https://ui.ac.ir/en

Journal of Taxonomy and Biosystematics
E-ISSN: 2322-2190
Document Type: Research Paper
Vol. 12, Issue 1, No.42, Spring 2020, P:3
Received: 10/08/2020 Accepted: 31/10/2020

A Karyological Study of F1 Hybrids between Female Asp and Male Kutum (*Leusiscus Aspius* × *Rutilus Kutum*)

Samaneh Poursaeid
Ph. D, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
s.poursaeid@yahoo.com

Mohammadreza Kalbassi*
*Corresponding author: Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
kalbassi_m@modares.ac.ir

Bahram Falahatkar
Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural resources, University of Guilan, Someasara, Iran
falahatkar@guilan.ac.ir

Mahdi Rahmati
Ph. D, Department of Fisheries, Faculty of Natural resources, University of Guilan, Someasara, Iran
mehdi_rahmaty@yahoo.com

Iraj Efatpanah
Ms. Dr. Yousefpour Marine Fishes Restocking and Genetic Conservation Center, Siahkal, Guilan, Iran
iefatpanah@yahoo.com

Bahman Meknatkhah
Ms. Dr. Yousefpour Marine Fishes Restocking and Genetic Conservation Center, Siahkal, Guilan, Iran
bmeknatkhah@yahoo.com

Abstract
In this study, cytogenetic characteristics of F1 progeny produced by crossbreeding of female Asp and male Kutum (*Leusiscus aspius* × *Rutilus frisii*) were determined using the tissue-squashing method of kidney and giemsa staining. Nucleolus organizer regions were also localized using AgNO3. Chromosome number was determined from a total of 85 metaphases plates achieved from 20 hybrid specimens with an average weight of 49.7 ± 2.5 g (S.E). Karyogram and ideogram were arranged from the best metaphase plates. Different characteristics of karyotype including the number of chromosome arms, the length of short and long arms, the centromic index, the arm ratio, and the relative and total length of chromosomes were calculated. The number of diploid chromosomes and chromosome arms was 2n=50 and NF=80, respectively. The karyotypes consisted of 10 pairs of metacentric, 5 pairs of submetacentric, and 10 pairs of acrocentric to sub-telocentric (10 m+5 sm+10 a-t). The ranges of centromic index, arm ratio, and relative length were 0-0.443, 1.266-∞ and 2.265-6.554 µm, respectively. The total length of chromosomes in the haploid series was 29.98 µm. The longest and shortest chromosomes were a pair of submetacentric and telocentric chromosomes, respectively. Nucleolus organizer regions were localized on the ends of long arms of the longest pair of acro-centric. These findings confirmed that F1 hybrids inherited the number and type of chromosomes from their parents.
Key words: Hybridization, Karyotype, Cyprinidae, Chromosome, Nucleolus Organizer Regions.

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they can't change it in any way or use it commercially.
Doi: 10.22108/tbj.2020.123313.1116

تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال دوازدهم، شماره چهل و دوم ، بهار ۱۳۹۹، صفحه ۳۹-۵۰
نوع مقاله: پژوهشی
دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۵/۲۰ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۰۸/۱۰

مطالعهٔ کاریولوژیک نسل F1 حاصل از آمیخته‌گری ماهیان ماش ماده و سفید نر (*Leusiscus aspius* × *Rutilus kutum*)

سمانه پورسعید، دکتری تخصصی گروه شیلات، دانشکدهٔ علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
s.poursaeid@yahoo.com
محمدرضا کلباسی*، استاد گروه شیلات، دانشکدهٔ علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران (مسوول مکاتبات)
kalbassi_m@modares.ac.ir
بهرام فلاحتکار، استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران
falahatkar@guilan.ac.ir
مهدی رحمتی، دکتری تخصصی گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران
mehdi_rahmaty@yahoo.com
ایرج عفت پناه، کارشناس ارشد مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور، سیاهکل، گیلان، ایران
iefatpanah@yahoo.com
بهمن مکنت خواه، کارشناس ارشد مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور، سیاهکل، گیلان، ایران
bmeknatkhah@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه، ویژگی‌های سیتوژنتیک ماهیان نسل اول حاصل از دورگه‌گیری بین ماهی ماش ماده و سفید نر (*Leusiscus aspius* × *Rutilus kutum*)، تولیدشده به روش تلاقی مصنوعی با استفاده از هموژن‌کردن بافت کلیه و رنگ‌آمیزی گیمسا تعیین شد؛ همچنین نواحی سازمان‌دهندهٔ هستک با رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشخص شد. با بررسی ۸۵ پلاک متافازی به‌دست‌آمده از ۲۰ عدد بچه‌ماهی دورگه با وزن متوسط ۲/۵ ± ۴۹/۷ (میانگین ± انحراف معیار) گرم، تعداد کروموزوم تعیین شد. از بهترین پلاک متافازی کاریوگرام و ایدوگرام استفاده و ویژگی‌های مختلفی نظیر تعداد بازوهای کروموزوم (NF)، طول بازوهای کوچک و بزرگ، شاخص سانترومری، نسبت بازوها، طول نسبی و طول کل کروموزوم‌ها محاسبه شد. تعداد کروموزوم‌ها و بازوهای کروموزومی این ماهیان دورگه به ترتیب ۲n = ۵۰ و NF = ۸۰ بود. در کاریوتایپ تهیه‌شده از ماهیان دورگه، ده جفت کروموزوم متاسانتریک، پنج جفت ساب‌متاسانتریک و ده جفت آکروسانتریک - تلوسانتریک (۱۰m + ۵sm + ۱۰a-t) وجود دارد. دامنهٔ شاخص سانترومری، نسبت بازوها و طول نسبی کروموزوم‌ها به ترتیب ۰/۴۴۳ - ۰، ∞ - ۱/۲۶۶ و ۶/۵۵۴ - ۲/۲۶۵ میکرومتر تعیین شد. مجموع طول کروموزوم‌ها (هاپلوئید) ۲۹/۹۸ میکرومتر بود. بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین کروموزوم در این ماهیان به ترتیب یک جفت کروموزوم ساب‌متاسانتریک و یک جفت کروموزوم تلوسانتریک بود. تنها یک جفت نواحی سازمان‌دهندهٔ هستک در انتهای بازوی بلند کرموزوم آکروسانتریک (جفت شانزدهم) مشاهده شد. نتایج مطالعهٔ حاضر تأیید می‌کند که گونهٔ بررسی‌شده ازلحاظ تعداد و نوع کروموزوم‌ها، ماهی دیپلوئید دورگه است و ویژگی‌های کروموزومی متفاوتی نسبت به والدین دارد.

واژه‌های کلیدی: دورگه‌گیری، کاریوتایپ، کپورماهیان، کروموزوم، نواحی سازمان‌دهندهٔ هستک.

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.
Doi: 10.22108/tbj.2020.123313.1116

مقدمه

با افزایش روزافزون جمعیت جهان و نیاز به غذا و مواد پروتئینی به‌ویژه پروتئین حیوانی، آبزیان در نقش یکی از اقلام غذایی سالم، با ارزش غذایی بسیار و ارزان نسبت به سایر مواد غذایی، از جایگاه به نسبت خوبی برخوردار شده‌اند. امروزه پرورش آبزیان به‌منظور تولید پروتئین برای تأمین نیازهای غذایی انسان، صنعتی روبه‌رشد در سراسر دنیا محسوب می‌شود؛ از این رو افزایش راندمان سیستم‌های آبزی‌پروری و توجه به پروش بسیار آبزیان در این سیستم‌ها دارای اهمیت فراوانی است؛ همچنین در این بین توجه به نوع آبزی که به نحوی قادر به تحمل شرایط پرورش و اسارت باشد، بسیار اهمیت دارد.

ازجمله تکنیک‌های آبزی‌پروری که به‌منظور تولید موجودات آبزی با صفات مطلوب در بین پرورش‌دهندگان رایج شده، دورگه‌گیری بین‌گونه‌ای است؛ با این هدف که آبزی جدید ازنظر سرعت رشد، دریافت تعدادی صفات مطلوب از والدین، کیفیت گوشت، عقیم‌بودن، افزایش قابلیت برداشت محصول، مقاومت دربرابر بیماری، افزایش تحمل زیست‌محیطی و به‌طور کلی افزایش مقاومت در شرایط پرورشی، نسبت به والدین خود دارای شرایط مطلوب‌تری باشد (Aminur Rahman *et al*., 2013, 2018). تاکنون دورگه‌گیری‌های متعددی بین ماهیان برای استفادهٔ احتمالی در آبزی‌پروری به‌منظور رفع نیازمندی‌های تغذیه‌ای و پروتئینی بشر صورت گرفته که این امر نشان‌دهندهٔ اهمیت فراوان دورگه‌ها و تولید و معرفی آنها به سیستم‌های پرورشی است (Noruz Fashkhami *et al*., 2001; Dorafshan and Kalbassi, 2007; Leitão *et al*., 2007; Porto-Foresti *et al*., 2007).

روش‌های متفاوتی برای شناسایی گونه‌های دورگه استفاده می‌شود که به اندازه‌گیری ویژگی‌های موفولوژیک و مریستیک و مطالعات آنزیمی، خونی، فیزیولوژیک و مولکولی اشاره می‌شود (Kennedy *et al*., 2009; Dotti do Prado *et al*., 2012; Meknatkhah *et al*., 2016; Liss *et al*., 2016). در بین روش‌های مختلف مولکولی، کاریولوژی ماهیان، ابزار مفیدی برای تشخیص گونه‌های دورگه، تعیین جنسیت و آنالیزهای تبارزایی و فرگشتی ارائه می‌دهد (Oliveira *et al*., 2009; Dotti do Pra *et al*., 2012). با استفاده از این تکنیک، امکان بررسی سطح پلوئیدی، شناسایی دودمان آندروژنز و ژینوژنز، تعیین سهم هرکدام از والدین در میزان پلوئیدی، بررسی تغییرات ساختاری در کروموزوم‌ها و یافتن نشانگرهای سیتوژنیک ازطریق تعیین تعداد و فرمول کروموزوم و مکان‌یابی نواحی سازمان‌دهندهٔ هستکی (NORs: Nucleolus Organizing Regions) برای تفکیک گونهٔ دورگه از والدین فراهم می‌شود (Almeida-Toledo *et al*., 1995, 1996; Noruz Fashkhami *et al*., 2001; Cleiton and Giuliano-Caetano, 2008; Porto-Foresti *et al*., 2008; Dotti do Prado *et al*., 2012).

ماهی سفید (*Rutilus kutum*) از خانوادهٔ کپورماهیان یکی از گونه‌های بومی دریای خزر است و به‌دلیل کیفیت گوشت و بازارپسندی، ارزش اقتصادی زیادی دارد (Abdoli, 2008). این ماهی با وجود اینکه در زیستگاه طبیعی به وزن هشت کیلوگرم می‌رسد، در مراکز پرورشی تا اندازهٔ بازاری رشد نمی‌کند (Kottelat and Freyhof, 2007). این امر ممکن است تا حدی به‌دلیل فقدان غذای طبیعی مناسب، نشناختن نیازمندی‌های تغذیه‌ای و همچنین نیازمندی‌های شوری احتمالی برای رشد مطلوب در مرحلهٔ پرواری و پتانسیل

ژنتیکی ضعیف آن تحت شرایط پرورشی باشد (Amini *et al*., 2007). مطالعهٔ کاریولوژی نشان داده است ماهی سفید ۵۰ کروموزوم دارد که شامل هفت الی هشت کروموزوم متاسانتریک، نه تا ده کروموزوم ساب‌متاسانتریک و هفت الی نه کروموزم آکروسانتریک می‌شود (Vasiliev, 1985; Noruz Fashkhami and Khosroshahi, 1995).

یکی دیگر از اعضای خانوادهٔ کپورماهیان، ماهی ماش (*Leusiscus aspius*) است. این ماهی بومی آب‌های داخلی اروپا و شمال شرق اقیانوس اطلس است، به آب‌های داخلی آسیا نیز معرفی شده و به‌دلیل نرخ رشد زیاد ازنظر اقتصادی و صید تفریحی دارای محبوبیت ویژه‌ای است (Martyniak and Heese, 1994; Coad, 2020). با وجود اینکه این ماهی از سوی اتحادیهٔ بین‌المللی حفاظت از محیط زیست (IUCN) در طبقهٔ «کمترین نگرانی (Least Concern)» قرار گرفته است، در ایران شرایط این گونه در حد مطلوبی ارزیابی نمی‌شود و هنوز نرماتیوهای پرورشی آن تعیین نشده است (Falahatkar and Tolouei Gilani, 2013). مطالعهٔ کاریولوژی Rab و همکاران (۱۹۹۰) روی این گونه نشان داد همانند ماهی سفید دارای ۵۰ کروموزوم است و شامل هفت کروموزوم متاسانتریک، ۱۴ کروموزوم ساب متاسانتریک و چهار کروموزم آکروسانتریک می‌شود.

به‌تازگی دورگهٔ جدیدی از تلاقی مصنوعی ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر با هدف افزایش توان تولید در آبزی‌پروری کشور و جبران پرورش‌نیافتن ماهی ماش و سفید تولید شده است. معرفی ماهی جدید به صنعت آبزی‌پروری نیازمند شناسایی و مطالعات دقیق روی ویژگی‌های فیزیولوژی و رفتاری آن است. مطالعات نخستین نشان داده است دورگهٔ حاصل، بازماندگی زیاد و رشد مناسبی در استخرهای خاکی دارد و همچنین به غذای دستی و سیستم پرورشی سازگار است (Bagheri *et al*., 2017; Rostamipour *et al*., 2017; Falahatkar et al., 2015). بررسی و مقایسهٔ شاخص‌های اندازشی و شمارشی نشان داده است دورگهٔ ذکرشده دارای صفات حد واسط و گاهی متفاوت نسبت به ماهی سفید و ماش است (Meknatkhah *et al*., 2016). با توجه به اینکه دربارهٔ کاریولوژی این ماهی دورگه اطلاعاتی دردسترس نیست، مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی کروموزومی نسل اول ماهی آمیختهٔ تولیدشده و پی‌بردن به چگونگی توارث کرموزوم‌های والدین به بچه‌ماهیان انجام شد.

مواد و روش‌ها

بچه‌ماهیان یک‌تابستانهٔ استفاده‌شده در این مطالعه، حاصل تکثیر مصنوعی یک عدد مولد ماش ماده با سه عدد ماهی نر سفید در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف‌پور سیاهکل (گیلان، سیاهکل) بودند. به‌منظور تکثیر مصنوعی، هورمون Ovaprim در طی دو مرحله شامل دوز مقدماتی ۰/۱ میلی‌لیتر هورمون به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و دوز نهایی ۰/۴ میلی‌لیتر هورمون به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مولد ماده تزریق شد. از آنجایی که مولدهای نر به‌طور کامل آمادهٔ تکثیر بودند، القای هورمونی روی آنها صورت نگرفت. لقاح به‌صورت خشک انجام شد. لاروها پس از رسیدن به وزن ۲/۵ گرم به استخرهای خاکی منتقل (Falahatkar *et al*., 2015) و تا شروع آزمایش در استخر نگهداری شدند؛ سپس به‌منظور مطالعات کاریوتایپ به آزمایشگاه شیلات دانشگاه تربیت مدرس (نور، مازندران) انتقال یافتند.

بیست قطعه بچه‌ماهی با میانگین وزنی ۲/۵ ± ۴۹/۷ گرم به‌طور تصادفی انتخاب شدند. به‌منظور متوقف‌کردن سلول‌ها در مرحلهٔ متافاز تقسیم سلولی، محلول کلشی سین (سیگما، آمریکا) پس از آماده‌سازی و حل‌کردن در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد، با غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ میکروگرم به ازای هر گرم از وزن بدن به‌صورت داخل‌صفاقی تزریق شد. سه تا هفت ساعت پس از تزریق در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد، بافت کلیه از بدن خارج و به‌طور کامل هموژن شد و هم‌زمان برای متورم‌شدن سلول‌ها و جداسازی کروموزوم‌های متافاز از یکدیگر، به آنها محلول هیپوتونیک KCl با غلظت ۰/۱ یا ۰/۰۷۵ مولار اضافه شد و در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از هموژن‌کردن به کمک پیپت پاستور، به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند؛ سپس محلول رویی حذف شد و نمونه‌ها طی سه مرحله در محلول کارنوی (سه قسمت متانول: یک قسمت اسیداستیک گلاسیال) به مدت ۳۰ دقیقه همراه با سه تعویض ده دقیقه‌ای تثبیت شدند (Kalbassi *et al*., 2006).

برای تهیهٔ گسترش کروموزومی از لام سرد استفاده شد. لام‌ها پس از خشک‌شدن در محیط آزمایشگاه با غلظت‌های مختلف رنگ گیمسای (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) در بازه‌های زمانی مختلف (۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه) رنگ‌آمیزی شدند. بعد از شستشوی لام‌ها با آب مقطر و خشک‌شدن آنها در دمای آزمایشگاه، بررسی میکروسکوپی با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال (Nikon, Tokyo, Japan) صورت گرفت. با شمارش تعداد کروموزوم‌ها در گسترش‌های به‌دست‌آمده، فراوانی کروموزوم‌ها تعیین شد. کاریوگرام با استفاده از نرم‌افزارهای Photoshop (Version 12) و Excel 2010 تهیه شد؛ همچنین شاخص سانترومری، نسبت بازوها و طول نسبی کروموزوم‌ها ازطریق فرمول‌های زیر محاسبه شد (Kalbassi *et al*., 2006):

(طول کل هر کروموزوم/طول بازوی کوتاه) = **شاخص سانترومری**

(طول بازوی کوتاه/طول بازوی بلند) = **نسبت بازوها**

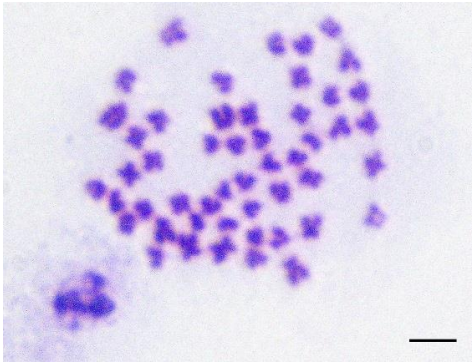
۱۰۰× (مجموع طول کل همهٔ کروموزم‌ها در یک‌سری هاپلوئید /طول کل هر کروموزوم) = **طول نسبی هر کروموزوم**

در مرحلهٔ بعد، نوع کروموزوم‌ها و فرمول کل کروموزوم‌ها طبق شاخص سانترومری تعیین شد (Levan *et al*., 1964). براساس این روش، کروموزوم‌های دارای شاخص سانترومری ۰/۳۷۵ تا ۰/۵ در گروه کروموزوم‌های متاسانتریک (M)، ۰/۲۵۰ تا ۰/۳۷۵ در گروه ساب‌متاسانتریک (SM)، ۰/۱۲۵ تا ۰/۲۵۰ در گروه ساب‌تلوسانتریک (ST) و ۰ تا ۰/۱۲۵ در گروه تلوسانتریک (T) طبقه‌بندی شدند. پس از تعیین پارامترهای ذکرشده، ایدیوگرام با نرم‌افزار Paint 2007 ترسیم شد؛ همچنین برای بررسی NORs در جایگاه یکی از نشانگرهای سیتوژنتیک برای شناسایی گونه از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (Howell and Black, 1980; Cleiton and Giuliano-Caetano, 2008). در این روش، پس از تهیهٔ گسترش و خشک‌شدن، روی هر لام دو قطره محلول کلوئیدی (دو گرم ژلاتین + ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر + یک

میلی‌لیتر اسیدفرمیک) و چهار قطره محلول نیترات نقرهٔ ۵۰ درصد اضافه شد و به مدت ده دقیقه در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد در محفظهٔ مرطوب قرار گرفتند؛ سپس با آب دوبار تقطیر شستشو و در دمای محیط خشک شدند. لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی x ۱۰۰۰ بررسی و عکس‌برداری شدند.

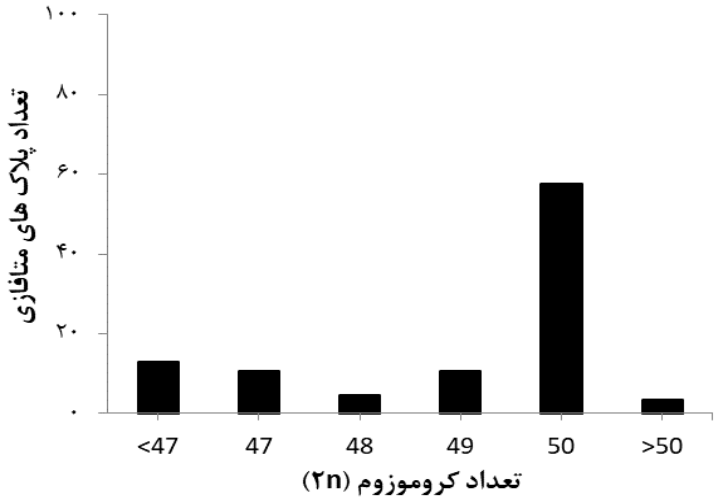
براساس نتایج به‌دست‌آمده، غلظت و مدت زمان مناسب برای تأثیر کلشی سین روی دورگهٔ حاصل از ماش × سفید در این مطالعه، به ترتیب ۲۰ میکروگرم به ازای هر گرم از وزن بدن به مدت چهار ساعت بود. بهترین غلظت محلول هیپوتونیک، ۰/۱ مولار بود؛ علاوه‌بر این غلظت و مدت زمان مناسب برای رنگ‌آمیزی گیمسا، ده درصد به مدت ۲۰ دقیقه بود (شکل ۱).

نتایج



شکل ۱- گسترهٔ کروموزومی ماهی دورگهٔ حاصل از تلاقی مصنوعی بین ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر (*Leusiscus aspius* × *Rutilus kutum*) (۲n = ۵۰). بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر. مقیاس برابر چهار میکرومتر.

به‌منظور تعیین تعداد کروموزوم‌ها، ۸۵ پلاک متافازی از ۲۰ ماهی شمارش شد که در این میان بیشترین فراوانی در گروه ۲n = ۵۰ مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲- فراوانی کروموزومی ماهی دورگهٔ حاصل از تلاقی مصنوعی بین ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر (*Leusiscus aspius* × *Rutilus kutum*) در پلاک‌های متافازی شمارش‌شده.

نوع کروموزوم و سایر ویژگی‌های مطالعه‌شده (شاخص سانترومری، نسبت بازوها و طول نسبی هر کرموزوم) در جدول شمارهٔ ۱ آورده شده است. با توجه به جدول ۱ و تصویر کاریوگرام تهیه‌شده (شکل ۳)، شاخص سانترومتری در کروموزوم‌های متاسانتریک بین ۰/۳۹۹ تا ۰/۴۴۰ بود که تعداد ده جفت کروموزوم در این گروه قرار داشتند. کروموزوم‌های ساب‌متاسانتریک، شاخص سانترومری ۰/۳۰۷ تا ۰/۳۵۹ داشتند و تعداد پنج جفت کروموزوم در این گروه بودند. در ماهی دورگهٔ حاصل تنها یک جفت کروموزوم آکروسانتریک با شاخص سانترومری ۰/۲۲۵ و نه جفت کروموزوم تلوسانتریک وجود داشت.

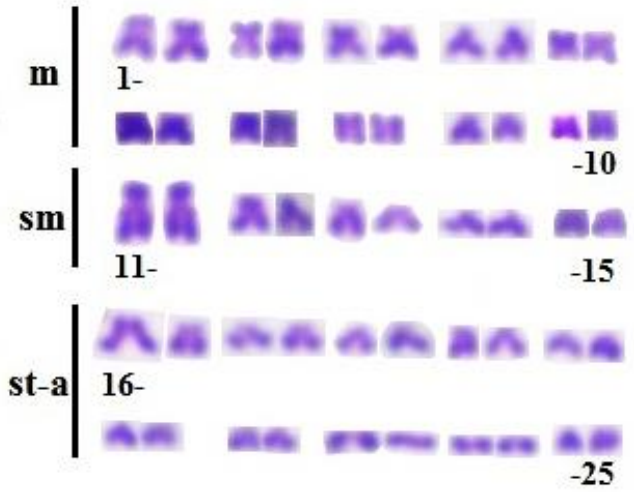
جدول ۱- شاخص های کروموزومی سری هاپلوئیدی در ماهی دورگهٔ حاصل از تلاقی مصنوعی بین ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر (*Leusiscus aspius* × *Rutilus kutum*)

سری	طول بازوی کوتاه (µm)	طول بازوی بلند (µm)	طول کل کروموزوم (µm)	طول نسبی کروموزوم (٪)	شاخص سانترومری	نسبت بازوها	نوع کروموزوم
۱	۰/۷۲۱	۱/۰۸۸	۱/۸۰۹	۵/۹۵۷	۰/۳۹۹	۱/۵۲۸	M
۲	۰/۶۸۴	۰/۸۹۹	۱/۵۸۳	۵/۲۱۱	۰/۴۳۲	۱/۳۱۵	M
۳	۰/۶۴۲	۰/۸۱۸	۱/۴۶۰	۴/۸۰۲	۰/۴۴۰	۱/۲۷۳	M
۴	۰/۵۹۱	۰/۸۰۵	۱/۳۹۶	۴/۵۹۵	۰/۴۲۴	۱/۳۶۴	M
۵	۰/۵۷۷	۰/۷۴۷	۱/۳۲۴	۴/۳۵۶	۰/۴۳۷	۱/۳۰۱	M
۶	۰/۵۶۸	۰/۷۴۰	۱/۳۰۸	۴/۳۰۶	۰/۴۳۳	۱/۳۲۶	M
۷	۰/۵۴۲	۰/۶۸۰	۱/۲۲۲	۴/۰۲۴	۰/۴۴۳	۱/۲۶۶	M
۸	۰/۵۰۳	۰/۶۵۰	۱/۱۵۳	۳/۷۹۴	۰/۴۳۸	۱/۲۹۲	M
۹	۰/۴۴۲	۰/۶۲۳	۱/۰۶۵	۳/۵۰۳	۰/۴۱۳	۱/۴۲۹	M
۱۰	۰/۴۵۸	۰/۵۸۵	۱/۰۴۳	۳/۴۳۲	۰/۴۳۹	۱/۲۸۲	M
۱۱	۰/۶۲۸	۱/۳۶۴	۱/۹۹۲	۶/۵۵۴	۰/۳۱۵	۲/۱۷۱	SM
۱۲	۰/۴۵۰	۱/۰۱۳	۱/۴۶۳	۴/۸۱۳	۰/۳۰۷	۲/۲۶۴	SM
۱۳	۰/۵۰۲	۰/۹۵۷	۱/۴۵۹	۴/۸۰۱	۰/۳۴۷	۱/۹۰۴	SM
۱۴	۰/۳۸۱	۰/۸۴۵	۱/۲۲۶	۴/۰۳۷	۰/۳۱۳	۲/۲۴۵	SM
۱۵	۰/۳۲۷	۰/۵۸۳	۰/۹۱۰	۲/۹۹۶	۰/۳۵۹	۱/۷۹۶	SM
۱۶	۰/۳۰۶	۱/۰۵۲	۱/۳۵۸	۴/۴۷۲	۰/۲۲۵	۳/۴۴۹	A
۱۷	۰	۱/۰۹۳	۱/۰۹۳	۳/۵۹۶	۰	∞	T
۱۸	۰	۱/۰۵۹	۱/۰۵۹	۳/۴۸۴	۰	∞	T
۱۹	۰	۰/۹۸۲	۰/۹۸۲	۳/۲۳۳	۰	∞	T
۲۰	۰	۰/۹۵۱	۰/۹۵۱	۳/۱۲۹	۰	∞	T
۲۱	۰	۰/۹۲۰	۰/۹۲۰	۳/۰۲۷	۰	∞	T
۲۲	۰	۰/۸۶۹	۰/۸۶۹	۲/۸۶۱	۰	∞	T
۲۳	۰	۰/۸۷۰	۰/۸۷۰	۲/۸۶۳	۰	∞	T
۲۴	۰	۰/۷۷۰	۰/۷۷۰	۲/۵۳۳	۰	∞	T
۲۵	۰	۰/۶۸۸	۰/۶۸۸	۲/۲۶۵	۰	∞	T

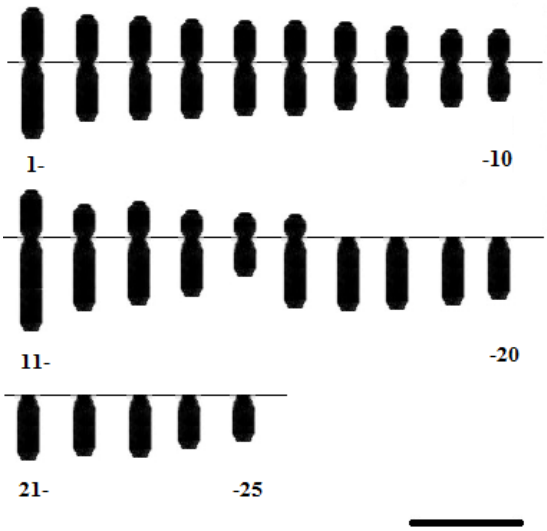
* M: متاسانتریک، SM: ساب‌متاسانتریک، A: آکروسانتریک و T: تلوسانتریک

اندازهٔ کروموزوم‌ها در محدودهٔ ۰/۶۸ تا ۱/۹۹ میکرون بود. بزرگ‌ترین کروموزوم در کاریوتایپ تهیه‌شده، یک‌سری کروموزوم ساب‌متاسانتریک و کوچک‌ترین آن مربوط به یک‌سری کروموزوم تلوسانتریک بود (جدول ۱ و شکل ۳).

با توجه به اندازه‌گیری‌های انجام‌شده، فرمول کروموزومی ماهی دورگهٔ حاصل از تلاقی مصنوعی بین ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر ۵ SM + ۱۰ T-A + ۱۰ M تعیین شد (شکل ۴).



شکل ۳- کاریوگرام ماهی دورگهٔ حاصل از تلاقی مصنوعی بین ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر (*Leusiscus aspius* × *Rutilus kutum*) (۵۰ = 2n). مقیاس برابر پنج میکرومتر.



شکل ۴- ایدیوگرام ماهی دورگهٔ حاصل از تلاقی مصنوعی بین ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر (*Leusiscus aspius* × *Rutilus kutum*) (۵۰ = 2n). مقیاس برابر ۱/۵ میکرومتر.

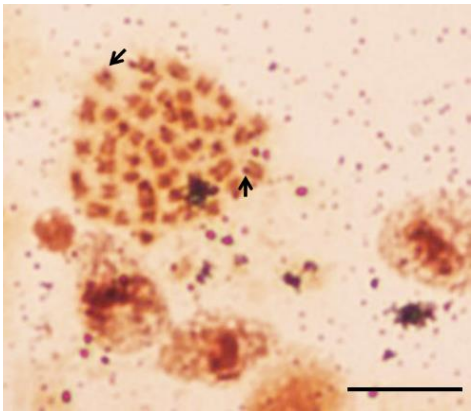
مجموع طول کروموزوم‌ها در یک‌سری هاپلوئید برابر ۲۹/۹۸ میکرومتر و مجموع طول بازوهای بلند و کوتاه کروموزم‌ها به ترتیب ۲۱/۶۵ و ۸/۳۲ میکرومتر بود. تعداد بازوهای کروموزومی در دورگهٔ حاصل ۸۰ تعیین شد (جدول ۲).

تعداد نوارهای NOR در مطالعهٔ حاضر یک جفت بود که در انتهای بازوی بلند کرموزوم آکروسانتریک (جفت شانزدهم) مشاهده شد (شکل ۵).

جدول ۲- مقایسهٔ تعداد و نوع کروموزوم‌های ماهی ماش (*Leusiscus aspius*)، ماهی سفید (*Rutilus kutum*) و ماهی دورگهٔ حاصل از تلاقی مصنوعی بین ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر.

ردیف	گونه	فرمول کروموزومی	۲n	NF*	منابع
۱	ماهی ماش	7 M + 14 SM + 4 T-A	۵۰	۹۲	Rab *et al*., 1990
۲	ماهی سفید رودخانهٔ ولگا	7 M + 9 SM + 9 T-A	۵۰	۸۲	Vasiliev, 1985
۳	ماهی سفید سواحل جنوبی خزر	8 M + 10 SM +7 T-A	۵۰	۸۶	Noruz Fashkhami and Khosroshahi, 1995
٤	ماهی دورگه	10 M + 5 SM + 10 T-A	۵۰	۸۰	مطالعهٔ حاضر

*NF تعداد بازوهای کروموزومی



شکل ۵- یک جفت نوار NOR به‌دست‌آمده در گسترش کروموزومی ماهی دورگهٔ حاصل از تلاقی مصنوعی بین ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر(*Leusiscus aspius* × *Rutilus kutum*). پیکان‌ها نشان‌دهندهٔ نواحی رنگ‌آمیزی‌شده با رنگ نیترات نقره هستند. مقیاس برابر پنج میکرومتر.

بحث

یکی از موارد توسعه‌ای در آبزی‌پروری، استفاده از گونه‌های جدید، تکنیک‌ها و تجهیزات پیشرفته، بهره‌گیری از فرمولاسیون غذاهای منطبق بر نیازمندی‌های تغذیه‌ای و گاهی استفاده از آمیخته‌های مقاوم و دارای رشد سریع است. دورگه‌گیری سبب تغییری ژنتیکی می‌شود که در آن ژن‌ها بین گونه‌های مختلف منتقل می‌شوند و به‌طور کلی هدف از این کار تولید فرزندانی است که عملکرد بهتری نسبت به هر دو گونهٔ والدین خود داشته باشند (Bartley *et al*., 2001). دگرآمیزی در تعداد زیادی از ماهیان برای افزایش نرخ رشد، دستکاری نسبت جنسی، تولید حیوانات عقیم،

بهبود کیفیت گوشت، افزایش مقاومت دربرابر بیماری، افزایش تحمل شرایط زیست‌محیطی و بهبود انواع دیگری از صفات به‌منظور تولید ماهیانی با سودآوری بیشتر برای پرورش استفاده می‌شود (Bartley *et al.*, 2001). نظر به اهمیت دگرآمیزی در آبزی‌پروری، درک مناسب از وضعیت ژنتیکی و ویژگی‌هایی که از والدین به ارث می‌برند باید در مطالعات مربوط مشخص شود. نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد ماهیان دورگهٔ حاصل از تلاقی مصنوعی بین ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر، ماهیان دیپلوئیدی محسوب می‌شوند و عدد کروموزومی آنها ۵۰ = ۲n است که از این نظر شبیه والدین خود هستند (Vasiliev, 1985; Rab *et al.*, 1990; Noruz Fashkhami and Khosroshahi, 1995). دورگه‌گیری بین‌گونه‌ای منجر به تولید ماهیان هاپلوئید، دیپلوئید، تریپلوئید و حتی تتراپلوئید عقیم یا زایا می‌شود (Aminur Rahman *et al.*, 2013, 2018). احتمال وقوع پدیدهٔ ماده‌زایی (Gynogenesis) در نتایج حاصل از دورگه‌گیری بین ماهی سفید ماده و ماهی آمور نر گزارش شده است (Noruz Fashkhami *et al.*, 2001). مطالعهٔ دیگر انجام‌شده توسط Dorafshan و Kalbassi در سال ۲۰۰۷ نشان داد ماهیان حاصل از دورگه‌گیری بین کپور علفخوار ماده (*Ctenopharyngodon idella*) و کپور سرگندهٔ نر (*Hypophtalmichthys nobilis*)، تریپلوئید و عقیم هستند.

با وجود شباهت عدد کروموزومی، نتایج نشان داد در نوع و تعداد کروموزوم‌ها و بازوهای کروموزومی بین ماهی دورگه با مولدین تفاوت‌هایی وجود دارد؛ به طوری که تعداد کروموزوم‌های متاسانتریک، ساب‌متاسانتریک، تلوسانتریک و تعداد بازو را به ترتیب برای ماهی سفید هفت الی هشت، نه تا ده، هفت الی نه و ۸۲ تا ۸۶ و برای ماهی ماش به ترتیب هفت، ۱۴، چهار و ۹۲ بیان کرده‌اند (Vasiliev, 1985; Rab *et al.*, 1990; Noruz Fashkhami and Khosroshahi, 1995)؛ در حالی که در این مطالعه، ده جفت کروموزوم متاسانتریک، پنج جفت کروموزوم ساب‌متاسانتریک و ده جفت کروموزوم تلوسانتریک با تعداد بازوی ۸۰، الگوی کروموزومی ماهی دورگهٔ حاصل از تلاقی مصنوعی بین ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر تعیین شد. این نتایج نشان می‌دهد ماهی دورگهٔ ذکرشده، دارای ویژگی‌های کروموزومی متفاوتی نسبت به والدین است. مقایسهٔ صفات اندازشی و شمارشی در ماهیان دورگهٔ حاصل با ماهیان ماش ماده و سفید نر نشان داد از این حیث نیز با والدین یکسان نیستند و صفات حد واسط و گاهی متفاوت دارند (Kashefi *et al.*, 2012; Rezaei *et al.*, 2012; Meknatkhah *et al.*, 2016). با توجه به اینکه این صفات بیشتر تحت کنترل ژنتیک قرار دارند؛ بنابراین به نظر می‌رسد دورگهٔ حاصل، ژن‌های خاصی از هر والد را دریافت کرده و تأکیدی بر اختلاف‌های کروموزوم در نتایج به‌دست‌آمده است.

در کاریوتایپ به‌دست‌آمده از ماهی دورگه، بزرگ‌ترین سری کروموزومی با طول ۱/۹۹۲ میکرون از نوع کروموزوم ساب‌متاسانتریک و کوچک‌ترین سری کروموزوم با طول ۰/۶۸۸ میکرون از نوع تلوسانتریک بود و تنها یک نوع کروموزوم آکروسانتریک مشاهده شد. یک جفت کروموزوم آکروسانتریک بزرگ و دو جفت از کروموزوم‌های ساب‌متاسانتریک بزرگ که به ترتیب از ویژگی‌های بارز کاریوگرام ماهی سفید و ماهی ماش محسوب می

شوند، در کاریوگرام دورگهٔ حاصل مشاهده شد (Rab *et al*., 1990; Noruz Fashkhami *et al*., 2001). وجود کروموزوم‌های بارز هر گونه در دورگهٔ حاصل از ماهی ماش ماده و ماهی سفید نر، تأکیدی بر حد واسط بودن این ماهی است.

نواحی سازمان‌دهندهٔ هستک، حلقه‌ای از DNA هستند و ژن‌های ریبوزومی دارند که RNA ریبوزومی برای پروتئین‌سازی از روی آنها ترجمه می‌شود. این نواحی، دارای پروتیئن‌های نقره‌دوست هستند و این پروتئین‌ها در رنگ‌آمیزی با نقره به‌صورت نقاط سیاه‌رنگ دیده می‌شوند (Britton-Davidian *et al*., 2012). بررسی NOR با استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره روی کاریوتایپ ماهی دورگه، حاکی از حضور یک جفت نواحی سازمان‌دهندهٔ هستک در انتهای بازوی کرموزوم آکروسانتریک (جفت شانزدهم) است. در ماهی ماش نیز NOR تنها در انتهای بازوهای کوچک‌ترین کروموزوم آکروسانتریک (جفت ۲۵ام) گزارش شد (Rab *et al*., 1990)؛ بنابراین این کروموزوم در نقش مارکری برای شناسایی نوع کروموزوم و گونهٔ دورگه استفاده می‌شود (Porto-Foresti *et al*., 2007; Rodrigo *et al*., 2008).

نتایج مطالعات انجام‌شده، اهمیت تولید دورگه‌گیری در آبزی‌پروری را نشان می‌دهد. در تولید دورگه‌ها، باید ویژگی‌هایی نظیر تطابق با شرایط پرورش در اسارت، تراکم‌پذیری، تغذیه با غذاهای فرموله‌شده و سرعت رشد زیاد تأمین شود. به‌طور کلی، نتایج حاصل از تلاقی مصنوعی ماهی ماش ماده و سفید نر، ماهیان دورگهٔ دیپلوئیدی هستند که از رشد مناسب در سیستم‌های پرورشی مختلف برخوردارند (Falahatkar *et al*., 2015) و قادرند از غذای فرموله‌شده تغذیه کنند (Bagheri *et al*., 2017; Rostamipour *et al*., 2017)؛ از این رو انتخاب مناسبی به‌منظور جایگزینی ماهی سفید برای پرورش هستند. با توجه به اینکه وضعیت باروری این ماهیان هنوز مطالعه نشده است، لازم است پیش از پرورش در مزارع، بررسی‌های لازم انجام شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کارشناسان و کارگران محترم مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان شهید دکتر یوسف‌پور و از آقای دکتر کمالی، سرپرست آزمایشگاه شیلات دانشکدهٔ علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی می‌شود.

منابع

Abdoli, A. (2008) The inland water fishes of Iran. Iran darabad wildlife and nature museum, Tehran (In Persian)

Almeida-Toledo, L. F., Bernardino, G., Oliveira, C., Foresti, F., & Toledo-Filho, A. S. (1996). Gynogenetic Fish Produced by a Backcross involving a Male Hybrid (Female *Colossoma Macropomum* × male *Piaractus Mesopotamicus*) and a Female *Piaractus Mesopotamicus*. *Boletim Técnico do CEPTA*, 9, 31-37.

Almeida-Toledo, L. F., Bigoni, A. P. V., Bernardino, G., & Toledo-Filho, S. A. (1995). Chromosomal Location of NORs and C Bands in F1 Hybrids of Bighead Carp and Silver Carp Reared in Brazil. *Aquaculture Journal*, 135, 277-284.

Amini, F., Zamini, A. A., & Ahmadi, M. R. (2007). Intergeneric Hybridization Between Kutum,

Rutilus Frisii Kutum, and Bream, *Abramis Brama Orientalis* of the Caspian Sea. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38, 497-505 (in Persian).

Aminur Rahman, M., Arshad, A., Marimuthu, K., Ara, R., & Amin, S. M. N. (2013). Inter-specific Hybridization and its Potential for Aquaculture of Fin Fishes. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 139-153.

Aminur Rahman, M., Lee, S., Yusoff, F., & Rafiquzzaman, S. M. (2018). Hybridization and Its Application in Aquaculture. *Sex Control in Aquaculture PP*, 163-178.

Bagheri, M., Falahatkar, B., & Efatpanah, I. (2017). Growth Performance and Body Composition of Aspikutum: A New Hybrid of Asp, *Leuciscus aspius* ♀, × Caspian Kutum, *Rutilus Frisii* ♂, Cultured Under Different Stocking Densities in Circular Concrete Tanks. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48, 947-954.

Bartley, D. M., Rana, K., & Immink, A. J. (2001). The Use of Inter-specific Hybrids in Aquaculture and Fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries Journal*, 10, 325-337.

Britton-Davidian, J., Cazaux, B., & Catalan, J. (2012). Chromosomal Dynamics of nuclear Organizer Regions (NORs) in the House Mouse: Micro-Evolutionary Insights. *Heredity Journal*, 108, 68-74.

Cleiton, F., & Giuliano-Caetano, L. (2008). Cytogenetic Characterization of Two Turtle Species: *Trachemys Dorbigni* and *Trachemys Scripta Elegans*. *Caryologia Journal*, 61, 253-257.

Coad, B. W. (2020). *Freshwater Fishes of Iran*. Available Online: www. Briancoad.com. Accessed 22 March 2020.

Dorafshan, S., & Kalbassi, M. R. (2007). A Karyological Study of Ctenopharyngodon Idella ♀ × Hypophtalmichthys Nobillis ♂ F1 Hybrids. *Iranian Journal of Biology*, 20, 277-285 (in Persian).

Dotti do Prado, F., Leite Nunes, T., Augusto Senhorini, J., Bortolozzi, J., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2012). Cytogenetic Characterization of F1, F2 and Backcross Hybrids of the Neotropical Catfish Species *Pseudoplatystoma Corruscans* and *Pseudoplatystoma Reticulatum* (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology Journal*, 35(1), 57-64.

Falahatkar, B., & Tolouei Gilani, M. H. (2013). The Use of Laparoscopy for Sex Identification of Asp *Aspius aspius*. *North American Journal of Fisheries Management*, 33, 894-899.

Falahatkar, B., Meknatkhah, B., & Efatpanah, I. (2015). Potential of Aspikutum (a hybrid of *Leuciscus aspius* ♀ × *Rutilus frisii* ♂) for Aquaculture: A Comparison of Growth Performance in Earthen Ponds and Tanks. *Iranian Journal of Ichthyology*, 2, 194-196 (in Persian).

Howell, W. M., & Black, D. A. (1980). Controlled Silver-staining of Nucleolus Organizer Regions with a Protective Colloidal Developer: A 1-Step Method. *Experientia Journal*, 36, 1014-1015.

Kalbassi, M. R., Dorafshan, S., Tavakolian, T., Khazab, M., & Abdolhay, H. (2006). Karyological Analysis of Endangered Caspian Salmon, *Salmo Trutta Caspius* (Kessler, 1877). *Aquaculture Research Journal*, 37, 1341-1347 (in Persian).

Kashefi, P., Bani, A., & Ebrahimi, E. (2012). Morphometric and Meristic Variations Between Nonreproductive and Reproductive Kutum Females (*Rutilus Frisii Kutum*, Kamensky, 1901), in the Southwest Caspian Sea. *Italian Journal of Zoology*, 79, 337-343 (in Persian).

Kennedy, B. M., Baumsteiger, J., Gale, W. L., Ardren, W. R., & Ostrand, K. G. (2009). Morphological, Physiological, and Genetic Techniques for Improving Field Identification of

Steelhead, Coastal Cutthroat Trout, and Hybrid Smolts. *Marine and Coastal Fisheries Journal*, 1, 45-56.

Kottelat, M., & Freyhof, J. (2007). *Handbook of European Freshwater Fishes*. Berlin: Publications Kottelat, Cornol and Freyhof.

Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for Centromic Position on Chromosomes. *Hereditas Journal*, 52, 201-220.

Lissa, S. A., Lamer, J. T., Sassd, G. G., & Suski, C. D. (2016). Physiological Consequences of Hybridization: Early Generation Backcrossing Decreases Performance in Invasive Bigheaded Carps. *Journal of Freshwater Ecology*, 31, 543-554.

Martyniak, A., & Heese, T. (1994). Growth Rate and Age Composition of asp *Aspius* (L., 1758) from Pierzcha"y Reservoir. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 24, 55-67.

Meknatkhah, B., Haghparast, P., Rahmati, M., Bagheri, M., & Falahatkar, B. (2016). Morphometric and Meristic Characteristics of Female Asp × male Kutum (*Leuciscus Aspius* ♀ × *Rutilus Frisii* ♂) Hybrid. *Iranian Aquaculture Society Journal*, 4, 1-11 (In Persian).

Noruz Fashkhami, M. R., & Khosroshahi, M. (1995). A Karyology (Chromosomal) Study of the Caspian Sea Kutum Roach by White Blood Cell Culture. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 4, 64-71 (in Persian).

Noruz Fashkhami, M. R., Pour Kazemi, M., & Kalbassi, M. R. (2001). Progeny Karyotyping of Female *Rutilus Frisii Kutum* × Male *Ctenophartngodon Idella* Hybrid. *Iranian Marine Sciences and Technology Journal*, 1, 69-74 (in Persian).

Oliveira, C., Foresti, F., & Hilsdorf, A. W. S. (2009). Genetics of Neotropical Fish: From Chromosomes to Populations. *Fish Physiology and Biochemistry Journal*, 35, 81-100.

Porto-Foresti, F., Hashimoto, D. T., Alves, A. L., Almeida, R. B. C., Senhorini, J. A., Bortolozzi, J., & Foresti, F. (2008). Cytogenetic Markers as Diagnoses in the Identification of the Hybrid Between Piauçu (*Leporinus Macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus Elongatus*). *Genetic and Molecular Biology Journal*, 31, 195-202.

Rab, P., Roth, P., & Arefjev, V. A. (1990). Chromosome Studies of European Leuciscine Fishes (Pisces, Cyprini Dae). Karyotype of *Aspius Aspius*. *Caryologia Journal*, 43, 249-256.

Rezaei, E., Vatandoust, S., Kazemian, M., & Anvarifar, H. (2012). Morphological variability of the *Aspius aspius taeniatus* (Eichwald, 1831) in the Southern Caspian Sea Basin. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11, 627-643.

Rostamipour, S., Falahatkar, B., & Efatpanah, I. (2017). Determination of Appropriate Dietary Protein Level of “Aspikutum”, A Hybrid of Asp (*Aspius aspius* ♀) and Caspian Kutum (*Rutilus frisii* ♂). *Journal of Aquatic Animal Nutrition*, 2, 11-22 (in Persian).