Archive of SID

تولید ماهی ماده زاد میوزی کپور معمولی (*Cyprinus carpio* L.) به وسیله اشعه گاما

مهدی یوسفیان
yousefianeco@yahoo.co
پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری صندوق پستی: ۹۶۱

تاریخ ورود: فروردین ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۸۴

چکیده

یکی از ابزرهای مهم در اصلاح نژاد و مطالعات ژنتیکی ماهی، دستکاری ژنتیکی (Genome manipulation) و بخصوص تکنیک ماده‌زایی است. در یک پروژه تحقیقاتی در سالهای ۱۳۷۸ و ۱۳۷۹ امکان تولید ماهی کپور (*Cyprinus carpio* L.) ماده‌زاد مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور در فصل تکثیر ماهی کپور، پس از انتخاب مولدین مناسب با نشانگرهای آلل‌های ترانسفرین خاص، نسبت به بهینه‌سازی اشعه گاما بر اسپرم ماهی جهت تخریب ژنوم اقدام شد. اسپرم ماهی در معرض اشعه با مقدار ۸۰ تا ۱۲۰ کیلو راد قرار گرفت و با مقدار ۱۰۰ کیلوراد مناسبترین نتیجه حاصل شد.

با استفاده از شوکهای سرمایی و گرمایی متفاوت به تخم در زمانهای مختلف پس از افزودن آب به ترکیب تخم و اسپرم، ماهی ماده‌زاد میوزی دیپلوئید بدست آمد. درصد باقیماندگی لارو فعال با شوک سرمایی (۷ درصد) نسبت به شوک گرمایی ۲/۵ درصد اختلاف معنی‌داری داشته است. مناسبترین شرایط شوک ۵ دقیقه پس از ترکیب تخم با اسپرم در صفر درجه سانتیگراد برای مدت ۵۰ دقیقه حاصل شد. از ۱۰۰ عدد بچه ماهی کپور برای هر تیمار جهت تعیین آزمایشات الکتروفورزی و تعیین اثر شوک و اشعه گاما استفاده شد. عدم وجود نشانگر پدری در بچه ماهیان ماده‌زاد میوزی صحت آزمایشات انجام شده را تائید نمود.

لغات کلیدی : کپور معمولی، *Cyprinus carpio*، دستکاری ژنتیکی، ماده‌زایی، اشعه گاما

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تکنیکهای دستکاری ژنوم از حدود ۳۰ تا ۴۰ سال پیش کم کم به مزارع تکثیر و اصلاح نژاد ماهی راه پیدا کرد و اکنون کم و بیش توسط برخی از کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر چند که انجام آزمایشات مربوط به این تکنیک چندان مشکل نیست.

تکنیکهایی که برای افزایش تعداد کروموزومها استفاده می‌شود شامل شوکهای فیزیکی مانند تغییر درجه حرارت، فشار هیدرو استاتیک، شوکهای شیمیایی و شوکهای الکتریکی است. محققان شوک حرارتی را به دلیل تاثیر ثبت و حجم نمونه بالا انتخاب می‌کنند. زمان و درجه حرارت دقیق شوک اعم از شوک در زمان میوز یا میتوز در نسبت موفقیت بسیار حائز اهمیت است.

تعیین و تبیین تولید ماهی ماده‌زاد دیپلوئید توسط چند روش عملی است. اولین روش استفاده از الکتروفورز است (Seeb *et al.*, 1988 ; McClean & Penman, 1990 ; Arai, 1988). دومین روش استفاده از الگوی فلس است (Yousefian, 1996) و سومین روش استفاده از فنوتیپ غالب است (Amirinia, 1996).

هر یک از تکنیکهای دستکاری ژنی برای امر خاصی بکار می‌رود. تکنیک ماده‌زایی بطور عمده در برنامه‌های اصلاح نژاد تولید جمعیت ماده تک جنس و شناسایی سیستم تعیین جنسیت بکار می‌رود.

یک روش تولید ماهی ماده‌زاد لقاح تخمک با اسپرمی است که مواد ژنتیکی آن توسط اشعه X یا گاما یا اشعه ماوراء بنفش تخریب گردیده و زمان اندکی پس از لقاح تخم شوک داده می‌شود تا از خروج دومین گویچه قطبی جلوگیری شود. تخم در این مرحله حاوی دو هسته هاپلوئید است. یکی از هسته تخم و دیگری از دومین گویچه قطبی تامین گردیده است. این دو هسته برابر 2N کروموزوم بوده که هر دو از مادر رسیده اند و به این ترتیب ماهی ماده‌زاد میوزی تولید می‌گردد. دومین روش ماده زاد مانند حالت اول است منتهی در این مرحله شوک در زمان اولین تقسیم جنین انجام می‌پذیرد. هسته دو سلول هاپلوئید با هم جفت شده و موجود دیپلوئید را بوجود می‌آورد. در این صورت ماهی ماده‌زاد میوزی تولید می‌گردد. Nagy و همکاران در سال ۱۹۷۸ در یک سری آزمایشات به منظور تولید ماهی ماده‌زاد میوزی کپور، ثابت نمودند که لقاح تخم معمولی با اسپرم اشعه دیده (۱۰۰ کیلو راد) تولید ماهیان هاپلوئیدی را می‌نماید که تماماً قبل از تغذیه فعال می‌میرند و ماهیان نرمالی که بعنوان ماهیان ماده‌زاد خود به خود باقی می‌مانند بیش از ۰/۳ درصد نیستند. بیشتر لاروهای حاصل از ماده‌زایی خیلی طولانی زنده نمی‌مانند و از بین می‌روند و این به دلیل

www.SID.ir

Archive of SID

ظهور آلل‌های مغلوب هموزیگوت است که سبب شده لاروها غیر نرمال شده یا بمیرند (Nagy *et al.*, 1978).

هر چند که مهمترین کاربرد، روش ماده‌زایی، در اصلاح نژاد است با این وجود در موارد بسیاری که به شناسایی ژنتیک ماهی مربوط می‌شود، استفاده گردیده است. به نقل از Nagy و همکارانش در سال ۱۹۷۸ این روش برای مطالعه کاریوتایپ ماهی توسط برخی محققان مانند Parmenter در سالهای ۱۹۲۵ ; ۱۹۳۳، Kawamura در سال ۱۹۳۹ و Svardson در سال ۱۹۴۵ مورد مطالعه قرار گرفت (Cited in Nagy *et al.*, 1978).

برای تهیه نقشه‌کروموزومی و مطالعه موتاسیون ماهی کپور Nagy *et al.*, 1978، در مطالعه سیستم ایمنی کپور Van Muiswinkel *et al.*, 1986 و جهت تولید ماهی هموزیگوت و تک جنس ماده‌زاد توسط بسیاری از محققان سایر کشورها در ماهی کپور گزارش شده است (Komen *et al.*, 1988 ; Taniguchi *et al.*, 1986. ; Wu *et al.*, 1986). (برای اطلاعات بیشتر به Yousefian, 1996 مراجعه شود).

تحقیقات در سالهای اخیر درخصوص استفاده از روش ماده‌زایی در دستیابی به ناشناخته‌های ژنتیکی کپور ماهیان و نیز کاربرد آن در اصلاح نژاد در بسیاری از کشورهای دنیا ادامه یافته است و Kobayashi & Nakanishi در سال ۱۹۹۹ بررسی هورمونهای جنسی را در ماهی ماده‌زاد کپورکاراس مورد مطالعه قرار دادند. شناسایی الگوی رنگ در ماهی کپور ژاپنی توسط Gomelsky و همکاران (۱۹۹۸) صورت گرفت.

مطالعه بر روی ماده‌زاد طبیعی کاراس نقره‌ای و مطالعه سیتوژنتیکی اسپرم در تلاقی بین اسپرم معمولی و تخم کاراس نقره‌ای در سال ۱۹۹۶ انجام گرفت (Yue *et al.*, 1996a). توسط همین محقق مطالعه خصوصیات بیوشیمیایی تخمک ماهی کپور معمولی و ماده‌زاد در زمان لقاح تخم یا اسپرم معمولی‌انجام گرفت (Yue *et al* ., 1996b). در سال ۱۹۹۷ محققی بنام Bieniarz و همکارانش بمنظور تولید ماهیان تک جنس کپور و مطالعات ژنتیکی اقدام به تولید ماهی ماده‌زاد کپور معمولی نمودند. محققان هندی نیز تحقیقات وسیعی بر روی ماده‌زایی و دستکاری ژنتیکی داشتند. وضعیت مطالعات ژنتیکی بر روی کپور و کلیه روشهایی که تحت عنوان دستکاری ژنتیکی در هند انجام شده است در یک مقاله توسط Das و همکاران (۱۹۹۶) گزارش شده است.

دانشمندان هلندی مطالعه واریانس ژنتیکی و فنوتیپی در ماهیان ماده‌زاد و نر زاد کپور معمولی انجام داده اند (Bongers *et al.*, 1997a,b). تولید لاینهای ماده‌زاد از گونه‌های مختلف کپور برای دستیابی به اثر هتروزیس نیز از فعالیتهای‌دانشمندان چینی است (Liu *et al.*, 1997).

www.SID.ir

Archive of SID

در ایران نیز تحقیقات چندی در القای ماده‌زاد میتوزی و میوزی بر روی انواع ماهیان پرورشی انجام گرفته است. بررسی اثر اشعه گاما بر روی اسپرم ماهیان خاویاری و ایجاد ماهی ماده‌زاد در تاسماهیان (یوسفیان و نظری، ۱۳۷۷) و القای ماده‌زاد میتوزی و میوزی با تاکید بر تعیین زمان خروج گویچه قطبی و اولین تقسیم جنسی (اسماعیلی و کلباسی، ۱۳۸۳) در قزل‌آلای رنگین کمان انجام گرفته است.

تقریباً در تمام مثالهای فوق، بصورت مستقیم یا غیرمستقیم هدف دستیابی به ماهیان ماده‌زاد برای دستیابی به لاینهای خالص در اصلاح نژاد ماهیان بمنظور تولید بیشتر و مناسبتر براساس اهداف تعیین شده در پروژه‌های اصلاح نژاد می‌باشد و هدف از این تحقیق نیز در این راستا نهایتاً تولید لاین‌های خالص از ماهی کپور ایران است.

مواد و روش کار

ماهیان مولد از مجتمع تکثیر و پرورش ماهی شهید رجایی ساری و کارگاه تکثیر و پرورش ماهی نصر ساری تامین گردیدند. غیرفعال ساختن ژنوم در دانشگاه شهید بهشتی بابل (بیمارستان شهید رجایی بابلسر) انجام گرفت و بررسی‌های آزمایشگاهی و کنترل نشانگرهای بیوشیمیایی در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انجام شد.

آزمایشات طی دو سال ۱۳۷۸ و ۱۳۷۹ صورت گرفت. در سال اول تعیین شدت نفوذپذیری اشعه گاما بر اسپرم و در سال دوم تولید لارو و بچه ماهی ماده‌زاد دیپلوئید مورد بررسی قرار گرفت.

پس از انتخاب مولدین، خونگیری از آنها جهت تعیین نشانگر بیوشیمیایی انجام و از بین مولدین نر یک ماهی نر با پروتئین ترانسفرین آلل AB و ماده با آلل هموزیگوت BB انتخاب شدند. از ماهی نر اسپرم استحصال گردید و در لوله‌های آزمایش درون یک فلاسک یخ به آزمایشگاه پرتوی اشعه گاما توسط اشعه کبالت ۶۰ انتقال یافت. جهت تامین اشعه، ابتدا با دستگاه مقدار سنجی، شدت تابش اشعه در فواصل نزدیک منشاء اشعه تعیین گردید. سپس نمونه اسپرم در تعدادی اپندرف در نزدیک مخزن اشعه کبالت ۶۰ به گونه‌ای قرارگرفت که با فواصل ایجاد شده، مقادیر متفاوتی از اشعه گاما تامین شود و گرمای ناشی از اثر اشعه برای مدت ۵ دقیقه بررسی گردید که کمتر از ۱ درجه بود. تخم گیری از ماهی و لقاح تخم براساس روش Horvath *et al.*, 1984 انجام گردید. تخم ماهی پیش از لقاح مورد بررسی‌های کیفی (رنگ، شکل، اندازه) و کمی (تعداد در گرم) قرار گرفته و در تمام آزمایشات تخم ماهی مورد نظر رسیده نبود. کیفیت اسپرم را از روی تراکم و قدرت حرکت اسپرماتوزوئیدها می‌سنجند. اسپرماتوزوئیدها را قبل از لقاح مورد آزمایش قرار می‌دهند تا در صورتیکه قدرت لقاح را دارند، استفاده شوند. طبقه‌بندی اسپرماتوزوئید براساس قدرت حرکت آنها توسط Persov (1947) صورت پذیرفت. براساس این تقسیم‌بندی اسپرماتوزوئیدها از بی حرکت تا حرکت مسقیم و سریع به ۵ بال دسته‌بندی

www.SID.ir

Archive of SID

شدند که در لقاح تخم از اسپرمهای ۴ و ۵ بال که بسیار مطلوب هستند، استفاده شد. اثر اشعه گاما در مقادیر بالا سبب کاهش قدرت حرکت اسپرم می‌شود و اسپرم ۴ و ۵ بال در مقدار ۱۲۰ کیلوراد به ۳ بال و در صورت ادامه به ۱ و۲ بال و در ۱۴۰ کیلو راد سبب مرگ اسپرم می‌گردد.

لقاح تخم با آب معمولی و شستشوی آن با محلول واینارویچ انجام گرفت. یک قسمت تخم با اسپرم معمولی برای تعیین کیفیت تخم و اسپرم لقاح داده شد و بقیه جهت آزمایشات اشعه گاما استفاده شد.

پس از مقدار سنجی و تعیین شدت نفوذپذیری اثر اشعه، آزمایشات در دو مرحله تعیین مقدار مقدماتی اشعه گاما و نهائی انجام گرفت. آزمایشات مقدماتی اثر اشعه گاما بین ۸۰ تا ۱۴۰ کیلو راد با اختلاف ۲۰ کیلو راد فواصل دو اشعه مورد بررسی قرار گرفت. این دامنه برای تعیین مقدار پایین اشعه که سبب تخریب ژنوم بصورت کامل نمی‌گردد و مقدار بالایی که سبب مرگ اسپرماتوزوئید شده و لذا تکامل تخم صورت نمی‌گردد، مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت جهت بدست آوردن مناسبترین مقدار اشعه گاما، مقدار ۹۰ تا ۱۱۰ کیلوراد با ۱۰ کیلوراد اختلاف مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق جهت بدست آوردن بیشترین لاروهای ماده‌زاد دیپلوئید، زمان شوک‌دهی تخم و درجه حرارت مناسب شوک‌دهی بر روی تخم ماهی کپور بررسی شد. بنابراین زمان شوک‌دهی به ترتیب ۲، ۵ و ۸ دقیقه پس از لقاح مورد آزمایش قرار گرفت. درجه حرارت شوک گرمایی ۳۸، ۴۰ و ۴۲ درجه سانتیگراد برای مدت زمان دو دقیقه و درجه حرارت شوک سرمایی صفر درجه و ۴ درجه سانتیگراد بترتیب برای مدت ۴۵ و ۶۰ دقیقه استفاده گردید.

پس از آبگیری کامل تخم که حدود ۱/۵ ساعت طول کشید، تخمها به انکوباتورهای ویس انتقال یافتند. درجه حرارت انکوباسیون ۲۳ درجه سانتیگراد بود. در هر آزمایش یک ویس تخمهای لقاح یافته با اسپرم معمولی (کنترل نرمال) و یک ویس برای تخمهای لقاح یافته با اسپرم اشعه دیده بدون شوک (کنترل هاپلوئید) و بقیه برای تیمارهای متفاوت زمان و درجه حرارت شوک اختصاص یافتند.

در هر ویس تقریباً ۵۰۰۰۰ تخم قرار گرفت. از هر ویس بیش از ۱۰۰ تخم در هر نمونه‌برداری برداشته شد و تمام مراحل خاص و بحرانی و وضعیت باقیماندگی جنین ثبت گردید. اولین بررسی در مرحله آخر مورولا و مرحله بعدی بلاستولا و سومین مرحله زمان حرکت جنین در داخل پوسته تخم بود که میزان باقیماندگی لارو بررسی شد. پس از تفریخ نیز میزان باقیماندگی و بدشکلی لاروها در مراحل تغذیه فعال و یک هفته پس از تغذیه فعال بررسی و ثبت گردید.

از آنجائیکه باقیماندگی لارو هاپلوئید و دیپلوئید شاخص مناسبی جهت بررسی کیفیت تخم و اسپرم می‌باشند، لذا لاروهای‌نرمال، هاپلوئید و تیمارهای شوک تا پایان آزمایشات بصورت جداگانه نگهداری شدند. انکوباسیون، ضدعفونی، تفریخ تخم و تغذیه لارو براساس روش متداول کارگاه تکثیر و پرورش ماهی شهید رجائی انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

پس از اولین مرحله تغذیه فعال، تعدادی از لاروها بعنوان نمونه برای سایر آزمایشات مربوط به بررسی تاثیر اشعه گاما و شوک به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی وابسته به مؤسسه تحقیقات شیلات ایران انتقال یافته و در حوضچه‌های فایبرگلاس (۲×۲×۰/۶ متر) بخش پرورش آن پژوهشکده نگهداری گردید. لاروها در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر ابتدا با ناپلیوس آرتمیا و سپس با دافنی و غذای دستی موردتغذیه قرار گرفتند.

روش تعیین لارو و بچه ماهی ماده‌زاد هاپلوئید و دیپلوئید براساس بازماندگی لارو و روش الکتروفورز انجام گرفت (Nagy *et al.*, 1978). برای این منظور ژنوتیپ نر در پروتئین ترانسفرین به شکل AB و ژنوتیپ ماده متفاوت و به شکل BB انتخاب گردید. در ماهیان کنترل دیپلوئید و بطور معمول فراوانی آلل‌های A و C به میزان ۵±۵۰ درصد بوده است. تنها تیمارهایی بعنوان ماده‌زاد لحاظ گردیدند که در ۱۰۰ نمونه مورد بررسی فراوانی آلل‌های A صفر درصد بوده است.

جهت تعیین اثر شوک و اشعه، میانگین تیمارهای مختلف مورد تجزیه واریانس قرار گرفته و در صورت وجود اختلاف از تست دانکن برای تعیین تفاوت بین تیمارهای مختلف استفاده شد. برای این منظور از برنامه کامپیوتری SPSS. 9.05 استفاده گردید.

نتایج

درصد لقاح و میزان باقیماندگی لارو در تیمارهای مختلف برای هر آزمایش بترتیب زیر ارائه گردیده است.

پس از مقدار سنجی دستگاه، تاثیر مقدار بین ۸۰ تا ۱۴۰ کیلوراد بر اسپرم ماهی کپور مورد بررسی قرار گرفت‌که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است.

مقدار ۸۰ کیلوراد سبب تخریب ناقص ژنوم گردیده که وجود ۲ تا ۸ درصد لاروهای دیپلوئید دلالت بر موثر نبودن اثر اشعه بصورت کامل می‌باشد. اشعه گاما بیش از ۱۲۰ کیلوراد سبب کاهش باقیماندگی اسپرم می‌شود و مقدار ۱۴۰ کیلوراد سبب تلفات کامل اسپرم می‌گردد. تاثیر مقدار در ۱۰۰ و ۱۲۰ کیلوراد باعث تولید لاروهای هاپلوئید شده است.

جدول ۱ : تاثیر اشعه گاما در دامنه ۸۰ تا ۱۴۰ کیلوراد

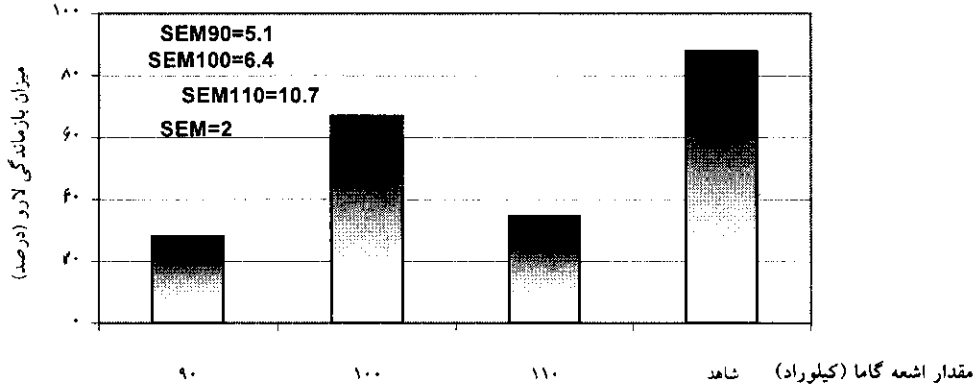
مقدار اشعه گاما (کیلوراد)	فعالیت اسپرم	درصد لقاح	درصد لارو فعال
۸۰	بال ۵	۴۱±۱۰	۵ ±۳
۱۰۰	بال ۵	۷۱±۴	۰/۲±۰/۱
۱۲۰	بال ۳	۴۵ ±۶	۰/۱±۰/۱
۱۴۰	بال ۱ و صفر	۰	۰
شاهد	بال ۵	۹۰±۶	۸۶±۴

www.SID.ir

Archive of SID

در سری دوم تیمارها، تاثیر اشعه گاما ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ کیلورواد مورد بررسی قرار گرفته و نتایج آن در نمودار ۱ ارائه شده است.

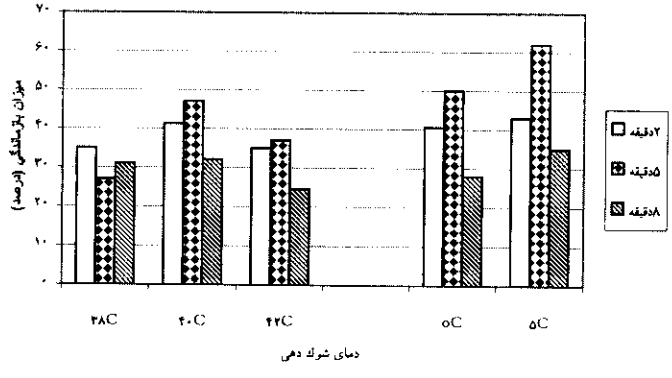
مقدار ۱۰۰ کیلورواد با تولید ۵۸/۶ تا ۷۱/۴ درصد لارو هاپلوئید و صفر (یا کمتر از ۰/۱) درصد لارو نرمال (Spontaneus gynogenesis) مناسبترین شوک برای غیرفعال ساختن ژنوم بوده است. مقادیر ۹۰ و ۱۱۰ کیلورواد لاروهای هاپلوئید کمتری را تولید نموده‌اند. تعداد لاروهای نرمال تولید شده ۸۶ درصد بود که دلالت بر کیفیت خوب تخم ماهی کپور و اسپرم ماهیان نر دارد.



نمودار ۱: اثر اشعه گاما در مقادیر ۹۰ تا ۱۱۰کیلورواد بر اسپرم ماهی کپور معمولی

اولین مرحله مورد توجه تعیین میزان لارو یا جنین در زمانهای متفاوت شوک پس از لقاح و درجه حرارتهای متفاوت شوک گرمایی و سرمایی بوده است. زیرا همبستگی بسیار بالایی بین میزان لارو قبل از تفریخ (جنین) و میزان لارو پس از تفریخ و در مرحله تغذیه فعال وجود دارد.

میزان لارو قبل از تفریخ تحت تاثیر شوک گرمایی ۳۸، ۴۰ و ۴۲ درجه سانتیگراد و شوک سرمایی ۵ و صفر درجه سانتیگراد برای مدت ۲، ۵ و ۸ دقیقه پس از لقاح در نمودار ۲ نشان داده شده است.



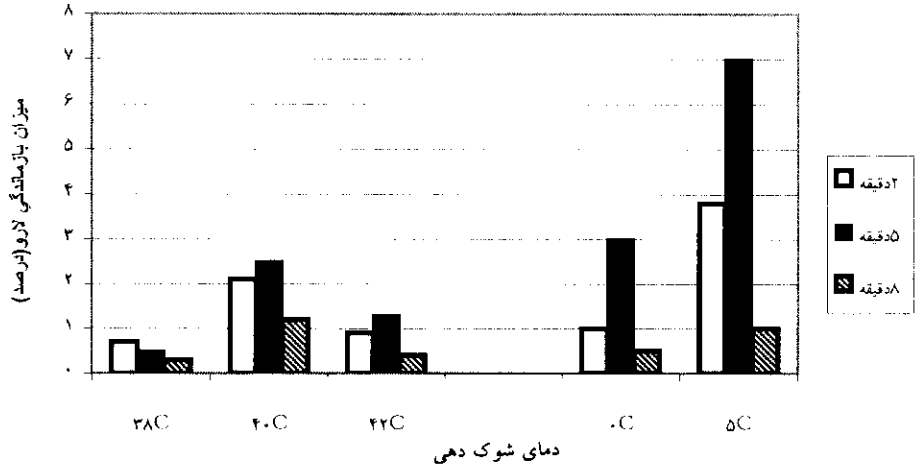
نمودار ۲: بازماندگی جنین در درجه حرارتهای مختلف و زمانهای متفاوت پس از لقاح اسپرم اشعه دیده (۱۰۰ کیلورواد) و تخم کپور معمولی

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به نمودار ۳، تامین شوک در خارج از زمان مناسب و نیز کمتر یا بیشتر از میزان مناسب تاثیر تخریبی بر جنین تخم ماهی کپور داشته و سبب تلفات بیشتر لاروهای تولیدی می‌گردد. تقریباً نتیجه مشابهی از تولید لارو دارای تغذیه فعال از تیمارهای فوق بدست آمده که در نمودار ۳ ارائه شده است.

تصمیم‌گیری درخصوص تاثیر شوک حرارتی یا زمان شوک‌دهی پس از مرحله تغذیه فعال بسیار علمی‌تر و منطقی‌تر از نتیجه‌گیری در مرحله جنینی ماهی است زیرا در مرحله پیش از تفریخ تخم، دقیقاً معلوم نیست که جنین زنده داخل تخم، دیپلوئید است یا هاپلوئید و آیا جنین داخل تخم به دلیل عدم تاثیر و ناکافی بودن شوک بصورت هاپلوئید باقیمانده یا شوک اثر نموده و لارو دیپلوئید تولید شده است. آنچه از نمودار ۳ حاصل می‌شود آن است که حرارت ۳۸ درجه سانتیگراد در مقابل ۴۰ درجه سانتیگراد برای شوک‌دهی کافی نبوده و ۴۲ درجه سانتیگراد ایجاد تاثیرات مخرب در تخم می‌نماید. از طرف دیگر در زمان مناسبی پس از لقاح باید نسبت به شوک‌دهی تخم ماهی اقدام نمود که این زمان در ماهی کپور حدود ۵ دقیقه پس از لقاح بدست آمد.



نمودار ۳: بازماندگی لارو در درجه حرارتهای مختلف و زمانهای متفاوت پس از لقاح اسپرم اشعه دیده (۱۰۰ کیلوراد) و تخم کپور معمولی

از نتایج دیگر بدست آمده از نمودار ۴ آن است که شوک سرمایی در هر دو تیمار انجام شده موثرتر از شوک گرمایی بوده است و شوک سرمایی صفر درجه و ۵ دقیقه پس از لقاح بیشترین باقیماندگی لارو دارای تغذیه فعال (۷ درصد) را داشته که نسبت به باقیماندگی لارو ۲/۵ درصد برای شوک گرمایی (۴۰/۲) اختلاف معنی داری را دارا بوده است ($P<0/05$).

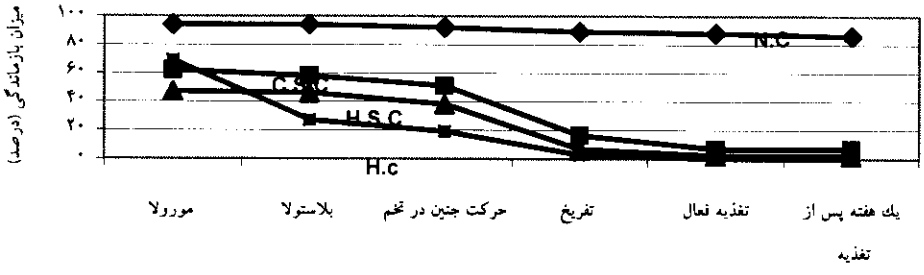
در گروه کنترل هاپلوئید نیز تخمهای چشم زده ماهی کپور مشاهده گردید ولی قبل از تفریخ تقریباً تمام آنها مردند و تنها تعداد کمی از آنها تفریخ شدند که این گروه به دلیل عدم همراه داشتن ژنوم پدری، ماده‌زاد خود به خود یا Spontaneus gynogenesis نامیده می‌شوند (نمودار ۴). بدیهی است در گروه ماده‌زاد هم تعدادی لارو ناشی از ماده‌زاد خود به خود وجود خواهد داشت و لذا هر گونه

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش نسبت به لاروهای نرمال گروه کنترل هاپلوئید بعنوان تاثیر شوک در ایجاد لارو دیپلوئید مادهزاد تلقی میگردد.

نمودار کنترل دیپلوئید نرمال، کنترل هاپلوئید و تیمارهای تخم های شوک داده شده در ۵ دقیقه پس از لقاح و در شوک صفر درجه سانتیگراد برای مدت ۴۵ دقیقه در نمودار ۴ نشان داده شده است.



نمودار ۴: بازماندگی لارو برحسب درصد مقدار مراحل انکوباسیون در گروههای تیمار (تیمار شوک گرمایی H.S.C و شوک سرمایی C.S.C) و شاهد (تیمار کنترل هاپلوئید H.C و زمان N.C).

این نمودار براساس زمانهای خاصی که زمانهای بحرانی محسوب میشوند، ارائه شده است. براساس این نمودار منحنی باقیماندگی لارو نرمال در حد بسیار بالایی قرار دارد (۹۴ درصد) که دلالت بر کیفیت مطلوب تخم و اسپرم ماهی دارد و تغییرات مراحل در این منحنی بسیار کم و تلفات لارو نیز بسیار اندک است (۸ درصد). درخصوص منحنی تیمار شوک و مقایسه آن با منحنی کنترل هاپلوئید این نتیجه بدست میآید که با وجود اینکه شوک توانسته جنین دیپلوئید را ایجاد نماید که از مقایسه مرحله حرکت فعال لارو درون تخم در منحنی فوق دیده میشود (۵۱ درصد در مقابل ۱۹ درصد)، با این وجود، نقطه بحرانی آن در زمان تفریخ است که منحنی سیر نزولیشدیدی دارد. میزان لارو در این مرحله بیش از ۸۰ درصد میزان جنین اولیه تلفات نشان میدهد. درخصوص منحنی کنترل هاپلوئید تلفات جنین از همان مراحل اولیه خود را نشان میدهد بطوریکه منحنی یک کاهش سریع در مرحله مورولا به مرحله حرکت جنین در تخم داشته و این کاهش در مراحل بعدی نیز تقریباً با همان شدت ادامه داشته و در مرحله تغذیه فعال تنها تعداد کمی لارو باقی مانده است (۰/۲ درصد).

در آزمایشات انجام شده از نشانگر ترانسفرین جهت بررسی صحت آزمایش استفاده گردید. الگوی انتخاب شده در ماهی ماده بصورت BB انتخاب گردیده در حالیکه در ماهی نر بصورت AB یا الگوی

www.SID.ir

Archive of SID

متفاوتی با ژنوتیپ ماده بوده است. بدین ترتیب از یکصد عدد بچه ماهیان ماده‌زا میوزی تنها ژنوتیپ BB مشاهده گردید و هیچ نمونه‌ای از نشانگر پدری یا بعبارتی ژن A مشاهده نشد.

بحث

آمیزش خویشاوندی خلوص ژنتیکی را افزایش می‌دهد، لذا در اثر کاهش تعداد افراد ناخالص، تعداد افراد خالص، افزایش می‌یابد ولی در تلاقی فامیلی و آمیزش خویشاوند دهها نسل طول می‌کشد تا ضریب خویشاوندی به یک نزدیک شود. ولی در شیوه ماده‌زاد تنها با یک نسل و طی زمان کوتاه این هدف حاصل می‌شود (Nagy *et al.*, 1978). در تحقیق حاضر که هدف بررسی امکان تولید ماهیان ماده‌زاد می‌باشد، با بررسی عوامل موثر بر تولید ماهیان ماده‌زاد نسبت به بهینه‌سازی این عوامل اقدام شد.

نتایج این تحقیق نشان داد که شوک دیر هنگام یا زود هنگام سبب کاهش درصد لاروهای دیپلوئید فعال می‌شود و زمان مناسبتر در مقایسه با سایر زمانهای بررسی شده ۵ دقیقه پس از لقاح بدست آمد. شوک تخم در زمان اولیه لقاح یا بسیار دیرتر از ۵ دقیقه با مرحله حساس رشد جنین تطبیق داشته و همانطورکه Komen و همکاران درسال ۱۹۹۰ بیان کردند، این زمان قبل از مرحله پروفاز یا پس از متافاز است که سبب ضربه زدن به جنین و مرگ آن می‌شود.

آزمایشات انجام شده توسط سایر محققان زمان مناسب شوک را ۳ تا ۶ دقیقه پس از لقاح نشان داده است (Yousefian, 1996) که با نتایج این آزمایش تطبیق دارد. میزان لارو ماده‌زاد بدست آمده نیز متفاوت بود. این دامنه وسیع زمانی و نیز اختلاف در میزان تولید به عوامل فراوانی بستگی دارد که از آن جمله می‌توان به چند عامل اشاره کرد: کیفیت مولد، بسته به کیفیت تخم و ژنوتیپ ماهی؛ تولید، واریانس را نشان می‌دهد. درجه حرارت، انکوباسیون و در نتیجه نزدیکی به زمان دقیق جداسازی میکروتیوبولها تفاوت تولید را بهمراه خواهد داشت. یکنواختی شوک که به دلیل عدم امکان تامین شوک به میزان ثابت و یکنواخت، درنهایت درصدی از تخمها در هر آزمایش به میزان مناسب شوک‌دهی نمی‌شوند. دقت دستگاه و ابزار کار، از عوامل ایجاد تفاوت در درصدی از لاروهای تولیدی هستند. تفاوتهای ژنتیکی گونه‌های ماهی و سرعت تکامل جنینی در گونه‌های متفاوت کپور یکسان نیست. این امر حتی درخصوص موجوداتی مانند موش که در زمان زایمان چندین فرزند تولید می‌نمایند نیز دیده شده است (Komen *et al.*, 1988). علاوه بر موارد فوق عوامل دیگری نیز ممکن است در تامین زمان مناسب شوک نقش داشته باشد که عبارتند از: سن ماهی، زمان لقاح تخم پس از تخمگیری از ماهی، حساسیت تخم به شوک و غیره. سن ماهی در این خصوص نقش بسیار مهمی دارد زیرا پوسته تخم که نقش حفاظتی تخم را در برابر شرایط نامناسب محیطی دارد در ماهیان جوانتر نازک و حساستر است، لذا بیشتر تحت تاثیر شوک یا درجه حرارت خاصی قرار می‌گیرد. از طرف دیگر،

www.SID.ir

Archive of SID

تخم ماهی در قسمتهای مختلف تخمدان در یک وضعیت یکسان نیست لذا پاسخ به شوک برای تمام تخمها که رهاسازی می‌شوند، کاملاً یکسان نمی‌باشد.

Komem و همکاران در تحقیقات خود در سال ۱۹۹۰ مشخص نمودند که تولید لارو دیپلوئید تنها در دوره زمانی پروفاز و پرومتافاز میسر است و تنها تخمهایی که دقیقاً در زمان شوک در این مرحله هستند، ممکن است تحت تاثیر شوک دیپلوئید شوند. در غیر اینصورت تاثیر حرارت سبب از بین رفتن جنین شده یا حتی اگر جنین هاپلوئید شوک حرارتی را تحمل نماید، موجود هاپلوئید بصورت ناقص تفریخ شده و امکان ادامه زندگی را ندارد.

در آزمایشات مربوط به تولید ماهی ماده‌زاد، لاروهای هاپلوئیدی که از لقاح تخم نرمال با اسپرم فاقد ژنوم انجام گرفت، اینگونه لاروها قادر به شکستن دیواره تخم نبوده و در همان مرحله تفریخ بیشترین میزان تلفات مشاهده گردید. پس از آن لاروهای غیرنرمال تا اولین مرحله تغذیه فعال پیش رفتند ولی پس از آن بجز تعداد معدودی (کمتر از ۰/۱ درصد) بقیه از بین رفتند. نتایج این مشاهدات با گزارش Nagy *et al.*, 1978 مطابقت داشته است. لاروهای هاپلوئید ممکن است از لحاظ ظاهری کامل باشند ولی به دلیل عدم تکامل اعضای داخلی قادر به هضم و جذب غذا نبوده و در این مرحله از بین می‌روند.

برگشت دومین گویچه قطبی و ایجاد ماهی ماده‌زاد میتوزی حتی پس از تیمارهای زمانی تعیین شده در این آزمایش نیز میسر است و همانطور که در تحقیقات Nagy در سال ۱۹۷۸ مشخص گردید تامین شوک تا قبل از بیست دقیقه پس از لقاح امکان تولید ماهی دیپلوئید را فراهم می‌سازد و پس از آن دومین گویچه قطبی کاملاً از بین رفته است.

در این تحقیق درجه حرارتهای متفاوت شوک با زمانهای متفاوت شوک مورد بررسی قرار گرفته تا مناسبترین زمان در درجه حرارت خاص بدست آید. این آزمایش نشان داد که شوک سرمایی صفر درجه در صورتی که ۵ دقیقه پس از لقاح اعمال شود بیشترین باقیماندگی‌لارو را خواهد داشت. کمترین میزان لارو در درجه حرارت ۳۸ درجه سانتیگراد بدست آمد که نشان می‌دهد اگر شوک به میزان موثر نباشد، تاثیری نداشته و تنها سبب می‌گردد تخمها صدمه دیده و تولید کم شود.

از نکات دیگری که از آزمایشات فوق نتیجه‌گیری می‌شود، امکان تخمین زمان و شوک مناسب در مرحله جنینی است. زیرا تامین شوک که در مراحل اولیه لقاح انجام می‌شود تاثیر خود را در همان زمان گذاشته و دسته‌های تخم تیمارهای ناموفق تلفات شدیدی را نشان داده و تخمها سفید می‌شوند و از درصد تخمهای سالم باقیمانده، شوک مناسب مشخص می‌شود.

با توجه به مباحثی که در این بخش مطرح شد تولید ماهی ماده‌زاد با در اختیار داشتن ابزار مناسب که مهمترین آن دستگاه اشعه گاما می‌باشد به راحتی میسر است ولی آنچه که بیشتر مد نظر قرار می‌گیرد دستیابی به شرایط مناسب و بهینه برای رسیدن به حداکثر لارو ماده‌زاد دیپلوئید است که آنهم با تغییرات کیفی تخم ماهی و حساسیت‌های متفاوت آن و تفاوتهای ژنتیکی و تاثیر تغذیه در

www.SID.ir

Archive of SID

مراحل نهایی تشکیل گناد، تاثیر عوامل تامین شوک مانند تامین یکنواخت درجه حرارت، زمان شوک، مدت شوک‌دهی و درجه حرارت انکوباسیون و دهها عامل دیگر، نمی‌توان اعداد ثابتی را برای دستیابی به اهداف فوق ارائه داد ولی می‌توان برای هر یک از عوامل فوق یک دامنه کوچک و محدود تعریف نمود و با انجام یک آزمایش اولیه انتظار داشت که بیشترین لارو دیپلوئید بدست آید.

به دلیل کاربرد وسیع شیوه ماده‌زاد در دو دهه اخیر، کشورهایی مانند مجارستان، هلند، چین، لهستان و هند پس از بهینه‌سازی عوامل موثر در ایجاد ماهی ماده‌زاد با تکمیل اطلاعات درخصوص شناسایی ماهیان کپور کشور خود و با انتخاب مولدین مناسب اقدام به استفاده از این روش در تولید لاین و اصلاح نژاد ماهی نموده‌اند. در کشور مجارستان از سال ۱۹۷۸ نسبت به شناسایی و انجام ماده‌زاد و تولید لاین اقدام شده است (Nagy *et al.*, 1978 ; Csizmadia *et al.*, 1995) .

محققان هلندی در ایجاد لاینهای تولیدی ماهی کپور به دنبال امکان استفاده از ماهی ماده‌زاد به منظور دستیابی به حداکثر واریانس افزایشی هستند (Bonger *et al.*, 1997a). محققان چینی در یک پروژه تحقیقاتی ۱۵ ساله (۱۹۹۵ – ۱۹۷۹)، روش ماده‌زاد و دو رگه گیری را تواماً استفاده نمودند (Liu *et al.*, 1997). ماهیان ماده‌زاد سه نوع کپور شامل کپور وحشی هلونگ جیانگ که مقاوم به سرماست، کپور قرمز هبایو که بصورت متراکم می‌تواند پرورش یابد و کپور آینه‌ای که رشد سریعی دارد، تولید شده و سپس بصورت سه گانه هیبرید شده‌اند. هدف از این تحقیق تولید ماهی کپور سریع‌الرشدی است که به سرما و بیماری مقاوم باشد.

با توجه به مقدار سنجی انجام گرفته اشعه گاما و تاثیر مثبت آن در تخریب ژنوم اسپرم و با توجه به بهینه‌سازی زمان و مدت شوک‌دهی، پیشنهاد می‌گردد از این روش بخوبی می‌توان در انجام اصلاح نژاد ماهی کپور و با انجام آزمایشات تکمیلی برای سایر ماهیان در مزارع تکثیر ماهی اقدام شود.

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم پژوهشکده اکولوژی دریای خزر آقای دکتر خوشباور رستمی و پرسنل بخش آبزی‌پروری آقای دکتر نظری و مهندس مخدومی و بخش اطلاعات علمی آقای نوش آبادی و سرکار خانمها نبوی و علوی که نهایت همکاری را مبذول داشته‌اند، تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

این پروژه تحقیقاتی از طریق طرح ملی تحقیقات شماره ۷۹۵ و با حمایت شورای پژوهش‌های علمی کشور انجام یافته است.

منابع

اسماعیلی، ا.ح. و کلباسی، م.ر. ، ۱۳۸۳. القای ژینوژنزیز میتوزی و میوزی در قزل آلای رنگین کمان با تاکید بر تعیین زمان خروج گویچه قطبی و اولین تقسیم جنسی. پایان نامه کارشناسی ارشد. ۹۵ صفحه.

www.SID.ir

Archive of SID

یوسفیان، م. و نظری. ر.م. ، ۱۳۷۷. بررسی اثر اشعه گاما بر روی اسپرم ماهیان خاویاری و ایجاد ماهی ژینوژنزیز در تاسماهیان. اولین سمپوزیوم ماهیان خاویاری. رشت. ۶۶ صفحه.

Amirinia, S. , 1996. Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Ph.D. Thesis. University of Godollo, Hungary.

Arai, K. , 1998. Viability of allotriploids in salmonids Nippon Suisan Gakkaishi. 01701-1695, Vol. 10, 54P.

Bieniarz, K. ; Koldras, M. and Meiza, T. , 1997. Unisex and polyploid populations of cyprinid and silurid fish. Arch. Ryb. Pol. Arch. Pol. Fish. Vol. 5, No. 1, pp.31-36.

Bongers, A.B.J. ; Bovenhuis, H. ; Van Stokom, A.C. ; Wiegerties, G.F. ; Zandieh Doulabi, B. and Komen, Richter, C.J.J. , 1997a. Distribution of genetic variance in gynogenetic or andrgenetic families. Aquaculture. Vol. 153, No. 3-4, pp.225 - 238.

Bongers, A.B.J. ; Ben AVED, M.Z. ; Zandieh Doulabi, B. ; Komen, J. and Richter, C.J.J., 1997b. Origin of variation in isogenic, gynogentic, and androgentic strains of common carp, *Cyrinus carpio.* L. Exp. ZOOL. Vol. 277, No. 1, pp.72-79.

Csizmadia, C.S. ; Jeney, Z.S. : Szerencses, I. and Gorda, S. , 1995. Transferrin polymorphism of some races in a gene bank of common carp. The carp proceeding of the second aquaculture sponsored symposium held in Budapest, Hungary. 6-9 September. (eds R. Billard R. and G.A.E. Gall). Vol. 129, No. 1-4, pp.193-198.

Das, P. ; Mishra, A. and Srivastava, V.K. , 1996. Status on research in applied carp genetics and breedings in India. Journal of Aquacult. Trop. Vol. 11, No. 4, pp.307-317.

Gomelsky, B. ; Cherfas, N. and Hulata, G. , 1998. Studies on the inheritance of black patches in ornamental (Koi) carp. Israeli Journal of Aquaculture. Bamidgeh Vol. 50, No. 3, pp.134 - 139.

Horvath, L. ; Tamas, G. and Tolg, I. , 1984. Special methods in pond fish husbandary. Akademiai Kiado, Budapost. 148P.

Kobayashi, M. and Nakanishi, T. , 1999. Ketotesterone induces male type sexual behavior and gonadotropin secretion in gynogentic crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii.* General and Comparative Endocrinology. Vol. 115, No. 2, pp. 178-187.

www.SID.ir

Archive of SID

Komen, J. ; Dugnhouwer, J. ; Richter, C.J.J. and Huisman, E.A. , 1988. Gynogenesis in commoncarp (*Cyprinus carpio* L.). Effects of genetic manipulation of sex products and incubation conditions of eggs. Aquaculture. Vol. 69, pp.227-239.

Komen, J. ; Bongers, A.B.J. ; Bonger, S. ; Richter, C.J.J. ; Van Muisiwinkel, W.B. and Huisman, E.A. , 1990. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpiol*). The production of homozygus gynogenetic commen carp, (ed. J. Komen). pp.57-60.

Liu, Minghua ; Shen, Junbao ; Bai, Qingli and Xu, Wei , 1997. Cross breeding of new frigid carp. Journal of Fish China, shuichan Xuebao. Vol. 21, No.4, pp.391-397.

MaClean, N. and Penman, D. , 1990. The application of gene manipulation to aquaculture. Aquaculture. Vol. 85, pp.1-20.

Nagy, A. ; Rajki, K. ; Horvath, L. and Csanyi, V. , 1978. Investigation on carp *Cyprinus carpio,* gynogenesis. Journal of Fish. Biol., Vol. 13, pp.215-224.

Persov, G.M. , 1947. Sexual function of Acipenserid males (a histological and experimental study). Candidate Disertation LGU, Leningrad (im Russaian).

Seeb, J.E. ; Thorgaad, G.H. and Uttev, F.M. , 1988. Survival and allozyme expression in diploid and triploid hybrids between cham, chinook, and coho salmon, Aquaculture. Vol. 71, pp.31-48.

Taniguchi, N. ; Kijima, A. ; Tamura, T. ; Takegami, K. and Yamasaki, I. , 1986. Color, growth and maturation in ploidy manipulated fancy carp. Presented, 2n internat. Symp. Genetics in aquaculture. 23-28 June, Davis, California, USA.. 205P.

Van Muiswinkel, W.B. ; Tichelaar, A.J. ; Harmsen, E.G.M. and Rijiders, P.M. , 1986. The use system of carp (*Cyprinus carpio* L.). Vet. Immunol. Immunopathol. Vol. 12, pp.1-6.

Wu, C. ; Ye, Y. and Chen, R. , 1986. Genome manipulation in carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture. Vol. 54, pp.57-61.

Yousefian, M. , 1996. Mitotic gynogenesis in Common Carp (*Cyprinus carpio L.*). Ph.D. Thesis. University of Godollo, Hungary. 180P.

Yue, Zhenyu ; Jiang, Yigui ; Shan, Shixin and Ding, Jun , 1996a. The regulated development of heterologous sperm nucleus by eggs of natural gynogenetic

www.SID.ir

Archive of SID

silver curcian carp *(Carassius auratus gibelio)* during fertilization. Axta Hydrobiol. Sin. Shuisheng Shengwu Xueebao. Vol. 20, No. 3, pp.236-241.

Yue, Zhenyu ; Jiang, Yigui and Shan, Shixin , 1996b. Biochemical characteristics of gynogenetic and bisexual repoductive fish eggs regulating the development of sperm nuclei during early fertilization. Acta Hydrobiol. Sin. Shuisheng Shengwu Xuebao. Vol. 20, No. 2, pp.164-172.

www.SID.ir

Archive of SID

Generating gynogenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.) by Gama ray

Yousefian M.

yousefianeco@yahoo.co

Caspian Sea Ecology Research Center, P.O.Box: 916 Sari, Iran

Received: March 2003 Accepted: July 2005

Keyword: Common carp, Genetic Manipulation, Gynogenesis, Gamma ray

Abstract

We investigated the generation of gynogenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.) during 1989–1990. After selection of suitable breeders containing special transfferin marker in breeding season, we applied ionizing radiation (60 Co gamma ray) for genetic inactivation of spermatozoa of the fish. We found that in the exposure of the sperm to a range 80-120 Krad irradiation, 100 Krad gave the best results. Application of various cold and heat shocks to the eggs at different time intervals after addition of water to the mixture of milk and eggs generated diploid gynogenetic fish. Cold and hot shock treatments generated significantly different gynogenetic fish (7% and 2.5% respectively). The optimum shock treatment was found to be 5 minutes after fertilization in $0^{\circ C}$ lasting 50 minutes. For each treatment, 100 fish fingerlings were subjected to electrophoresis which showed the mitotic diploid progenies were all-maternal inherited with BB genotype.

www.SID.ir