مطالعات کروموزومی ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) خلیج فارس از طریق کشت سلول‌های خون

مرجان ابراهیمی پور،[۱] فروغ پاپهن،[۲]
دکتر اشرف جزایری[۳]

چکیده

امروزه مشخص شده است که ماهیان مرکب کاربرد وسیعی در زمینه‌های مختلف دارند با این وجود اطلاعات کمی در مورد بیولوژی آن‌ها در آب‌های ایران وجود دارد. به همین دلیل در این مطالعه سعی شده است که اطلاعاتی در زمینه تعداد کروموزوم‌ها در گونه غالب ماهیان مرکب (ماهی مرکب ببری) در آب‌های جنوب کشور در منطقه بحرکان ارائه شود. خور بحرکان یکی از مهم‌ترین مناطق صیادی در قسمت شرقی استان خوزستان است. در این منطقه صیادان به وسیله تورهای ترال و گرگور اقدام به صید آبزیان می‌نمایند. در بررسی حاضر مشخص شد ماهی مرکب ببری (Sepia pharaonis) دارای ۴۸ کروموزوم است ($2n = 48$). اکثر پلاک‌های متافازی شمارش شده در دامنه ۴۲ تا ۵۶ قرار داشتند. مرفولوژی کروموزوم‌ها نشان دهنده وجود انواع کروموزوم‌های متاسانتریک، تلوسانتریک و آکروسانتریک بود. به علاوه در تمامی پلاک‌ها همواره تعدادی میکروکروموزوم مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: *ماهی مرکب ببری، Sepia pharaonis ، کاریوتایپ، دریای بحرکان، خلیج فارس.*

مقدمه

دانستن ساختار ژنتیکی آبزیان کمک مهمی در بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها می‌نماید. یکی از راه‌های بررسی ساختار ژنتیکی آبزیان، استفاده از ژنتیک جمعیت‌ها بوده و شناسایی تحولات درون گونه‌ای و ساختار جمعیت یکی از نیازهای اساسی در اعمال مدیریت صحیح بهره برداری می‌باشد. امروزه هدف اصلی آزمایش‌های ژنتیک مولکولی در آبزیان، آنالیز ساختار جمعیتی، تنوع ژنتیکی، ارتباطات گونه‌ای سیستماتیک و طبقه‌بندی آن‌ها می‌باشد. گوناگونی ژنتیکی به عنوان صفت ماندگار یک گونه با مرگ جاندار ناپدید نمی‌شود بلکه به نسل‌های بعد منتقل می‌گردد و به عنوان عوامل پایدار و اسناد

محکمی در مطالعات رده‌بندی محسوب می‌شوند (۱۸).

سرپایان یکی از بزرگترین گروه‌های نرمتنان بوده که دارای حدود ۱۰۰۰ گونه شناخته شده در آب‌های جهان می‌باشند که از این میان بیش از ۱۰۰ گونه مهم تجاری تا کنون شناخته شده و این امر باعث افزایش لزوم شناخت و رده‌بندی آن‌ها گردیده است. آب‌های جنوبی ایران نیز به دلیل خصوصیات جغرافیایی، زیستی و هیدروبیولوژیکی خاصی که دارند، یکی از مراکز عمده زیست این جانوران می‌باشند (۲). بخصوص دریای عمان که به آب‌های اقیانوس هند متصل بوده و تحت تأثیر آن قرار می‌گیرد و دارای نادرترین گونه سرپایان جهان و یا به عبارت دیگر تنها گونه دیرینه این رده به نام نوتیلوس (*Nutilus*) می‌باشد (۲).

رده سرپایان دارای دو زیر رده Nautiloidea با تعداد کمی گونه و Coleoidea می‌باشد. زیر رده Coleoides شامل دو زیر شاخه است، Belemnoidea، که در اواخر کرتاسه از بین رفته است و Neocoleoidea که شامل اختاپوس‌ها، اسکوئید و ماهیان مرکب می‌باشد.

سرپایان Neocoleoid به وسیله کاهش یا از دست دادن کامل صدف مشخص می‌شوند. به همین دلیل به ندرت فسیلی از آن‌ها باقی می‌ماند. در نتیجه اطلاعات بسیار کمی درباره منشاء و رابطه سرپایان Coleoid موجود از فسیل‌ها بدست می‌آید (۱۷). مطالعات مورفولوژیکی در طبقه‌بندی گونه‌ها میان زیرخانواده‌ها یا جنس‌ها اهمیت زیادی دارد (۴).

سرپایان صدف‌دار که متعلق به دوره سنوزوئیک هستند مانند تمامی نمونه‌های اسکوئیدها و ماهیان مرکب، توزیع گسترده‌ای در اقیانوس هند – آرام، در طول خط ساحلی از ساحل آفریقا تا دریای سرخ، دریای عرب و دریای چین دارند. در مناطق ذکر شده توزیع اصلی جانوران در اعماق کمتر از ۵۰ متر می‌باشد.

راسته Sepioidea شامل خانواده‌های Sepiidae، Sepioloidae، Sepiadariidae، Idiosepiidae و Spirulidae می‌باشد (۲۰).

دو خانواده Idiosepiidae و Spirulidae گونه‌های اندکی را شامل شده و غالباً غیر خوراکی و فاقد هر گونه ارزش اقتصادی هستند. در میان سه خانواده دیگر، خانواده Sepiidae از ارزش اقتصادی بالاتری برخوردار بوده و همواره در صیدهای سنتی و صنعتی بخش مهمی از صید را شامل می‌شود (۲۱).

خانواده Sepiidae شامل بیش از ۱۰۰ گونه می‌باشد که در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و درجه حرارت‌های گرم در سراسر جهان پراکنده شده‌اند و در سه جنس Sepia، Metasepia و Sepiella قرار می‌گیرند (۵).

در آب‌های جنوب کشور تا کنون ۸ گونه ماهی مرکب از دو جنس Sepia و Sepiella شناسایی شده که تماماً متعلق به خانواده Sepiidae می‌باشند. از جنس Sepia هفت گونه و از جنس Sepiella فقط یک گونه گزارش شده است (۲ و FAO, 1984).

ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) گونه غالب رده سرپایان در آب‌های جنوب کشور است. این گونه از ماهیان مرکب، در ایران در آب‌های

خلیج فارس و دریای عمان و در سراسر آب‌های جنوب کشور از استان سیستان و بلوچستان در شرق تا استان خوزستان در غرب پراکندگی دارد (۲).

با مطالعات انجام شده از سال ۱۳۷۰ ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) به عنوان یک گونه آبزی جدید قابل استحصال صادراتی در محدوده شرق آب‌های دریای عمان به جامعه شیلات معرفی گردید (۲).

شایان ذکر است تا کنون از نقطه نظر بررسی کروموزومی بر روی این گونه مطالعه‌ای انجام نشده است. در مطالعه حاضر، تعداد کروموزوم‌های ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) را تعیین کرده و با سایر گونه‌ها مورد مقایسه قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

کاریوتایپ کردن سلول‌های خون یک عمل اساسی در ژنتیک مدرن است. از مزایای استفاده از این بافت امکان نمونه‌گیری آسان با حفظ شرایط استریل می‌باشد.

در مطالعات کاریوتایپی اصولاً ماده مورد مطالعه، کروموزوم‌های متافازی است. به همین منظور لازم است تا سلول‌های سوماتیک را که در حال تقسیم میتوز هستند، در متافاز متوقف کرده و کروموزوم‌ها را در آن‌ها مورد بررسی قرار داد (۱۴).

بافت‌های تامین کننده سلول در مطالعات کروموزومی به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند. دسته اول بافت‌هایی است که سلول‌ها به طور طبیعی در آن‌ها در حال تقسیم است مانند بافت مغز استخوان.

دسته دوم بافت‌هایی است که سلول‌های موجود در آن پتانسیل تقسیم میتوز را دارند ولی برای شروع تقسیم لازم است تا در محیط کشت قرار گرفته و میتوژن مربوط به آن‌ها اضافه شود. مثال بارز این نوع بافت‌ها سلول‌های خون محیطی می‌باشد.

نمونه‌های ماهی مرکب ببری، از منطقه بحرکان که بخشی از خلیج فارس واقع در طول جغرافیایی ´۳۰/°۴۹ شرقی تا ´۵۵/°۴۹ شرقی و عرض جغرافیایی ´۱۵/°۳۰ شمالی تا ´۵۰/°۲۹ شمالی می‌باشد، جمع‌آوری شدند (شکل ۱).

شکل ۱. نقشه منطقه مورد مطالعه در استان خوزستان (خلیج فارس)

شکل ۲. خون‌گیری از قلب آبششی ماهی مرکب ببری

خون بدست آمده در کیت کشت کروموزوم از نوع RPMI 1640 کشت داده شدند. تقسیم سلولی با استفاده از محلول کلشیسین (Colchicine) با غلظت ۰/۱ درصد در مرحله متافاز متوقف شد.

در ادامه سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه به وسیله محلول کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵ مولار رسوب داده شدند. برای ثابت شدن، محلول تازه تهیه شده‌ای از ۳ سهم متانول و ۱ سهم اسید استیک گلایسال به سلول‌ها اضافه شد. سوسپانسیون سلولی حاصل بر روی لام‌ها چکانده شد، در مجاورت هوا خشک شد و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه با رنگ گیمسا ۵ درصد رنگ‌آمیزی شد.

لام‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین (Olympus Japan) مورد مشاهده قرار گرفتند. کروموزوم‌های متافازی با بزرگنمایی (۱۰۰ × ۱۰) بررسی شدند. سپس از آن‌ها عکس تهیه شد و مورد شمارش واقع شدند.

نتایج

نتایج بدست آمده نشان دادند تعداد کروموزوم‌های دیپلوئید در ماهی مرکب ببری برابر ۴۸ می‌باشد (2n = 48). اکثر پلاک‌های متافازی شمارش شده در دامنه ۴۲ تا ۵۶ قرار داشتند. مرفولوژی کروموزوم‌ها نشان‌دهندهٔ وجود انواع کروموزوم‌های ساب‌متا سانتریک، تلوسانتریک و آکروسانتریک بود. به علاوه همواره تعدادی میکروکروموزوم در تمامی پلاک‌ها مشاهده شد (شکل ۳).

شکل ۳. پلاک متافازی در ماهی مرکب ببری

بحث

تا کنون تعداد کروموزوم‌ها برای بسیاری از گروه‌های نرم‌تنان گزارش شده و مشخص شده که تعداد کروموزوم‌ها بیش از سایر نرم‌تنان می‌باشد. Nautilus کمترین تعداد کروموزوم را در میان سرپایان دارد و باعث می‌شود تصور کنیم تعداد کم کروموزوم‌ها حالت اجدادی برای سرپایان می‌باشد. تعداد کروموزوم‌ها و کروموزوم‌هایی با اندازه بزرگ در Decabrachia نسبت به Octopoda بیشتر است. تعداد و مورفولوژی کروموزوم‌ها در نشان دادن فیلوژنی استفاده می‌شوند و ظاهراً در طول تکامل تغییر می‌کنند (۱۶).

مطالعات مولکولی اخیر بر روی فیلوژنی سرپایان Coleoid نتایج ضد و نقیضی در بر داشت (۱۸). در بررسی‌های فیلوژنی سرپایان، محدوده وسیعی از مسیر توالی یابی و روش‌های تجزیه مورد نیاز است. اولین مطالعات در اواسط سال ۱۹۹۰ با استفاده از توالی DNA برای تخمین رابطه فیلوژنتیکی سرپایان بر اساس ژن‌های میتوکندری انجام شد (۷). مطالعات فیلوژنتیکی سال‌های اخیر بر اساس توالی ژن‌های هسته‌ای و میتوکندریایی به طبقه‌بندی سرپایان کمک شایانی نموده است. در بسیاری از سرپایان (به ویژه Decabrachia) وجود فرم‌های متفاوتی از ژن‌های 18s rDNA اثبات شده است (۸ و ۱۵).

بررسی‌های گونه ماهی مرکب ببری در آب‌های خلیج‌فارس و دریای عمان نشان داد که تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های بررسی شده وجود ندارد. نمونه‌ها احتمالاً مربوط به جمعیت واحدی بوده و در ژن s 18s rDNA میتوکندری با هم شباهت دارند (نهاوندی و همکاران، ۱۳۸۴).

بر اساس یافته‌های Nakamura در سال ۱۹۸۵، دامنه تعداد کروموزوم‌های دیپلوئید در دوکفه‌ایها ۱۴ تا ۴۸، در پرتاران ۱۲تا ۲۶ و در سرپایان ۵۲ تا ۵۶ می‌باشد.

بر این اساس مشخص شد در میان بی‌مهرگان ذکر شده، سرپایان بیشترین تعداد کروموزوم را دارا می‌باشند. اطلاعات منتشر شده‌ای در مورد مرفولوژی کروموزومی سرپایان وجود ندارد (Nakamura, 1985).

طی مطالعاتی که توسط Bonnaud و همکارانش در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت مشخص شد تعداد کروموزوم‌های Nautilus macromphalus مانند Nautilus pompilus برابر ۵۲ می‌باشد.

Inaba در سال ۱۹۸۵ کروموزوم‌های سه گونه از نرم‌تنان[1] را مورد بررسی قرار داد و مشخص کرد حاوی تعداد زیادی کروموزوم دیپلوئید هستند و در آن‌ها 2N = ۵۲ و2N = ۵۶ می‌باشد. همچنین نشان داد در *Octopus vulgaris* و *Octopus variabilis sasaki* تعداد کروموزوم‌ها ۵۶ (2n = 56) می‌باشد (۱۳).

منابع

۱. نهاوندی، ر.، رضوانی گیل کلایی، س.، وثوقی، غ.ح. و کاظمی، ب. گزارش نهایی طرح‌های تحقیقاتی بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) خلیج فارس و دریای

1. Bivalvia , Polyplacophora and Cephalopoda

عمان با استفاده از روشPCR- RFLP. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۸۰ صفحه، ۱۳۸۴.

۲. ولی نسب، ت.، گزارش نهایی بررسی بیولوژی ماهی مرکب در آب‌های سواحل سیستان و بلوچستان. مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار. ۴۵ صفحه، ۱۳۷۲.

3. Aoyama,T. and Nguyan, T., Stock assessment of cuttlefish off the coast of the People's Democratic Republic of Yemen. Shimonosaki University of Fisheries, Vol. 37, No. 203, pp.61-112, 1989.

4. Berthold, T. and Engeser, T., Phylogenetic analysis and systematic - zation of the cephalopoda (Mollusca). Comparative reviews, Vol. I. Academic Press, London. pp. 187-220, 1987.

5. Boletzky, S.V., Cephalopod eggs and egg masses. Bulletin of Marine Science, Vol. 21. pp. 964-969, 1998.

6. Bounnaud, L., Boucher – Rodoni, R. and Monnert, M. Phylogeny of decapoda based on partial 16s rDNA nucleotide sequences. C.R. Academic Science. Vol.111, No. 317. pp. 581 – 588, 1994.

7. Bounnaud, L., Boucher – Rodoni, R. and Monnert, M. Relationship of some coleoid cephalopods established by 3 end of the 16s Rdna and cytochrom c oxidase 3 gene sequence comparison. Animal Malacology Bulletin. Vol.12. pp. 87 – 90, 1996.

8. Bounnaud, L.; Boucher – Rodoni, R. and Monnert, M. 1997. Phylogeny of cephalopods inferred from mitoch-ondrial DNA sequences. Molecular Phylogeny Evolution. Vol. 7. pp. 44 – 54, 1997.

9. Bounnaud, L., Rodhouse, P.G and Boucher – Rodoni, R. A phylogenetic study of the squid family Onychoteuthidae (Cephalopoda: Oegopsida),. Academic Press, London. Vol. B 265. pp. 197 – 208, 1998.

10. Carlini, D.B. and Graws, E., Phylogenetic analysis of cytochrome c oxidase I sequences to determine higher-level relationships within the coleoid cephalopods. Bulletin of Marine Science. Vol. 64. pp. 57-76, 1999.

11. FAO Species Identification Sheets for Fishery Purposes, Wesern Indian ocean fishing area. Universal software for fishery statistical time series, version 2.3. publisher, Rome. pp. 44-50, 1984.

12. Graham, J. P., Mastic, L.C. and Boyle, P.R., Morphometric variation in *Loligo forebsi* and *L. vulgaris*: Regional, seasonal, sex, maturity and worker differences. Fisheries Research, Vol. 21. pp. 127-148, 1994.
13. Inaba, A., Notes on the chromosomes of two species of octopods (Cephalopoda, Mollusca), Japanes Journal of Genetic. Vol. 34. pp. 137-139, 2007.
14.Long,S.E. Chromosome methodology in domestic animal cytogenetic. Cytogenetic and reproduction Unit, Department of Clinical Veterinary Science, University of Bristol. Longford House. Vol. 72. No. 2-3. pp. 162-163, 1990.
15. Miquelis, A., Martini,J.F., Carson, E.W., Brun, G. and Gilles. A., Performance of 18s rDNA helix E23 for phylogenetic relationships within and between the Rotifera-Acanthocephala clades, Comparative reviews, Academic Science Paris, Series III. Vol. 323. pp: 925 – 941, 2000.
16. Nabhitabhata, J., 1995. The culture of cephalopods in Thailand. Info fish International. Vol. 6, pp. 28 – 33, 1995.
17. Nakamura, H.K., A review of molluscan cytogenetic for molluscan chromosome. Bivalvia, Polyplacoph-ora and Cephalopoda, venus Japens Journal Malacology.Vol. 44, pp. 193-226, 1985.
18. Nishinguchi, M.K. and Mapes, R., Cephalopoda. *In*: Molluscan evolution. Journal of Molluscan Studies, pp. 1464-3766, 2007.
19. Pierteny, S. B., Hudelot, C., Hochberg, F.G. and Collins, M.A., Phylogenetic relationships among cirrate octopuds (Mollusca: Cephalopoda) resolved using mitochondrial 16 S ribosomal DNA sequences. Molecularly Phylogenetic Evolution, Vol. 27, pp. 348-353, 2003.
20. Silas, E.G., Sarvesan, R., Nair, K.P., Sastri, Y. A., Sreenivasan, P.V., Meiyappan, M. M., Vidyasagar, K., Rao, K.S. and Rao, B.N., Some aspects of the biology of cuttlefishes. Cephalopod bionomics fisheries and resources of the exclusive economic zone on India. Central marine Fisheries Research Institue. Cochin**,** India**.** No**.** 37, pp.49-70, 1985.

21. Yoshida, M.A., Tsuneki, K. and Furuya, H., Phylogeny of selected sepiidae based on 12S, 16S and Col sequences with comments on the taxonomic reliability of several morphological characters. Zoological Science, Vol. 23, No. 4, pp. 341-351, 2006.