بررسی شاخصهای خون‌شناسی ماهی خاویاری شیپ (*Acipenser nudiventris*) ماده- زایی شده با استفاده از پرتو گاما

غلامرضا شاه حسینی*

* پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج ـ ایران

چکیده:

با توجه به ارزش ماهیان خاویاری در جهان استفاده از تکنیک‌های دستکاری کروموزومی نظیر ماده‌زایی دارای ارزش زیادی است. در هر دستکاری کروموزومی به دلیل اهمیت شاخصهای فیزیولوژیکی به ویژه شاخصهای خون شناسی، این شاخصها باید مورد بررسی قرار گیرند. بنابراین، هدف از انجام این تحقیق بررسی شاخص‌های خون شناسی در ماهی شیپ ماده‌زایی شده، بود. پس از رسیدن ماهیان خاویاری شیپ به وزن مناسب (۲/۰۹±۰/۲۱۲ کیلوگرم)، از خون ماهیان گروه ماده‌زایی شده، ماهیان هیبرید و ماهیان گروه کنترل (دیپلوئید معمولی) نمونه‌گیری بعمل آمد. تعداد گلبول سفید و قرمز، مقادیر هماتوکریت، هموگلوبولین، MCV و MCH اندازه‌گیری گردیدند. نتایج اثبات نمود که ماده‌زایی با استفاده از پرتو گاما تأثیر معنی‌داری روی میزان گلبول سفید، گلبول قرمز، هموگلوبولین،MCV و MCH نداشته است ولی هیبرید کردن تاثیر معنی‌داری روی این شاخصها دارد. با توجه به این نتایج می‌توان جمع بندی کرد که ماده زایی تاثیر منفی روی شاخصهای خون شناسی ماهی شیپ نداشته است و با توجه به بررسی این شاخص‌های فیزیولوژیکی دارای اهمیت، می‌توان از این نوع ماهیان به عنوان یک ماهی با خصوصیات فیزیولوژیک عادی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: ماده‌زایی، پرتوگاما، ماهی خاویاری شیپ، شاخص‌های خون‌شناسی

Evaluation of hematological indices of gynogenic ship sturgeon, *Acipenser nudiventris* induced by gamma radiation

***Gholamreza shahhosseni**

*Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, I.R. of Iran

Abstract:

Considering the value of caviar in the world, the use of gynogenesis technique in sturgeon is very important. However, in any chromosomal manipulation, hematological indicators should be considered. Therefore, the aim of this study was to evaluate the hematological indices in gynogen sturgeon ship fish. After reaching the appropriate weight of sturgeon in the aquatic research laboratory complex, blood samples were taken from fish of different groups and the number of white and red blood cells, hematocrit, hemoglobin, MCV, MCH were measured. The results show that gamma radiation did not have a significant effect on white blood cell count, red blood cell count, MCV hemoglobin and MCH. According to these results, it can be concluded that gynogenesis did not have a negative effect on the hematological parameters of sturgeon ship fish and it can be used as a fish with normal blood physiological characteristics in breeding situation.

Keywords: gynogenesis, Gamma radiation, ship sturgeon, hematological indices

Email: ghshahhoseini@aeoi.org.ir

۱. مقدمه

تاس‌ماهیان (خاویاری) از مهمترین گروه ماهیان این حوزه محسوب می‌شوند [۱]. مقدار صید تاس‌ماهیان همواره سیر نزولی داشته و در سالهای اخیر به حداقل خود رسیده است، بطوریکه میزان صید این ماهیان ۵ کشور ساحلی طی سال‌های ۱۹۹۰ لغایت ۲۰۰۹ بیش از ۹۷/۵ درصد کاهش داشته و میزان آن از ۱۶۳۰۰ تن در سال ۱۹۹۰ به حدود ۴۰۰ تن در سال ۲۰۰۹ رسیده است [۲] . که در صورت تداوم وضع موجود و عدم انجام اقدام جدی، نه تنها میزان تولید خاویار ایران از دریای خزر تا ۱۰ سال آینده به صفر خواهد رسید بلکه گونه‌های ارزشمند خاویاری که بعنوان فسیل زنده زیست می‌کنند نیز منقرض و نابود خواهند شد. یکی از بهترین و موثرترین روش‌ها برای حفظ ذخایر ماهیان خاویار تحقیق و مطالعه دستگاه تولیدمثلی آنها و شناسایی تمام فاکتورهای موثر در ارتقاء و توسعه ساختارهای تولیدمثلی آنها می‌باشد [۳]. تکنولوژی‌های هسته‌ای و تمام صنایع وابسته به آن شامل انواع پرتوتابی‌ها در تمامی بخش‌های صنایع، کشاورزی، دامپزشکی و غیره به عنوان یک فرصت ارزیابی می‌شوند که استفاده بهینه از این استراتژی‌ها به پیشرفت روزافزون این صنایع کمک خواهد کرد. صنعت تکثیر و پرورش آبزیان نیز یکی از این بخش‌ها می‌باشد که همواره جهت تولید محصول بیشتر و همچنین با کیفیت بالاتر از تکنولوژی‌های مختلفی استفاده کرده است [۹-۴]. یکی از مسیرهایی که می‌توان از تکنولوژی هسته‌ای (پرتو تابی) جهت بهبود کمیت و کیفیت آبزیان تولید شده استفاده کرد، استفاده از این تکنولوژی‌ها در بحث تکثیر آبزیان و دستکاری‌های ژنتیکی جهت تولید جمعیت‌های ماده‌زایی شده است [۱۰-۱۳]. با توجه به اینکه ایجاد ماده‌زایی نوعی دستکاری کروموزومی است و در زمان استفاده از یک دستکاری باید شاخص‌های فیزیولوژیکی به ویژه خون‌شناسی مورد ارزیابی قرار گیرد، بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی شاخص‌های خون شناسی شامل هماتوکریت، هموگلوبولین و گلبول قرمز در ماهیان ماده‌زایی شده در شرایط پرورشی و مقایسه با سایر گروه‌های پرورشی بود.

۲. روش کار

بعد از ۲۴ ساعت گرسنگی از ۳ عدد ماهی مربوط تیمارهای مختلف پرتوتابی شده شامل دزهای ۴۵۰، ۶۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰، ۱۰۵۰ گری، تریپلوئید و هیبرید با میانگین وزن ۲/۰۹±۰/۲۱۲ کیلوگرم بصورت کاملاً تصادفی نمونه‌برداری شد تا پارامترهای خون‌شناسی گلبول قرمز، گلبول سفید، هموگلوبولین، هماتوکریت، شمارش افتراقی گلبول سفید، MCH و MCV ماهی‌های هر واحد آزمایشی در مجموعه آزمایشگاهی تحقیقات آبزیان مورد سنجش قرار گیرد. به این منظور ابتدا ماهی‌ها با استفاده از پودر گل میخک (به مقدار 200 ppm) در چند ثانیه بی‌هوش و سپس کاملاً با حوله خشک شدند (گرفتن رطوبت از سطح بدن). برای مطالعات خون‌شناسی از کلیه نمونه‌ها همزمان با خونگیری گسترش خونی تهیه شده و پس از خشک شدن در معرض هوا توسط متانول تثبیت و درگیمسای ۱۰ درصد به مدت ۴۵ دقیقه غوطه‌ور و رنگ‌آمیزی بعمل آمد. در این مرحله برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل) از لام‌های تهیه شده استفاده گردید. همچنین میزان هماتوکریت و هموگلوبولین نیز در کلیه گروه‌های آزمایشی اندازه‌گیری شد. شاخص‌های خون‌شناسی شامل هموگلوبولین (با بهره‌گیری از کیت سنجش هموگلوبولین شرکت پارس آزمون ، ابتدا ۲۰میکرولیتر خون با ۵ میلی‌لیتر درابکین مخلوط و پس از طی مدت لازم جهت کامل شدن واکنش جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر غلظت هموگلوبین نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر در مقابل بلانک و غلظت استاندارد محاسبه شد)، هماتوکریت (ابتدا لوله مویینه در نمونه خون ماهی قرار داده شد تا حدود دو سوم لوله از خون پر شود. سپس با فرو بردن لوله در خمیر مخصوص، انتهای لوله مویینه بسته شد. لوله‌های مویینه در دستگاه سانتریفیوژ هماتوکریت قرار داده شده و سپس درب روتور بسته و نمونه‌ها به مدت ۴ تا ۵ دقیقه با سرعت ۱۱۰۰۰ تا ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در انتها هماتوکریت هر نمونه روی خط کش مخصوص قرائت شد)، تعداد گلبول‌های قرمز و تعداد گلبول‌های سفید (برای رقیق کردن گلبول‌قرمز از پیپت ملانژور قرمز و محلول رقیق‌کننده گلبول قرمز و برای رقیق‌کردن گلبول‌سفید از پیپت ملانژور سفید و محلول رقیق کننده گلبول سفید استفاده شد. سپس لامل

سنگی روی لام نئوبار قرار داده و قطره کوچکی از سوسپانسیون تهیه شده بین لام و لامل قرار داده شد. سوسپانسیون طبق خاصیت موئینه در بین لام و لامل پخش شد. برای شمارش از مربع وسط که بهترین انتشار سلولی را دارد، استفاده شد. در انتها از طریق فرمول‌های اختصاصی تعداد گلبول قرمز و سفید در هر نمونه محاسبه شد). در انتها شاخص‌های MCV، MCH وMCHC با استفاده از فرمول‌های زیر اندازه‌گیری شدند:

$$\mathrm{MCV} = \mathrm{Ht} \times \frac{1000}{\mathrm{RBC}}$$

$$\mathrm{MCH} = \mathrm{Hb} \times \frac{10}{\mathrm{RBC}}$$

$$\mathrm{MCHC} = \frac{\mathrm{Hb}}{\mathrm{Ht}}$$

۱.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح آزمایش به صورت یک طرح کاملاً تصادفی استفاده بود. عادی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی شد. داده‌های درصدی پیش از انجام آنالیزها با (Arc sin) تبدیل شدند. برای مقایسه میانگین داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ONE-WAY-ANOVA) استفاده شد و سطح معنی‌دار بودن در بین تیمارها از طریق آزمون Ducan در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. تجزیه و تحلیل آماری به وسیله نرم افزار SPSS 17 در محیط ویندوز انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم افزارExcel 2010 در محیط ویندوز استفاده شد.

۳. نتایج

نتایج نشان داد که میزان گلبول سفید تفاوتی بین گروه‌های مختلف آزمایشی ندارد و تنها بین گروه‌های تریپلوئید و ۷۵۰ گری اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. گلبول قرمز در گروه هیبرید کمترین میزان می‌باشد که با گروه‌های دیگر اختلاف آماری معنی‌داری دارد. هماتوکریت تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف ندارد و هموگلوبولین در گروه هیبرید میزان کمتری را در مقایسه با سایر گروه ها نشان می‌دهد. مقدار MCV در گروه هیبرید در مقایسه با سایر گروه‌ها در سطح بالاتری قرار دارد (P<۰/۰۵) . MCH در گروه هیبرید کمترین مقدار را نشان می‌دهد (جدول ۱).

جدول ۱. عملکرد شاخص‌های خون‌شناسی (میانگین ± انحراف معیار) در گروه ماهیان خاویاری ماده‌زایی شده، هیبرید (HS) و کنترل

	گاینوژن	هیبرید	شاهد دیپلوئید
WBC	۱۴۳۵۳±۹۸/۲۲^{b}	۱۴۱۰۰±۱۱۰/۵۱^{a}	۱۴۲۹۱±۱۱۲/۵۴^{b}
RBC	۹۶۴۰۰۰±۲۲۳۰/۲۱^{b}	۸۰۰۰۰۰±۲۳۶۵/۰۴^{a}	۹۷۹۵۰۰±۳۱۰۲/۱۲^{b}
هموگلوبولین	۷/۷۴±۰/۴۲^{b}	۶/۴۲±۰/۵۵^{a}	۷/۳±۰/۲۹^{b}
هماتوکریت	۱۶/۹±۱/۵۳^{a}	۱۷/۱±۱/۰۲^{a}	۱۷/۴±۱/۲۹^{a}
MCV	۱۶۵/۸۶±۱۵/۲۱^{a}	۲۱۱/۴۵±۲۱/۲۲^{b}	۱۶۲/۴۹±۱۸/۵۴^{a}
MCH	۸۷/۹۱±۷/۴۱^{c}	۵۵/۰۲۵±۳/۵۴^{a}	۷۸/۶۳±۸/۰/^{b}

جدول مقادیر میانگین ± انحراف معیار سه تکرار آزمایشی را نشان می‌دهد.

۴. بحث

دستکاری کروموزومی در ماهیان با هدف اصلی افزایش محصول صورت می‌گیرد. این در حالی است که این افزایش ممکن است همراه با تغییراتی در خصوصیات ایمنی‌شناسی، خونشناسی، فیزیولوژی و ... باشد [۱۴]. به دلیل اینکه ماهیان به نسبت سایر مهره‌داران دارای سیستم ایمنی ابتدایی‌تری می‌باشند و از طرفی محیط آب به عنوان محیط زندگی آبزیان برای انتقال عوامل بیماریزا محیط مناسبی می‌باشند در دستکاری‌های کروموزومی این گروه از مهره‌داران سنجش شاخص-های ایمنی دارای اهمیتی دو چندان می‌باشد [۱۹-۱۵].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دزهای مختلف مورد استفاده در تولید ماهیان تک جنس ماده روی خون‌شناسی (هماتوکریت، هموگلوبولین، حجم گلبول قرمز، MCH و MCHC) تیمارهای مختلف آزمایشی تأثیر دارد ولی از آنجایی که این اولین مطالعه است که روی این ماهی انجام می‌شود نمی‌توان با قطعیت گفت که این تغییرات به دنبال پرتودهی و ایجاد ماده‌زایی است و یا اینکه به دلیل شرایط خاص محیط و شرایط پرورش می‌باشد. همچنین نتایج این پژوهش حاکی از آن است که در گروه تریپلوئید شاخص‌های خونشناسی شامل هماتوکریت، هموگلوبولین، حجم گلبول قرمز، MCH و MCHC نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری تغییراتی داشته است که این نشان دهنده مناسب بودن شوک حرارتی و انجام موفقیت آمیز تریپلوئیدی در این گروه می‌باشد که این با سایر نتایج بدست آمده همخوانی دارد [۱۹ و۱۸].

بنابراین می‌توان از این روش دستکاری کروموزومی بدون تغییر در شاخص‌های خونشناسی استفاده کرد ولی دقت، تجربه و دانش کافی در انتخاب دز مورد نظر به عنوان اصلی‌ترین موضوع در ایجاد ماده‌زایی به این روش است. در سال‌های اخیر حجم بالایی از بیماری‌های آبزیان همراه با تخم‌های وارداتی از سایر کشورها به کشور وارد شده است که این موجب فلج شدن بخش زیادی از این صنعت شده است. بنابراین استفاده از روش‌های مناسب در جهت خودکفایی و تولید تخم چشم زده و ماهیان تک جنس ماده و بومی در کشور امری ضروری می‌باشد.

۶. تشکر و قدردانی

به این وسیله از تمامی همکاران گرامی و کارمندان پرتلاش پژوهشکده کشاورزی هسته ای که به نحوی از انحاء به پیشبرد این تحقیق کمک نمودند بویژه جناب آقایان دکتر نبی پور، دکتر نیسی و مهندس مجیدی تشکر وافر می گردد.

۶. مراجع

1. J. HOLČÍK, In the Catchment Area of the Southern Caspian Sea, Biologica 40 (1996) 99-114.
2. H. Abdolhay, Sturgeon stocking programme in the Caspian Sea with emphasis on Iran, FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 429 (2004) 133.
3. M.A. Webb, S. Doroshov, Importance of environmental endocrinology in fisheries management and aquaculture of sturgeons, General and Comparative Endocrinology 170(2) (2011) 313-321.
4. P.D. Greany, J.E. Carpenter, K.-H. Tan, Use of nuclear techniques in biological control, Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Joint proceedings of the international conference on area-wide control of insect pests, 28 May-2 June, 1998 and the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Penang, Malaysia, 1-5 June, 1998., Penerbit Universiti Sains Malaysia, 2000, pp. 221-227.
5. N. Sun, S. Lee, K.B. Song, Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation, International journal of food microbiology 94(3) (2004) 263-267.
6.]M.M. Husseiny, H.F. Madsen, Sterilization of the navel orangeworm, Paramyelois transitella (Walker), by gamma radiation (Lepidoptera: Phycitidae), University of Calif.1964.
7. L. Andrews, M. Jahncke, K. Mallikarjunan, Low dose gamma irradiation to reduce pathogenic Vibrios in live oysters (Crassostrea virginica), Journal of Aquatic Food Product Technology 12(3) (2003) 71-82.
8. M. Parikka, M.M. Hammarén, S.-K.E. Harjula, N.J. Halfpenny, K.E. Oksanen, M.J. Lahtinen, E.T. Pajula, A. Iivanainen, M. Pesu, M. Rämet, Mycobacterium marinum causes a latent infection that can be reactivated by gamma irradiation in adult zebrafish, (2012).

9. K.-I. Ijiri, Gamma-ray irradiation of the sperm of the fish Oryzias latipes and induction of gynogenesis, Journal of radiation research 21(3-4) (1980) 263-270.
10. D. Chourrout, B. Chevassus, F. HERIOUX, Analysis of an Hertwig effect in the rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson) after fertilization with γ-irradiated sperm, Reproduction Nutrition Développement 20(3A) (1980) 719-726.
11. H. Komen, G.H. Thorgaard, Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review, Aquaculture 269(1) (2007) 150-173.
12. J.G. Christopher, A.G. Murugesan, N. Sukumaran, Optimization of UV treatment to induce haploid androgenesis in the stinging catfish, Heteropneustes fossilis, International Aquatic Research 4(1) (2012) 1-8.
13. G.F.S.R.J.M. Wiegertjes, Van Muiswinkel.W. B Divergent selection for antibody production in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using gynogenesis, Animal Genetics 25 (1994) 251-257.
14. K. Hashimoto, T. Nakanishi, Y. Kurosawa, Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens, Proceedings of the National Academy of Sciences 87(17) (1990) 6863-6867.
15. I. Hordvik, U. Grimholt, V.M. Fosse, Ø. Lie, C. Endresen, Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the MHC class II β chain in Atlantic salmon (Salmo salar), Immunogenetics 37(6) (1993) 437-441.
16. M. Marsden, L. Freeman, D. Cox, C. Secombes, Non-specific immune responses in families of Atlantic salmon, Salmo salar, exhibiting differential resistance to furunculosis, Aquaculture 146(1) (1996) 1-16.
17. E. Koppang, M. Lundin, C.M. Press, K. Rønningen, Ø. Lie, Differing levels of Mhc class II β chain expression in a range of tissues from vaccinated and non-vaccinated Atlantic salmon (Salmo salarL.), Fish & shellfish immunology 8(3) (1998) 183-196.
18. R. Sheehan, S.P. Shasteen, A.V. Suresh, A.R. Kapuscinski, J.E. Seeb, Better growth in all-female diploid and triploid rainbow trout, Trans. Am. Fish. Soc 128 (1999) 491-498.
19. M. Beyea, T. Benfey, J. Kieffer, Hematology and stress physiology of juvenile diploid and triploid shortnose sturgeon (Acipenser brevirostrum) ,Fish Physiology and Biochemistry 31(4) (2005) 303-313.]