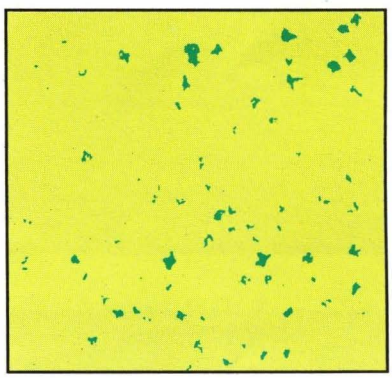
مطالعات کاریولوژی میگوی آب شیرین

(Macrobrachium rosenbergii)

● **حسین نوروزی مقدم و مجید عابدی** - مؤسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران - مرکز تحقیقات شیلاتی استان مازندران

مقدمه

خانواده پالونیده تقریباً شامل ۱۲۵ گونه است. اگر چه فقط مطالعات کاریولوژی دو گونه *Palammen lamarrei* (Vishnoi, ۱۹۷۲) و *Macrobrachium. siwalikensist* (Mittal and Dhall) گزارش شده است و با وجود اینکه میگوی روزنبرگی (rosenbergii) یکی از میگوهای مهم تجاری است که به طور قابل توجهی مورد تکثیر و پرورش قرار می‌گیرد. فقط اطلاعات مختصری درباره تعداد کروموزومهای آن گزارش شده است. اطلاعات کاریولوژی این گونه می‌تواند سهم مؤثری برای فهم تاکسونومیک و فیلوژنی آن داشته باشد. دستکاری کروموزومهای آن در آینده بویژه در آزمایشهایی مانند ژینوژنز، پلی‌پلوئید، می‌توان پایه‌ای برای تکثیر این گونه باشد. این مقاله بحثی پیرامون شمارش دقیق کروموزومها و آزمایش



تصویر ۱: گسترش متافاز میتوزی به دست آمده از بافتهای شاخی میگوی آب شیرین *M. rosenbergii*

کاریوتیپ این‌گونه با به کارگیری تکنیک خشک کردن (لامها) با شعله دارد که با این تکنیک تحقیقات کروموزومی پالونیده‌ها بهتر از تکنیکهای محققان قبلی قابل انجام است.

مواد و روش

تعداد ۵۰ عدد از هر دو جنس نر و ماده که وزن آنها بین ۱ تا ۴۰ گرم بود مورد آزمایش قرار گرفت. میگوهای نر مورد آزمایش متعلق به مالزی بودند که تکثیر و پرورش آنها در جنوب کشور ژاپن صورت گرفت. میگوها برای یکبار به یکی از میزانهای ۲ و ۱/۵ و ۱ و ۰/۵ و ۰/۲۵ میکروگرم بر گرم وزن بدن از محلول نمکی که ۵ میلی‌گرم کلشیسین (Colchicine) و ۹۰ میلی‌گرم کلریدسدیم در ۱۰ میلی‌لیتر آب حل شده بود، از ناحیه عضلانی مورد تزریق قرار گرفتند و تقریباً برای مدت ۳، ۴، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۵ و یا ۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تا زمان تشریح نگهداری شدند. در این روشها حتی‌الامکان از ۵۰ عدد و به میزانهای مختلف مورد تزریق قرار گرفتند و در طی زمانهای ذکر شده جهت تحقیق، نگهداری شدند و سپس تشریح گردیدند و با برشهای مناسب قطعات، تقریباً ۲ میلی‌متر از بافت غدد شاخی و بیضه را جدا کرده و سپس بافتها را در محلول ۰/۰۱ مولار کلرید سدیم هیپوتونیک برای مدتهای ۱۰ و ۱۱، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ و یا ۳۰ دقیقه در حالی که دمای اطاق تقریباً برابر ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود قرار دادند.

سلولها را در محلول الکل متانول و اسید استیک به نسبت ۳ به ۱ (سه قسمت الکل متانول و یک قسمت اسید استیک) برای مدت ۴۰ دقیقه فیکس نمودند و سپس آنها را روی لامهای با حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و له نمودند و بلافاصله بر اساس روش Hasegawa (۱۹۸۱) و Murofushi و Deguchi (۴) (۱۹۸۳) با شعله خشک کردند و جهت رنگ آمیزی کروموزومها لامها را برای مدت ۴۰ دقیقه در محلول ۲٪ گیمسا رقیق شده و با بافرفسفات (۴۰ میلی‌مولار Na2HPO4 و ۲۶/۶ میلی‌مولار KH2PO4, pH=۶/۸) قرار دادند و سپس لامها را دوبار با آب شستشو داده و اجازه دادند در هوای آزاد برای مدت ۲۴ ساعت خشک کردند. پس از مشاهده، از کروموزومها با فتومیکروسکوپ نیکون مجهز به دوربین، عکس تهیه نمودند و سر انجام کروموزومها را مرتب کرده و جفتهای هملوگ را در کنار یکدیگر قرار داده و با توجه به نسبت طول بازوی بزرگ به طول بازوی کوچک بر اساس نظریه Levan با در نظر گرفتن تغییرات اندازه آنها را منظم کردند.

نتیجه

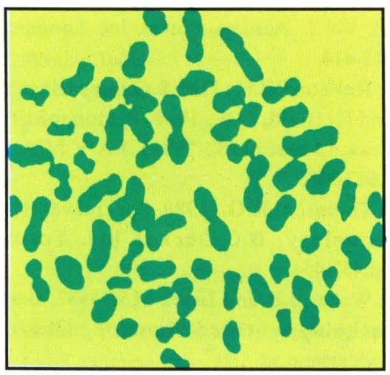
برای هر دو بافت غدد شاخی و بیضه اغلب نمونه‌ها به طور مؤثر تحت تزریق کلشیسین به میزان ۱ تا ۲ میکروگرم بر گرم وزن بدن قرار گرفتند و به مدت ۸ تا ۱۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند و نیز به مدت ۱۱ تا ۱۲ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در محلول هیپوتونیک قرار گرفتند. در گسترشهایی که از بافت غدد شاخی میگوهای نوجوان (بین ۱/۴ تا ۲/۶ گرم) تهیه شده بودند کروموزومها به روشنی قابل مشاهده بودند (تصویر ۱).

در میگوهای بزرگتر از این اندازه، به ویژه در میگوهای بالغ تعداد گسترشهای کروموزومی متافازی به طور قابل توجهی کاهش نشان می‌داد. گسترشهای کروموزومی هاپلوئید به روشنی از بافتهای بیضه هر دو گونه میگوی بالغ و نابالغ به دست آمد (تصویر ۲).

معمولاً در گسترشهای هاپلوئید با توجه به یکسان بودن اندازه میگوها نتایج یکسانی به دست نیامد. از تجزیه و تحلیل گسترشهای تهیه شده از بافتهای غدد شاخی هر دو جنس نر و ماده نتیجه گیری شده که تعداد دیپلوئید کروموزومها ۲n=۱۱۸ است (تصویر ۴ و ۳).

ترتیب توزیع تعداد کروموزومهای به دست آمده از جنس ماده، مشابه جنس نر است اگر چه در تعداد زیادی از گسترشهای سلولی جنس ماده تعداد کروموزومها ۱۱۷ عدد بوده است و نیز در دومین پیک بعد از پیک اصلی در جنس ماده تعداد کروموزومها ۱۱۱ عدد بوده است. و در جنس نر تعداد دیپلوئید کروموزومها با تعداد هاپلوئید کروموزومها (n=۵۹) که از بیضه به دست آمده قابل تأیید بود (تصویر ۵).

کاریوتیپ تهیه شده از کروموزومهای متافازی غدد شاخی دارای ۴۵ جفت کروموزوم متا و ساب متاسنتریک و ۱۴ جفت کروموزوم ساب تلو و اکروسنتریک بود (تصویر ۶).



تصویر ۲: گسترش متافاز میوزی به دست آمده از بافت بیضه‌های میگوی آب شیرین *M. rosenbergii*

چکیده
مطالعات سیتوژنتیک در میگوی آب شیرین M. rosenbergii به وسیلهٔ تهیهٔ گسترشهای متافازی از کروموزومهای بافتهای غدد شاخی و بیضه انجام گرفته است. تجزیه و تحلیل کروموزومهای غدد شاخی در جنس نر نشان داد که مدل دیپلوئید کروموزومی ۲n=۱۱۸ است و در همین جنس شمارش هاپلوئید کروموزومهای بیضه n=۵۹ بوده است. منحنی هیستوگرام مربوط به جنس ماده مدل دیپلوئید کروموزومهای آن را ۲n=۱۱۸ نشان می‌دهد. اگر چه در تعداد بخصوصی از سلولها تعداد کروموزمها ۱۱۷ بوده است. در دومین نقطه اوج منحنی جنس ماده تعداد ۱۱۱ کروموزوم مشاهده شده است. بنابراین امکان نتیجه گیری قطعی در تعداد کروموزومهای جنس ماده وجود نداشته است. از مشاهدات کاریوتیپی میتوزی بافتهای غدد شاخی احتمال داده می‌شود که کروموزومها شامل ۴۵ جفت متا و ساب متاسنتریک و ۱۴ جفت ساب تلو و اکروسنتریک می‌باشند و کروموزومهای جنسی تشخیص داده نشدند.

کوچکترین جفت کروموزوم در طبقه‌بندی بر اساس نسبت طول بازوها نیز قطعاً کوچکتر بود و اگر چه مشاهدات میکروسکوپی پیشنهاد می‌کند که تشابه بین جفت کروموزومهای متا و ساب متاسنتریک بیشتر از جفت کروموزومهای ساب تلو و اکروسنتریک بوده است. در کاریوتیپ هر دو جنس ویژگی یکسانی برای یک جفت از کروموزومهای ساب متاسنتریک بزرگ وجود داشت که اندازه آن ۶/۴ مرتبه بیش از کوچکترین جفت کروموزوم بود و کروموزومهای جنسی تشخیص داده نشد.

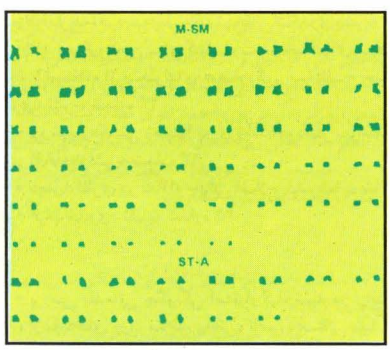
بحث

برای رسیدن به سلولهایی که کروموزومهای آنها در مرحله متافاز باشند، نیاز به بافتهای میتوزی فعال در حال تقسیم می‌باشد بنابر این میگوهای نوجوان که در حالت رشد سریع هستند از میگوهای بالغ برای به دست آوردن کروموزومهای دیپلوئیدی در تهیه گسترشهای کروموزومی مناسبند. Negamin (۱۹۸۰) و همکارانش مشاهده کردند که در داخل لوبولهای اسپرماتوژنیک جنس نر مملو از اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید است که این تنوع سلولی وابسته به مراحل مختلف اسپرماتوژنز در نرهای تشریح شده است. بنابر این بسته به این مراحل در گسترشهای کروموزومهای هاپلوئید که از بافت بیضه میگوهای با اندازه یکسان تهیه می‌گردند و امکان عدم سازگاری کروموزومی وجود دارد. زیرا بعضی دارای مراحل اسپرماتوژنز پیشرفته‌تری نسبت به هم اندازه‌های خود هستند.

غلظت کلشیسین به میزان ۱ تا ۲ میکروگرم بر گرم وزن به طور مؤثری از تقسیم سلولهای متافازی جلوگیری می‌کند اما در مقایسه با سایر سخت پوستان که نیازمند به نگهداری به مدت ۴ تا ۶ ساعت بعد از تزریق هستند، در این میگو نیاز به زمان طولانی‌تر برای نگهداری (۱۲-۸ ساعت) بعد از تزریق است و با نگهداری میگوها بعد از تزریق در دماهای بالاتر (بالای ۲۸ درجه سانتیگراد) می‌توان مدت زمان نگهداری را کوتاه کرد، برای قرار دادن بافتها در محلول هیپوتونیک از کلرید پتاسیم ۰/۰۱ مولار استفاده گردید. که سلولها را در متافاز متورم کند و تا حدودی این تورم از روی هم افتادن کروموزومها جلوگیری می‌کند و مشابه این عمل در گزارشهای مربوط به سخت پوستان در دماهای معتدل بیان شده است.

به طور دقیق تعداد دیپلوئید کروموزومهای جنس نر ۲n=۱۱۸ عدد بود. اگر چه در نمودار هیستوگرام جنس ماده در تعداد بخصوصی از گسترشها تعداد دیپلوئید کروموزومها ۱۱۷ و در دومین پیک پایین‌تر از بلندترین پیک تعداد کروموزومها ۱۱۱ عدد بودند. به علاوه در بالاترین نمودار کروموزومها ۱۱۸ عدد بود که این اطلاعات از تعیین مطلق شماره دیپلوئید کروموزومها جلوگیری می‌کنند. گذشته از اینها استفاده از تکنیکهای دقیق‌تر در آزمایشات کروموزومی به منظور تعیین تعداد دقیق کروموزومها ضروریست. ما حدس می‌زنیم تعداد دیپلوئید کروموزومها بر طبق آنچه در گزارشهای قبلی Malecha (۱۹۷۷) برای هر دو جنس این گونه ۲n=۱۱۵ بیان شده، نمی‌باشد. و در حقیقت اختلافات می‌تواند ناشی از این مسئله باشد که در تجزیه و تحلیل‌های Malecha تعدادگسترشهای اندکی مورد مطالعه قرار گرفتند و تعداد دیپلوئید کروموزومها و شمارش هاپلوئید کروموزومها تأیید نشده است. تعداد دیپلوئید و هاپلوئید کروموزومهای این میگو مشابه آنچه در میگوی *Palaemon lemarrei* گزارش شده می‌باشد. اما تعداد آنها از آنچه در مورد میگوی *Macrobrachium siwalikensis*(۲n=۱۰۰) گزارش شده بیشتر بوده است.

هر دو گونه میگوی پالمونیده فوق بومی هند می‌باشند. Taken و همکاران در مطالعات خود پیشنهاد کرده‌اند که در میگوهای پالمونیده ممکن است تعداد کروموزومها ۱۱۸-۱۰۰ عدد باشد. این کروموزومی بیشتر از کروموزومها در گونه‌های پنائیده (۹۲-۸۸) و کمتر از تعداد کروموزومهای



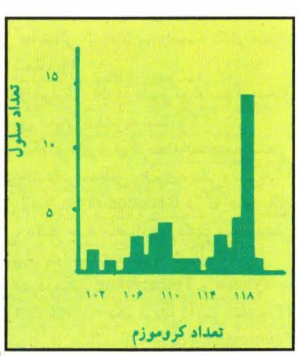
تصویر ۶: نتایج کاریوتیپ میگوی آب شیرین که جفت کروموزومهای همولوگ با توجه به اندازه و طول نسبی بازوها از بزرگ به کوچک مرتب شدند.

کمبریده واستاسیده (۳۷۶-۱۸۸) است.

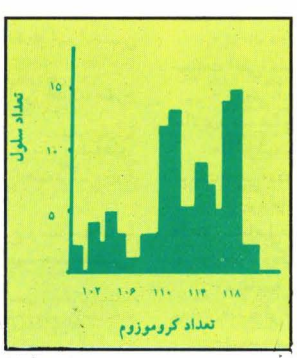
کاریوتیپ این میگو دارای ۴۵ جفت کروموزوم متا و ساب متاسنتریک و ۱۴ کروموزوم ساب تلو و اکروسانتریک است که این با آنچه در مورد میگوی سیوالیکنسیس که دارای ۵۰ جفت کروموزوم متاسانتریک بوده است و میگوی گونه لاماری که دارای ۴ جفت کروموزوم متاو ۵۵ جفت کروموزوم اکروسنتریک بوده است، تفاوت دارد. این کاریوتیپ به ما پیشنهاد می‌کند که کاریوتیپهای پالمونیده برای هر گونه اختصاصی است.

منبع مورد استفاده

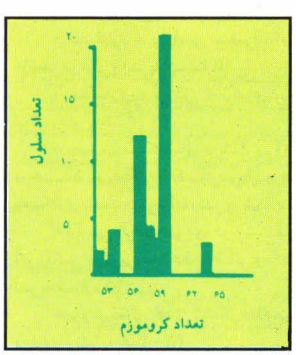
Claudio Chavez Justo, Makoto Murofushi Katsumi Aida and Isao Hanyu, 1991, Karyological studies on the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, Aquaculture. 97, 327-334.



تصویر ۳: مدل توزیع تعداد دیپلوئید کروموزومهای جنس‌نر میگوی آب شیرین *M. rosenbergii* (سه عدد میگوی نر مورد بررسی قرار گرفتند).



تصویر ۴: مدل توزیع تعداد دیپلوئید کروموزومهای جنس ماده میگوی آب شیرین *M. rosenbergii* (یازده عدد میگوی ماده مورد بررسی قرار گرفتند)



تصویر ۵: مدل توزیع تعداد هاپلوئید کروموزومهای جنس نر میگوی آب شیرین *M. rosenbergii* (ده عدد میگوی نر مورد بررسی قرار گرفتند)