تهیه کاریوتایپ ماهی کپور علفخوار
(*Ctenopharyngodon idella*)

محمدرضا نوروز فشخامی[۱]، محمد پورکاظمی[۲] و محمد رضا کلباسی[۳]

nowruzfashkhami@yahoo.com

۱ و ۲ ـ انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت صندوق پستی: ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵

۳ ـ دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، نور صندوق پستی: ۳۵۶-۴۶۴۱۴

تاریخ دریافت : مرداد ۱۳۸۰　　تاریخ پذیرش : شهریور ۱۳۸۱

لغات کلیدی: ماهی کپور علفخوار، *Ctenopharyngodon idella*، کاریوتایپ، گلبولهای سفید خون

در این بررسی کاریوتایپ ماهی کپورعلفخوار (آمور) *Ctenopharyngodon idella* بمنظور تعیین تعداد و نوع کروموزومهای این ماهی با استفاده از روش کشت گلبولهای سفید خون تهیه گردید.

با شمارش کروموزومها در ۴۷ پلاک متافازی بدست آمده از ۳ عدد ماهی آمور، تعداد کروموزومهای این ماهی ۲n=۴۸ و تعداد بازوهای کروموزومی آن NF=۸۴ تعیین گردید. در کاریوتایپ تهیه شده از این ماهی ۱۰ جفت کروموزوم متاسنتریک، ۸ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک و ۶ جفت کروموزوم ساب‌تلوسنتریک (۱۰m+۸sm+۶st) وجود دارد. بزرگترین کروموزوم در ماهی آمور یک جفت کروموزوم ساب متاسنتریک می‌باشد.

ماهی کپور علفخوار متعلق به خانواده کپورماهیان Cyprinidae و تنها گونه جنس *Ctenopharyngodon* است که بومی رودخانه‌های بزرگ آسیا از جمله رودخانه آمور در روسیه تا رودخانه West در چین می‌باشد (Guillory & Gasaway, 1978).

این ماهی در حال حاضر در بسیاری از مناطق جهان نظیر برونئی، چین، اروپای شرقی،

انگلستان، هندوستان، اندونزی، فلسطین، ژاپن، مالزی، فیلیپین، سنگاپور، تایلند، ویتنام و آمریکا زندگی می‌کند (Stevenson, 1965 ; Greenfeild, 1973). این ماهی در سال ۱۳۴۶ بمنظور کنترل گیاهان آبزی تالاب انزلی از شوروی سابق خریداری و در این تالاب رهاسازی شد.

ماهی کپور علفخوار بدلیل رشد سریع و توانایی کنترل رشد گیاهان آبزی طی چهار دهه گذشته، در سراسر جهان مورد توجه قرار گرفته است. مسئله اصلی در محدودیت استفاده از این ماهی جهت کنترل بیولوژیک گیاهان آبزی، تولید مثل ناخواسته و کنترل نشده این ماهی است. لذا در بسیاری از کشورها برای جلوگیری از چنین تولید مثلی اغلب از کپور علفخوار تریپلوئید و دو رگه های تریپلوئید عقیم این ماهی با سایر گونه‌ها استفاده می شود.

با توجه به اینکه انجام هر گونه دستکاری کروموزومی از جمله ماده‌زایی (گامتوژنز)، دو رگه‌گیری، تولید تریپلوئیدی (3n) و ... در ماهیان مستلزم دانستن تعداد و نوع کروموزومهای (کاریوتایپ) والدین می‌باشد و از طرفی مطالعه کروموزومی این ماهی در کشورمان انجام نشده و نتایج بدست آمده توسط سایر محققین در این ارتباط متفاوت می‌باشد، لذا این تحقیق بمنظور تعیین تعداد و نوع کروموزومهای ماهی آمور صورت گرفته که نتایج آن می‌تواند برای بررسی نتایج پروژه‌های "دو رگه‌گیری بین ماهی سفید و ماهی آمور" و "القای تریپلوئیدی در ماهی آمور" مورد استفاده قرار گیرد.

آزمایشها روی ماهیان ۲۰ تا ۴۰ گرمی انجام گرفت. ماهیان مورد آزمایش در وان فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری نگهداری شدند و این ماهیان در دوران آزمایش بخوبی هوادهی و تغذیه گردیدند.

کشت گلبولهای سفید خون ماهیان مورد آزمایش از روش (Hartley & Horne, 1983) و (Al-Sabti, 1985) با کمی تغییر انجام شد، که مراحل کاری انجام شده در این رابطه بشرح ذیل می‌باشد:

ابتدا ماهیان مورد آزمایش با ماده MS 222 (۱۰۰ppm) بیهوش شدند و بوسیله یک سرنگ ۵ میلی‌لیتری حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر هپارین سدیم، مقدار ۲ میلی‌لیتر خون از رگ ساقه دمی گرفته شد. سپس سرنگ حاوی خون و ماده ضد انعقاد را چند بار به آرامی بهم زده و در آزمایشگاه قرار داده شدند (سر سرنگ بطرف بالا). بعد از جدا شدن مقدار کافی پلاسما، تعداد ۱۰ قطره پلاسمای

حاوی گلبولهای سفید خون و یا ۲ تا ۴ قطره خون کامل به شیشه‌های کوچک حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت با ترکیب ۷/۵ میلی‌لیتر محیط کشت M 199 (Sigma)، ۲/۵ میلی‌لیتر سرم جنین گوساله (دانشکده دامپزشکی تهران)، ۰/۱ میلی‌لیتر فیتوهماگلوتی‌نین (PHA) (Sigma) و یا ماده لیپوپلی ساکارید (LPS) استخراج شده از باکتری *E. coli* (Sigma)، استرپتومایسین $100 \mu g\ ml^{-1}$ (Sigma)، پنی‌سیلین پتاسیم G $100 IU\ ml^{-1}$ (شرکت رازی) اضافه گردید.

بعد از ۵ روز (۱۲۰ ساعت) انکوباسیون در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد، به نمونه‌ها محلول کلشی‌سین ($0/5 \mu g\ ml^{-1}$) افزوده شد. پس از گذشت ۵ ساعت نمونه‌ها بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی را دور ریخته و به رسوب باقیمانده مقدار ۴ میلی‌لیتر محلول هیپوتونیک کلریدپتاسیم ۰/۰۷۵ مول اضافه شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه نمونه‌ها سانتریفوژ شدند. مایع رویی را دور ریخته و به رسوب باقیمانده مقدار ۴ میلی‌لیتر محلول فیکساتیو تازه و سرد شده کارنوی (۳ قسمت متانول خالص و ۱ قسمت اسیداستیک خالص) اضافه گردید و نمونه‌ها دوباره سانتریفوژ شدند. عمل فیکس‌کردن سلولها بار دیگر تکرار شد و نمونه‌ها سانتریفوژ شدند. ۳ میلی‌لیتر از محلول فیکساتیو را دور ریخته، رسوب و ۱ میلی‌لیتر محلول فیکساتیو باقیمانده بوسیله پیپت پاستور چند بار بهم زده شد تا ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی بدست آید. ۳ تا ۴ قطره از سوسپانسیون سلولی بدست آمده بر روی تعدادی لام تمیز چکانده شد. لامهای تهیه شده را در دمای آزمایشگاه خشک نموده، سپس با محلول گیمسای ۱۰ درصد بمدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. بعد از سپری شدن مدت زمان رنگ‌آمیزی، لامهای رنگ آمیزی شده را با آب مقطر شستشو داده و در محیط آزمایشگاه خشک شدند. بعد از خشک شدن لامها، آنها را مورد مطالعه میکروسکوپی قرار داده و از گسترشهای کروموزومی مناسب بوسیله یک دستگاه میکروسکوپ دوربین‌دار (Nikon، مدل Labophot 2) عکسهایی تهیه گردید. بهترین عکس برای تهیه کاریوتیپ مورد استفاده قرار گرفت. سانتریفوژ نمودن در تمامی مراحل آزمایش در ۱۳۰۰rpm و مدت زمان ۸ دقیقه انجام شد.

برای تعیین تعداد کروموزومها، ۴۷ پلاک متافازی بدست آمده از ۳ عدد ماهی مورد آزمایش بررسی شد و تعداد کروموزومها در هر یک از پلاکهای متافازی شمارش گردیدند (جدول ۱).

جدول ۱: فراوانی کروموزوم‌ها در پلاک‌های متافازی بررسی شده

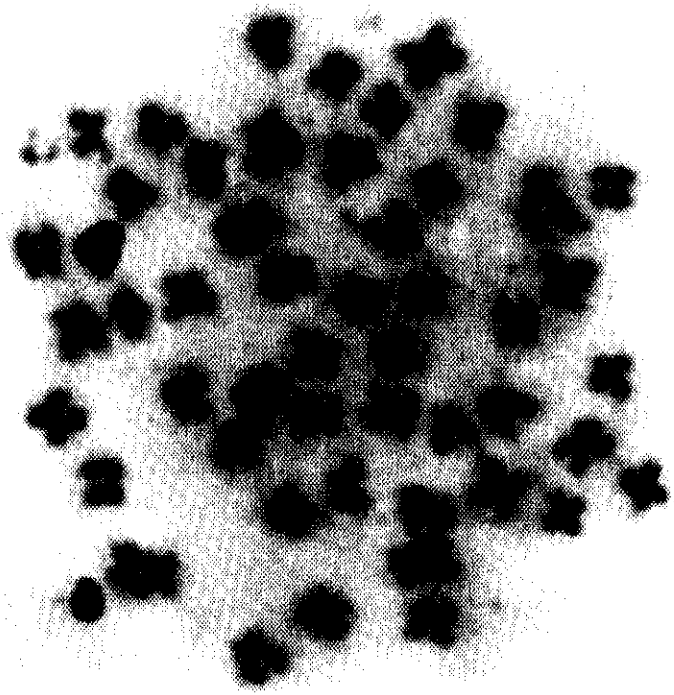
تعدادکروموزومهادرهرپلاک متافازی	۴۸	۴۷	۴۶	۴۵
تعداپلاکهای متافازی	۳۹	۴	۳	۱

تعداد کروموزومهای ماهی آمور با توجه به جدول ۱ و با استفاده از فرمول محاسبه میانگین ۲n= ۴۸ تعیین گردید (شکل ۱). در کاریوتایپ تهیه شده از این ماهی، تعداد ۱۰ جفت کروموزوم متاسنتریک، ۸ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک، ۶ جفت کروموزوم ساب تلوسنتریک (۱۰m+۸sm+۶st) وجود دارد (شکل ۲). با توجه به کاریوتایپ تهیه شده، تعداد بازوهای کروموزومی این ماهی NF=۸۴ تعیین گردید. بزرگترین کروموزوم در کاریوتایپ تهیه شده از این ماهی یک جفت کروموزوم ساب متاسنتریک می‌باشد (با فلش مشخص شده است).

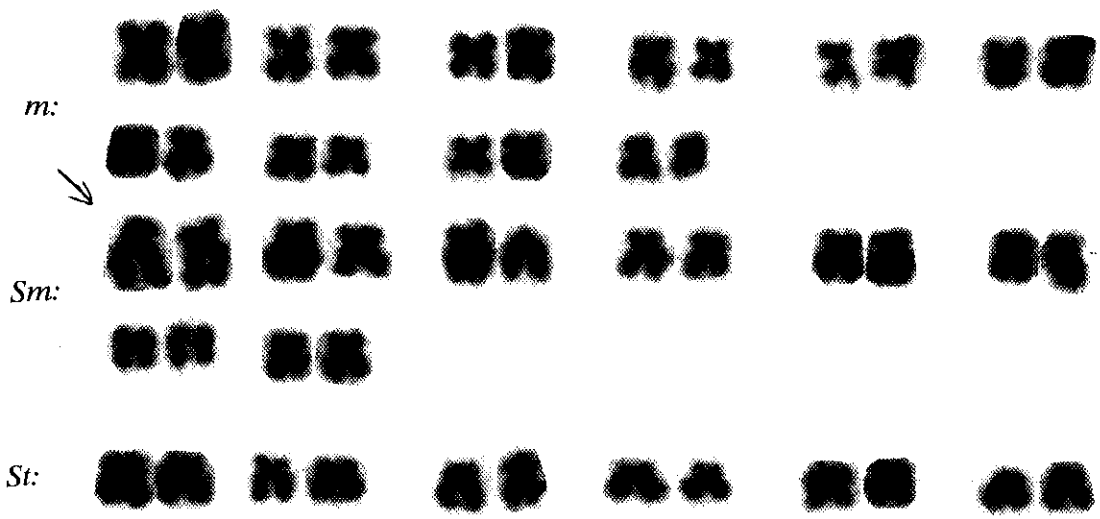
طبق نتایج بدست آمده کشت پلاسما در کسب نتیجه مثبت مؤثرتر از کشت خون کامل بود و هر چه مقدار پلاسمای کشت داده شده بیشتر بود نتیجه بهتری بدنبال داشت. همچنین اثر میتوژنی ماده LPS در مورد لنفوسیتهای ماهیان مورد آزمایش بیش از ماده فیتوهماگلوتی‌نین (PHA) بود. چنین وضعیتی در مورد سایر ماهیان استخوانی نیز مشاهده گردیده است. با توجه به اینکه ماده LPS میتوژن لنفوسیتهای B و ماده فیتوهماگلوتی‌نین میتوژن لنفوسیتهای T می‌باشد (Hartley & Horne, 1983) بنابراین شاید بتوان نتیجه گرفت که میزان لنفوسیتهای B در ماهیان مورد آزمایش بیش از لنفوسیتهای T بوده است.

نتایج کسب شده در این بررسی در ارتباط با تعداد کروموزومهای ماهی‌آمور (۲n=۴۸) با نتایج بدست آمده توسط (Nagusa, 1960)، (Ojima *et al.*, 1972)، (Kirpichnikov, 1973)، (Manna & Khuda-Bukhsh, 1977)، (Lin, 1980)، (Marian & Krasznai, 1979)، (Beck *et al.*, 1980) و (Reddy, 1991) مطابقت دارد.

کاریوتایپ تهیه شده از ماهی آمور در این بررسی (۱۰m+۸sm+۶st) با نتایج (Beck *et al.*, 1980) (۹m+۱۵sm) تفاوت کامل دارد. Lin در سال ۱۹۸۰ وجود ۸ جفت کروموزوم متاسنتریک و ۱۶ جفت کروموزوم ساب متاسنتریک (۸m+۱۶sm) را در ماهی آمور گزارش نمود.



شکل ۱: گسترش کروموزومی ماهی کپور علفخوار ۲n = ۴۸ (×۲۰۰۰)



شکل ۲: کاریوتایپ ماهی کپور علفخوار

نتایج بدست آمده در این بررسی با نتایج کسب شده توسط (Marian & Krasznai, 1979) (۱۰m+۸sm+۶a) مطابقت دارد. تنها تفاوت جزئی مربوط به وجود ۶ جفت کروموزوم اکروسنتریک در ماهی آمور توسط این افراد است. در ماهیان آمور مورد مطالعه در این تحقیق ۶ جفت کروموزوم ساب‌تلوسنتریک (st) وجود داشت و کروموزوم اکروسنتریک مشاهده نگردید که علت آن می‌تواند عدم تشخیص و تفکیک بازوهای بسیار ریز در کروموزومهای ساب‌تلوسنتریک توسط این افراد باشد. (Manna & Khuda-bukhsh, 1977) نیز وجود کروموزومهای ساب‌تلوسنتریک را در ماهی آمور گزارش نمودند.

متفاوت بودن کاریوتایپ بدست آمده توسط محققین مربوط به تفاوت در تشخیص انواع کروموزومها توسط این افراد می‌باشد که ممکنست ناشی از تأثیر غلظت کلشی‌سین بر کروموزومها باشد.

غلظت زیاد و طولانی بودن مدت تأثیر کلشی‌سین باعث تراکم زیاد و کوچک شدن کروموزومها و کوتاه شدن بازوهای کروموزومی می‌گردد (Beck *et al.*, 1980)، که این مسئله تشخیص بازوهای کوتاه کروموزومهای ساب تلوسنتریک را مشکل می‌سازد در نتیجه اشتباهاتی در تفکیک انواع کروموزومها بوجود می‌آید که در نهایت بصورت تفاوت در کاریوتایپ‌های بدست آمده توسط افراد مختلف نمایان می‌گردد.

منابع

Al-Sabti, K. , 1985. Chromosomal studies by blood leukocyte culture technique on three salmonids from Yugoslavian waters. J. Fish Biol., Vol. 26, pp.5-12.

Beck, M.L. ; Bigger, C.J. and Dupree, H.K. , 1980. Karyological analysis of *Ctenopharyngodon idella*, *Aristichthys nobilis*, and their F1 Hybrid. Transact. Amer. Fish. Soc. Vol. 109, pp.433-438.

Greenfield, D.W. , 1973. An evaluation of the advisability of the release of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* into the natural waters of the United States. Trans. Am. Fish. Soc. Vol. 107, pp.105-112.

Guillory, V. and Gasaway, R.D. , 1978. Zoogeography of the grass carp in the United States. Trans. Am. Fish. Soc. Vol. 107, pp.105-12.

Hartly, S.E. and Horne, M.T. , 1983. A method for obtaining miotic figures from blood leucocyte cultures of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish Biol., Vol. 22, pp.77-82.

Kirpichnikov, V.S. , 1973. On karyotype evolution in Cyclostoma and Pisces. Ichthyologia, Vol. 5, No. 1, pp.55-77.

Lin, L. , 1980. On karyotype of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Acta. Zool. Sin., Vol. 26, No. 2, pp.126-131.

Manna, G. K. and Khuda-Bukhsh, A.R. , 1977. Karyology of cyprinid fishes and cytological evolution of the family. *Nucleus*, Vol. 20, No. 1&2, pp.119-127.

Marian, T. and Krasznai, Z. , 1979. Comparative karyological studies on Chinese carps. Aquaculture, Vol. 18, pp.325-336.

Nagusa, S. , 1960. A comparative study of the chromosomes in fishes with particular consideration on taxonomy and evolution, Memories of the Hoyogo Univ. Agric., Vol. 3, pp.1-62.

Ojima, Y. ; Hayashi, M. and Veno, K. , 1972. Cytogenetic studies in vertebrates. X. karyotype DNA studies in 15 species of Japanese Cyprinidae. Japan. J. Genetics, Vol. 47, No. 6, pp.431-440.

Reddy, P.V.G.K. , 1991. A comparative study of the karyomorphology of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* and their F1. J. Aqua. Vol. 1, pp.31-41.

Stevenson, J.H. , 1965. Observation on grass carp in Arkansas. Progre Fish Cult. Vol. 27, pp.203-206.