محمدرضا نوروز فشخامی
مؤسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران
مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان (بندر انزلی)

بررسی کاریوتیپ ماهی *Rutilus frisii Kutum (Kamendky)*

خلاصه :

کاریوتیپ ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* متعلق به حوزه جنوب غربی دریای خزر با استفاده از روش کشت گلبولهای سفید خون تهیه شد. تعداد کروموزومهای پلاک متافازی این ماهی $2n = ۵۰$ و تعداد بازوهای کروموزومی آن $NF = ۸۶$ تعیین گردید. این کاریوتیپ شامل ۸ جفت کروموزوم متاسانتریک *(m)*، ۱۰ جفت کروموزوم ساب متاسانتریک *(sm)* تا اکروسانتریک *(a)* و ۷ جفت کروموزوم ساب تلوسانتریک می‌باشد ($۸ m + ۱۰ sm + ۷ st^a$). بزرگترین کروموزوم در این زیرگونه یک کروموزوم ساب تلوسانتریک می‌باشد.

مقدمه :

جنس *Rutilus (Ratinesque , 1820)* احتمالاً شامل ده گونه و زیر گونه‌هایی است که در منطقه اروپا و آسیا بخصوص منطقه پال آرکتیک زندگی می‌کنند *(Banarescu, 1973)*. گونه *Rutilus rutilus* در منطقه اروپا و سیبری پخش شده و گونه *R. frisii* در منطقه دانوب و حوزه دریای مازندران زندگی می‌کند.[۱]

زیرگونه *R.frisii kutum* عمدتاً در سواحل جنوبی دریای خزر زندگی می‌کند و علاوه بر رودخانه‌های کشورمان تعداد کمی هم در رودخانه ولگا تخم‌ریزی می‌کنند.

۱- دکتر محمود خسروشاهی استاد مشاور پروژه.

کاریوتیپ گونه *Rutilus rutilus* که گسترش وسیعی دارد توسط محققین کشورهای مختلف، سوئد *(Nygreen et al. 1975)*، آلمان *(Lieder 1954, Wolf et al. 1969)*، مجارستان *(Marian - Kraszanai & Kaszanai. 1978)*، فرانسه *(Hafez et al. 1978)*، یوگسلاوی *(Berberovic & So fradzija. 1972; Vusjoevic & al. 1983)*، روسیه *(Andodin & Zukinskij. 1974; Vasliev. 1985)* بخوبی مطالعه شده است همچنین کاریوتیپ ماهی سفید متعلق به رودخانه ولگا *(Vasliey. 1985)*، کاریوتیپ *Rutilus* های بومی جزیره ایبریک (اسپانیا - پرتقال) شامل گونه‌های *R. alburnoides*، *R. macrolepidtus*، *R. arcasii* نیز بررسی شده‌اند *(Collares - Pereira, M.J. 1985 b)*. در تمامی گونه‌های متعلق به جنس *Rutilus* که بررسی شده‌اند تعداد کروموزومی $2n = 50$ به چشم می‌خورد ولی از نقطه‌نظر مرفولوزی کروموزومها، تفاوتهایی در گونه‌های مختلف به چشم می‌خورد. تفاوتهای مشاهده شده می‌تواند به تکنیکهای تهیه کاریوتیپ، کشت یاخته‌ها و تغییرات داخل گونه‌ای و بین گونه‌ای مربوط باشد. البته موارد آنیوپلوئیدی در گونه *R.rutilus* مشاهده شده است *(Hafez, R;Labat, Quillier, R. 1978 b)*. در این بررسی که اولین پژوهش در زمینه تهیه کاریوتیپ ماهی سفید متعلق به حوزه جنوبی دریای خزر می‌باشد سعی شده است تا ضمن تعریف و مشخص کردن تکنیکهای کشت لنفوسیتهای خون ماهی سفید، تعداد کروموزومها و کاریوتیپ این ماهی مشخص گردد.

کشت بافت خون از زمانیکه *(Nowell, 1960)* پی برد ماده فیتو هماگلوتینین *(PHA)* که یک لکتین گیاهی است تقسیمات میتوزی را در لنفوسیتهای انسانی افزایش می‌دهد ابتدا در مورد بافت خون انسان رایج شد و سپس بتدریج در مورد سایر موجودات از جمله ماهیان بکار گرفته شده است.

در تکنیک کشت گلبولهای سفید خون فیتو هماگلوتینین *(PHA)* و سرم گوساله جنینی *(FCS)*، لیپوپلی ساکاریدهای *(LPS)* استخراج شده از باکتری *E. coli* برای تحریک

تقسیمات میتوزی لنفوسیتها مورد استفاده قرار می‌گیرند و کسب موفقیت در کشت دادن گلبولهای سفید خون وابستگی کامل به نوع و تازگی این مواد دارد (Hartley,S.E و Horne M.T. 1985; Blaxhll. P.C. 1983a).

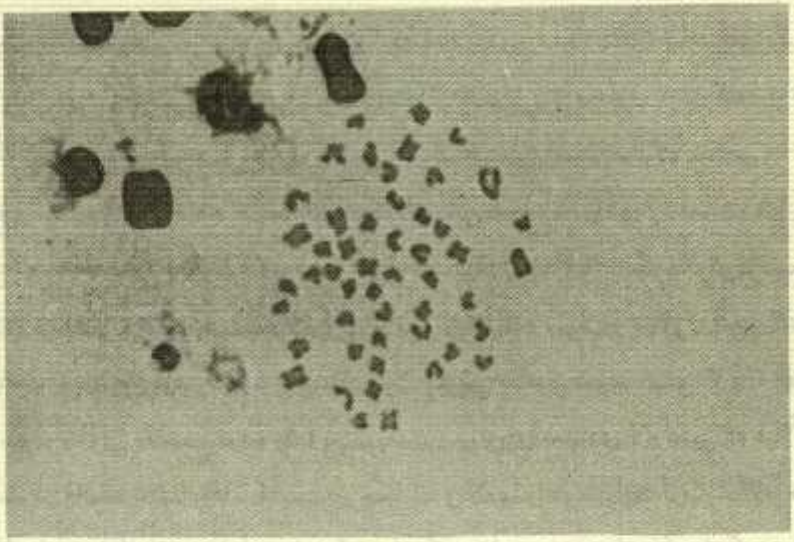
مواد و روش کار:

ماهیان مورد آزمایش ما از بین ماهیان صید شده توسط تعاونیهای صیادی منطقه غرب گیلان انتخاب شد و این ماهیان بطور همزمان در حوضچه‌های ایستگاه تحقیقاتی ساحل غازیان و در حوضچه‌های فایبرگلاس منتقل شده به آزمایشگاه سیتوژنتیک گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تبریز نگهداری شدند. اندازه ماهیان مورد بررسی مابین ۳۰ تا ۴۰ سانتیمتر متغیر بود.

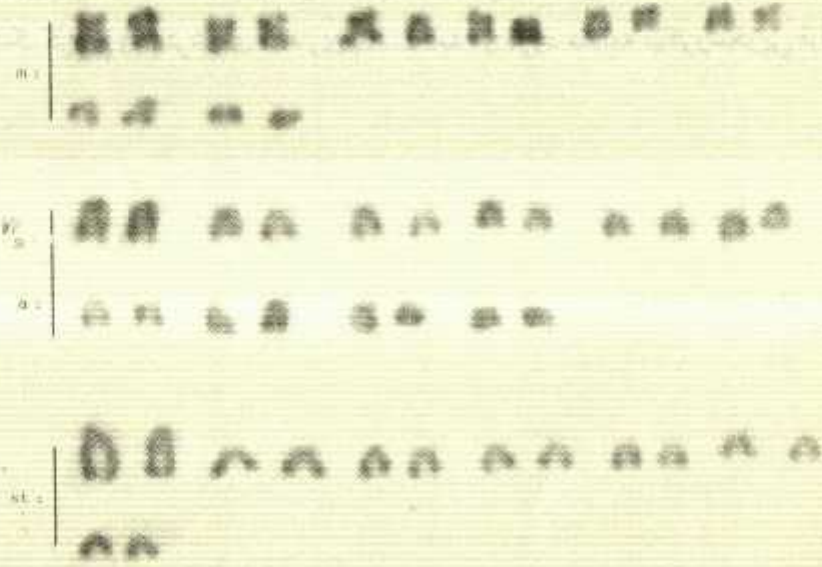
ماهیان مورد آزمایش را قبل از خونگیری با ماده MS 222 بیهوش کرده (۰/۵ گرم در ۲۰ لیتر آب) سپس بوسیله یک سرنگ ۵ میلی‌لیتری حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر هپارین سدیم مقدار از ۱ تا ۲ میلی‌لیتر خون از رگ ساقه دمی تهیه کردیم. در آزمایشات ما خون کامل و پلاسمای حاوی گلبولهای سفید خون کشت داده شد که در حالت اول ۵ قطره خون کامل و در حالت دوم ۱۰ قطره پلاسمای حاوی گلبولهای سفید خون را در محیطهای کشت کیت کروموزومی (Difco) و یا یکی از محیطهای کشت پایه MEM ، M 199 و RPMI 1640 (۷ml محیط کشت پایه + ۲/۵ml سرم گوساله جنینی + ۰/۱ mj ماده P - PHA + ۰/۱ml پنی سیلین پتاسیم G ۱۰۰۰۰ iu / ml + ۰/۱ ml استرپتومایسین ۱۰۰۰۰ ug / ml) ریختیم.

پس از پنج روز انکوباسیون در دمای بیست درجه سانتیگراد به هر یک از محیطهای کشت حاوی گلبولهای سفید خون مقدار یک میلی‌لیتر کلشی سین difco (حاوی ۰/۰۰۰۱ مول کلشی سین) و یا یک میلی‌لیتر کلشی سین Sigma (۰/۰۰۵ mg / m) اضافه نمودیم. پس از چهار ساعت محیطهای کشت را ابتدا بمدت ده دقیقه در دور ۱۲۰۰ rpm سانتیریفوژ کردیم تا گلبولهای سفید را جدا کنیم. پس از یک بار شستشو سلولها در تامپون هنک یاخته‌های جدا شده را بمدت ۴۵ دقیقه در محلول کلریدپتاسیم ۰/۷۵ مول مورد تیمار

هیپوتونیک دادیم. سپس نمونه‌ها را بمدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۱۰۰ rpm سانتریفوژ کردیم، مایع رویی را دور ریخته و به رسوب باقیمانده مقدار ۴ میلی‌لیتر محلول ثابت کنند و تازه و سرد شده کارنوی (سه قسمت متانول خالص + یک قسمت اسید استیک خالص) اضافه کردیم. پس از بهم زدن یاخته‌ها در محلول فیکساتیو این مجموعه را دوباره بمدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفوژ کرده و سپس عمل تثبیت سلولها را بار دیگر تکرار کردیم. بعد از تثبیت دوم مقدار ۳ میلی‌لیتر محلول رویی را دور ریختیم. رسوب و محلول ثابت کننده را با پیپت پاستور چند بار بهم زدیم تا سوسپانسیون سلولی حاصل شود. سپس ۳ - ۲ قطره از سوسپانسیون سلولی بدست آمده را با پیپت پاستور بر روی تعدادی لام تمیز که قبلاً سرد شده بودند از فاصله ۵۰ تا ۷۰ سانتیمتری چکانده و لامها را در شرایط آزمایشگاه خشک کرده و لامهای خشک شده را با محلول گیمسای کیت (در صورت استفاده از کیت) و یا گیمسای Merck پنج درصد بمدت بیست دقیقه رنگ‌آمیز می‌کردیم. لامهای رنگ‌آمیزی شده را پس از گذشت مدت ذکر شده با آب مقطر شستشو داده و در شرایط آزمایشگاه خشک کردیم و گسترشهای متافازی بدست آمده را مورد مطالعه میکروسکوپی قرار دادیم.



شکل شماره ۱: گسترش کروموزومی ماهی سفید *Rutilus frisii kutum*



شکل شماره ۲: کاریوتیپ *Rutilus frisii kutum*

نتایج و بحث :

بررسی پنجاه پلاک متافازی ماهی سفید نتایج زیر را بدنبال داشت :

تعداد کروموزوم در پلاک متافازی	۴۵	۴۶	۴۷	۴۹	۵۰
تعداد پلاک متافازی	۱	۳	۲	۵	۳۹

جدول ۴ – فراوانی کروموزومها در ماهی سفید *R.frisii kutum*

تعداد کروموزومها در ماهیان مورد مطالعه ما $2n = 50$ و $NF = 86$ محاسبه شد (عکس شماره ۱ و ۲). کاریوتیپ تهیه شده در این بررسی شامل ۸ جفت کروموزوم متاسنتریک، ۱۰ جفت کروموزوم ساب‌متاسنتریک و ۷ جفت کروموزوم ساب‌تلوسنتریک و اکروسنتریک می‌باشد ($8m + 10sm + 7st - a$). بنظر می‌رسد که اختلافات داخل گونه‌ای و بین گونه‌ای در جنس *Rutilus* کم باشد *(Rab, P & Roth, P. 1989)*. تفاوت مرفولوژیکی در کروموزومهای این جنس معمولاً مشاهده می‌شود. بزرگترین کروموزوم در زیرگونه مورد بررسی ما یک جفت کروموزوم ساب تلوسانتریک است.

این نتایج با نتایج کسب شده توسط *Vasiliev (1985)* در مورد ماهی سفید رودخانه ولگا $2n = 50$ ، $NF = 82$ ($7m + 9sm + 3a + 6st$) شباهتهایی را نشان می‌دهد. به غیر از اولین جفت کروموزوم متاسانتریک، دو جفت کروموزوم ساب‌متاسانتریک و یک جفت کروموزوم ساب‌تلوسانتریک به علت وجود کروموزومهای تقریباً هم‌اندازه در هر رده کروموزومی تعیین دقیق جفت کروموزومهای هومولوگ مستلزم بکارگیری روشهای رنگ‌آمیزی باندینگ می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از زحمات و مساعدتهای کلیه افرادی که در انجام این پروژه ما را یاری نموده‌اند از جمله:

ریاست محترم مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه

تبریز، سرپرست محترم بخش زیست‌شناسی مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان، سرپرست محترم ایستگاه تحقیقاتی ساحل غازیان، برادر رحیم خدایاری و برادر محمود آقامعالی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع :

1 - AL - Sabti, Kabil (1983). Chromosomal studies by blood leukocyte culture techniques. on three salmonids from yugoslavian waters. J.F. Biol. (1985) 26, 5 - 12.

2 - Banarescu. P., 1973: Origin and affinities of the freshwater fish fauna of Europe. Acta Biol. Jugosl. Ichthyologia, 5: 1 - 8.

3 - Collares - Pereira, M.J., 1985 a: The "Rutilus alburnoides (Steindachner 1866 complex " Pisces, Cyprinidae. II. First data on ,the Karyology o a well established diploid ، triploid group. Arq. Mus. Bocage, ser. A, 3(5): 69 - 90.

4 - Collares - Pereira, M.J., 1985 B: Cytotaxonomic studies in Iberian cprinids. II. Karyology of Anaecypris hispanica (Steindachner, 1866), Rutilus arcasii (Steindachner, 1866(and R.macrolepidatus, c.c. Thomas.

5 - Grammeltvedt, A - F (1974). A method of obtaining chromosome preparaion from rainboe trout (Salmo gairdnri) by leucocyte culture. Norw. J. Zoo. 22, 129 - 134.

6 - Grammeltvedt, A - F (1975). Chromosomes of salmon (Salmo salar) by leucocyte culture. Aquaculture 5, 205 - 209.

7 - Hartley, S.E and Horne, M.T (1983). A method for obraining

mitotic figures from blood leucocty culture of rainbow trout, Salmo gairdneri. J.Fish Biol. (1983) 22, 77 - 82.

8 - *Hartley, S.E. and Horne, M.t (1985). Cytogentic techniques in fish genetics. J.Fish Boil. 26, 575 - 582.*

9 - *Heckman, J.R Brubaker, D.F (1970) chromosome perparation from fish blood leucocytes. Progve Fish cult 32, 206 - 208.*

10 - *Rab, P and Roth, P (1989) Chromosomes studies of European Leuciscine fishes (pisce: cyprinidae). Karyotypes of Rutilus pigus cigro and R. rutilus, Folia Zoologica 38 (3): 239 - 245.*

11 - *Vasilev, V.P, 1985: Evoljucionnaja kariologija [Evolutionary karyology of fishes]. Nauka, Moskova, 300 pp.*

Mohammad Reza Noruz Fashkhami, Dr. Mahmud Khosroshahi
Guilan Fisheries Research Centre,
I . F . R . T . O

Karyology (Chromosomal Study) of the Caspian Sea Kutum Roach by White Blood Cells Culture

Abstract

The Karyotype of Rutilus frisii kutum belonging to the south western basin of the Caspian Sea, was carried out by the method of white blood cells culture. The number of metaphasis chromosomes in this fish was determined to be 2n = 50 and the number of chromosomes arms nf = 86. This karyotype consists of 8 pairs of metacentric (m), 10 pairs of submetacentric chromosomes (sm) and 7 pairs of subtelocentric or acrocentric, (8m + 15sm + 7st - a). The biggest chromosome in this subspecies is a pair of subtelocentric chromosome.