Archive of SID

تعیین زمان اولین تقسیم میتوزی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

- **ثارالله زارعی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران، صندوق پستی: ۸۳۱۱۱-۸٤۱٥٦
- **سالار درافشان***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران، صندوق پستی: ۸۳۱۱۱-۸٤۱٥٦
- **فاطمه پیکان‌حیرتی**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران، صندوق پستی: ۸۳۱۱۱-۸٤۱٥٦

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹٦ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹٦

چکیده

متوسط زمان لازم بین لقاح تا اولین تقسیم میتوزی (First Cleavage Interval (FCI در قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* و ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* تعیین شد. لقاح با استفاده از تخمک و اسپرم استحصالی از ٦ الی ۹ قطعه مولد ماده از هر گونه انجام شد. به‌منظور 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 به‌روش خشک انجام و تخم‌های لقاح یافته در ۰/۳± ۷/۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. نمونه‌برداری از تخم‌های لقاح یافته هر گونه در فاصله زمانی ٥ الی ۱۲ ساعت پس از لقاح با فاصله زمانی ۱۰ دقیقه انجام شد. در هر مرحله، حداقل ۳۰ عدد تخم نمونه‌برداری شده و بلافاصله پس از شفاف‌سازی، در محلول داویدسون تثبیت شدند. نمونه‌ها با بزرگ‌نمایی X٤۰ جهت حضور شیار تقسیم و وقوع تقسیم میتوزی بررسی شدند. معیار وقوع اولین تقسیم میتوزی، وجود شیار تقسیم کامل در حداقل ٥۰ درصد نمونه‌ها بود. نتایج نشان داد که اولین تقسیم سلولی تخم در قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌طور میانگین در ۳۰±۳۲۱۲ درجه-دقیقه پس از لقاح (حدود ۷ ساعت و بیست دقیقه) به‌طور معنی‌داری در زمان کوتاه‌تری نسبت به ماهی آزاد دریای خزر ۳٥±٤۰۱٥ درجه-دقیقه (۹ ساعت و ده دقیقه) رخ می‌دهد و لذا زمان مناسب برای القای تتراپلوییدی در ماهی آزاد دریای خزر و قزل‌آلای رنگین‌کمان با یکدیگر کاملاً متفاوت خواهد بود. ارزیابی اثرات انفرادی والدین بر زمان اولین تقسیم سلولی تخم در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، ماهی آزاد دریای خزر، تقسیم میتوز

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

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 آبزی پروری مورد توجه قرار گرفته‌اند. هم‌اکنون بخشی از تولید تجاری ماهیان سردابی در جهان متعلق به تولید ماهیان دستکاری شده کروموزومی (پلی‌پلوییدی) است. پلی‌پلوییدی‌ها افرادی هستند که نسبت به هم‌نوعان خود، یک یا تعداد سری بیش‌تری از مجموعه کروموزومی دارند و به‌نظر می‌رسد وقوع این فرایند در گروه‌های ابتدایی‌تر مهره‌داران، نظیر ماهیان بیش‌تر است (Legatt و همکاران، ۲۰۰۶).به‌طور مصنوعی، می‌توان تریپلوییدی یا تتراپلوییدی 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 تتراپلویید به‌عنوان یک منبع مهم در تولید انواع تریپلویید به‌روش غیرالقایی حائز اهمیت است.موفقیت القای پلی‌پلوییدی در آبزیان،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 پلوییدی محسوب می‌گردند (Dunhum، ۲۰۰۴؛ Weber و Hostuttler، ۲۰۱۲). از این‌رو موفقیت القای تتراپلوییدی 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 تتراپلوییدی در پژوهش‌های مختلف به‌دلیل مدنظر قرار ندادن تفاوت در FCI، با یکدیگر متفاوت است (Hershberger و Hostuttler، 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.

مواد و روش‌ها

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 ۳۴۶±۱۹۸۶ گرم و هم‌چنین ۹ قطعه مولد ماده ماهی آزاد خزر با میانگین وزنی ۲۴۶ ±۲۲۱۶ 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 ۱۸۶±۹۳۹ و ۱۸۶±۱۵۹۳ 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، به‌منظورحذف 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 آبگیری تخم‌های لقاح یافته به‌طور مرسوم انجام شد (نفیسی‌بهابادی و فلاحتی‌مروست، ۱۳۸۶). زمان افزودن محلول لقاح به تخم‌ها، زمان صفر درنظر گرفته شد. تخم‌ها سپس به ترافهای کالیفرنیایی منتقل و با میانگین دمای ۰/۲±۷/۳ 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 ۳۷٪، ۱۰۰ میلی‌لیتر گلیسرول، ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول، ۱۰۰ میلی‌لیتر استیک اسید و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر جایگزین شد. به‌این‌ترتیب از چروکیدگی تخم‌ها پیشگیری شد تا در فرصت مناسب در زیر میکروسکوپ قابل‌مطالعه 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 ازلحاظ توسعه و تکامل جنینی بررسی شدند. میانگین FCI یا فاصله زمانی اولین تقسیم سلولی، زمانی درنظر گرفته شد که در آن زمان شکاف تسهیم

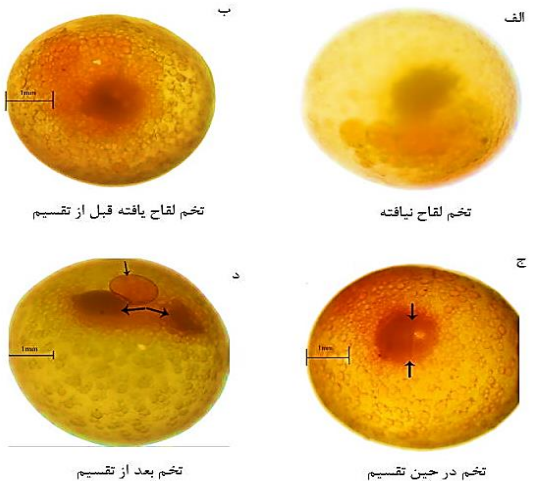
www.SID.ir

Archive of SID

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، ۷/۳±۰/۲ 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 رنگین کمان 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 ۷/۳ درجه سانتی‌گراد، تکمیل شیار تسهیم در وسط ژرمینال دیسک در ۵۰٪ تخم‌های قزل آلای رنگین‌کمان در بازه زمانی ۳۲۱۲±۳۰ درجه-دقیقه (حدود ۷ ساعت و ۲۰ دقیقه پس از لقاح) و در تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر در محدوده زمانی ۴۰۱۵±۳۵ درجه-دقیقه (حدود ۹ ساعت و ده دقیقه) پس از لقاح مشاهده شد.



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، ۷/۳±۰/۳ 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، ۷/۳±۰/۳ درجه سانتی‌گراد. بزرگ‌نمایی X۴۰.

بحث

تعیین زمان اولین تقسیم سلولی در ماهیان می‌تواند اطلاعات با ارزشی را درخصوص احتمال موفقیت شوک‌های فیزیکی یا شیمیایی برای القای تتراپلوییدی 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 تتراپلوییدی در ماهیان هستند (Pandian و Koteeswaran، ۱۹۹۸).

با این وجود در سالیان اخیر، اطلاعات بعضاً متفاوتی از موفقیت القای تتراپلوییدی در یک گونه مشخص از آزادماهیان نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش شده است. به‌عنوان مثال (کلباسی و همکاران، ۱۳۸۲)، بهترین بازده تتراپلوییدی را در این گونه، در اعمال شوک در ۷۴ ساعت-درجه، Thorgaard و همکاران (۱۹۸۱) بهترین زمان آغاز شوک را ۵۰ ساعت-درجه و Chourrout (۱۹۸۸) بهترین زمان را برای القای تتراپلوییدی ۸۵ ساعت-درجه عنوان کردند. درحالی‌که درافشان و همکاران (۱۳۹۳)، بالاترین درصد تتراپلوییدی 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 (Hershbeger 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 تفریخ در دو گونه فوق، کاملاً قابل پیش‌بینی است. به‌طوری‌که تخم ماهی آزاد دریای خزر به‌طور معمول نیازمند ۴۵۰ درجه-روز برای تفریخ است درحالی‌که این دوره برای قزل‌آلای رنگین کمان حدود ۳۰۰ درجه-روز گزارش شده‌است (پاشازانوسی و همکاران، ۱۳۹۲). از این رو به‌نظر می‌رسد زمان اعمال شوک برای القای تتراپلوییدی در ماهی آزاد دریای خزر، در فاصله زمانی بیش‌تری نسبت به زمان لقاح، نسبت به قزل‌آلای رنگین‌کمان باشد. با توجه به مطالعات پیشین (Hershbeger و Hostuttler، ۲۰۰۵؛ Weber و Hostuttler، ۲۰۱۲) که زمان مناسب برای اعمال شوک جهت القای تتراپلوییدی 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 تتراپلوییدی در این گونه مثمر ثمر باشد. با عنایت به عدم وجود اطلاعات لازم درخصوص القای موفقیت‌آمیز تتراپلوییدی 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.

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.، ۱۳۸۵.** دستکاری‌های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) و قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و مقایسه رشد در نسل F_1. رساله دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۴۰ صفحه.

۳. **درافشان، س.؛ وفایی‌سعدی، ا. و نکوئی‌فر، ع.، ۱۳۹۳.** بهترین شرایط شوک حرارتی برای القای تتراپلوییدی در قزل‌آلای رنگین کمان (*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 تتراپلویید قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌وسیله شوک گرمایی. مجله علمی شیلات ایران. دوره ۱۲، شماره ۴، صفحات ۱۴۳ تا ۱۵۲.

۵. **نفیسی‌بهابادی، م. و فلاحتی‌مروست، ع.، ۱۳۸۶.** راهنمای عملی تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. دانشگاه هرمزگان، بندرعباس. ۲۸۸صفحه.

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., l987.** 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., 198l.** 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.

www.SID.ir