بررسی تعداد کروموزومهای ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و تهیه کاریوتایپ آن

ابوالحسن وارسته[۱] ـ مرتضی حسین‌زاده مقدم[۲] ـ محمد پورکاظمی[۳] و محمدرضا نوروز فشخامی[۴]

varasteh-en@yahoo.com

۱ و ۲ - رشت صندوق پستی: ۳۸۷۷-۴۱۶۳۵

۳ و ۴ - انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت، صندوق پستی: ۳۴۶۴ - ۴۱۶۳۵

تاریخ دریافت : آبان ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش : بهمن ۱۳۸۰

لغات کلیدی: کاریوتایپ، کروموزوم، کپور نقره‌ای، *Hypophthalmichthys molitrix*

تعداد کروموزومهای ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و کاریوتایپ آن با استفاده از روش له‌کردن بافت و رنگ‌آمیزی گیمسا تعیین گردید.

در آزمایشاتی که روی ۸۰ عدد لارو و ۱۰ عدد بچه ماهی ۱ تا ۸ گرمی کپور نقره‌ای و با شمارش تعداد ۳۰ عدد گسترش کروموزومی انجام گرفت، تعداد کروموزومهای ماهی کپور نقره‌ای ۲n = ۴۸ و تعداد بازوهای کروموزومی NF = ۸۸ تعیین گردید. کاریو تایپ کروموزومهای این گونه نشان داد که ماهی کپور نقره‌ای دارای ۶ جفت کروموزوم متاسنتریک (M)، ۱۴ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک (SM) و ۴ جفت کروموزوم آکروسنتریک (A) می‌باشد که بطور خلاصه می‌توان فرمول کاریوتایپ آن را طبق فرمول (۶M+۱۴SM+۴A) اعلام نمود.

ماهی کپور نقره‌ای متعلق به رده ماهیان استخوانی، راسته کپور ماهی شکلان، خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae)، زیر خانواده Hypophthalmicthinae و جنس *Hypophthalmichthys*

می‌باشد که در رودخانه های ساحل آسیایی اقیانوس آرام از رود آمور در شمال تا رود پول در جنوب چین یافت می‌شود (نظری، ۱۳۷۵).

تاکنون تحقیقات بسیاری در مورد مطالعه کروموزومی آبزیان صورت گرفته است و از روشهای مختلف برای بدست آوردن تعداد کروموزم‌ونوع آن استفاده شده است. در سالهای اخیر با تکمیل تکنیکهای سیتولوژی، تهیه گسترش کروموزومی ماهیان ساده‌تر گردیده بطوریکه با توجه به امکانات، می‌توان روش مناسب را انتخاب نمود. برای این کار می‌توان از بافتهای نرم ماهیان زنده نظیر کلیه، طحال، کبد، سلولهای اپی تلیال آبششها (Lieppman & Hubbs, 1969)، قرنیه (Drewry, 1964)، باله و فلسها (Denton & Howell, 1969) از طریق تزریق محلول کلشی‌سین به ماهیان مورد آزمایش یا قرار دادن لاروها در محلول کلشی‌سین و خارج نمودن بافتهای مورد نظر و له نمودن آنها و همچنین روش کشت گلبولهای سفید خون استفاده نمود.

روش کشت گلبولهای سفید خون توسط بسیاری از محققین در مورد تعداد زیادی از ماهیان از جمله *Cyprinus carpio*، ماهی طلایی *Carassius auratus* (Ojima *et al.*, 1970)، قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* (Heckman *et al.*, 1971)، مار ماهی ژاپنی *Anguilla japonica* ، مار ماهی *Anguilla anguilla* (Kang & Pank 1975)، ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* ازون برون *Acipenser stellatus*، فیل ماهی *Huso huso* سواحل جنوب دریای خزر (نوروز فشخامی، ۱۳۷۴) و قره‌برون *Acipenser persicus* (Nowruzfashkhami *et al.*, 2000) بکار گرفته شده است.

این پژوهش با هدف مطالعه کروموزومی ماهی کپور نقره‌ای و تهیه کاریوتایپ آن در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری صورت گرفت که می‌تواند منشأ بسیاری از فعالیتهای کروموزومی مربوط به این ماهی با ارزش باشد.

در این مطالعه ۸۰ عدد لارو و ۱۰ عدد بچه ماهی ۱ تا ۸ گرمی کپور نقره‌ای از مرکز تکثیر و پرورش ماهی شهید انصاری رشت جمع‌آوری و به بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری انتقال داده شد که کلیه بررسیهای سیتوژنتیکی در بخش ژنتیک انستیتو صورت گرفت.

در آزمایشاتی که روی لارو ماهی کپور نقره‌ای انجام گرفت برای متوقف نمودن سلولها در مرحله متافاز تقسیم سلولی از حمام کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد به مدت ۶ ساعت و از محلول کلرید پتاسیم ۰/۰۶ مولار برای هیپوتونیزه کردن سلولها استفاده گردید. تثبیت سلولها توسط محلول کارنوی (سه قسمت اتانول + یک قسمت اسید استیک)صورت گرفت و سپس سلولهاتوسط گیمسای ۱۰ درصد رنگ‌آمیزی شدند.

برای بچه ماهیان ۱ تا ۸گرمی از روش تزریق کلشی‌سین به عضله استفاده شدکه به صورت زیر انجام شد.

یک عدد بچه ماهی از آکواریوم خارج و با ترازوی دقیق وزن گردید. محلول کلشی‌سین ۰/۰۱ درصد به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن ماهی با سرنگ انسولین به عضله پشتی ماهی تزریق گردید و مدت ۳ ساعت و ۳۰ دقیقه در آکواریوم کاملاً هوادهی شده، رها گردید. ۴ میلی‌لیتر کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵ مولار به آن اضافه شد و پس از خرد نمودن بافت کلیه توسط قیچی، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول کلرید پتاسیم نگهداری شد. پس از آن نمونه‌ها با هاون به خوبی له گردید و مجدداً دو میلی‌لیتر کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵ مولار اضافه شد و محصول بدست آمده به یک لوله سانتریفوژ منتقل گردید و مدت ۱۰ دقیقه در این حالت نگهداری شد.

سپس محصول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰ rpm سانتریفوژ شده و محصول رویی دور ریخته شد. در مرحلهٔ بعد ۴ میلی‌لیتر فیکساتیوکارنوی (سه قسمت الکل اتانول + یک قسمت اسید استیک) سرد و تازه به لوله آزمایش اضافه گردید و با یک پیپت پاستور سوسپانسیون تهیه شد.

۳ عدد لام در الکل ۵۰ درصد قرار داده شد و به خوبی تمیز گردید. لامها را تا دمای ۴۰ درجه سانتیگراد روی هات پلیت گرم نموده چند قطره از سوسپانسیون سلولی را با پیپت برداشته و از فاصله ۶۰ تا ۸۰ سانتیمتری روی لامها چکانده شد. پس از خشک شدن لامها در هوای آزمایشگاه، بمدت ۳۰ دقیقه با گیمسای ۱۵ درصد با pH ۶/۸ رنگ‌آمیزی شدند و سپس با آب مقطر شستشو شده و در محیط آزمایشگاه خشک گردیدند.

بررسی میکروسکوپی لامهای تهیه شده توسط میکروسکوپ نوری انجام شد. با مشاهده گسترشهای کروموزومی مناسب، جداولی که مربوط به مختصات کروموزومها روی لام بودند ترسیم

گردید. سپس با میکروسکوپ دوربین‌دار از متافازهای مناسب عکس گرفته شد. عکسها پس از بزرگ نمایی برای تهیه کاریو تایپ آماده شدند.

طی آزمایشات انجام گرفته روی لارو و بچه ماهی کپور نقره‌ای مشخص گردید که روش استفاده از حمام کلشی‌سین در مورد لارو نتایج خوبی در برنداشته است اما آزمایشهایی که روی ۱۰ عدد بچه ماهی ۱ تا ۸ گرمی کپور نقره‌ای انجام گرفت، نتایج بسیار خوبی بدست آمد که در بررسی میکروسکوپی لامها ۱۰۰ عدد متافاز مشاهده شد که ۳۰ عدد از آنها بخوبی قابل شمارش بودند. از این تعداد ۲۱ عدد ۴۸ تایی، ۴ عدد ۴۷ تایی، ۳ عدد ۴۹ تایی، ۱ عدد ۵۰ تایی و ۱ عدد ۴۶ تایی بودند.

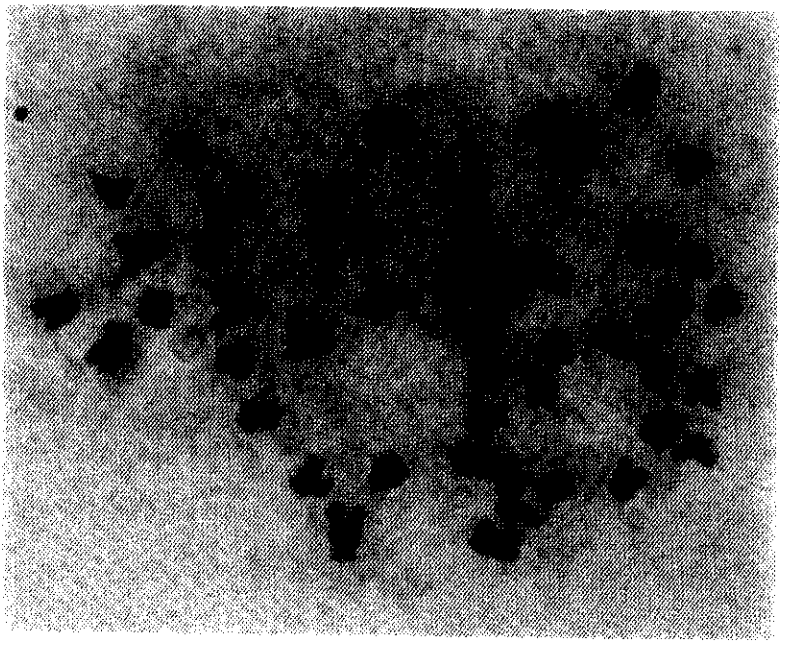
جدول ۱ : فراوانی کروموزومها در ماهی کپور نقره‌ای

تعداد کروموزوم در پلاک متافازی	۴۸	۴۷	۴۹	۵۰	۴۶
تعداد پلاک متافازی	۲۱	۴	۳	۱	۱

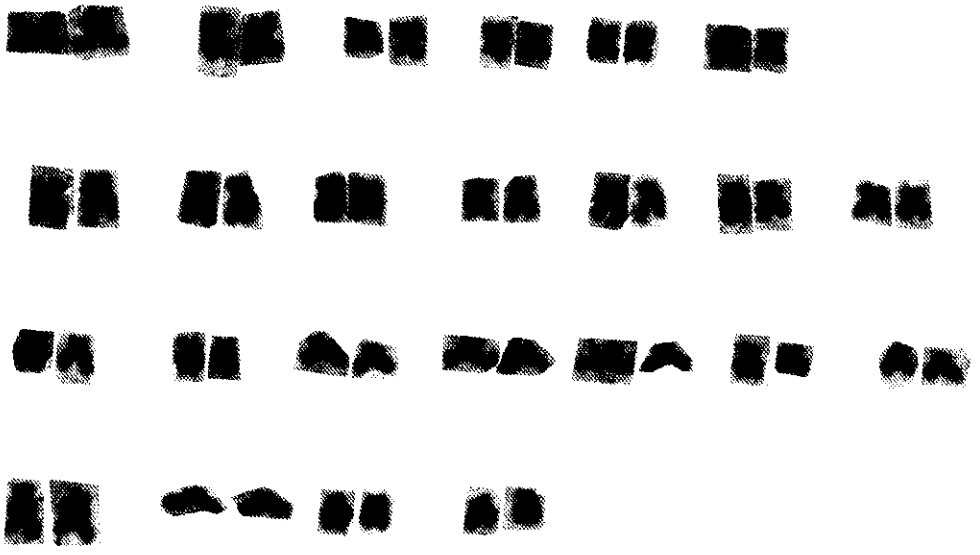
با توجه به جدول ۱ و محاسبات انجام شده، می‌توان تعداد کروموزومهای ماهی کپور نقره‌ای را ۲n=۴۸ و تعداد بازوهای کروموزومی را NF=۸۸ اعلام نمود.

در بررسی کاریوتایپ کپور نقره‌ای تعداد ۶ جفت کروموزوم متاسنتریک، تعداد ۱۴ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک و ۴ جفت کروموزوم آکرو سنتریک بدست آمد (شکل‌های ۱ و ۲)، که فرمول آن را می‌توان بصورت (۶M + ۱۴ SM + ۴A) و NF=۸۸ مشخص نمود.

در این بررسی تعداد کروموزومهای ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) ۲n=۴۸ عدد و تعداد بازوهای کروموزومی NF=۸۸ بدست آمد. که با نتایجی که توسط Kirpichnikov, 1973 ; Marian & keraznai, 1978 و Vasileva, 1978 در مورد تعداد کروموزومهای ماهی کپور نقره‌ای (۲n=۴۸) آورده‌اند، مطابقت دارد.



شکل ۱ : گسترش کروموزومی ماهی‌کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)



شکل ۲ : کاریوتایپ ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmicthys molitrix*)

در بررسی کاریوتایپ ماهی کپور نقره‌ای تعداد ۶ جفت کروموزوم متاسنتریک و ۱۴ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک و ۴ جفت کروموزوم آکروسنتریک بدست آمد. که این نتایج با نتایج بدست آمده توسط Reddy در سال ۱۹۹۱ که تعداد ۶ جفت کروموزم متاسنتریک، ۱۶ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک و ۲ جفت کروموزم تلوسنتریک گزارش نمود، متفاوت می‌باشد. همچنین با نتایجی که توسط Marian & keraznai در سال ۱۹۷۸ بدست آمد و تعداد ۱۱ جفت کروموزم متاسنتریک، ۷ جفت کروموزم ساب متاسنتریک و ۶ جفت کروموزم تلوسنتریک بیان گردید، متفاوت می‌باشد. این اختلاف را می‌توان با توجه به شرایط آزمایش و امکانات موجود و همچنین احتمال وجود نژادهای مختلف با توجه به گزارشهای سایر محققین که کاریوتایپ مختلفی را ارائه داده‌اند توجیه نمود که باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. با مشخص شدن تعداد و نوع کروموزومها در ماهی کپور نقره‌ای می‌توان برای انجام مطالعات کروموزومی مشابه اقدام نمود. بعنوان مثال صحت انجام عملیات در زمینه تولید ماهیان دورگه را می‌توان مورد بررسی قرار داد زیرا در بسیاری از عملیات دورگه‌گیری که بطور مصنوعی توسط بشر صورت می‌گیرد، موفقیت حاصل نمی‌شود. در ضمن با داشتن تعداد کروموزومهای ماهی کپور نقره‌ای (۲n=۴۸) می‌توان در صورت تولید ماهی کپور نقره‌ای تریپلوئید یا تتراپلوئید تعداد کروموزمهای ماهی کپور نقره‌ای ۳n یا ۴n کروموزومی قابل شمارش خواهد بود و در سایر موارد نظیر باندینگ نیز می‌توان از تعداد و کاریوتایپ ماهی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات و مساعدتهای کلیه افرادی که در انجام این پروژه ما را یاری نموده‌اند بویژه کارشناسان بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، آقایان مهندس نویری، مهندس علیپور و آقای چکمه‌دوز و همچنین ریاست محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهی شهید انصاری رشت آقای مهندس طلوعی و همچنین خانم فاطمه نوش آذر که در تنظیم این مقاله ما را یاری دادند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

نظری، ر.م.، ۱۳۷۵. زیست‌شناسی و تکثیر ماهی کپور نقره‌ای. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. اداره کل آموزش و ترویج. ۱۰ صفحه.

نوروز فشخامی، م. ر.، ۱۳۷۴. پروژه کاریولوژی ماهیان خاویاری از طریق کشت گلبولهای سفید خون. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال چهارم. صفحات ۶۳ تا ۷۱.

Denton, T.E. and Howll, W.M. , 1969. A technique for obtaining chromosomes from the scale epithelium of teleost fishes. Copeia. pp.392-393.

Drewry, G. , 1964. Chromosom number bull. Thx. Mem. Mus. pp.5-72

Heckman, J.R. ; Allendorf, F.W. ; Wright, G.E. , 1971. Trout leukocytes growth in oxygenated cultures. Science 173, pp.246-247.

Kang, V.S. and Park, E.H. , 1975. Leukocyte culture of the eel without logous serum. Jpn. J. Genet. No. 50, pp.159-161.

Kirpichnikov, V.S. , 1973. On Karyotype evolution in cyclostomate and pisces Ichthyologia. Vol. 5, No. 1, pp.55-77.

Lieppman, M. and Hubbs, C. , 1969. A karyological analysis of two cyprinid fishes *Notemigonus crysdeuscas* and *Notropis lutrensis*. Tex. Rep. Bid. Med. 27, pp.427-435.

Marian, T. and Krasznai, Z. , 1978. Karyologocal investigations on *Ctenopharyngodon idella* and *Aristichthys nobilis* and their cross-breeding. Aquacultura Hungarica (Szarvas). Vol. 1, pp.44-50.

Nowruzfashkhami, M.R. ; Pourkazemi, M. and Baradarannoveiri, S. , 2000. Chromosome study of Persian sturgeon *Acipenser persicus* B. Cytologia, Vol. 65, pp.197-202.

Ojima, Y. ; Hitosumachi, S. and Hayashi. M. , 1970. A blood culture method for fish

chromosomes. Japanese Journal of Genetics. No. 45, pp.161-162.

Reddy, P.V.G.K. , 1991. A comparative study of the karyo morphology of Grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and their hybrids. J. Aqua., No. 1, pp.31-41.

Vasileva, V.P. , 1978. The study of chromosome complexes in cyprinid fish and their hybrids. Genetik. Vol. 18, No. 4.