پروژه کاریولوژی (مطالعات کروموزومی) ماهیان خاویاری از طریق کشت گلبولهای سفید خون

محمدرضا نوروزفشخامی
مرکز تحقیقات شیلاتی گیلان
مؤسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران
محمود خسروشاهی
استاد مشاور پروژه

خلاصه

کاریوتیپ فیل ماهی *(Huso huso)*، ماهی اوزون برون *(Acipenser stellatus)* و ماهی قره‌برون *(Acipnser persicus)* متعلق به حوضه جنوبی دریای خزر، با استفاده از روش کشت بافت خون مورد بررسی قرار گرفت.

باشمارش پنجاه پلاکت متافازی کاملاً پخش شده، تعداد کروموزومهای فیل ماهی ۲n=۱۱۵ ± ۱ و NF=۳۵۶، و تعداد کروموزومهای ماهی اوزون برون ۲n=۱۱۴ ± ۱ و NF=۳۷۲ تعیین گردید.

در مورد گونه قره‌برون به علت بدست نیاوردن گسترش کروموزومی مناسب به تعداد کافی، تعداد کروموزومها و کاریوتیپ آن مشخص نگردید، و نیاز به بررسی بیشتر می‌باشد. با توجه به ارزیابی اولیه انجام گرفته، گمان می‌رود تعداد کروموزومهای این گونه احتمالاً بیش از ۲n=۲۵۰ باشد.

مقدمه

طبق منابع علمی موجود برای بررسی کاریوتیپ ماهیان، له کردن و سوسپانسیون بافتهای مختلف از جمله کلیه، کبد، طحال (Denton, 1973, Sharma, and Sharma, 1972; Harthey, and Horne, 1983; AL-Sabti, and Bloom, Fijian, 1983; Kingerman, and Bloom, 1977) لاروماهی (Baksi, and Means, 1988) ، کشت مایع حفره شکمی و کشت گلبولهای سفید خون (Denton, 1973; Blaxhall, 1983a; Al-Sabti, 1983; Grammeltvedt, 1974; Etlinger, et al., 1976; Horne, 1985; ·Hartley and Horne, 1983; Grammeltvedt, 1974; Wright, 1971; Heckman, and Brubaker, 1970; Hartley, and Hayashi, 1970; Kang, and Park, 1975; Heckman, and Allendrof, 1971; Ojima, and Kitotsumachi, 1970 ، مورد استفاده قرار گرفته است.

کشت بافت خون از زمانیکه (Nowell, 1960) پی‌برد ماده فیتوهماگلوتینین (PHA) که یک لکتین گیاهی است تقسیمات میتوزی را در لنفوسیتهای انسانی افزایش می‌دهد ابتدا در مورد بافت خون انسان رایج شد و سپس به تدریج در مورد سایر موجودات از جمله ماهیان به کار گرفته شده است.

گونه فیل ماهی *(Huso huso)* بزرگترین ماهی دریای خزر است. این گونه در دریای خزر، سیاه، آزوف، شرق مدیترانه و دریای آدریاتیک زندگی می‌کند. نوع بهاره آن اواخر اسفندماه، و نوع زمستانی آن اواخر شهریور و مهرماه وارد رودخانه‌های ولگا، اورال، اترک، سفیدرود، کورا، دانوب و غیره می‌شود. به علت آلودگی رودخانه‌ها و بسته‌شدن سد در مسیر رودخانه‌ها تولید مثل طبیعی این ماهی رو به کاهش می‌باشد لذا مسئله پرورش آن از اهمیت خاصی برخوردار گشته است. خاویار این گونه بسیار مرغوب است (Holcik, 1989).

مطالعات مرفولوژیک و تاکسونومیک زیادی درباره آن صورت گرفته، ولی بررسیهای کاریوتیپی زیاد گسترده نیست. تعداد کروموزو- مهای فیل ماهی ولگا ۳ ± ۱۱۸ = ۲n مشخص شده است که در آن تعداد ۲ ± ۶۰ کروموزوم متا، و ساب متاسانتریک وجود دارد، و بقیه کروموزومها آکروسانتریک هستند. تغییرات ۳±۱۱۸ بیشتر به تعداد زیاد میکرو کروموزومها که امکان تعیین تعداد دقیق کروموزومها را نمی‌دهد مربوط می‌شود. در این گونه تعداد بازوهای کروموزومی ۴ ± ۱۸۰ تعیین شده است. در مورد کروموزومهای آکروسانتریک، حداکثر سه تا پنج کروموزوم دقیقاً مشخص هستند و بقیه به صورت میکروکروموزوم می‌باشند (Serebryakove et al. , 1983). تعداد کروموزومهای فیل ماهی متعلق به رودخانه پو در ایتالیا ۴ ± ۱۱۶ = ۲n تعیین شده است که در آن تعداد ۶۸ کروموزوم متا، وساب متاسانتریک تشخیص داده شده است (Fontana and Colombo, 1974).

گونه اوزون برون در دریای خزر، سیاه و آزوف زندگی می‌کند. ماهیان این گونه به طور دسته جمعی مهاجرت می‌کنند و بدینصورت وارد رودخانه‌های کورا، سفیدرود، بابل‌رود، سرخ‌رود،

گرگان رود و رودتجن می‌شوند. دو نوع بهاره و پاییزه این گونه مشخص شده که نوع بهاره از فروردین تا خردادماه و نوع پاییزه از شهریورتا مهرماه وارد رودخانه‌های فوق‌الذکر می‌شوند (Holcik,1989). با توجه به مرغوبیت گوشت و خاویار این گونه، بررسی این گونه از اهمیت زیادی برخوردار است.

اطلاعات موجود در مورد کاریوتیپ این ماهی خیلی محدود و منحصر به کارهای انجام گرفته توسط آکادمی علوم شوروی سابق می‌باشد. تعداد کروموزومهای این گونه ۲ ± ۱۱۸=۲n تعیین شده که در آن تعداد ۴ ± ۷۰کروموزوم متا وساب متاسانتریک وجود دارد، و بقیه کروموزومها آکروسانتریک هستند. در بین کروموزومهای آکروسانتریک، فقط دو جفت کاملاً مشخص وجود دارد که مشخصه اصلی این گونه در مقایسه با سایر گونه‌های همردیف خاویاری است. NF برای این ماهی ۶ ± ۱۸۸ محاسبه شده و تعداد هستکهای موجود در هسته را هم‌دوتاسه‌عددمشخص کرده‌اند (Vasiliev,1985). در برآورد تعداد بازوهای کروموزومی (NF) این ماهیان، تعداد بازو در کروموزومهای تک کروماتیدی حساب شده است. ما در تحقیقات خود تعداد بازو در کروموزومهای دو کروماتیدی (کروموزومهای پلاک متافازی) را محاسبه کردیم.

گونه قره‌برون نظر به اینکه بیشتر در سواحل جنوبی دریای خزر و محدوده آبهای ایران زندگی می‌کند *Acipenser persicus* نام گرفته است. این گونه برای اولین بار توسط Borodin در سال ۱۸۹۷ به عنوان یک گونه در رودخانه اورال تعریف شد ولی Berg در سال ۱۹۳۳ آن را به صورت یک زیرگونه تحت عنوان *A. guldenstadti persicus* که در رودخانه‌های کورا و سفیدرود زندگی می‌کنند تعریف کرد. جمعیت رودخانه کورا به چهار گروه زودبهاره، دیر بهاره، زمستانه و بهاره باقیمانده از پاییز تقسیم شده است. در سفیدرود این ماهی در اردیبهشت تا اواسط خرداد و ندرتاً تا مرداد و شهریور تخمریزی می‌کند. طول این ماهی به دو متر و گاهی بیشتر می‌رسد. مقایسه مرفولوژیک و سرولوژیک بین *A. persicus* و *A.guldenstadti* در سالهای اخیر محققین را متقاعد ساخته است که *A. persicus* یک گونه مجزا و مشخص می‌باشد و رده‌بندی اولیه Borodin صحیح بود. (Holcik,1989)

بررسی کاریوتیپ (تاس ماهی روس) *A.guldenstadti* نشان می‌دهد که تعداد کروموزومهای آن ۸± ۲۵۰=۲n است که در آن تعداد ۴±۹۲ کروموزوم متاسانتریک تاساب متاسانتریک، و بقیه ساب‌تلوسانتریک یا اکروسانتریک هستند و تعداد بازوهای کروموزومی آن ۱۲ ± ۳۴۲ = NF است (Vasiliev et al. 1980). در این گونه یک دوم تا یک سوم از کروموزومها به صورت میکروکروموزوم هستند. کاریوتیپ این گونه شباهتهایی را با گونه *A.naccarii* متعلق به دریای آدریاتیک نشان می‌دهد (Fontana and Colombo, 1974).

مواد و روش کار

آزمایشات بر روی ماهیان بزرگ صید شده

توسط صیدگاههای منطقه غرب گیلان و ماهیان کوچک پرورش یافته انجام گرفت که تعداد چند قطعه از ماهیان کوچک به طور همزمان در حوضچه‌های ایستگاه تحقیقاتی ساحل غازیان و حوضچه فایبرگلاس انتقال یافته به آزمایشگاه سیتوژنتیک گروه زیست‌شناسی دانشگاه تبریز نگهداری شدند. قبل از خونگیری، ابتدا ماهیان مورد آزمایش را با ماده MS 222 بیهوش کرده (۰/۵ گرم در ۲۰ لیتر آب) و به وسیله یک سرنگ پنج‌میلی‌لیتری حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر هپارین سدیم استریل، مقدار ۳ تا ۴ میلی‌لیتر خون از رگ ساقه‌دمی ماهی تهیه و سرنگ حاوی خون در محیط آزمایشگاه قرار گرفت (سوزن سرنگ به طرف بالا). بعد از جدا شدن مقدار کافی پلاسما، مقدار ۱۰ تا ۲۰ قطره از پلاسمای حاوی گلبولهای سفید خون را به محیط کشت کیت کروموزومی difco (در صورت استفاده از کیت) و یا به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MEM با ترکیب ۷ میلی‌لیتر محیط کشت پایه MEM (sigma) + ۳ میلی‌لیتر سرم گوساله جنینی (sigma) + ۰/۳ میلی‌گرم لیپوپلی‌ساکارید استخراج شده از باکتری اشریشیا کولی (sigma) + ۰/۱ میلی‌لیتر پنی‌سیلین پتاسیم G iu/ml ۱۰۰۰۰ + ۰/۱ میلی‌لیتر استرپتومایسین ug/ml (۱۰۰۰۰) وارد، و در مورد ماهی قره‌برون به جای محیط کشت پایه MEM از محیط کشت پایه ۱۹۹ (طبق فرمول فوق‌الذکر) استفاده گردید.

پس از ۵ تا ٦ روز انکوباسیون در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، به هر یک از محیطهای کشت حاوی سلولهای خون، مقدار یک میلی‌لیتر کلشی‌سین difco (در صورت استفاده از کیت) و یا یک میلی‌لیتر کلشی‌سین sigma (با غلظت mg/ml ۰/۰۰۵) اضافه گردید و پس از گذشت ۵ ساعت محیطهای کشت حاوی گلبولهای سفید خون به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۱۰۰۰، سانتریفوژ گردید تا گلبولهای سفید جدا شوند. بعد از دوبار شستشوی سلولها در تامپون هنک، یاخته‌های جدا شده به مدت ۵۰ دقیقه در محلول کلرورپتاسیم ۰/۰۷۵ مول تیمار هیپوتونیک قرار داده شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۹۰۰ rpm، سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ کردن، مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب باقیمانده مقدار ۴ میلی‌لیتر محلول ثابت کننده تازه و سرد شده اسید الکل (۳ قسمت متانول خالص + یک قسمت اسید استیک خالص) اضافه گردید و پس از به هم زدن یاخته‌ها در محلول ثابت کننده، این مجموعه در دور rpm ۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ، و عمل ثابت کردن سلولها بار دیگر تکرار گردید. بعد از سانتریفوژ دوم، ۳ml محلول ثابت کننده، دور ریخته شد، سپس رسوب و محلول ثابت کننده به وسیله یک پیپت پاستور چند بار به هم زده شد تا سوسپانسیون سلولی کامل به دست آید. سوسپانسیون سلولی به دست آمده بر روی تعدادی لام تمیز که قبلاً سرد شده بود، از فاصله تقریباً یک متری پرتاب گردید (بر روی هر لام ۲ تا ۳ قطره) و لامهای تهیه شده در شرایط آزمایشگاهی خشک و با محلول گیمسای کیت (در صورت استفاده از کیت) و یا محلول گیمسای پنج درصد MERK به مدت سی دقیقه رنگ آمیزی گردید. لامهای رنگ آمیزی شده پس از گذشت

جدول ۱- فراوانی کروموزومها در فیل ماهی

تعداد کروموزوم در پلاک متافازی	۱۰۵	۱۱۰	۱۱۲	۱۱۴	۱۱۵	۱۱۶	۱۱۷	۱۱۸
تعداد پلاکهای متافازی	۱	۴	۸	۱۴	۱	۱۰	۱	۱۱

جدول ۲- فراوانی کروموزومها در ماهی ازون برون *Acipenser stellatus*

تعداد کروموزوم در پلاک متافازی	۱۰۷	۱۱۰	۱۱۲	۱۱۴	۱۱۶	۱۱۷	۱۱۸
تعداد پلاکهای متافازی	۱	۸	۱۰	۱۲	۱۳	۱	۵

مدت فوق‌الذکر با آب مقطر شستشو و در شرایط آزمایشگاه خشک گردید. بعد از گذشت بیست و چهارساعت پلاکهای متافازی به دست آمده مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

بررسی پلاکهای متافازی ماهیان خاویاری مورد آزمایش نتایج زیر را به دنبال داشت:

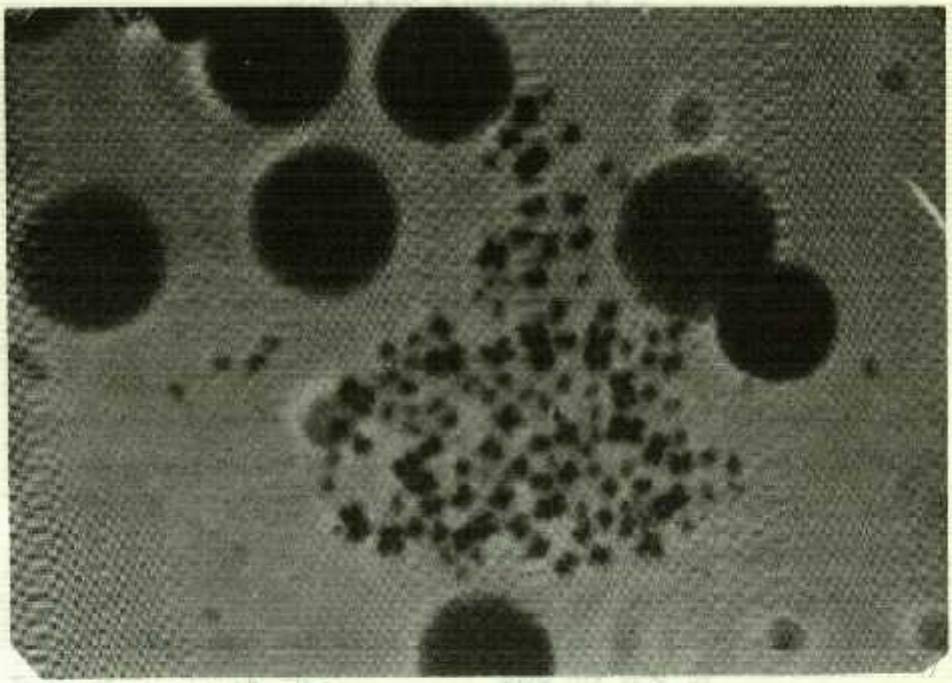
برای گونه *Huso huso* (فیل ماهی) در پنجاه پلاکت متافازی خوب پخش شده توزیعی مطابق جدول ۱ وجود داشت.

تعداد کروموزومها در این گونه با توجه به جدول (۱) ۲n = ۱۱۵ ± ۱ محاسبه گردید. این نتایج با نتایج کسب شده توسط Serebryokove یعنی ۲n=۱۱۸±۴ مطابقت زیادی ندارد ولی با نتایج Fontana,Colobmo یعنی ۲n=۱۱۶±۴ شباهتهایی را نشان می‌دهد. بازوهای کروموزومی برای کاریوتیپ تهیه شده با ۲n=۱۱۶ برابر با NF=۳۵۶ (شکل ۱)

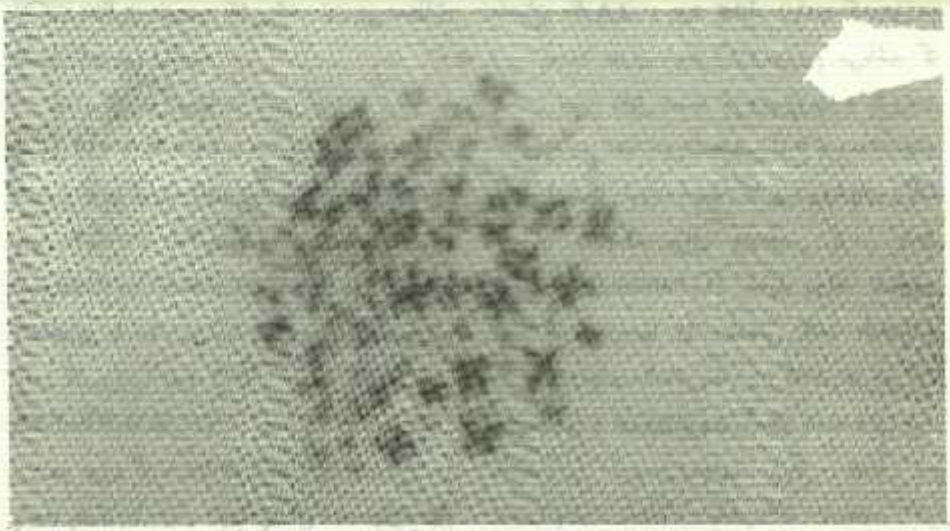
در مورد گونه *A.stellatus* (اوزون‌برون) در پنجاه پلاک متافازی خوب پخش شده توزیع زیر به دست آمد:

تعداد کروموزومها در این گونه با توجه به جدول (۲) ۲n = ۱۱۴ ± ۱ محاسبه گردید که این نتایج با نتایج به دست آمده توسط Vasliev یعنی ۲n=۱۱۸±۳ مطابقت چندانی ندارد. در مطالعات ما پلاکهای متافازی بالاتر از ۲n=۱۱۸ به دست نیامد. تعداد بازوهای کروموزومی برای کاریوتیپ تهیه شده با ۲n=۱۱۸ برابر با NF=۳۷۲ . (شکل ۲)

مشکل اصلی در مورد مطالعات کروموزومی ماهیان خاویاری وجود تعداد زیادی کروموزوم ریز تحت عنوان میکروکروموزوم می‌باشد که امکان تعیین دقیق تعداد کروموزومها و بازوهای کروموزومی، همچنین تشخیص نوع کروموزومهای آنها را مشکل نموده است. کاربرد روشهای رنگ آمیزی باندینگ برای مشخص کردن محل سانترومر (C-banding) شاید بتواند تشخیص نوع کروموزومها را ساده‌تر کند. طبقه‌بندی کروموزومهای متاسانتریک بزرگ در هر دو گونه فیل ماهی و اوزون برون آسان است ولی برای طبقه‌بندی کروموزومهای دیگر حتماً باید ازروشهای مختلف باندینگ استفاده کرد (G-banding).



شکل ۱- گسترش کروموزومی فیل ماهی



شکل ۲- گسترش کروموزومی ماهی ازون برون

مقایسه کاریوتیپ و پلاکهای متافازی به دست آمده از دوگونه *Huso huso* و *Acipenser stellatus* که با روشهای معمولی ذکر شده رنگ‌آمیزی شده‌اند، دو مشخصه اصلی را نشان می‌دهد:

۱- دربزرگنمایی یکسان،اندازه کروموزومهای فیل ماهی از کروموزومهای اوزون‌برون بزرگتر است. این مسئله در مورد کروموزومهای بزرگ متاسانتریک کاملاً واضح است. اولین کروموزوم بزرگ فیل ماهی از اولین کروموزوم بزرگ اوزون برون بزرگتر است، و این مسئله برای بقیه کروموزومها نیز صادق است.

۲- ساختار کلی کروموزومها در پلاکهای متافازی نیز تفاوتهایی را نشان می‌دهد به طوری که در فیل ماهی بازوهای کروموزومی چندان از هم فاصله نگرفته‌اند یعنی حالت کاملاً X شکل ندارند در صورتی که حالتهای X (بازوهای از هم دور شده) در پلاکهای متافازی‌اوزون‌برون زیاد به چشم می‌خورد.

طی یک بررسی کلی، در پلاکهای متافازی و کاریوتیپ اوزون‌برون، کروموزومهای اکروسا- تریک مشخص‌تری نسبت به فیل ماهی به چشم می‌خورد.

در مورد کاریوتیپ ماهی قره‌برون هیچ اطلاعی در دست نیست و به نظر می‌رسد که تا به امروز تهیه نشده است. با توجه به اینکه سطح اریتروسیتها در ماهیان تراپلوئید ۱/۵ تا ۱/۶ بار بیش از ماهیان دیپلوئید می‌باشد (Fontana 1976, Vasilev, and Vasilev 1982) و از آنجائیکه سطح اریتروسیتها در گونه قره‌برون ۱/۵۲ بـــار بیش از سطح اریتروسیتهای ماهی اوزون برون (گونه دیپلوئید) می‌باشد بنابراین گمان می‌رود تعداد کروموزومهای این گونه بیش از ۲۴۰ عدد باشد (Holcik, 1989). گسترشهای کروموزومی تهیه شده در این بررسی ظاهراً موید این حدس و گمان می‌باشد.

متأسفانه در پلاکهای متافازی تهیه شده از این گونه، به علت زیاد بودن تعداد کروموزومها، کروموزومها دارای گسترش و پراکندگی مناسب برای تهیه کاریوتیپ نبودند. در مورد آداپته‌کردن گلبولهای سفید خون این گونه، به محیطهای کشت، و به دست آوردن تکنیک مناسب هیپوتونیزه کردن (به دست آوردن زمان و مولاریته مناسب)، نیاز به صرف وقت بیشتری است تا شاید بتوان ساختار کروموزومی آن را به دست آورد. این احتمال وجود دارد که این گونه از آمیزشهای بین گونه‌ای، و یا با افزایش کلی یا جزئی تعداد کروموزومها حاصل شده باشد.

در زمینه کروموزومهای جنسی گونه‌های مورد بررسی هیچ منبعی به دست نیامد، و مکاتبات انجام شـــده با چندین مرجع علمی خارج از کشور نشان می‌دهد که در این زمینه در هیچ کشوری کاری صورت نگرفته است و این امر شاید به علت بالا بودن تعداد کروموزومها، و وجود تعداد زیادی میکروکروموزوم باشد. در ضمن با توجه به وضعیت و درجه تکاملی ماهیان خاویاری، به احتمال زیاد هنوز کروموزوم کاملاً تمایز یافته‌ای تحت عنوان کروموزوم جنسی در این ماهیان شناخته نشده است.

آرشیو علمی و دفتر مطالعات
شماره طبقه‌بندی:

با توجه به امکانات زمانی و تجهیزاتی موجود در طی پروژه، امکان انجام کار زیادی در این زمینه وجود نداشت.

پیشنهادات

بالا بودن تعداد کروموزومها وبخصوص وجود تعداد زیادی میکروکروموزوم در ماهیان خاویاری، امکان تشخیص کروموزوم جنسی، و تعیین جنسیت در ماهیان نابالغ را مشکل می‌سازد. کاربرد روشهای جدید بیولوژی مولکولی در زمینه دو رگ گیری DNA به روش insitu (در صورت مشخص بودن یک ژن وابسته به جنس در ماهی خاویاری مورد نظر، و یا حتی در ماهیان دیگر که دارای کروموزوم جنسی مشخصی هستند) شاید بتواند گره‌گشای تشخیص کروموزوم جنسی و یا کروموزوم جنسی در حال تمایز در این ماهیان باشد. استفاده از نرم‌افزارهای کامپیوتری مخصوص طبقه‌بندی کروموزومها می‌تواند وسیله‌ای مناسب، دقیق و سریع برای تشخیص کروموزومهای همولوگ، و احیاناً کروموزومهای جنسی باشد. استفاده از این نرم‌افزارها معمولاً توصیه می‌شود.

اختصاصی بودن ماهی قره‌برون به سواحل جنوبی دریای خزر و کسب مهارتهای لازم در زمینه بررسیهای سیتوژنتیک این ماهی، سرمایه‌گذاری برای مشخص کردن تعداد و وضعیت کروموزومهای این گونه، می‌تواند توفیق بزرگی در سطح بین‌المللی باشد، زیرا تا به امروز تعداد کروموزومها و کاریوتیپ این گونه کاملاً ناشناخته باقی مانده است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات و مساعدتهای کلیه افرادی که در انجام این پروژه ما را یاری نموده‌اند، از جمله: ریاست محترم مرکز تحقیقات شیلات گیلان، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز، سرپرست محترم بخش زیست‌شناسی مرکز تحقیقات شیلات گیلان، سرپرست محترم ایستگاه تحقیقاتی ساحل غازیان و برادر محمود آقامعالی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

وثوقی، غ. و ب. مستجیر، ۱۳۷۱. ماهیان آب شیرین - دامپزشکی تهران. دانشکده

بریمانی، ا. ۱۳۴۵. ماهی شناسی و شیلات - دانشگاه تهران

Al-Sabti, K. , B. Kurelec, and N. Fijian, 1983. A simple and fast technique for the chromosome preparation in the fish. Vet. Arch. 54,83-89.

Al-Sabti, K,, 1983. Chromosomal studies by blood leukocyte culture techniques on three salmonids from Yugoslavian waters. J. F. Biol. 1985. 26, 5-12.

Amemiya, C. T., Bichham, J.W Gold, J. R. 1984. A cell culture technique for chromosome preparation in Cyprinid . Copeia 1984, fishes. 232-235.

Baksi, S.M. and J.C. Means, 1988. early Preparation of chromosomes from stages of fish for cytogenetic analysis. J. Fish Biol 32, 321-325.

Blaxhall, P.C 1983a. Factors affecting lymphocyte culture for chromosome studies. J. Fish Biol. 22, 61-96.

Chen. T.R. and A. W. Ebeling 1975. Karyotypes from short and long-

term cultrues of hybrid killfish and platyfish tissues. Copeia, 178-181.

Denton, T. E. 1973. Fish chromosome methodology. Springfield, Illinois, C.C. Thomas.

Etlinger, H. M., H. O. Hodgins and J. M. Chiller, 1976. Rainbow trout leucocyte culture a simplified method. In vitro 12, 599-601.

Fan. Z., and P. Fox. 1990: A new method for fish chromosome preparation, J. Fish Biol. 37, 353-361.

Fontana, F. and G. Colombo, 1974: The chromosomes of Italian sturgeons eperienta, 30: 739-742.

Fredga, K. 1977. Chromosomal changes in vertebrate evolution, Proc. R Soc Lone B. 199, 377-397.

Grammeltvedt, A. F. 1974. A method of obtaining chromosome preparaion from rainbow trout *(Salmo gairdneri)* by leucocyte culture. Norw. J. Zool. 22, 129-134.

Grammeltvedt, A. F. 1975. Chromosomes of salmon *(Salmo salar)* by leucocyte culture. Aquacultrue 5, 205-209.

Hartley, S.E and M.T. Horne 1983. A method for obtaining mitotis figures from blood leucoctye culture of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish Biol. 1983. 22, 77-82.

Hartley, S. E. and M.T. Horne 1985. Cytogenetic techniques in fish genetics. J. fish Biol. 26, 575-582.

Heckman, J. R., and P. E. Brubaker 1970. Chromosome preparation from fish blood leucocytes. Progve Fish Cult 32, 206-247.

Kang, K. Y. and E. H. Park, 1975. Leucocyte culture of the eel without autologous serum. Jap. J. Genet. 50, 159-161.

Kingerman, A. D. and S. E. Bloom, 1977. Rapid chromosome preparation from Sloid tissue of fish. J. fish, Res. Br. Can 34, 266-269.

Nowell, P. C. 1960. phytohaemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human lymphocytes. Cancer Res. 20, 426-468.

Ojima, Y. S. Hitotsumachi, and M. Hayashi. 1970. A blood culture method for fish chromosome, Jap. J. Genet 45, 161-162.

Paul, J. 1975. Cell and tissue culture, 5th ed. london: Churchill, Livingstone.

Serebryakova, E. V. V.A. Arefev, V.P. Vasilev, and Sokolov, 1983: Izuchenie Kariotipa belugi Huso huso (L.) (Acipenseridae, chondrostei) vsvyazisee sistematicheskim polozheniem. In: Genetika Promyslovykh ryb i obektov akvakultury. Izd. legkaya i pishchevaya pishchevaya promyshlennost, Moskva. PP. 63-69.

Sharma, A. K. and A. Sharma 1972. Chromosome techniques: theory and practice, 2nd ed. London University Park Press, Baltimore, Butter Worths.

Dtermining karyotype of sturgeons

Mohammad Reza Noruz Fashkhami

Guilan Fisheries Research Centre, Bandar Anzali, I. F. R. T. O

Abstract

Karyotype of sturgeons *Huso huso, Acipenser stellatus,* and *Acipenser persicus* from southern region of the Caspian Sea, has been examined by use of blood tissue culture.

By counting fifty completely extended metaphase plates, the number of chromosomes in *Huso huso,* and *Acipenser stellatus,* were determined to be 2n=115 ± 1 , NF = 356, and 2n = 114 ± 1 , NF = 372 , respectively. Obtaining sufficient number of suitable chromosome extensions for *Acipenser persicus* was not passible, therefore its chromosomal number and karyotype were not determined. More research is required for this species. According to the basic estimations, it is presumed that the chromosomal number of this species is more than 2n = 250. The karyotype and chromosomal number of this species have not been determined.