بررسی سیتوژنتیک ماهی سیم (*Abramis brama*) حوزه جنوبی دریای خزر

رضا نهاوندی [۱] ـ فرهاد امینی [۲] ـ سهراب رضوانی [۳]
R_Nahavandi@yahoo.com
۱ و ۳ ـ موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵
۲ ـ گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران صندوق پستی: ۶۴۵۳-۱۴۱۵۵
تاریخ دریافت : بهمن ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش : آبان ۱۳۸۰

چکیده

با توجه به اینکه مطالعات کروموزومی روی ماهی سیم (*Abramis brama*) در ایران انجام نپذیرفته است، لذا این بررسی به منظور تعیین تعداد کروموزومها و بازوهای کروموزومی و همچنین ارائه کاریوتایپ ماهی سیم حوزه جنوبی دریای خزر با تهیه گسترشهای کروموزومی به روش Squash، انجام شده است. تعداد کروموزومهای پلاک‌های متافازی حاصل از طریق له کردن بافتهای قسمت قدامی کلیه و آبشش در این ماهی ۲n = ۵۰ و تعداد بازوهای کروموزومی آن NF = ۸۲ تعیین گردید. کاریوتایپ تهیه شده از این ماهی شامل ۸ جفت کروموزوم متاسنتریک، ۸ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک و ۹ جفت کروموزوم آکروسنتریک بود.

لغات کلیدی: سیتوژنتیک، ماهی سیم، *Abramis brama*، دریای خزر، ایران

مقدمه

ماهی سیم از خانواده کپورماهیان Cyprinidae و از جنس *Abramis* می‌باشد. از این جنس دو گونه بنامهای *Abramis ballerus synets* (Linne) و *Abramis sapa* (Pallas) و دو زیر گونه *Abramis brama orientalis* و *Abramis sapa* (Begi-Beliacff) در حوضه دریای خزر شناسایی شده است که زیر گونه *Abramis brama orientalis* دارای ارزش اقتصادی می‌باشد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۳).

از جمله کاربردهای مختلف علم ژنتیک در تحقیقات شیلاتی، مطالعات کروموزومی ماهیان است که در جهان زمینه تحقیقاتی گسترده‌ای داشته و در بررسیهای تاکسونومیک، ژنتیک، سیتوتوکسیکولوژیک، اصلاح نژاد و فناوری زیستی کاربرد فراوانی دارد. بسیاری از ماهیانی که دارای شباهت مورفولوژیک هستند، ممکن است از نظر تعداد و انواع کروموزومها با یکدیگر تفاوت داشته باشند. ناهنجاریهای کروموزومی ناشی از آلودگیهای محیط زیست بعضاً می‌توانند از نسلی به نسل بعد به ارث برسند، لذا اطلاع از کاریوتایپ طبیعی گونه‌های آبزی می‌تواند در چنین مطالعاتی راهگشا باشد. وجود قرابت کاریولوژیک در بسیاری از دو رگه‌گیری‌های بین گونه‌ای و حتی بین جنسی می‌تواند بعنوان کلید موفقیت مطرح باشد که دانستن آن از طریق بررسیهای کروموزومی امکان‌پذیر است. یکی از روشهای بررسی موفقیت در پلی‌پلوئیدی و ماده‌زایی یا نرزایی در ماهیان، بررسیهای کاریولوژیک است. همچنین قبل از اعمال برخی روشها به منظور اصلاح نژاد ماهیان، داشتن اطلاعات کافی در مورد تعداد و نوع کروموزوم گونه‌های مورد نظر ضروری است. زیرا برای اثبات موفقیت یا عدم موفقیت، مطالعات کروموزومی ماهیان تولید شده سودمند است. تاکنون تحقیقات قابل توجهی در مورد سیتوژنتیک آبزیان در سایر کشورها صورت گرفته است و از روشهای مختلف برای بدست آوردن تعداد کروموزوم و انواع آن استفاده شده است. از حدود بیش از ۲۰۰۰۰ گونه که تاکنون شناخته شده است، تعداد کروموزومهای ۷۰۰ تا ۷۵۰ گونه ماهی تعیین گردیده است. (Gold & Powers, 1990).

مواد و روشها

ماهیان سیم مورد آزمایش در این بررسی از بین ماهیان تکثیر شده در مرکز تکثیر و پرورش شهید انصاری که در استخرهای این کارگاه نگهداری می‌شدند و همچنین ماهیان صید شده از تالاب انزلی انتخاب شدند. سپس این ماهیان به مخازن فایبرگلاس بخش تکثیر و پرورش و آکواریومهای موجود در بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری منتقل گردیدند.

برای تهیه گسترش‌های کروموزومی ماهی سیم، از روش له کردن بافت بصورت *In vivo* استفاده شده است. ابتدا محلول کلچی‌سین ۱ درصد (مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر به ازاء هر صد گرم وزن بدن) در صفاق و یا عضله ماهیان مزبور تزریق شد (Kinkhart, 1991).

بعد از گذشت ۳ تا ۴ ساعت و پس از نخاعی کردن ماهی مورد آزمایش، قسمت قدامی (بافت خونساز) کلیه و آبشش آنرا خارج نموده و پس از آنکه به وسیله یک قیچی کوچک قطعه قطعه گردید به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در یک شیشه ساعت حاوی محلول هیپوتونیک (محلول کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵ مولار) قرار داده شد (Bhamrah & Chaturvedi, 1997).

سپس بافتهای قسمت قدامی کلیه و آبشش در هاون له گردید و دوباره در محلول هیپوتونیک گذاشته شد. بعد از گذشت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه، محلول هیپوتونیک حاوی سوسپانسیون بافتی بدست آمده، به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی (محلول هیپوتونیک) جدا گردید و به رسوب باقیمانده چهار میلی‌لیتر محلول فیکساتیو کارنوی (سه قسمت متانول خالص + یک قسمت اسید استیک گلاسیال) تازه و سرد اضافه گردید. هدف از تثبیت سلولها، حفظ شکل سلولها با کمترین تغییر در ساختار و ترکیب آنها است. لازم به ذکر است که محلول کارنوی باید تازه مصرف شود زیرا محلول کهنه حاوی مقادیر بسیار زیادی متیل استات است که برای تثبیت مناسب نیست. از نظر تئوری، الکل سبب سخت شدن، انقباض و چروکیده شدن بافت می‌شود و برعکس اسید استیک روی بافتهای چروک خورده اثر کرده و باعث باز شدن چروک بافتها می‌گردد. عمل توأم الکل و اسید سبب مرگ سلولهای نمونه ضمن حفظ ساختار آنها می‌شود (برگ و سینگر، ۱۹۹۱).

پس از گذشت ۳۰ دقیقه، نمونه‌ها بمدت ۱۰ دقیقه با ۱۱۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و بعد از دور ریختن محلول فیکساتیو، دوباره به نمونه‌ها چهار میلی‌لیتر محلول فیکساتیو اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. صبح روز بعد، نمونه‌ها بوسیله پیپت پاستور بهم زده شدند و سوسپانسیون بافتی بدست آمده در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از ته نشین شدن ذرات درشت، ۳ تا ۴ قطره از این سوسپانسیون روی تعدادی لام گرم (۴۵ درجه سانتیگراد) چکانده شد. (Rivlin و همکاران، ۱۹۸۵).

سپس لامهای تهیه شده بعد از خشک شدن در دمای آزمایشگاه با محلول گیمسای ۲۰ تا ۴۰ درصد رنگ‌آمیزی شدند. بعد از ۲۰ تا ۳۰ دقیقه، لامهای رنگ‌آمیزی شده با آب مقطر شستشو داده شدند. لامها پس از خشک شدن مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفته و بوسیله میکروسکوپ دوربین‌دار (Labophot-2-AFX-DX مدل Nikon) از تعدادی از گسترشهای کروموزومی مناسب تهیه شده از ۳۰ عدد ماهی سیم، عکسبرداری گردید. بعلاوه عکسهای گرفته شده برای کاریو تایپینگ اسکن گردیده و با نرم‌افزار کامپیوتری Photoshop 5 مورد مطالعه قرار گرفتند.

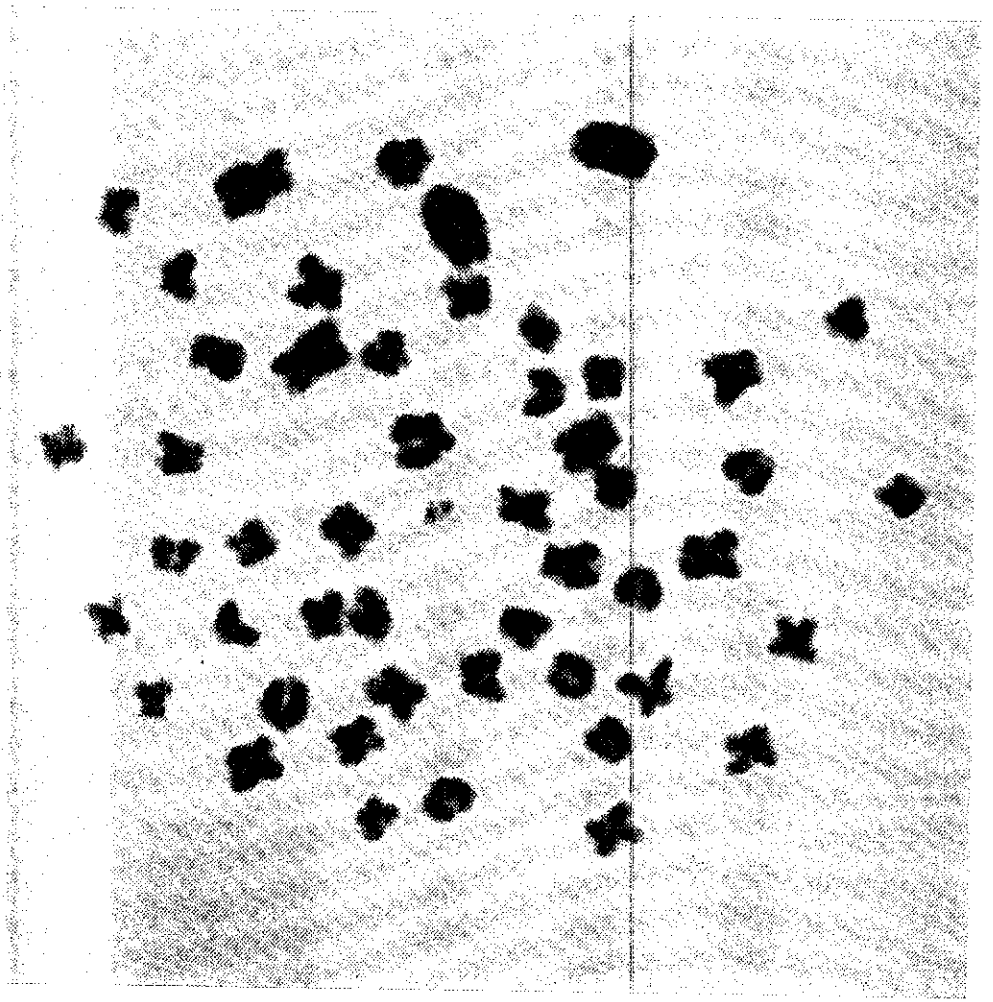
نتایج

نتایج بدست آمده از آزمایش‌های انجام شده با روش له‌کردن بافت کلیه و آبشش ماهی سیم در جدول ۱ آورده شده است.

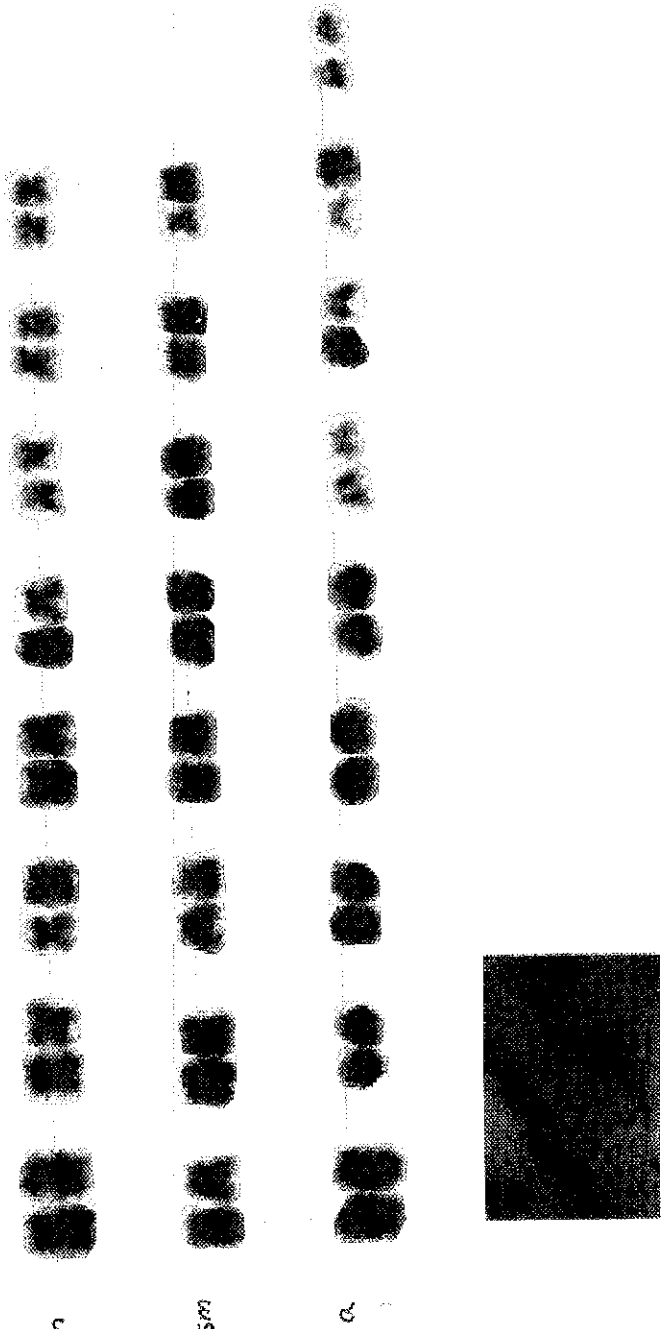
در تعدادی از پلاک‌های متافازی بدست آمده از طریق له‌کردن بافت قسمت قدامی کلیه و آبشش شکل کروموزومها واضح و انواع کروموزومها از نظر موقعیت سنترومر قابل تشخیص بودند. پس از بررسی گسترشهای کروموزومی ماهی سیم (شکل ۱)، تعداد کروموزومهای دیپلوئید ماهی سیم (*Abramis brama*) حوزه جنوبی دریای خزر ۲n = ۵۰ و تعداد بازوهای کروموزومی، با توجه بوجود ۸ جفت کروموزوم متاسنتریک، ۸ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک و ۹ جفت کروموزوم اکروسنتریک با استفاده از فرمول :

$$NF=[(M+SM)\times 2]+(A+ST+T)$$

NF = ۸۲ تعیین گردید (شکل ۲).



شکل ۱: گسترش کروموزومی ماهی سیم (*Abramis brama*)



شکل ۲: کاریوتایپ ماهی سیم (*Abramis brama*)

جدول ۱: نتایج بدست آمده از له‌کردن بافت کلیه و آبشش ماهی سیم

شماره آزمایش	مشخصات ماهی		تیمار کلچی‌سین (۰/۰۱ درصد)		مدت هیپولونیزاسیون	رنگ‌آمیزی باگیسما	
	طول (سانتیمتر)	وزن (گرم)	حجم تزریق شده (بازای ۱۰۰ گرم وزن‌بدن)	مدت زمان تأثیر (دقیقه)	(Kcl ۰/۰۷۵M) به دقیقه	غلظت (درصد)	زمان (دقیقه)
۱	۶/۳	۱۰	۰/۰۵	۲۱۰	۲۰	۲۰	۲۰
۲	۴/۳	۸	۰/۰۴	۲۱۰	۳۰	۳۰	۲۰
۳	۱۷/۶	۳۵	۰/۱۷	۲۳۰	۲۰	۲۵	۲۰
۴	۵/۹	۱۴	۰/۰۷	۲۲۰	۳۰	۲۰	۳۰
۵	۱۱/۲	۲۳	۰/۱۱	۲۱۰	۲۰	۲۰	۳۰
۶	۹/۱	۱۷	۰/۰۸	۲۱۰	۳۰	۳۰	۲۰
۷	۱۱/۶	۲۱	۰/۱	۲۳۰	۳۰	۲۵	۲۰
۸	۹/۵	۱۸	۰/۰۹	۲۱۰	۳۵	۲۵	۲۰
۹	۱۴/۲	۲۹	۰/۱۴	۲۱۰	۳۰	۳۰	۲۰
۱۰	۴/۶	۹	۰/۰۴	۲۰۰	۲۵	۲۰	۲۰
۱۱	۵/۹	۱۲	۰/۰۶	۲۲۰	۲۰	۲۰	۳۰
۱۲	۷/۸	۱۶	۰/۰۸	۲۱۰	۳۰	۲۵	۲۰
۱۳	۱۲/۹	۲۶	۰/۱۲	۲۳۰	۳۵	۳۰	۲۰

ادامه جدول ۱:

شماره آزمایش	مشخصات ماهی		تیمار کلچی‌سین (۰/۰۱ درصد)		مدت هیپولونیزاسیون	رنگ‌آمیزی باگیسما	
	طول (سانتیمتر)	وزن (گرم)	حجم تزریق شده (بازای ۱۰۰ گرم وزن‌بدن)	مدت زمان تأثیر (دقیقه)	(Kcl ۰/۰۷۵M) به دقیقه	غلظت (درصد)	زمان (دقیقه)
۱۴	۵/۲	۱۱	۰/۰۵	۲۱۰	۲۰	۲۰	۳۰
۱۵	۵/۷	۱۳	۰/۰۶	۲۱۰	۳۰	۲۰	۳۰
۱۶	۹/۱	۱۹	۰/۰۹	۲۱۰	۲۰	۳۰	۲۰
۱۷	۱۲/۶	۲۷	۰/۱۳	۲۳۰	۲۰	۳۰	۲۰
۱۸	۶/۹	۱۵	۰/۰۷	۲۲۰	۲۵	۳۰	۲۰
۱۹	۹/۳	۱۸	۰/۰۹	۲۱۰	۳۰	۳۰	۲۰
۲۰	۱۲/۹	۲۸	۰/۱۳	۲۱۰	۲۰	۲۵	۳۰
۲۱	۱۰/۸	۲۳	۰/۱۱	۲۱۰	۲۰	۳۰	۲۰
۲۲	۱۷/۳	۳۹	۰/۱۹	۲۰۰	۲۵	۳۰	۲۰
۲۳	۱۵/۲	۳۶	۰/۱۸	۲۲۰	۲۰	۳۵	۲۰
۲۴	۸/۹	۲۰	۰/۱	۲۱۰	۲۰	۲۵	۲۰
۲۵	۱۱/۹	۲۵	۰/۱۲	۲۳۵	۳۰	۲۰	۳۰
۲۶	۱۳/۸	۳۱	۰/۱۵	۲۲۰	۳۵	۲۵	۳۰
۲۷	۱۰/۲	۲۲	۰/۱۱	۲۳۵	۳۰	۲۰	۳۰
۲۸	۲/۹	۵	۰/۰۲	۲۳۰	۳۰	۳۵	۲۰
۲۹	۱۳/۸	۳۰	۰/۱۵	۲۴۵	۲۰	۳۰	۲۰
۳۰	۱۰/۹	۲۴	۰/۱۲	۲۳۰	۴۰	۲۰	۳۰

همچنین موارد زیر در بهینه سازی روش له‌کردن بافت در مورد ماهی سیم بدست آمد :

۱ـ بهترین مدت زمان هیپوتونیزاسیون سلولها قبل از له‌کردن و بعد از له‌کردن بافت قسمت قدامی کلیه و آبشش ۱۰ دقیقه بود.

۲ـ فاصله زمانی ۲۱۰ دقیقه بین تزریق کلچی‌سین و خارج کردن بافت قسمت قدامی کلیه و آبشش از بدن ماهی و ادامه آزمایشها مناسب بود.

۳ـ به هنگام استفاده از محلول کارنوی سرد و تازه، در نظر گرفتن زمان ۳۰ دقیقه برای فیکس کردن نمونه نتایج مثبتی دربر داشت.

۴ـ بهترین غلظت گیمسا و مدت زمان لازم برای رنگ‌آمیزی گسترشهای تهیه شده به ترتیب ۳۰ درصد و به مدت ۳۰ دقیقه بود.

۵ـ تفاوت قابل ملاحظه‌ای در کیفیت گسترشهایی که بلافاصله تهیه گردید با آنهایی که ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند.

۶ـ خرد کردن بافت قسمت قدامی کلیه و آبشش در داخل محلول هیپوتونیک توسط قیچی قبل از له‌کردن با هاون هموژنیزه کننده و بهم خوردن دائم سوسپانسیون بافتی در داخل محلول هیپوتونیک، در بدست آوردن گسترشهای کروموزومی مناسب و همچنین گرفتن نتایج مثبت مؤثر بود.

بحث

اصول و روش مطالعات کروموزومی در تمام موجودات زنده مشابه است. متوقف کردن سلولها در حال تقسیم در مرحلهٔ متافاز، تیمار هیپوتونیک، تثبیت نمونه‌ها، تهیه لام و رنگ‌آمیزی از مراحلی هستند که انجام گرفت. در آزمایشهای انجام گرفته بر روی ماهیان سیم مشخص گردید که در روش تزریقی کلچی‌سین به بچه ماهیان سیم به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر کلچی‌سین ۰/۰۱ درصد به ازاء هر ۱۰۰ گرم وزن بدن بچه ماهی بمدت سه ساعت، همچنین استفاده از محلول هیپوتونیک کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵ مولار و استفاده از محلول تثبیت کننده کارنوی، نتایج خوبی حاصل شد که در بررسی میکروسکوپی لامها، تعداد کروموزومهای ماهی سیم ۵۰ = 2n بدست آمد که این تعداد

با نتایجی که Hafez و همکاران، ۱۹۷۸ ؛ Arefjev & Karnaucov، ۱۹۸۹ و Jankon و همکاران، ۱۹۹۷ بدست آوردند مطابقت دارد.

در ضمن بافت‌های آبشش و قسمت قدامی کلیه را از سایر بافتهای میتوزی جامد (مانند طحال) جهت تهیهٔ گسترش کروموزومی مناسب‌تر بودند. بطوریکه بهینه‌سازی سایر بافتها جهت تیمار هیپوتونیک بسیار مشکل بود و در اکثر مواقع، کروموزومها در پلیت‌های کروموزومی از همدیگر خوب جدا نمی‌شدند و شمارش از روی آنها تقریباً امکان‌پذیر نبود.

تاکنون تعداد کروموزومهای ۴۳۵ گونه و زیرگونه از کپور ماهیان مشخص شده است که شامل الگوهای ۲n = ۵۰، تتراپلوئیدی (۲n = ۱۰۰)، هگزاپلوئیدی (۲n = ۱۵۰) و اکتاپلوئیدی (۲n = ۲۰۰) می‌باشد. باید دانست که تعداد کروموزومهای ۲۸۲ گونه، ۲n = ۵۰ می‌باشد که ماهی سیم حوزه جنوبی دریای خزر در دسته ۵۰ کروموزومی قرار می‌گیرد. شایان ذکر است که تشخیص کروموزومهای همولوگ در ماهیان بعلت کوچکی اندازه آنها و گاهی بدلیل فشردگی زیاد بازوهای کروموزومی، دشوار و گاهی غیرممکن است. برای غلبه براین مشکل می‌توان به روشهای نواربندی کروموزومی (Banding) مبادرت نمود. انجام روشهای نواربندی برای مطالعات کروموزومی آبزیان، در صورت مهیا شدن امکانات، باعث شناسایی دقیق‌تر کروموزومها می‌گردد. چون بدون الگوهای نواربندی در بازوهای کروموزومی، تشخیص مشابهت‌های کروموزومی فقط براساس اندازه کروموزوم و موقعیت سنترومر خواهد بود. اکنون ذکر این نکته ضروری است که بررسی و مطالعات سیتوژنتیک در ماهیان، بطور عمده به تعیین تعداد و نوع کروموزومها محدود می‌گردد که این اطلاعات می‌تواند در مطالعات دورگه‌گیری بسیار مفید واقع شود. البته علت اینکه اطلاعات کمی در زمینه سیتوژنتیک ماهیان وجود دارد، این است که علاوه بر مشکل زیاد بودن تعداد و اندازهٔ خیلی کوچک کروموزومها (در بعضی گونه‌ها)، محدودیتهایی نیز در روشهای موجود دارد. در ضمن تجزیه و تحلیل کروموزومها می‌تواند به تشخیص تفریقی یافته‌های طبیعی و بدخیم نیز کمک کند، چون تعداد کروموزومهای یافته‌های طبیعی، ثابت است (بجز مواردی در موش که تعداد کروموزومها در یافته‌های طبیعی پس از کشت ممکن است بسرعت تغییر یابد).

باید توجه داشت که به هنگام تزریق مواد میتوژن در ناحیه صفاقی ماهیان، باید سوزن سرنگ

بطور آرام از پوست ناحیه شکم رد کرده و بعد یک مکش انجام داده تا مطمئن شویم که سوزن وارد لوله گوارش نشده باشد. اما در روش تزریقی عضلانی، باید تزریقی در عضلات نیمه بالایی بدن یا زیر باله پشتی در بالای خط جانبی صورت گیرد. البته بهتر است که نیمی از محلول در یک سمت و نیمی دیگر در سمت دیگر بدن ماهی تزریق شود.

تشکر و قدردانی

از مؤسسه تحقیقات شیلات ایران که این پروژه با حمایت مالی آن انجام پذیرفت، تشکر بعمل می‌آید. همچنین از آقای دکتر محمد پورکاظمی مشاور این پروژه، کارکنان محترم انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری و استاد ارجمند جناب آقای دکتر پورغلام که صمیمانه در اجرای هر چه بهتر این پروژه یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

منابع

برگ، پ. و سینگر،م. ، ۱۹۹۱. نگرشی بر ژن. ترجمه: ع. محمدی و ر. پیله‌چیان لنگرودی ، ۱۳۷۷. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی. تهران. ۳۹۶ صفحه.

وثوقی، غ. و مستجیر، ب. ، ۱۳۷۳. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۱۷ صفحه.

Arefjev, V.A. and Karnavchov , 1989. Species specificity of electrophoretic patterns of haemoglobin and uniformity of karyotypes in fishes, genus *Abramis* (Pisces, Cyprinidae). Biochem. Syst. Ecol. Vol. 17, pp.479-488.

Bhamrah, H.S and Chaturvedi, C.M., 1997. A textbook of genetics. Armol publication, PVT LTD, New Delhi. 212 P.

Gold, J.R and Powers, P.K., 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. J. Fish Biol. Vol. 37, pp.563-575.

Hafez, R. ; Labat, R. and Quiller, R. , 1978. Etude cytogenetique chez quelques

especes de cyprinides de la region Midi-Pyrences. Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse., Vol. 114, pp.122-159.

Jankon, M. ; Kucharczyk, D. ; Woznicki, P. and kotik, A. , 1997. Chromosome study of *Abramis brama* LL.) from lake kortowskie, Poland. Cytobios. Vol. 90, pp.175-179.

Kinkhart, M. , 1991. A brief comparison of methods for preparing fish chromosomes: An overview. Cytobios. Vol. 67, pp.193-208.

Rivlin, K. ; Rachlin, J.W. and Dale, G. , 1985. A simple method for the preparation of fish chromosomes applicable to field work, teaching and banding. J. Fish Biol. Vol. 26, pp.267-272.