تحضير ودراسة الطابع النووي في عينات غير حية من نوعين من الأسماك(الكارب والجري)

د. محمد ركـــبي

مركز البحوث العلمية الزراعية بحلب/الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية

الملخص

تعتبر دراسة التنميط النووي أو الصيغة الصبغية للأسماك من الأمور المهمة من الناحية التصنيفية والتعرف على الأنواع السمكية. ولا يخلى تحضير الصـــبغيات باستخدام طريقة المعاملة المباشرة بالكولشسين للسمك الحي (in vivo) أو لأنســجته بعد استخلاصها (in vitro) من صعوبات متمثلة بنقل الأسماك حية بعيداً عن أماكن تواجدها لإجراء المعاملة السابق ذكرها بالكولشيسين، لذا كـــان لا بـــد مـــن اختبـــار صلاحية عينات الأنسجة المستخلصة من الأسماك بعد برهة من صيدها لاســـتخدامها في تحضير الصبغيات.

لتنفيذ البحث نزعت عينات من أنسجة عائدة لأنواع مختلفـــة مـــن الأســـماك مباعة في السوق تم صيدها من بحيرة الأسد. وقد تضمن تحضير صبغيات الأســـماك والذي أجري في مركز البحوث العلمية الزراعية بحلب نقع الأنســـجة in vitro فـــي وسط حضن يحتوي على الكولشيسين بتركيز 10% لمدة 2.5 ســـاعة، ثـــم بمحلـــول KCl منخفض التوتر لمدة 30 دقيقة قبل أن يجري تثبيتها بمحلـــول كـــارنوي. وقـــد أخذت 2-4 نقاط من المعلق وأسقطت على شرائح زجاجية ثم جففـــت ولونـــت فـــي محلول جيمسا 4%. وقد تم فحص الشرائح بالتكبير X 170 ثم X 1020 للبحث عن لوحات استوائية لتصويرها بالتكبيرX 1700.

أظهرت النتائج إمكانية تحضير صبغيات الأسماك بعد برهة من صيدها مـــن عينات الغلاصم المنزوعة. كما أمكن تنصيب وترتيب صبغيات سمك الجـــري مـــن

الأطول للأقصر وذلك ضمن مجموعات حسب توضع النقطة المركزية وكذلك حساب عدد أذرع الصبغيات(NF).

الكلمات المفتاحية: **تحضير الصبغيات، الأسماك، المعاملة بالكولشيسين، في الأنبوب ، دراسة النمط الصبغي**

مقدمة

تعتبر دراسة التنميط النووي أو الصيغة الصبغية من الأمور المهمة في تربية الأسماك Aqaculture من الناحية الوراثية genetic control لتحديد هوية المخزون الوراثي ودراسة الهجن hybrids والتعدد الصبغي المحرض بالتوليد التطفري mutagenesis and induced polyploidy في الأنواع السمكية المختلفة (Thoorgard and Disney,1990;Al- Sabti,1987). وقد برزت أهميته كأداة تصنيف evolutionary systematics والبحث في صلة القرابة بين الأنواع phylogenic relationships (Lagier et al.,1981) والتحكم الوراثي genetic control والإنتاج السريع لخطوط التربية (CIHEAM,2009 ;Al-Sabti,1991) إذ يمثل مصدر بيانات إضافي دقيق ومفصل لتحديد هوية الأسماك كونه لا يعتمد كالطرق التقليدية الأخرى على الشكل بل على الاختلافات الوراثية genetic divergences في عدد وشكل الصبغيات variation in chromosome number and morphology والتي تمثل موارد حيوية potential resource في برامج تربية الأسماك وإدارتها (Philips & Rab,2001).

وقد لاقى تطبيق هذا النوع من الدراسة اهتماماً ملحوظاً في السنوات الأخيرة(Ozouf-Costaz et al.,1992) وذلك لكثرة الأبحاث في هذا المجال والتي لم تتطرق سوى لـ 10 % من مجموع الأنواع السمكية الذي يزيد عددها عن20.000(Bolla,1987).

إن الصعوبة الرئيسية في دراسة صبغيات الأسماك تكمن في الحصول على لوحات استوائية ذات نوعية عالية high quality metaphase spreads

(Bolla,1987)إذ أن غالبية الأسماك تمتلك أعداد كبيرة نسبياً من الصبغيات الصغيرة والتي يمكن رؤيتها بالمجهر الضوئي في مرحلة اللوحة الاستوائية من الانقسام الخلوي (CIHEAM,2009). كما تواجه دراسة الصبغيات في الأسماك صعوبات أهمها اختلاف العدد الصبغي بين محضرات النوع الواحد من الأسماك يصل (Esmaeili et al.,2007) إلى 17.5% من صور اللوحات الاستوائية، كما أن هناك اختلافاً في العدد الصبغي يحصل خلال مرحلة التحضير ويتمثل بفقدان أو كسب عدد من الصبغيات من الخلايا المجاورة وذلك بسبب زيادة في تركيز ومدة المعاملة بالمحلول منخفض التوتر (Kilic-Demirok & Unlu 2004;Vitturi et al.,1993). ويضاف إلى ذلك الاختلاف الشكلي حتى بين الصبغيات المتجانسة من نفس النواة(Al-Sabti,1991;Vitturi et al.,1993). فقد يحدث أن تتقلص بعض الصبغيات أكثر من غيرها مما يسبب صعوبة في أخذ قراءات دقيقة لأطوال الصبغيات. ويزيد على كل ذلك التعددية الشكلية للصبغيات polymorphism وعدم تماثلها حتى في النوع الواحد بخلاف الإنسان والثدييات (Al-Sabti,1991). وباختصار إن صغر حجم صبغيات الأسماك وعددها الكبير وعدم وجود طريقة معيارية لتحضيرها يجعل تقييمها صعباً (Thoorgard and Disney,1990;Denton,1973).

وتعتمد طرائق تحضير الصبغيات المستخدمة عادة على التحضير المباشر للصبغيات من الأنسجة الصلبة والزرع الخلوي من جميع الأطوار اليرقية وكذلك من أنسجة السمك البالغ كالطحال والكلية والمثانة السباحية والكبد والمناسل(Thorgaad & Disney, 1990)، كما يمكن أن تستخدم أنسجة مختلفة في مراحل حياتية مختلفة(Baksi & Means, 1988) وكبديل عن ذلك الرأس والأقواس الغلصمية. وتتميز خلايا رؤوس الكلى kidney's head cells وخلايا خيوط الأقواس الغلصمية gill filament cells والأمعاء والطحال والخصى وظهارا القشور الصدفية scale epithelial وأنسجة الأحشاء fin tissues المتجددة بقدرة انقسامية عالية يمكن الحصول منها على لوحات استوائية ذات نوعية عالية يسهل من خلالها

التعرف بشكل جيد على الصبغيات. وتستخدم عادة مواد كيميائية خاصة كالكولشيسين وهو أكثرها استخداماً لإيقاف الانقسام الخلوي في مرحلة اللوحة الاستوائية، وهو يحقن في السمك الحي بجرعة 0.1 ملغ/غ وزن حي في العضل وفي البريتون (Saygun et al.,2006; Kilic-Demorok and Unlu, 2001). كما يمكن أن يحقن في البريتون بجرعة 0.1%(1مل/100غ) أو بتركيز 0.6% وبجرعة 0.01 مل/غ. ويمكن الحصول على نفس النتيجة بحقن محلول كولشيسين (0.005غ/20مل) بجرعة 0.02مل/غ وزن حي في البريتون (Kilic-Demirok et and Unlu,2004; Gul et al.,2004, Esmaeili et al.,2007)، أو كولسيميد في البريتون بجرعة1ملغ/200غ وزن الجسم(Cataudella et al.,1979) أو 0.5 –1 ميكروغرام/غ وزن الجسم (Ueno et al.,1988,1985). وكان Hitoshi وزملاؤه (1979) قد طور طريقة بديلة عن الطرائق السابقة لتحضير الصبغيات لتجاوز الصعوبات في نقل الأسماك أو إبقائها حية في المخبر والاحتفاظ فقط بأنسجة الأسماك المراد اختبار صيغتها الصبغية، وهي تتضمن معاملة الغلاصم في الزجاج in vitro بمحلول الكولشيسن بعد استئصالها فوراً من السمك الحي.

إن دراسة وراثية خلوية للأنواع السمكية المستوطنة في المياه السورية ضرورية من الناحية الاقتصادية والبيئية خصوصاً وأنه لم يجرى في سوريا سوى عدداً قليلاً من الدراسات التصنيفية للأسماك على أساس المواصفات والفروقات الشكلية كان أخرها الدراسة التي أجريت من خلال المشروع السوري الألماني لتطوير الثروة السمكية(Kofad Fisch.Syr.,1976-2001).

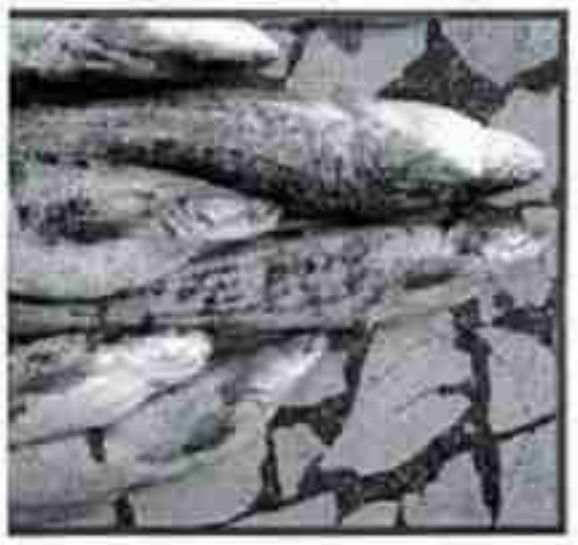
يهدف البحث إلى اختبار صلاحية عينات الأنسجة المستخلصة من الأسماك بعد فترة وجيزة من صيدها، وإمكانية استخدامها في تحضير ودراسة صبغيات بعض الأسماك القرانية.

المواد وطرائق العمل

لتنفيذ البحث أجريت المعاملة بالكولسيميد في الأنبوب بطريقة Hitoshi وزملاؤه (1979) في مخابر مركز البحوث العلمية الزراعية بحلب التابع للهيئة

العامة للبحوث العلمية الزراعية على عينات غلاصم (شكل 1) تم نزعها من أسماك الكارب العادي *Cyprinus carpio* (Linnaeus,1758) (عدد 2)، وأسماك الجري الفرائي *Silurus triostegus* (Heckel, 1843) (عدد 2) مباعة في السوق.

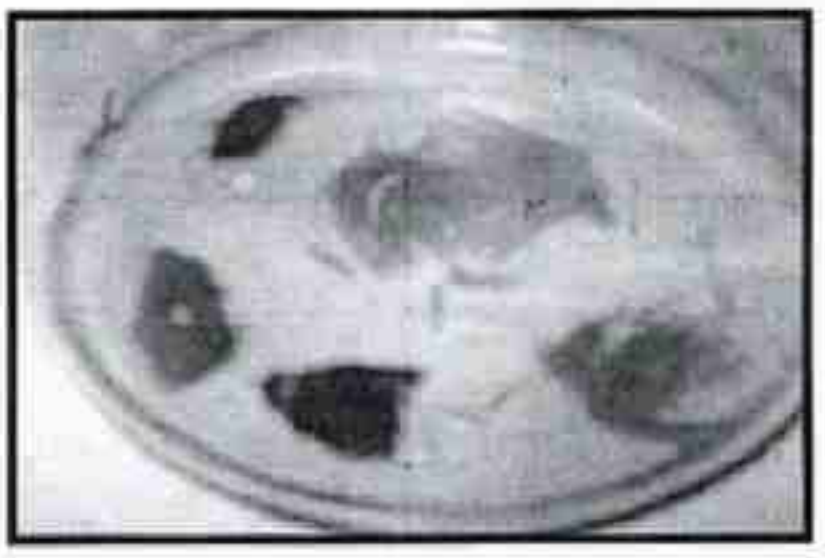
سمك الكارب العادي



سمك الجري الفرائي

شكل 1 أنواع الأسماك التي استخلصت منها العينات الخاصة بتحضير الصيغيات

وقد تضمنت المعاملة نقع أجزاء الأنسجة المستخلصة (شكل 2) في محلول يحتوي على الكولسيميد بتركيز 10% لمدة 2 -2.5ساعة. ولقد استبدل الكولشيسين(تركيز 0.003-0.005%) بالكولسيميد بتركيز 0.1 ميكروغرام/1مل (BSmart,2002) وسط حضن كونه متوفراً في مخبر المركز وهو أقل سمية من الكولشيسين.



شكل 2 معاملة الأنسجة المختلفة بمحلول الكولشيسين

وقد خضعت الأنسجة للمعاملة بمحلول KCl منخفض التوتر ذي التركيز 0.36% لمدة 45 دقيقة تم جرى تثقيلها لمدة 10 دقائق ثم تثبيتها بإضافة 2 -3 نقاط من محلول كارنوي (1 حمض الخل الثلجي: 3 ايثانول) طازج وبارد ، ثم أعيد تثقيلها ثانية وبعد استبعاد الطائف واستبداله بكمية متساوية من محلول كارنوي ومزجه جيداً ترك في درجة حرارة الغرفة مدة 45 دقيقة ثم أعيد التثقيل والتثبيت للمرة الثالثة ثم أخذت 2-4 نقاط من المعلق وأسقطت على شرائح زجاجية باردة ثم جففت بتركها10 -15 دقائق بدرجة حرارة الغرفة، ولونت في محلول جيمسا 4% مدة 15 دقيقة. وقد تم فحص الشرائح بالتكبيرX 170 ثم X 1020 للبحث عن لوحات استوائية لتصويرها بالتكبير X 1700 بواسطة كاميرا ديجيتال Canon power Shot 470.

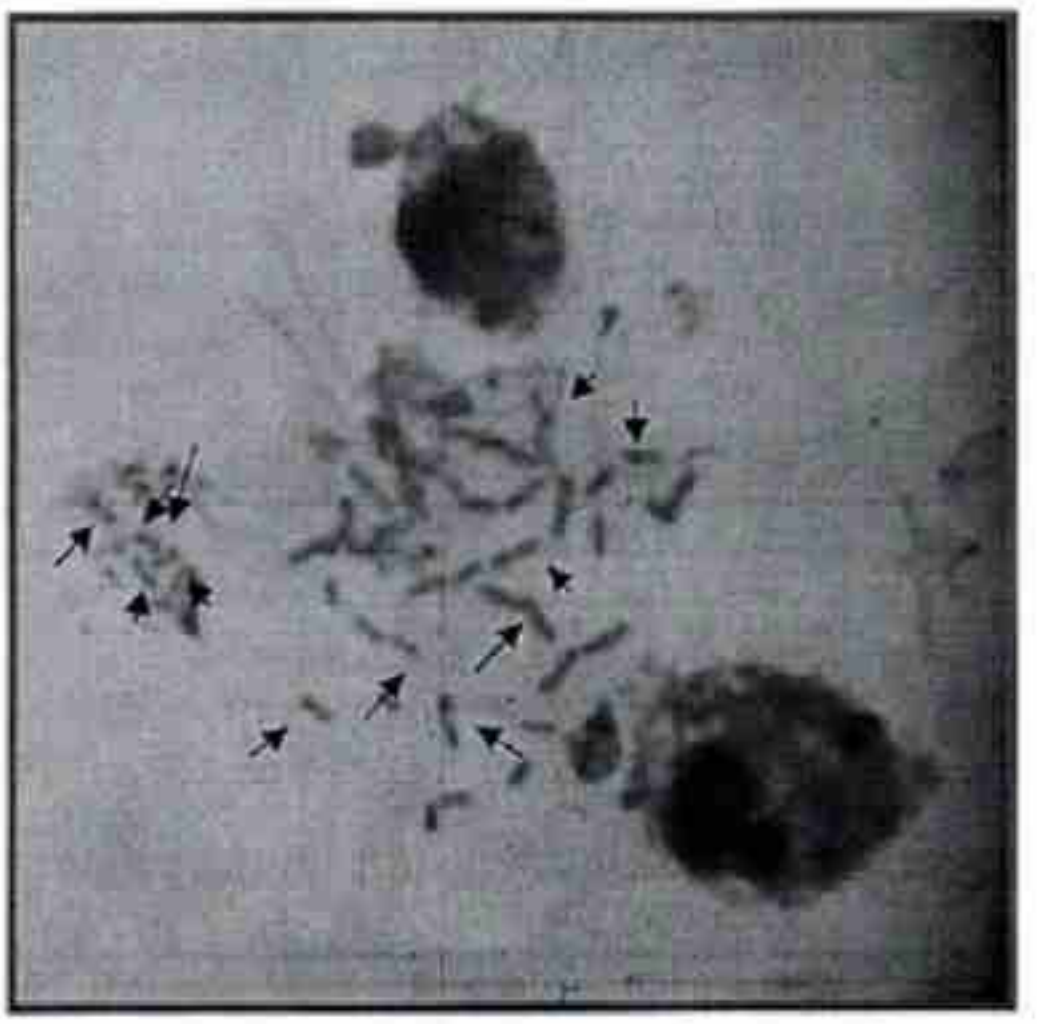
النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج إمكانية تحضير صبغيات الأسماك في جميع عينات الغلاصم المنزوعة بعد فترة وجيزة من صيدها وذلك من خلال الحصول على لوحات استوائية لكل من سمك الكارب العادي وسمك الجري :

1-اللوحة الاستوائية لسمك الكارب العادي *Cyprinus carpio* :

الشكل 3 لوحات استوائية لسمك الكارب العادي *Cyprinus carpio* بعدد صبغي 2n=50 والذي يتوافق مع العدد الصبغي لمعظم أنواع الشبوطيات (Collares Pereira,1989) التي تنتمي للعائلة الشبوطية Cyprinidae ، رغم أن هناك أنواعاً أخرى من *cyprinus carpio* تمتلك 98 صبغياً (Al-Sabati, 1986)، ونوع *Barbus spp.* وهو متعدد العدد الصبغيpolyploidy يعيش في جنوب أفريقيا ويمتلك 148 أو 150 صبغياً (Golubsov and E.Y. Krysanov, 1993). وكان(Kilic-Demirok & Unlu,2004) قد أشار إلى أن سمك الكارب *Alburnoides bipunctatus* يمتلك ثمانية أزواج من الصبغيات متوسطة النقطة

المركزية وأحد عشرة زوجاً من الصبغيات شبه متوسطة وستة أزواج من الصبغيات طرفية وشبه طرفية النقطة المركزية(NF=88).

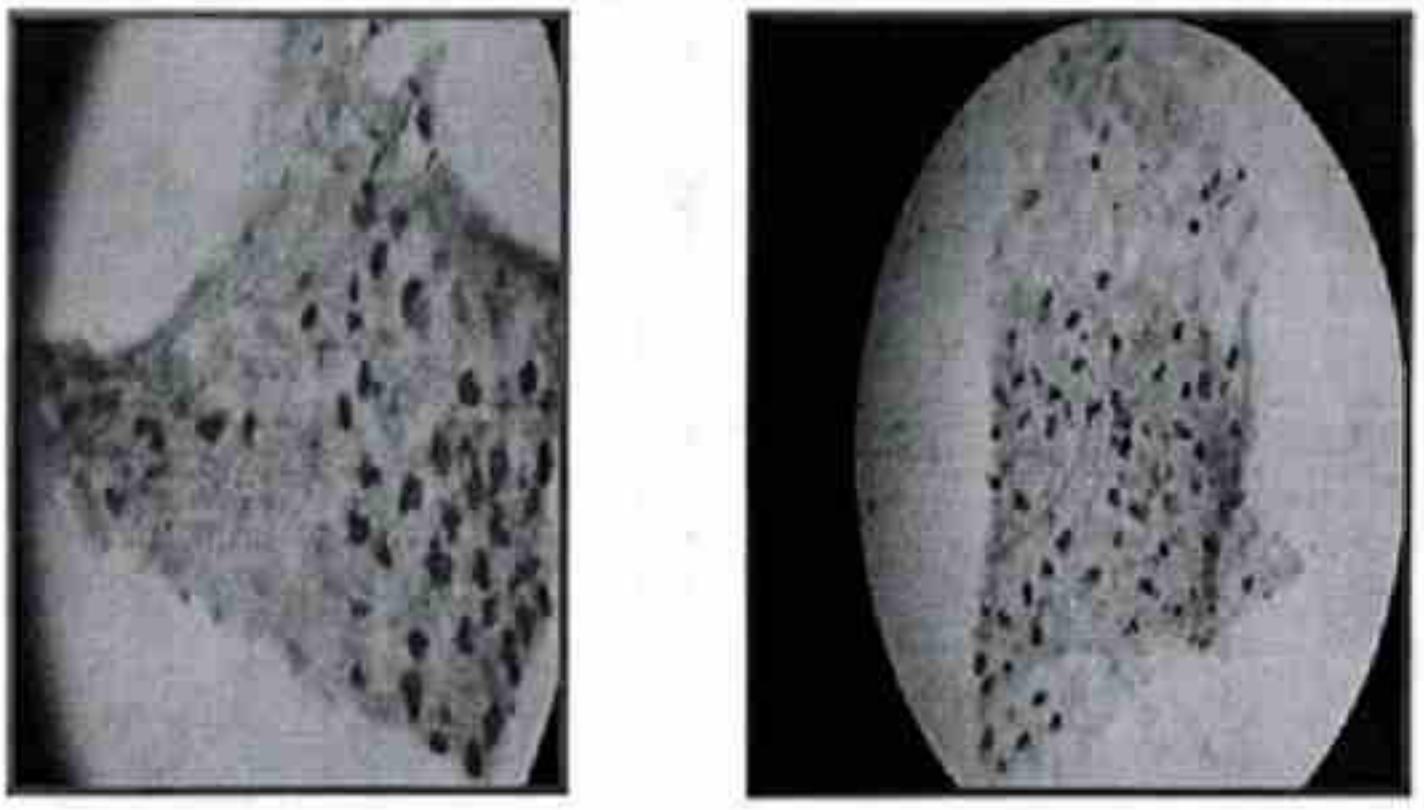


شكل 3 اللوحة الاستوائية لسمك الكارب (2n=50) بالتكبير X 1700

كما يمكن من الشكل 3 تمييز أزواج الصبغيات متوسطة وشبه النقطة المركزية الستة لتكون الصيغة الصبغية كالتالي: 2n=50=12 M/SM+38 ST/A وعدد أذرع الصبغيات (NF=62).

2-اللوحة الاستوائية لسمك الجري الفراتي *Silurus triostegus*:

الشكل 4 صبغيات سمك الجري *Silurus triostegus* وهو أيضاً من الأسماك الفراتية التي تعيش في نهر الفرات وبحيرتا الاسد والبعث في محافظة الرقة.



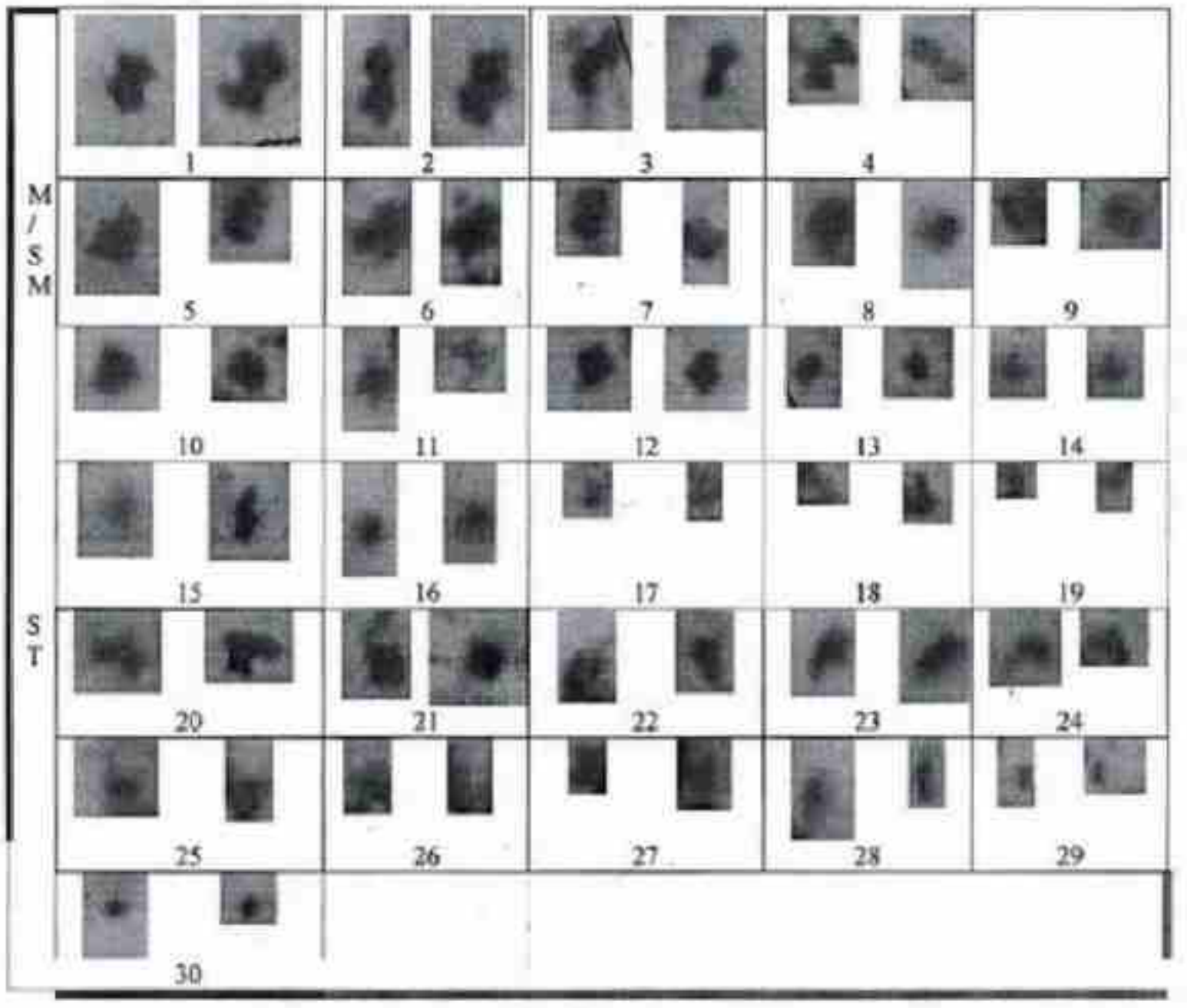
أ- التكبير X 1020 ب-التكبير 3.8 X 1700

شكل 4 لوحات استوائية لسمك الجري (2n=60)

أظهرت النتائج إمكانية تحضير صبغيات الأسماك في جميع عينات الغلاصم المنزوعة بعد فترة وجيزة من صيدها وذلك من خلال الحصول على لوحات استوائية لكل من سمك الكارب وسمك الجري مع صعوبة إيجاد لوحات استوائية يمكن تصويرها بالمجهر الضوئي بالتكبير X 1700 وتضم جميع الصبغيات ضمن الساحة المجهرية. وقد يعود ذلك لتدني أو ضعف الانقسامات الخلوية كون الأنسجة غير حية أو لأنه اضطر لحفظها خلال نهاية الأسبوع بدرجة حرارة -12 مئوية، أو لقصر فترة الحضانة في محلول الكولشيسين (2.5 ساعة)، علماً أن فترة الحضانة لـ Hitoshi وزملاؤه (1979) وغيره من الباحثين للسمك الحي وكذلك للأنسجة المنزوعة فوراً من السمك الحي تتراوح بين 3 و 10 ساعات.

كما تم ترتيب صبغيات سمك الجري (شكل 5) من الأطول للأقصر والتعبير عن التنميط النووي (الصيغة الصبغية) كما يلي:2n=60=38M/SM+22ST/A ، وحساب عدد أذرع الصبغيات وهو عبارة (Levan et.al.,1964) عن عدد الصبغيات ثنائية الأذرع (متوسطة M وشبه متوسطة SM النقطة المركزية)2X مضافاً إليه عدد الصبغيات أحادية الأذرع (طرفية T أو نهائية A وشبه طرفية ST النقطة المركزية)،

مع الإشارة إلى صعوبة تحديد نمط بعض الصبغيات من حيث توضع النقطة المركزية. وقد توافق العدد الصبغي 2n=60 مع (Ráb *et al.*, 1991) لسمك *Silurus glanis* وهو من أسماك السلوريات Catfish ، كما بلغ عدد أذرع الصبغيات (NF=98).



شكل 5 التنميط النووي(الصيغة الصبغية) لسمك الجري

وكان (Philips & Rab, 2001) قد ذكرا أن اختلاف العدد (NF) بين اسماك النوع الواحد يعود لفروق في تسجيل أنماط بعض الصبغيات وخصوصاً متوسطة وشبه متوسطة النقطة المركزية.

وبما أن عينات الأسماك كانت من إناث اسماك الكارب والجري فإنه لم يتثنى المقارنة بين صبغيات إناث وذكور النوع من الأسماك، كما لم يتمكن(Saygun et al.,2001) أيضاً من ملاحظة فروق بين صبغيات ذكور وإناث الأسماك، وكان(Philips and Rab,2001) قد أشارا إلى أن الصبغيات الجنسية عند كثير من الأسماك متغيرة الشكل heteromorphic ويعود ذلك لإضافة كروماتين مغاير heterochromatin كما هو الحال في كثير من الحيوانات خاصة وأنه لم يتوفر أي دليل على ازدواج في شكل أو هيئة dimorphism الصبغيات الجنسية(Kilic-Demirok et al.,2001;Al-Sabti,1991).

مما سبق نستنتج ما يلي:

إمكانية الفصل بين وقت أخذ العينات الغلصمية من الأسماك ووقت تحضير ودراسة الصبغيات مما يساهم في تنظيم العمل في المخبر، كما يتيح المجال لزيـــادة عدد العينات السمكية المراد أخذها خلال الجولة الحقلية لإختبار صيغتها الصبغية.

Reference

Al-SABATI K., 1991- Handbook of Genetic Effects and Fish Chromosomes. Ljubljana;97.

AL-SABTI K, 1987- Cytogenetic studies on five species from Yugoslava. *Cytobios*, 49:175-188.

Al-SABTI K. 1986- Karyotypes of *Cyprinus carpio and Leuciscus cephalus* orientalis. *Cytobios*, 47: 19-25

BAKSI S.M. and J.C.MEANS , 1988- Preparation of Chromosomes from early stages of fish for cytogenetic analysis. *J. Fish Biol*., 32: 321-325.

BOLLA S., 1987- Cytogenetic studies in Atlantic salamon and rainbow trout embryos. *Hereditas*;106:11-17.

BSmart, 2002- concentration Colcemid Solution, in culture medium. chromosome analysis during lymphocyte karyotyping and amniotic fluid cell chromosome analysis,;Site Building;Info@bioind.com.

CATAUDELLA S.; PERIN P. and L. SOLA, 1980- A Chromosome study of eight Mediterranean species of Sparidae (pisces, perciformes), Genetica 2(54):155-159.

CIHEAM Options Mediterraneenes, 2009-Protocol I-Preparation of metaphasic chromosomes from early stages of fish for cytogenetic studies. Advances in fish reproduction and their application to broodstock management: A practical manual for sea bassdescribed in several fish species including common carp, channel catfish, .. ,B/no.63:61-65.ressources.ciheam.org.

COLLARES-PEREIRA M.J. ,1989- Hybridazation potential of unsexual population, in: R.M. Dawley(ed). Evolution and Ecology of Unsexual vertebrates. Bulletin 466. New York, 281-287.

DENTON E.T., 1973- Fish Chromosome Methodology. Charles Thomas Publisher,Springfield. 166pp.

ESMAEILI H.R.; PIRAVAR Z. And H. SHIVA, 2007-Karyological Analysis of tow Endemic Tooth-Carps, Aphanius persicus and Aphanius sophiae(Pisces: Cyprinodontidae), from Southwest iran; *Turk J Zool.* 31:69-74.

GOLUBTSOV A.S. and E.Y. KRYSANOV. ,1993-Karyological study of some Cyprinid species from Ethiopia, The polyploid differences between large and small Barbus of Africa. *J. Of Fish Biol.*,42: 445-455.

GUL S.; COLAK A., A SEZGIN I. And B. KALOGLU, 2004 -Kayotype Analysis in Alburnus heckeli (Battalgil, 1943) from Lake Hazer- Scientific Report; *Turk J Vet Anim Soc.* 28: 309-314.

HITOSHI I.; MUROFUSHI M., FUJIWARA S. And K. FUJINO , 1979- Preparation of Fish Chromosomes by in Vito Colchcine Treatemnt; *Japanese J. Of Ichthyology* Vol.24,No.4:281-284.

KILIC-DEMIROK N. And E. UNLU , 2004- Karyotype of the Cyprinid Fish Alburnoides bipunctatus(Cyprinidae) from the Tigris River;Folilia biologica(Krakow),vol.52,No 1-2

KILIC DEMOROK N. And E.UNLU , 2001-Karyotypes of Cyprinid Fish Capoata trutta and Capoata umbla(Cyprinidae) from the Tigris River, *Turk J Zool*;25:389-393.

KOFAD FISHEREI SYRIAN 10;32, 1976 - 1983: GTZ Fischerei- Entwicklung in Assadsee/ Syrian;1993 – 2001: GTZ

Fischerei und Aquakultur; . 1960er Jahre: FAO Aquakultur-Entwicklung Al Ghab.

LAGIER K.F.; BARDACH J.E., MILLER R.R And D.R. MAY PASSINO, 1981- Chthyology. John and Sons, New York, Sata Barbara, London, Sydney, Toronto

LEVAN A. ; FREDGA K and A. SANDBURG, 1964- Nomenclature for centromer posiion on chromosomes. *Hereditas* 52,201-220.

OZOUF-COSTAZ C and F. FORESTI, 1992 - Fish cytogenetic research advance, application and perspectives. *Netherland Journal of Zoology*, 42: 277-290.

PHILIPS R. And P. RAP(2001): Chromosomes evolution in the Salmonidae(Pisces); an update. Biol.Rev.;76:1-25.

RAB P.; MAYR B. and P. ROTH, 1991- Chromosome banding study of European catfish, *Silurus glanis*(Pisces, Siluridae)

SAYGUN S.; KARAYUCEL I. and R. BIRICAN , 2006- Karyogical Observation of Red Mullet(Mullus barbatus Linnaeus,1758), Tur J. Bio;30:235-238 .

THORGAARD G.H. and J.E. DISNEY,1990: Methods for fish biology Ed.Cari B, Schreck and Peter B. Moyle *American Fisheries Society*, U.S.A.,171-187.

UENO K.; NAGASE A. And Y-J YE , 1988- Tetraploid Origine of the Karyotype of Asian Sucker, Myxocyprinus asiaticus; *Jpn. J. Of Ichthyology*;34(4):512-514.

UENO K.; SENOU H. And K. So , 1985- A Chromosome study of five species of Korean cobitid fish; *Jpn.J. Genet*(60): 539-544.

VITTURI. R.; CATALANO E. And E. COLOMBERA, 1993-Chromosomes of Bothus podas(Pisces, Pleuronectiformes) from the Mediterranean Sea. *J. Fish. Biol.*; 43: 221-227.

Chromosomes Preparation & Karyotyping in unlived specimen of two fish species (*Cyprinus carpio* & *Silurus triostegus*)

Dr. Mohammed ROUKBI

Aleppo Scientific Agricultural research center- /General commission for Scientific Agricultural research

Abstract

Karyological information of fish are important from taxonomical view point. To overcoming the difficulties due to the transport for long distances or to keep fish alive in a laboratory for in vivo and in vitro Colchicine treatment, the use of in field removed fresh gill for the preparation of Fish Chromosomes were proposed.

To perform this study gill specimen dissected from *Cyprinus carpio & Silurus triostegus* sold in the market after the fish were being captured in Assad lake were submitted Colchcine treatment in Aleppo agricultural research center /General commission for Scientific Agricultural research which has been included an incubating in incubation medium containing colcemid (10%) for 2-2.5 hours. Another treatment with 0.3% KCl solution for 30 min were applied. Afterwards, tissues were fixed in fresh Carnoy solution. Cell suspension was dropped onto slides, dried and then stained in 3% Giemsa solution. Several metaphase plates were selected and photographed.

The results showed the possibility of chromosomes preparation in vitro in fresh fish gill specimen after a while from capture. The karyogram of *Silurus triostegus* were constructed, by grouping the chromosomes into three series, i. e., metaphase, submetacentric and subtelocentric-acrocentric elements, and aligned serially from the larger to smaller, respectively. Also, the number of arms were established.

Key words: **Chromosomes preparation, Fish, Colchcine Treatment, in vitro, Karyotyping**