

تعیین زمان اولین تقسیم میتوزی در قزل آلابی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

- نثارالله زارعی: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران، صندوق پستی: ۸۴۱۵۶-۸۳۱۱۱
- سالار درافشان*: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران، صندوق پستی: ۸۴۱۵۶-۸۳۱۱۱
- فاطمه پیکان حیرتی: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران، صندوق پستی: ۸۴۱۵۶-۸۳۱۱۱

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

چکیده

متوسط زمان لازم بین لقاح تا اولین تقسیم میتوزی (First Cleavage Interval (FCI) در قزل آلابی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* و ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* تعیین شد. لقاح با استفاده از تخمک و اسپرم استحصالی از ۶ الی ۹ قطعه مولد ماده از هر گونه انجام شد. به منظور حذف اثرات انفرادی مولدین بر زمان احتمالی تقسیم سلولی، اسپرم و تخمک متعلق به افراد مختلف یک گونه، پیش از لقاح با یکدیگر مخلوط شدند. لقاح به روش خشک انجام و تخم‌های لقاح یافته در 3 ± 0.7 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. نمونه برداری از تخم‌های لقاح یافته هر گونه در فاصله زمانی ۵ الی ۱۲ ساعت پس از لقاح با فاصله زمانی ۱۰ دقیقه انجام شد. در هر مرحله، حداقل ۳۰ عدد تخم نمونه برداری شده و بلافاصله پس از شفاف‌سازی، در محلول داویدسون تثبیت شدند. نمونه‌ها با بزرگ‌نمایی $\times 40$ جهت حضور شیار تقسیم و وقوع تقسیم میتوزی بررسی شدند. معیار وقوع اولین تقسیم میتوزی، وجود شیار تقسیم کامل در حداقل ۵۰ درصد نمونه‌ها بود. نتایج نشان داد که اولین تقسیم سلولی تخم در قزل آلابی رنگین کمان به‌طور میانگین در 3.0 ± 2.1 درجه-دقیقه پس از لقاح (حدود ۷ ساعت و بیست دقیقه) به‌طور معنی‌داری در زمان کوتاه‌تری نسبت به ماهی آزاد دریای خزر 3.5 ± 1.0 درجه-دقیقه (۹ ساعت و ده دقیقه) رخ می‌دهد و لذا زمان مناسب برای القای تتراپلویدی در ماهی آزاد دریای خزر و قزل آلابی رنگین کمان با یکدیگر کاملاً متفاوت خواهد بود. ارزیابی اثرات انفرادی والدین بر زمان اولین تقسیم سلولی تخم در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: قزل آلابی رنگین کمان، ماهی آزاد دریای خزر، تقسیم میتوز

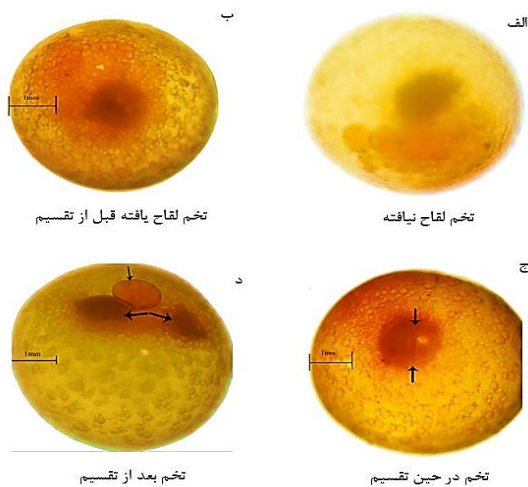


مقدمه

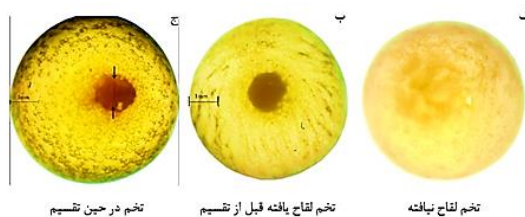
مواد و روش‌ها

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) دو گونه از مهم‌ترین ماهیان سردآبی کشور هستند که به‌منظور توسعه فعالیت‌های شیلاتی و آبی پروری مورد توجه قرار گرفته‌اند. هم‌اکنون بخشی از تولید تجاری ماهیان سردآبی در جهان متعلق به تولید ماهیان دستکاری شده کروموزومی (پلی‌پلویدی) است. پلی‌پلویدی‌ها افرادی هستند که نسبت به هم‌نوعان خود، یک یا تعداد سری بیش‌تری از مجموعه کروموزومی دارند و به‌نظر می‌رسد وقوع این فرایند در گروه‌های ابتدایی تر مهره‌داران، نظیر ماهیان بیش‌تر است (Legatt و همکاران، ۲۰۰۶). به‌طور مصنوعی، می‌توان تریپلویدی یا تتراپلویدی را به‌ترتیب با ایجاد اختلال در دومین تقسیم میوزی یا اولین تقسیم میتوزی تخم لقاح یافته ماهیان القا نمود (Dunhum, ۲۰۰۴). به این منظور می‌توان از شوک‌های فیزیکی یا شیمیایی استفاده کرد. تولید ماهیان تتراپلوید به‌عنوان یک منبع مهم در تولید انواع تریپلوید به‌روش غیرالقایی حائز اهمیت است. موفقیت القای پلی‌پلویدی در آبزبان، تابع شرایط محیطی منطقه و ویژگی‌های والدین می‌باشد و به‌دلیل اختلاف حساسیت در تخم‌های بین نژاد و گونه‌های نزدیک، شوک‌های مختلفی برای نتایج بهینه مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این‌رو نتایج متفاوتی در این خصوص حتی برای یک گونه تاکنون ارائه شده است (Thorgaard و همکاران، ۱۹۸۱؛ Hershberger و Hostuttler, ۲۰۰۵؛ Weber و Hostuttler, ۲۰۱۲). زمان آغاز شوک‌دهی (زمان پس از لقاح)، دوره شوک‌دهی و دمای شوک از مهم‌ترین عوامل مؤثر در موفقیت شوک جهت القای پلویدی محسوب می‌گردند (Dunhum, ۲۰۰۴؛ Weber و Hostuttler, ۲۰۱۲). از این‌رو موفقیت القای تتراپلویدی در یک گونه تابع شرایط خاصی است که شاید مهم‌ترین آن زمان آغاز تقسیم اول میتوز باشد. پیشنهاد شده است که شوک باید در بازه زمانی ۷۰-۶۰٪ فاصله زمانی بین لقاح تا اولین تقسیم میتوزی (First Cleavage Interval: FCI) انجام شود. این زمان در گونه‌های مختلف، حتی نژادهای مختلف یک گونه و احتمالاً در شرایط پرورشی متغیر، می‌تواند متفاوت باشد، لذا نتایج القاء تتراپلویدی در پژوهش‌های مختلف به‌دلیل مدنظر قرار ندادن تفاوت در FCI، با یکدیگر متفاوت است (Hostuttler و Hershberger, ۲۰۰۵؛ Weber و Hostuttler, ۲۰۱۲). در تحقیق حاضر، زمان اولین تقسیم میتوزی در تخم‌های تازه لقاح یافته قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) به‌عنوان دو گونه مهم از آزاد ماهیان ایران برای اولین بار مورد مقایسه قرار گرفت.

این تحقیق در دی‌ماه ۱۳۹۵ در سالن تکثیر گروه شیلات دانشگاه صنعتی اصفهان انجام گرفت. در این پژوهش، از تخمک مخلوط ۶ ماهی قطعه مولد ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۱۹۸۶±۳۴۶ گرم و هم‌چنین ۹ قطعه مولد ماده ماهی آزاد خزر با میانگین وزنی ۲۲۶±۲۱۶ گرم استفاده شد. اسپرم از مخلوط کردن گامت‌های استحصالی از ۹ قطعه مولد از هر یک از گونه‌های توصیف شده تأمین شد. میانگین وزنی مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد دریای خزر به‌ترتیب معادل ۹۳۹±۱۸۶ و ۱۵۹۳±۱۸۶ گرم بود. اسپرم‌گیری از مولدین نر با سرنگ ۱۰ سی‌سی به‌منظور جلوگیری از آلودگی با خون و مدفوع انجام شد. قبل از انجام عمل لقاح، فعال بودن اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری، لام و محلول لقاح بررسی شد (درافشان، ۱۳۸۵). قبل از انجام عمل لقاح، به‌منظور حذف اثرات فردی، تخمک‌های مولدین (قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد دریای خزر) به‌طور جداگانه باهم مخلوط شدند. عملیات لقاح هم‌زمان و با شرایط یکسان برای دو گونه انجام شد. برای انجام لقاح مصنوعی به مخلوط تخمک‌های مولدین ماده مخلوطی از اسپرم مولدین نر به میزان ۱ به ۱۰۰ (حجم اسپرم به حجم تخمک) اضافه شد. اسپرم‌ها با افزودن محلول لقاح، فعال شده و فرایند شستشو و آبیگری تخم‌های لقاح یافته به‌طور مرسوم انجام شد (نفیسی‌به‌بادی و فلاحتی‌مروست، ۱۳۸۶). زمان افزودن محلول لقاح به تخم‌ها، زمان صفر در نظر گرفته شد. تخم‌ها سپس به تراف‌های کالیفرنایی منتقل و با میانگین دمای ۱۲/۳±۰/۲ سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌برداری در بازه زمانی ۵ الی ۱۲ ساعت (۳۰۰ الی ۷۲۰ دقیقه) پس از لقاح با فواصل زمانی ۱۰ دقیقه انجام شد. در هر مرتبه، حداقل ۳ نمونه، هر نمونه حاوی ۱۰ عدد تخم به‌طور تصادفی از هر گروه از تخم‌ها (قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد دریای خزر) برداشت شد. نمونه‌ها به‌سرعت به‌داخل دو برابر حجمی (حدود ۲۰ میلی‌لیتر) محلول شفاف‌کننده شامل حجم‌های مساوی متانول و استیک اسید و آب مقطر انتقال یافت. پس از ۱۰ دقیقه، محلول شفاف‌کننده با محلول فیکساتیو داویدسون، شامل ۲۰۰ میلی‌لیتر فرمالین ۳٪، ۱۰۰ میلی‌لیتر گلیسرول، ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول، ۱۰۰ میلی‌لیتر استیک اسید و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر جایگزین شد. به‌این ترتیب از چروکیدگی تخم‌ها پیشگیری شد تا در فرصت مناسب در زیر میکروسکوپ قابل مطالعه باشند (Weber و Hostuttler, ۲۰۱۲). در بازه زمانی ۲۴ الی ۴۸ ساعت پس از نمونه‌برداری، نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ (مدل XSZ-801 BN) با بزرگ‌نمایی X۴۰ از لحاظ توسعه و تکامل جنینی بررسی شدند. میانگین FCI یا فاصله زمانی اولین تقسیم سلولی، زمانی در نظر گرفته شد که در آن زمان شکاف تسهیم



شکل ۱: مراحل وقوع تقسیم میتوز در تخم‌های مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان. الف: تخم لقاح نشده؛ ب: تخم لقاح شده در ۳۰۰ دقیقه بعد از لقاح؛ ج: تکمیل تشکیل شیار تسهیم در ۴۴۰ دقیقه بعد از لقاح؛ د: تقسیم کامل هسته تخم، به دو هسته پیش از تقسیم سیتوپلاسم در قطب حیوانی در ۵۲۰ دقیقه بعد از لقاح. مقیاس برابر یک میلی‌متر. درجه حرارت آب انکوباسیون، $7/3 \pm 0/3$ درجه سانتی‌گراد. بزرگ‌نمایی X۴۰.



شکل ۲: مراحل وقوع تقسیم میتوز در تخم‌های مولدین آزاد دریای خزر. الف: تخم لقاح نشده؛ ب: تخم لقاح شده در ۴۲۰ دقیقه بعد از لقاح؛ ج: تکمیل تشکیل شیار تسهیم در ۵۵۰ دقیقه بعد از لقاح. مقیاس برابر یک میلی‌متر، درجه حرارت آب انکوباسیون، $7/3 \pm 0/3$ درجه سانتی‌گراد. بزرگ‌نمایی X۴۰.

با این وجود در سالیان اخیر، اطلاعات بعضاً متفاوتی از موفقیت القای تتراپلویدی در یک گونه مشخص از آزادماهیان نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش شده است. به‌عنوان مثال (کلباسی و همکاران، ۱۳۸۲)، بهترین بازده تتراپلویدی را در این گونه، در اعمال شوک در ۷۴ ساعت-درجه، Thorgaard و همکاران (۱۹۸۱) بهترین زمان آغاز شوک را ۵۰ ساعت-درجه و Chourrou (۱۹۸۸) بهترین زمان را برای القای تتراپلویدی ۸۵ ساعت-درجه عنوان کردند. درحالی‌که درافشان و همکاران (۱۳۹۳)، بالاترین درصد تتراپلویدی را عمدتاً در زمان ۶۵ ساعت-درجه پس از لقاح گزارش کردند. به‌نظر می‌رسد که تفاوت در زمان تقسیم سلولی در میان گروه‌های مختلف مولدین در جمعیت‌های

یا Cleavage furrow در ۵۰ درصد نمونه‌ها قابل مشاهده باشد. تعداد تخم‌های لقاح نیافته در این برآورد منظور نگردید و تعداد آن‌ها از تعداد کل تخم‌ها کسر گردید (Hershberger و Hostuttler، ۲۰۰۵). در نهایت میانگین زمانی حاصل برای دو گروه از ماهیان، پس از ارزیابی نرمال بودن داده‌ها، از نظر آماری، با آزمون t-test مستقل در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

میانگین دمای آب انکوباسیون، $7/3 \pm 0/2$ درجه سانتی‌گراد بود. در این درجه حرارت، اولین علائم تکمیل شکاف تسهیم در تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در ۴۴۰ دقیقه بعد از لقاح و برای تخم‌های لقاح شده ماهی آزاد دریای خزر در ۵۵۰ دقیقه بعد از لقاح مشاهده شد (شکل ۱ و ۲). این زمان به‌ترتیب معادل با ۳۲۱۲ و ۴۰۱۵ درجه-دقیقه برای دو گونه مورد بررسی بود. مطابق انتظار تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌طور معنی‌داری در مدت زمان کم‌تری حدود (۸۰۰ دقیقه-درجه)، از تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر به اولین تقسیم میتوزی رسیدند. در ذیل تصاویر نمونه‌های تخم لقاح‌یافته قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد دریای خزر از نظر میزان توسعه تکاملی و وجود یا عدم وجود ژرمینال دیسک ارائه شده است (شکل ۱ و ۲). تخم‌های لقاح نیافته فاقد ژرمینال دیسک بودند درحالی‌که ژرمینال دیسک در تخم‌های لقاح یافته در فاصله زمانی پس از لقاح تا آغاز تقسیم سلولی به‌صورت مشخص دیده شد (شکل ۱ و ۲، ب). در دمای $7/3$ درجه سانتی‌گراد، تکمیل شیار تسهیم در وسط ژرمینال دیسک در ۵۰٪ تخم‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان در بازه زمانی 30 ± 3212 درجه-دقیقه (حدود ۷ ساعت و ۲۰ دقیقه پس از لقاح) و در تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر در محدوده زمانی 35 ± 4015 درجه-دقیقه (حدود ۹ ساعت و ده دقیقه) پس از لقاح مشاهده شد.

بحث

تعیین زمان اولین تقسیم سلولی در ماهیان می‌تواند اطلاعات ارزشی را در خصوص احتمال موفقیت شوک‌های فیزیکی یا شیمیایی برای القای تتراپلویدی فراهم کند. به‌نظر می‌رسد زمان اعمال شوک (زمان بعد از لقاح) به‌همراه شدت (تفاوت درجه حرارت بین آب سالن انکوباسیون و درجه حرارت حمام آب گرم برای شوک‌های گرمایی) و طول مدت اعمال شوک از مهم‌ترین پارامترهای مرتبط با شوک برای القای موفقیت‌آمیز تتراپلویدی در ماهیان هستند (Pandian و Koteeswaran، ۱۹۹۸).



منابع

۱. پاشازانوسی، ع.; درافشان، س. و ابراهیم‌زاده، س.م.، ۱۳۹۲. ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*). انتشارات آموخته، اصفهان، ایران. ۱۷۲ صفحه.
 ۲. درافشان، س.م.، ۱۳۸۵. دستکاری‌های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و مقایسه رشد در نسل F₁. رساله دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۴۰ صفحه.
 ۳. درافشان، س.م.; وفایی‌سعدی، ا. و نکوئی‌فر، ع.، ۱۳۹۳. بهترین شرایط شوک حرارتی برای القای تتراپلوئیدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۹، شماره ۴، صفحات ۴۱۱ تا ۴۲۱.
 ۴. کلباسی، م.ر.; باقری، ع.; پورکاظمی، م. و عبدالحی، ح.، ۱۳۸۲. بررسی ایجاد ماهیان تتراپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌وسیله شوک گرمایی. مجله علمی شیلات ایران. دوره ۱۲، شماره ۴، صفحات ۱۴۳ تا ۱۵۲.
 ۵. نفیسی‌بهبادی، م. و فلاحتی‌مروست، ع.، ۱۳۸۶. راهنمای عملی تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. دانشگاه هرمزگان، بندرعباس. ۲۸۸ صفحه.
 ۶. Chourrout, D., 1988. Induction of gynogenesis, triploidy and tetraploidy in fish. Animal Plant Science. Vol. 1, pp: 65-70.
 ۷. Dunhum, R.A., 2004. Aquaculture fisheries biotechnology: genetic approaches. CABI Publishing, Massachusetts. 372 p.
 ۸. Hershberger, W.K. and Hostuttler, M.A., 2005. Variation in time first cleavage in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* embryos a major factor in induction of tetraploids. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 36, pp: 96-102.
 ۹. Legatt, R.A.; Scheer, K.W.; Afonso, L.O.B. and Iwama, G.K., 2006. Triploid and diploid rainbow trout do not differ in their stress response to transportation. North American Journal of Fisheries Management. Vol. 68, pp: 1-8.
 ۱۰. Myers, J.; Iwamoto, R.N. and Hershberger, W.K., 1987. The introduction of tetraploidy in salmonids. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 17, pp: 1-17.
 ۱۱. Palti, Y.; Li, J.J. and Thorgaard, G.H., 1997. Improved efficiency of heat and pressure shocks for producing gynogenetic rainbow trout. The Progressive Fish Culturist. Vol. 59, pp: 1-13.
 ۱۲. Pandian, T.J. and Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia, Vol. 384, pp: 167-243.
 ۱۳. Thorgaard, G.H.; Jazwin, M.E. and Stir, A.R., 1981. Polyploidy induced by heat shock in Rainbow trout: high interference over long map distance. Genetics. Vol. 103, pp: 771-783.
 ۱۴. Weber, G.M. and Hostuttler, M.A., 2012. Factors affecting the first cleavage interval and effects of parental generation on tetraploid production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 344, pp: 231-238.
- مختلف یا حتی در میان مولدین ماده متعلق به یک گله، می‌تواند توجیه‌کننده این تفاوت‌ها در زمان بهینه آغاز شوک در بین گزارش‌های متفاوت باشد. چنین تفاوت‌هایی می‌تواند متأثر از نژاد یا ذخیره ژنتیکی متفاوت مولدین و یا حتی اندازه متفاوت تخمک باشد. هم‌چنین اختلاف در دمای آب انکوباسیون میان این تحقیق (۷/۳ درجه سانتی‌گراد) در مقایسه با دیگر مطالعات (محدوده بین ۹ تا ۱۱ درجه سانتی‌گراد) می‌تواند تا حدودی تفاوت در زمان آغاز تقسیم سلولی را توجیه کند (Myers, ۱۹۸۷؛ Palti و همکاران ۱۹۹۷). زمان اولین تسهیم تخم ممکن است براساس نوع نژاد در یک گونه تا ۲۰٪ متفاوت باشد که در درجه حرارت‌های مختلف، دامنه زمانی ۲۰ تا ۵۰ دقیقه را پوشش می‌دهد (Hershberger و Hostuttler ۲۰۰۵). زمان وقوع اولین تقسیم سلولی تخم در ماهی آزاد دریای خزر به‌طور معنی‌داری طولانی‌تر از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود، این مسأله با عنایت به تفاوت زمان وقوع چشم‌زدگی و تفریح در دو گونه فوق، کاملاً قابل پیش‌بینی است. به‌طوری‌که تخم ماهی آزاد دریای خزر به‌طور معمول نیازمند ۴۵۰ درجه-روز برای تفریح است درحالی‌که این دوره برای قزل‌آلای رنگین‌کمان حدود ۳۰۰ درجه-روز گزارش شده است (پاشازانوسی و همکاران، ۱۳۹۲). از این رو به‌نظر می‌رسد زمان اعمال شوک برای القای تتراپلوئیدی در ماهی آزاد دریای خزر، در فاصله زمانی بیش‌تری نسبت به زمان لقاح، نسبت به قزل‌آلای رنگین‌کمان باشد. با توجه به مطالعات پیشین (Hershberger و Hostuttler ۲۰۰۵؛ Weber و Hostuttler ۲۰۱۲) که زمان مناسب برای اعمال شوک جهت القای تتراپلوئیدی را در محدوده ۷۰-۶۰٪ زمان لازم برای تکمیل اولین تقسیم سلولی تخم، FCI گزارش کرده‌اند، به‌نظر می‌رسد اعمال شوک در بازه زمانی ۲۸۱۰-۲۴۱۰ درجه-دقیقه پس از لقاح (۵ ساعت ۳۰ دقیقه تا ۶ ساعت ۲۰ دقیقه بعد از لقاح) در ماهی آزاد دریای خزر بتواند جهت القای تتراپلوئیدی در این گونه مثمر ثمر باشد. با عنایت به عدم وجود اطلاعات لازم در خصوص القای موفقیت‌آمیز تتراپلوئیدی در این گونه، ارزیابی زمان‌های پیشنهادی نیازمند انجام تحقیق مجزا خواهد بود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه تمامی دوستانی که در به ثمر نشستن این تحقیق تلاش نموده‌اند، ابراز می‌دارند.