الثدييات (من حيث نسب الحموض النووية الغوانين والسيتوزين إلى الأدنين والتايمين، أمّا في العظايا والأفاعي فهو أقرب إلى اللامشيميات (Olmo 2008). الاختلاف الصبغي الأساسي بين السلاحف والحرشفيات squamates هو في حجم الجينوم وتركيبه ومعدل تغيرات الصبغيات الحاصلة في الأنواع التي تؤدي إلى التطور وظهور الأنواع الجديدة أو انقراضها. ففي صف الزواحف عموماً يرتبط معدل التغيّرات الصبغية بعدد الأنواع الحية ومعدل الانقراض، وهي علاقة متميّزة في مجمل صف الزواحف (Olmo 2008). ويختلف ذلك بين السلاحف والتماسيح من جهة والحرشفيات من جهة أخرى. حيث يكون معدل تغيرات الصبغيات في السلاحف والتماسيح أقل والخطوات التطورية المختلفة لا تورث تغيّرات صبغية ظاهرة، في حين يكون للحرشفيات معدل تغيرات صبغية أعلى ومرتبط بشكل واضح بعدد الأنواع الحية، ويبدو أن التنوع الصبغي أدّى دوراً مهماً في نشوء العديد من المراتب التصنيفية taxa (Olmo 2008).

ولم تستخدم البيانات الصبغية بشكل كاف في دراسات نشوء الأنواع رغم الإمكانيات الواضحة لدراسات الوراثة الخلوية للكشف عن التماثل البنيوي والوظيفي بين الأنواع. وتعدُّ التغيرات الصبغية (أي تنوع أعداد الصبغيات وترتيبها وأطوالها) من الأسباب التي يمكن أن تؤدي دوراً في تشكل الأنواع، وهي تستخدم لذلك كمعايير تصنيفية (Dobigny, Ducroz *et al*. 2004).

أمّا بالنسبة إلى الحرذون النجمي موضوع الدراسة فقد سجل أن عدد صبغياته في الصيغة المضاعفة (النوع *Laudakia stellio*) هو 36 صبغياً (Beutler 1981). وقد سجل وجود الصبغيات النقطية dot chromosomes في فصيلة الحراذين منذ بدايات الدراسات الصبغية على هذه الفصيلة (Makino and Asana 1950).

أهمية البحث وأهدافه

أصبح من الشائع استخدام الأنسجة الحيوية ومنها الدم في توصيف الأنواع. وتعدُّ الأوعية الدموية المحيطية الأماكن الأكثر ملاءمة لأخذ عينات الدم في الزواحف (Rohilla and Tiwari 2008).

وهناك العديد من البحوث التي تركز على زرع الخلايا الحيوانية في مجال تقليدي كالتنميط النووي ودراسة الصبغيات (Ezaz, O'Meally *et al*. 2008) كما أن هناك اهتماماً خاصاً بالزرع الخلوي لحيوانات الزواحف بهدف دراسة سمة ترميم الأعضاء والأنسجة organ and tissue regeneration (Philipkoski 2006) أو في التطبيقات الصيدلانية (D'Anna 1994) أو في بحوث إطالة العمر؛ لأن العديد من خلايا الزواحف يملك إمكانيات الاستمرار والديمومة (Christiansen, Henderson *et al*. 2001) وتعدُّ ظاهرة السبات الاستقلابي الخلوي ذات أهمية خاصة في بحوث الطب والفضاء (Johnson, Nettikadan *et al*. 2005) في تقنيات الهندسة الوراثية والعلاج المورثي (Ryan 2008).

هَدفت هذه الدراسة إلى تطبيق تقانة زرع الخلايا على الحرذون النوع *stellio Laudakia* بوسائل معتمدة في زراعة الخلايا البشرية، بهدف توفير مستلزمات التنميط النووي. نفذ هذا البحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق في العام 2009 كجزء من رسالة معدة لنيل درجة الدكتوراه.

مواد البحث وطرائقه

الأجهزة:

استخدمت حاضنة زرع خلوي عقيمة مزودة بغاز ثاني أكسيد الكربون (Shel Lab CO_2 Incubator) كما في الشكل (1)، وحجرة سلامة عقيمة من الدرجة الثانية

(Microflow Advanced Biosafety Cabinet class II)، ومجهر بحوث (Nikon E80)مربوط بحاسب وبلوحة تحكم وبرنامج لمعالجة الصور خاص بالصبغيات Lucia Cytogenetics كما في الشكل (2)، وبرنامج لمعالجة قياسات الصور المجهرية Mesurim، ومجمدة -20 درجة مئوية، وبراد +8 درجة مئوية.

الشكل (1) حاضنة ثاني أكسيد الكربون

الشكل (2) مراقبة النمط النووي بمجهر البحوث

الأدوات:

استخدمت أنابيب 15 ملم و50 ملم بلاستيكية عقيمة (TPP)، وماصات باستور بلاستيكية عقيمة 3 ملم، وماصات باستور زجاجية عقيمة مستدقة الرأس 3 ملم، وماصات بلاستيكية عقيمة 5 ملم و10 ملم، وشرائح زجاجية خاصة بالتنميط النووي (Frost)، وهي أدوات خاصة بالزرع الخلوي العقيم.

المواد:

استعمل وسط الزرع Lympho Grow Plus (Cytogen) ليمفو غرو بلوس ويتألف من ألفا إم إي إم MEM معزز بمصل بقري جنيني Fetal Bovine Serum مختبر مسبقاً في مزارع خلوية وهرمونات وعوامل نمو مع إل- غلوتامين L-Glutamine والمضاد الحيوي جنتامايسين Gentamicin مع محرض انقسامي للمفاويات وهو الفيتوهيماغلوتينين Phytohemagglutinin، فضلاً عن هيبارين الصوديوم Sodium Heparin، وكولشيسين colchicines، وميتانولmethanol، وحمض الخل الثلجي glacial Acetic acid، وصبغة غيمسا giemsa stain ومحلول هانك Hank's Solution (Cytogen) وكانت المواد المستخدمة جميعها بنقاوة ملائمة للزرع الخلوي.

العينات:

أخذت عينة من النويع *Laudakia stellio stellio* المصنف مورفولوجياً بحسب (Daan 1967) المتميّز بنمط التحرشف الظهري وعدد الصفائح الحرشفية تحت الإصبع الرابع للطرف الخلفي وغيره من الصفات المورفولوجية المعتمدة في تصنيف النويع ضمن النوع *Laudakia stellio*، من طريق حمص طرطوس بتاريخ 7-2-2009 وهي أنثى يافعة كما يظهر في الشكل (3).

طريقة العمل:

طريقة تحضير العينة:

رش بطن الحيوان بالكحول بتركيز 70% وانتظر جفافه ثم استخدم محقن 5 مل يحوي هيبارين الصوديوم بنسبة 90 وحدة USP لكل مل من الدم، وسحبت كمية من الدم من القلب مباشرة حسب وزن الحيوان بنسبة % 1-0.5 من وزن الحيوان (Rohilla and Tiwari 2008).

طريقة تحضير وسط الزرع:

استعمل 7 ملم من سائل الزرع Lympho Grow Plus من المحفوظ في المجمدة وأُذيب في حاضنة ثاني أكسيد الكربون بدرجة حرارة 37 مئوية قبل استخدامه للزرع مباشرة.

طريقة الزرع الأولي:

نقل الدم في شروط عقيمة إلى أنبوب زرع عقيم سعة 15 مل يحوي وسط الزرع Lympho Grow Plus بدرجة الحرارة 37 مئوية في حجرة السلامة من الدرجة الثانية Biosafety Cabinet class II، ومن ثم نقل أنبوب الزرع إلى حاضنة ثاني أكسيد الكربون بدرجة حرارة 37 مئوية وهي زراعة مغلقة. يظهر بعد استهلاك خلايا اللمفاويات المتكاثرة لوسط الزرع (بعد قرابة أسبوع من الزرع تقريباً) تغيّر لون وسط الزرع إلى اللون الأصفر بفضل كاشف أحمر الفينول الموجود في الوسط. ثفل الوسط المزروع مدة 7 دقائق بسرعة 1200 rpm (دورة في الدقيقة) وسحب الطافي وأضيف وسط جديد مدفأ في الحاضنة على درجة 37 مئوية؛ وذلك بحسب (Unchern 1999).

الشكل (3) عينة من النويع *Laudakia stellio stellio*

طريقة عزل الصبغيات:

استعمل الكولشيسين Colchicin في وسط زرع الخلايا، وذلك بتركيز 5 ميكروغرام/ مل. وحُضن مدة ساعة في 37°م. واستعمل المثبت ميتانول وحمض الخل الثلجي بنسبة (3 :1) لتثبيت الخلايا، ومحلول هانك Hank Solution بدرجة حرارة 37 °م.

طريقة فصل الصبغيات:

بعد إضافة الكولشيسين إلى الخلايا بساعتين تماماً أجري التثفيل مدة 10 دقائق بسرعة 1200 rpm وسُحب الطافي، وأضيف 5 مل محلول هانك المدفأ، ثم عومت الخلايا، وحضنت مدة 12 دقيقة في درجة الحرارة 37 °م، تلاه إضافة 5 نقط من المثبت والخلط والتثفيل مدة 8 دقائق بسرعة 1200 rpm. سُحب الطافي وخُلِطَ الراسب بالباقي وأُضيف

5 مل من المثبت وخُلطَ حتى التجانس، وترك بدرجة حرارة الغرفة مدة 10 دقائق. ومن ثم جرى التثفيل مدة 8 دقائق بسرعة 1200 rpm وسحب الطافي وأُضيف 5 مل من المثبت، وأعيدت العملية الأخيرة ثلاث مرات. كانت كمية المثبت المضافة الأخيرة (0.5 – 1) مل طبقاً لعدد الخلايا.

طريقة دراسة النمط النووي:

جرت الدراسة للعينة المستخدمة بزرعة واحدة لعينة الدم المستخرجة من الحيوان، درست نتائج النمط النووي باستخدام التلوين بصبغة غيمسا (ODIERNA 1993)؛ وذلك باستخدام برامج الحاسوب الحديثة المخصصة لتحليل النتائج LUCIA Cytogenetics ، وMesurim لقياسات الصبغيات، أجريت القياسات بالبيكسل في الصورة، جرت دراسة بين خمس وعشر لوحات استوائية، وطُبّق القياس على أفضل المجموعات الصبغية. ووُضع المخطط النووي Karyogram لصبغيات الأنواع بترتيبها بحسب أطوال الصبغيات وبحسب توضع الجزيء المركزي في أزواج الصبغيات وذلك بمساعدة برمجية خاصة لترتيب صور الصبغيات وهي Lucia Cytogenetics حيث تترتب الصبغيات ابتداء من الأطول وانتهاء بالأقصر. حُسب الطول النسبي لذراعي كل صبغي بدلالة الجزيء المركزي والقيم العددية للصبغيات مما يسمح بتعرف دقيق للأنواع (Unchern 1999)، وتسمية الصبغيات حسب توضع الجزيء المركزي بحسب الجدول (1).

Arm ratio = حسبت نسبة الجزيء المركزي= الذراع الطويل/ الذراع القصير Centromeric ratio (CR)

relative حسبت نسبة طول الزوج الصبغي إلى طول الجينوم الكامل (الطول النسبي) length (%)

L.R.(%)=percentage length of chromosome pair over total genome length.

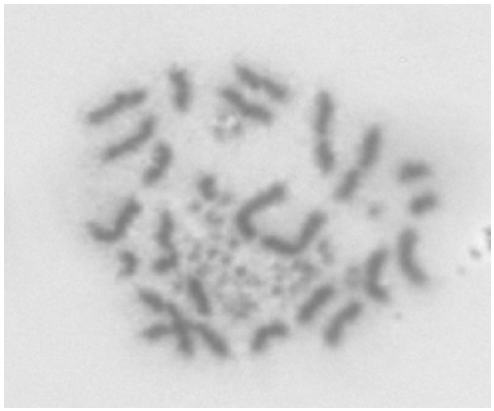
الجدول (1) تسمية أنواع الصبغيات بحسب توضع الجزيء المركزي بحسب بتصرف (Levan, Fredga *et al.* 1964)

Centromeric position	Arm ratio= Centromeric ratio (CR)	Chromosome designation (Cenromeric position)		
Median *sensu stricto*	1.0	M	Atelocentric	Metacentric
Medain region	——*1.7——	m		
Submedian	——*3.0——	Sm		Submetacentric
Subterminal	——*7.0——	st		Subtelocentric
Terminal region		t		Acrocentric
Terminal *sensu stricto*	∞	T	Telocentric	

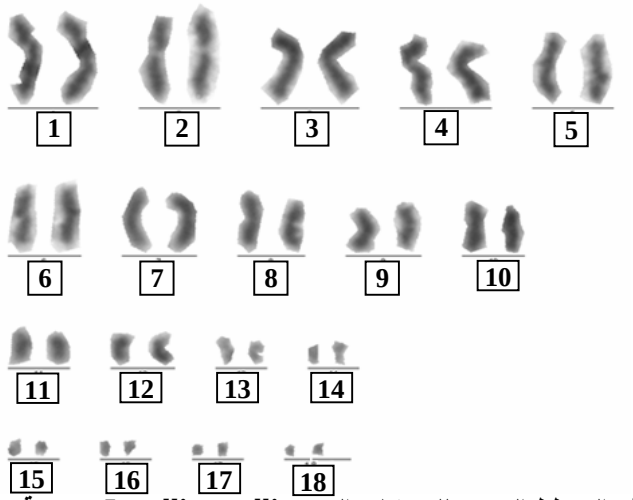
تُحسب القيم التي بجانبها * كقيم حد فاصل بين الحالتين

النتـــائـــج

لوحظ أن زرع كمية محدودة من الدم الكامل (تبلغ تقريبـــاً 0.5 مـــل) فـــي الوســـط المستخدم (الحاوي على فيتوهيماغلوتينين Phytohemagglutinin المحرض علـــى نمـــو اللمفاويات) يؤدي إلى تكاثر خلايا الكريات البيض فقط، علماً أن كريات الـــدم الحمـــراء منواة لدى الحرذون لكنها لا تنمو بسببٍ عدم تحريض عامل النمو للكريـــات. وتبـــيّن أن الخلايا تستغرق قرابة أربعة عشر يوماً كي تملأ عبوة الزرع بعدد مـــن الخلايـــا يكفـــي للحصول على تنميط نووي.



الشكل (4) يبيّن صـــبغيات خليـــة للنـــوع *L.stellio stellio* فـــي مرحلـــة الـــدور التـــالي metaphase بتكبير قدره 1000 X وباستخدام العدسة الغاطسة



الشكل (5) يبيّن المخطط النووي للصبغيات النوع *L.stellio stellio* مرتبـــة وفقـــاً للأطـــوال ولتوضع الجزيء المركزي باستخدام برمجية Lucia Cytogenetics

يبيّن الشكل (5) المخطط النووي Karyogram لصبغيات النويع *L.stellio stellio* مرتبة وفقاً لأطوال الصبغيات ولموضع الجزيء المركزي في أزواج الصبغيات.

لوحظ أن الجزيء المركزي للأشفاع 9-1-2-3-4-7-8-10-11-12-13-14 متوسطة الوقع، أمّا الشفعان 5-6- فإن الجزيء المركزي هو قرب متوسط، في حين أن الأشفاع 15-16-17-18 من النمط النقطي، ونجد في الجدول (2) جميع التفاصيل الخاصة بهذه الصبغيات.

الجدول (2) يبيّن قياسات الصبغيات لدى النوع *Laudakia stellio stellio*

رقم الصبغي	معدل طول الذراع القصير p	معدل طول الذراع الطويل q	معدل طول الصبغي	نسبة الجزيء المركزي CR	الطول النسبي RL	موقع الجزيء المركزي CP
1	29.05	46.5	75.55	1.600688	12.1383	m
2	30.6	39.35	69.95	1.285948	11.23857	m
3	26.25	35.65	61.9	1.358095	9.945213	m
4	23.07	32.42	55.49	1.405288	8.915345	m
5	15.75	30.75	46.5	1.952381	7.47096	sm
6	15.45	27.3	42.75	1.76699	6.868463	sm
7	17.55	28.6	46.15	1.62963	7.414727	m
8	19.4	22.45	41.85	1.157216	6.723864	m
9	15.4	15.65	31.05	1.016234	4.988673	M
10	15.3	18.25	33.55	1.19281	5.390338	m
11	10.95	14.5	25.45	1.324201	4.088945	m
12	10	12.05	22.05	1.205	3.542681	m
13	8.37	11.3	19.67	1.35006	3.160296	m
14	6	7.63	13.63	1.271667	2.189875	m
15	نقطية	نقطية	9.87	نقطية	1.585771	نقطية
16	نقطية	نقطية	11	نقطية	1.767324	نقطية
17	نقطية	نقطية	9	نقطية	1.445992	نقطية
18	نقطية	نقطية	7	نقطية	1.124661	نقطية

الذراع القصير	p
الذراع الطويل	q
الطول النسبي ,(%) relative length	RL
نسبة الجزيء المركزي ,centromeric ratio	CR
موقع الجزيء المركزي ,centromeric position	CP
مركزي الجزيء المركزي ,metacentric	M, m
قرب مركزي الجزيء المركزي ,submetacentric	SM
طرفي الجزيء المركزي subtelocentric. Morphometric	ST
طرفي الجزيء المركزي telocentric. Morphometric	T

المناقشة

هدف البحث بشكل أساسي إلى الزرع الخلوي وتكثير الخلايا اللمفاوية المأخوذة من الدم، ومن ثم فصل الصبغيات في مرحلة اللوحة الاستوائية للانقسام الخيطي بهدف دراسة النمط النووي.

لم نتمكن من فصل المصل عن الكريات الحمراء كما في زرع الدم البشري بسبب صغر كميات الدم الممكن سحبها من الحيوانات الصغيرة الحجم أساساً، ولذلك زرع الدم كاملاً.

ومن المعروف أن خلايا الزواحف أبطأ في التضاعف من خلايا الثدييات أو الطيور، وهذا ما يفسر حاجة خلايا الدم من هذا النوع قرابة ضعف المدة التي تحتاج إليها الخلايا البشرية حتى توفر عدداً كافياً من الخلايا لإجراء التنميط النووي (Stephenson 1966).

وتوافقت شروط الزرع مع شروط الزرع المستخدمة عموماً لزرع خلايا اللمفاويات البشرية إلا أن أحجام الخلايا كانت أصغر بشكل واضح. وتشير الدراسات إلى أن زرع الخلايا لدى الزواحف تتم غالباً من خلايا غير دموية (Stephenson 1966; Ezaz, O'Meally *et al.* 2008; Patel, Mangalipalli *et al.* 2009) .

وتظهر بعض الأنواع القريبة تصنيفياً من بعضها بعضاً أنماطاً نووية متشابهة، إذ أظهر أحد عشر نوعاً من الجنس *Phrynocephalus* من الحراذين (دُرست في سبع وعشرين جماعة) ثلاثة أشكال من الأنماط النووية (Pang, Wang *et al.* 2003)، وسنحاول أن نبحث في دراسات لاحقة لأنواع قريبة منه علاقات القرابة بين هذه الأنواع.

الاستنتاج

يمكن اعتماد هذه الطريقة في استحصال النمط النووي أي الزرع الخلوي عوضاً عن حقن الكولشيسين لكامل الحيوان والتضحية به وخسارته نهائياً لإجراء التنميط النووي، وتعدُّ هذه الطريقة حديثة في عالم التنميط حيث تطبق لجعل التنميط وسيلة لتعرّف الحيوانات دون قتلها.

وقد عملنا على زرع اللمفاويات الدموية بهدف التنميط النووي للحرذون النجمي الذي يبلغ عدد صبغياته (النوع *Laudakia stellio*) 36 صبغياً في الصيغة الصبغية المضاعفة (Beutler 1981)، ستة أزواج منها كبيرة ذات ذراعين تراوح أطوالها النسبية بين 19.17% و6.17% فضلاً عن اثني عشر زوجاً من الصبغيات الصغيرة التي تراوح أطوالها النسبية بين 2.20% و1.27% والعدد الأساسي (إجمالي عدد الأذرع) FN=48 (Hassan 1996) لعينات من مصر.

بلغ عدد صبغيات النويع *Laudakia stellio stellio* ستة وثلاثين صبغياً 2n=36 في الصيغة الصبغية المضاعفة؛ منها اثنا عشر زوجاً بأحجام كبيرة macrochromosomes راوحت أطوالها النسبية بين 12.14% و3.54% وزوجان صغيرا الحجم راوحت أطوالها النسبية بين microchromosomes 3.16% و2.19% وأربعة أزواج نقطيه راوحت أطوالها النسبية بين 1.59% و1.12%، والعدد الأساسي هو 64 =FN؛ وهو ما يعدُّ اختلافاً يمكن عدّه نوعياً عن عينات النوع *Laudakia stellio* في مصر (Hassan 1996) التي هي غالباً من النويع *L.s.vulgaris*.

شكر وتقدير

للهيئة العامة للتقانة الحيوية لإتاحتها الفرصة لي للعمل في مخابرها وتقديم كل التسهيلات اللازمة والسيدة ميسون العلوي لمساعدتها وملاحظاتها القيمة في عملية الزرع الخلوي ومراقبته.

REFERENCES المراجع

Beutler A. 1981. *Agama stellio* (Linnaeus 1758)- Hardun. In: Böhme, W., editor). Wiesbaden: Akad. verlag. Gesellchaft. p. 161-177.

Christiansen J, Henderson E, Budke B, Lynch M, Lu Q & Johnson J. 2001. A final report of studies of the Hayflick limit in Reptiles, a test of potential immortality. Proceedings of the Iowa Space Grant Consortium:10.

D'Anna J. 1994. Information resources for reptiles, amphibians, fish, and cephalopods used in biomedical research. DIANE Publishing.

Dobigny G, Ducroz J-F, Robinson TJ & Volobouev V. 2004. Cytogenetics and Cladistics. Syst Biol 53(3):470-484.

Ezaz T, O'Meally D, Quinn A, Sarre S, Georges A & Marshall Graves J. 2008. A simple non-invasive protocol to establish primary cell lines from tail and toe explants for cytogenetic studies in Australian dragon lizards (Squamata: Agamidae). Cytotechnology 58(3):135-139.

Hassan HA. 1996. Chromosomal studies of four Egyptian lizards of the families Agamidae and Scincidae. Cytologia 61(4):443-456.

Huiyi WUZY. 1980. Karyotype analysis of frogs and toads by the method of lymphocyte culture [J]. Acta Zoologica Sinica 1.

Johnson J, Nettikadan S, Vengasandra S, Lovan S, Muys J, Henderson E & Christiansen J. 2005. Characterization of testudine melanomacrophage linear, membrane extension processes—Cablepodia—By phase and atomic force microscopy. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal 41(7):225-231.

Levan A, Fredga K & Sandberg A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52(2):201-220.

Makino S & Asana JJ. 1950. A sexual difference in the chromosomes of two species of agamid lizards. Chromosoma 3(1):208-219.

Odierna G, T. Capriglione, V. Caputo & E. Olmo. 1993. Chromosome G-banding comparison among some mediter-ranean lacertid lizards. Lacertids of the Mediterranean region: A biological approach. Hellenic Zoological Society, Athens:51-59.

Olmo E. 2008. Trends in the evolution of reptilian chromosomes. Integrative and Comparative Biology.

Pang J, Wang Y, Zhong Y, Hoelzel AR, Papenfuss TJ, Zeng X, Ananjeva NB & Zhang Y. 2003. A phylogeny of Chinese species in the genus Phrynocephalus (Agamidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 27:398–409.

Patel L, Mangalipalli B, Tiwari A, Anand V, Mishra M & Singh K. 2009. Cytogenetic Characterization and Fluorescence in situ Hybridization of (GATA) 10 Repeats on Established Primary Cell Cultures from Indian Water Snake (Natrix piscator) and Indian Mugger (Crocodylus palustris) Embryos. Cytogenet Genome Res 127:287-296.

Philipkoski K. 2006. MID- How animal research leads to knowledge about human regeneration. Grow Your Own Limbs.

Rohilla M & Tiwari P. 2008. Simple method of blood sampling from Indian freshwater turtles for genetic studies. Acta Herpetologica 3(1):65.

Ryan J. 2008. Introduction to Animal Cell Culture. Corning Incorporated, Life Sciences, Chelmsford St.

Stephenson N. 1966. Effects of temperature on reptilian and other cells. Journal of Embryology and Experimental Morphology 16(3):455.

Unchern S. 1999. Basic techniques in animal cell culture. Drug Delivery System Workshop, Bangkok, Thailand Laboratory Practice on Caco-2 Cell Culture:1-30.