

मात्स्यगंधा

2003



मात्स्यिकी और जीविकोपार्जन



केंद्रीय समुद्री मात्स्यिकी अनुसंधान संस्थान
(भारतीय कृषि अनुसंधान परिषद)
कोचीन - 682018



संरक्षण हेतु मत्स्य युग्मकों का हिमपरिरक्षण

ए. गोपालकृष्णन, वी.एस. बशीर, कुलदीप कु. लाल, डी. कपूर एवं ललित कु. त्यागी
राष्ट्रीय मत्स्य आनुवंशिक संसाधन ब्यूरो, लखनऊ, उ. प्रदेश

भविष्य में विवेकपूर्ण उपयोग हेतु जलीय निकायों के पारिस्थितिकीय तंत्र (ecosystem) का संरक्षण आवश्यक है। इनमें से कुछ ही अपनी पूर्व स्थिति में बचे हैं। विश्व के अनेक भागों में लाभभोगियों तथा उपयोग-अभिकरणों में, विभिन्न पारिस्थितिकीय तंत्रों को बचाने तथा संरक्षित करने के बारे में जागरूकता बढ़ रही है। अतः हमारे देश में भी प्राकृतिक संसाधनों के संरक्षण की अति आवश्यकता है।

यू.एन.ई.पी. (1980) द्वारा कल्पित तथा प्रस्तावित आनुवंशिक संसाधन संरक्षण में दो प्रमुख आवश्यकताएं शामिल हैं:

इन सीटू (यथावत्) संरक्षण

आनुवंशिक संसाधनों का प्राकृतिक अथवा मानव - निर्मित पारिस्थितिकीय तंत्रों में अनुरक्षण द्वारा संरक्षण, जिनमें कि वे संसाधन पाए जाते हैं।

एक्स सीटू (बाह्य) संरक्षण

संसाधनों का उनके वास स्थलों के बाहर या तो आनुवंशिक संसाधन केन्द्रों में नमूना जनसंख्या कायम रखके अथवा उनके युग्मकों (gametes) के जीन पूल या जनन द्रव्य बैंकों के रूप में।

जीव मात्रा संरक्षण अवधारणा

यथावत् तथा एक्स सीटू संरक्षण के अलावा, एक नई पद्धति बायोमास संरक्षण अवधारणा है। इसका आशय है यथावत्

पत्रव्यवहार : डॉ. ए. गोपालकृष्णन, प्रभारी वैज्ञानिक, नैशनल फिश जेनेटिक्स रिसोर्सस ब्यूरो ओफ, कोचीन यूनिट, सी एम एफ आर आइ काम्पस, कोचीन-682018

संरक्षण में वास स्थलों के बड़े भागों का सम्पूर्ण परिरक्षण करना, जो कि जातियों के विलुप्त होने की दर को धीमा करेगा।

मत्स्य युग्मकों का हिम परिरक्षण

मत्स्य युग्मकों का सफलतापूर्वक हिमीकरण तथा उनको बिना ह्रास के लम्बी अवधि तक भंडारित करना, जलकृषि के सुधार हेतु बहुत महत्वपूर्ण होगा। यह, चयनित प्रजनन करने हेतु आनुवंशिक पदार्थ आरक्षित क्षेत्र स्थापित करने, संकटग्रस्त जातियों का बचाव करने, आनुवंशिक पदार्थ का समय-स्वतंत्र वितरण करने, वांछनीय स्टाकों का क्रास प्रजनन करने तथा वर्तमान प्रेरित प्रजनन तकनीकी को सुधारने का अवसर प्रदान करता है।

जलीय जन्तुओं के अण्डों तथा भ्रूणों के लम्बे समय तक भण्डारण में अभी थोड़ी ही सफलता मिली है किन्तु इस दिशा में हो रहे नए वैज्ञानिक विकास के परिप्रेक्ष्य में यह असम्भव नहीं होना चाहिए। बहुत सी टेलिओस्ट मछलियों के शुकाणु परिरक्षण की तकनीक विकसित की जा चुकी है जिसे कि दूसरी जातियों हेतु संशोधित करने की आवश्यकता है।

हिमपरिरक्षण के सिद्धांत

हिमपरिरक्षण के आधारभूत सिद्धांतों की, सामान्य हिम परिरक्षण प्रक्रिया की विभिन्न स्थितियों पर, निम्न प्रकार व्याख्या की गई है:

हिमीकरण

जब कोशिकाओं को जलीय घोल में ठंडा किया जाता है, कोशिकाएं तथा घोल दोनों ही कुछ हद तक अति ठंडे हो जाते हैं, सामान्यतः तब हैट्रोजीनस न्यूक्लीएशन (heterogenous nucleation) बाह्यकोशिकीय घोल में होता है। यदि यह अंतराकोशिकीय (interacellularly) होता है तो परिणामी



केन्द्रक (nuclei) दूसरी अहिमीकृत कोशिकाओं से प्लाज्मा झिल्ली द्वारा अलग होगा। जैसे-जैसे पानी हिमीकृत होता जाता है, वाह्यकोशिकीय घोल उत्तरोत्तर अधिक गाढ़ा होता जाता है। यदि ठंडा होने की दर कम है तो कोशिकाओं को गाढ़ा होते वाह्यकोशिकीय घोल के साथ ओसमोटिक संतुलन में रहने हेतु पर्याप्त पानी छोड़ने का पर्याप्त समय रहता है, किन्तु गाढ़े घोल की लम्बी अवधि तक प्रभावन सामान्यतः घातक होता है। यदि ठंडा होने की दर अधिक है तो पानी के कोशिकाओं से हिम कणों की ओर विसरित होने के लिए समय कम होता है। ऐसी स्थिति में कोशिकाएं, होमोजीनस अथवा हैट्रोजीनस न्यूक्लीएशन द्वारा शुरू की गई अन्तःकोशिकीय हिमीकरण द्वारा संतुलित अवस्था प्राप्त की होगी। अन्तःकोशिकीय हिमीकरण को घातक माना जाता है। इनके अलावा एक संतुलित स्थिति भी हो सकती है जिसमें कि कोशिकाएं जीवित रह सकती हैं जबकि ठंडा होने की दर इतनी अधिक हो कि गाढ़े घोल के प्रभावन का समय कम हो सके किन्तु फिर भी इतनी कम हो कि अन्तःकोशिकीय हिम की मात्रा को घातक स्तर से कम रखा जा सके। कुछ रसायन इस संतुलन को बढ़ा सकते हैं तथा इस प्रकार कोशिकाओं का उत्तरजीवन बढ़ सकता है। इन रसायनों को हिम परिरक्षक (Cryoprotectants) कहा जाता है।

पिघलना

पिघलने की क्रिया के दौरान पुनक्रिस्टलन होता है जिससे घातक अन्तःकोशिकीय हिम बनता है। पुनक्रिस्टलन की दर को कम करने के लिए सामान्यतः एक उच्च तापन दर (high warming rate) का प्रयोग किया जाता है। जब पिघलने की क्रिया तेज होती है तो निर्जलित कोशिकाओं (dehydrated cells) द्वारा हिमीकरण के दौरान नष्ट हुए पानी को सोखने हेतु समय अपर्याप्त होता है। अधिकांश तथा ऊतक तेज पिघलने की क्रिया के प्रति सहनशील होते हैं किन्तु स्तनधारी भ्रूण एक अपवाद है।

भण्डारण

भण्डारण का तापमान - 130° से. कम होना चाहिए तथा सामान्यतः प्रयोग होने वाला भण्डारण तापमान - 196° से. है (जो कि द्रवित नाइट्रोजन का तापमान है) इन निम्न तापमानों

पर सभी जैविक अणु गतिरहित हो जाते हैं अतः किसी जैव रासायनिक प्रक्रिया में भाग नहीं ले सकते। सैद्धान्तिक रूप से जैविक पदार्थ को इस हिमीकृत अवस्था में अनिश्चित समय तक रखा जा सकता है।

हिमपरिरक्षण

जल-घुलनशीलता तथा निम्न विषाक्तता, हिमपरिरक्षकों की दो सबसे महत्वपूर्ण विशेषताएं हैं। हिमीकरण के दौरान जल की भौतिक एवं रासायनिक विशेषताएं परिवर्तित करने के लिए, हिम परिरक्षक अत्यधिक जल घुलनशील होना चाहिए। इनकी विषाक्तता, यदि हो तो, इनकी रक्षण क्षमता से कम होनी चाहिए अन्यथा ये रक्षा की बजाय नुकसान करेंगे। हिमपरिरक्षक अधिकांश हिम क्षति को दबा सकते हैं किन्तु अधिक गाढ़ी अवस्था में प्रयोग करने पर, इनमें से अधिकतर, जैविक पदार्थ विषाक्त हो जाते हैं। परिरक्षकों को दो समूहों में बांटा जा सकता है:

हिमपरिरक्षक

(1) फैलने वाले परिरक्षक

फैलने वाले परिरक्षक (1) कोशिका से हिमकण की ओर पानी के विसरण की गति को कम करते हैं, (2) कोशिका आयतन परिवर्तन / लवण गाढ़ापन कम करते हैं, (3) होमोजीनस न्यूक्लीएशन तापमान कम करते हैं, (4) हिमकण की वृद्धि दर कम करते हैं, तथा (5) ग्लास ट्रांसफारमेशन तापमान बढ़ाते हैं। परिरक्षक का चुनाव सामान्यतः कोशिका के लिए इनकी पारगम्यता तथा विषाक्तता एवं हिमीकरण के दौरान जल-घुलनशीलता के आधार पर होता है।

सामान्यतः प्रयोग किए जाने वाले फैलने वाले हिमपरिरक्षक हैं: डी.एम.एस.ओ., ग्लिसरौल, मिथेनौल, तथा 1, 2-प्रोपेनिडिओ। इनमें से ग्लिसरौल सबसे कम विषाक्त है किन्तु कोशिका झिल्ली हेतु सबसे कम पारगम्य भी। इसलिए ग्लिसरौल ओसमोलैलिटी से इक्यूलिब्रेट होने में अधिक समय लगता है।

(2) न फैलने वाले हिम परिरक्षक

ये परिरक्षक हैं- शर्कराएं (sugars) पालीमर्स तथा प्रोटीन। ये यौगिक क्योंकि कोशिकाओं में दाखिल नहीं होते, इसलिए ये किसी अनुबद्ध बचाव को बढ़ाने में सक्षम नहीं होने चाहिए।



इनकी हिमपरिरक्षण क्षमता, प्रायः एक फैलने वाले हिमपरिरक्षक के साथ में, हिमीकरण बिन्दु को दबाने तथा बाह्यकोशिकीय घोल का ग्लास ट्रांसफारमेशन तापमान बढ़ाने, में इनकी क्षमता से संबंधित होती है।

(3) हिमपरिरक्षक विषाक्तता

मिल्ट (milt) का हिम परिरक्षण

मिल्ट को सूखी हुई परखनलियों में, मूत्र अथवा मल से संक्रमित हुए बिना निकालना चाहिए। मछली के शुक्राणु जीवित निकल आते हैं किन्तु वे निष्क्रिय रहते हैं। ऐसा मिल्ट द्रव्य में पोटेशियम आयनों की अधिक सान्द्रता होने (concentration) के कारण होता है। जैसे ही ये शुक्राणु पानी अथवा किसी अन्य अधिक पी.एच. (8 से अधिक) वाले घोल के सम्पर्क में आते हैं, वे सक्रिय हो जाते हैं तथा यह सक्रियता कुछ सैकन्डों से कुछ मिनटों तक रहती है जो कि प्रजाति तथा ओसमोटिक साक (Osmotic shock) एवं मृत्यु पर निर्भर करती है। ऐसे शुक्राणुओं को जो कि पहले से ही सक्रिय हैं, परिरक्षित करने का कोई लाभ नहीं है क्योंकि हिमीकरण-पिघलने की प्रक्रिया के दौरान इनकी सक्रियता नष्ट हो जाती है। इसलिए हिमीकरण से पहले मिल्ट को किसी एक्सटेंडर घोल से पतला करना आवश्यक होता है। एक्सटेंडर घोल, एक उचित पी.एच. (प्रायः 7.0 से 7.5 तक) मान पर लवणों का मिश्रण होता है जो हिमीकरण के दौरान शुक्राणुओं को सक्रिय किए बिना उनकी जीवनक्षमता बनाए रखने में मदद करता है। एक हिम परिरक्षक युक्त एक्सटेंडर घोल द्वारा हिमीकरण प्रक्रिया के दौरान इलेक्ट्रोलाइट्स (electrolytes) बंधे रहते हैं और इस प्रकार ये घातक घोल बनने से बच जाते हैं। इनसे बाह्यकोशिकीय द्रव्यों का हिमीकरण बिन्दु भी कम हो जाता है।

ग्लिसरौल, इथायलीन ग्लायकोल तथा प्रोपायलीन ग्लायकोल का प्रयोग मछली के शुक्राणुओं को हिमपरिरक्षित करने में किया जा चुका है किन्तु सबसे अधिक प्रभावशाली डी.एम.एस.ओ. है। हिमीकरण तथा पिघलने की प्रक्रिया की दर को प्रत्येक प्रजाति के लिए अलग रूप से प्रतिस्थापित (establish) करने की आवश्यकता है। सामान्यतः हिमीकरण की 30-160° से. प्रति मिनट की दर सफल रही है। पिघलने की प्रक्रिया सामान्यतः,

हिमीकृत मिल्ट को सीधे अण्डों पर डालकर की जाती है।

समुद्री मछलियों के मिल्ट हिमपरिरक्षण की विधि

समुद्री मछलियों के मिल्ट हिमपरिरक्षण हेतु विकसित की गई निम्नलिखित विधि को संशोधनों के साथ दूसरी प्रजातियों हेतु प्रयोग किया जा सकता है:

(1) ताजे निकाले गए मिल्ट को 1:3 के अनुपात में एक्सटेंडर हिमपरिरक्षक घोल के साथ, जो कि मिल्ट के समान तापमान पर ही रखा होता है, मिलाया जाता है।

(2) एक्स्टेन्डिड मिल्ट के 200 मि.ली. एलिक्यूओट्स (aliquots) को ठोस कार्बनडाई आक्साइड (solid CO₂) के एक ब्लाक पर हिमीकृत किया जाता है। कार्बनडाईआक्साइड ब्लाक की ऊपरी सतह पर 0.5 से.मी. व्यास का एक छेद किया जाता है। एक रिपीटर पिपेट का प्रयोग करते हुए 200 म्यू एल (μL) मिल्ट मिश्रण इमसें भरा जाता है। हिमीकृत पैलेट्स को हिमीकरण वायल में द्रव्य नाइट्रोजन के अन्दर हिमीकृत किया जाता है।

(3) एक वैकल्पिक विधि भी है जिसमें केवल द्रव नाइट्रोजन का ही प्रयोग किया जाता है। इसमें प्लास्टिक ट्यूब के मिनी स्ट्राज को 250 म्यू एल (μL) या 500 म्यू एल (μL) एक्सेटेंडिड मिल्ट के एलिक्यूओट्स से भरा जाता है। स्ट्राज के सिरे बन्द करके द्रव्य नाइट्रोजन में हिमीकृत किए जाते हैं। मिल्ट के स्ट्राज को पतली धातु की ट्रे, जिसे पौलीस्टायरीन फ्लोएट द्वारा द्रव्य नाइट्रोजन की सतह से 4 से.मी. ऊपर रखा जाता है, पर रखकर ठण्डा करने की एक अनुमानित दर प्राप्त की जाती है। इसके लिए द्रव्य नाइट्रोजन को एक पौलीस्टायरीन इग्लू वाक्स में रखा जाता है। दस मिनट बाद स्ट्रा द्रव नाइट्रोजन में भीग जाता है तत्पश्चात आवश्यकता पड़ने तक भंडारित कर दिया जाता है।

(4) हिमीकृत मिल्ट को द्रव नाइट्रोजन में लम्बे समय तक भण्डारित किया जा सकता है क्योंकि क्षति की दर नगण्य होती है।

(5) निषेचन के सबसे अच्छे परिणाम, हिमीकृत मिल्ट के तेजी से पिघलने से प्राप्त होते हैं। मिल्ट के 5 पैलेट्स



समुद्रीजल की 5 मि.ली. मात्रा में मिला दिए जाते हैं तथा कुछ सैकेन्डस के लिए हिलाते हैं ताकि वे लुग्दी बन जाएं फिर उनको तुरन्त ही निषेचन हेतु अण्डों के साथ मिला दिया जाता है। वैकल्पिक रूप से दो स्ट्रा एक वाटर बाथ में 40° से. पर 5 सैकन्डस के लिए पिघलाए जाते हैं, उनके सिरे काट दिए जाते हैं तथा इनकी सामग्री 5 मि.ली. समुद्री जल के साथ अण्डों पर डाल दी जाती है। मिल्ट की ये मात्राएं 500 से 1000 अण्डों को निषेचित करने के लिए पर्याप्त हैं।

एक्सटेंडर घोल

समुद्री मछलियों के मिल्ट हेतु एक्सटेंडर घोल निम्नलिखित अवयवों का एक मिश्रण होता है:

| | |
|----------------------|------------|
| डिस्टिल्ड पानी | 100 मि.ली. |
| सुक्रोज | 4.28 ग्राम |
| KHCO ₃ | 1.00 ग्राम |
| रिड्यूज्ड ग्लूटेथिआन | 0.20 ग्राम |

इस घोल के 7 भागों का एक भाग डी.एम.एस.ओ. में मिलाया जाता है।

ऐसे कारक, जिनमें मीठाजल मछलियों तथा अन्य प्रजातियों हेतु संशोधनों की आवश्यकता होती है, वह है एक्सटेंडर संघटन, वीर्य तनुकरण का स्तर, हिमीकरण तथा पिघलने की दरें, प्रति अण्डे आवश्यक शुक्राणुओं की संख्या तथा निषेचन के दौरान मिल्ट का तनुकरण।

मुख्य शब्द - Keywords

मत्स्य युग्मक - fish gametes
हिमपरिरक्षण - cryopreservation
यथावत संरक्षण - in situ preservation
बाह्य संरक्षण - ex situ preservation
अस्थिमीन - teleost fishes
जीन पूल - gene pool
क्रिस्टलन - crystallisation
निर्जलित कोशिका - dehydrated cell
फैलनेवाले हिम परिरक्षक - permeating cryoprotectant
ठोस कार्बनडाइआक्साइड - solid CO₂
द्रव नाइट्रोजन - liquid nitrogen
पारिस्थितिकीय तंत्र - ecosystem
जीव मात्रा - biomass
हिमीकरण - freezing
पिघलना - thawing
हिमपरिरक्षक - cryoprotectant
विषाक्तता - toxicity
घोल - solution

