

مقایسه روند تکامل تخمدان ماهیان تمام ماده دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلاهی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* در طول سال دوم پرورش

ایمان سوری نژاد¹، محمدرضا کلباسی^{1*}، صابر خداینده² و مسعود رضایی¹

¹ نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات

² نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی، گروه زیست شناسی دریا

تاریخ پذیرش: 87/8/15

تاریخ دریافت: 86/7/22

چکیده

تولید و پرورش جمعیت‌های تمام ماده تریپلوئید از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در صنعت آبی‌پروری اهمیت زیادی دارد. کاهش یا توقف روند تکامل تخمدان جمعیت ماهیان تمام ماده تریپلوئید باعث افزایش رشد و کیفیت گوشت آنها می‌گردد. به همین دلیل در تحقیق حاضر روند تکامل تخمدان ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان در سال دوم پرورش در مقایسه با جمعیت تمام ماده دیپلوئید با روش بافت‌شناسی کلاسیک مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی یکساله در طی 6 مرحله نمونه برداری نشان داد که تکامل سلولهای جنسی در تخمدان ماهیان تریپلوئید حداکثر تا زیر مرحله 2a توسعه یافت و سپس تا پایان دوره بررسی در همین مرحله متوقف ماند؛ در حالی که تخمدان ماهیان دیپلوئید روند تکامل طبیعی خود را طی نموده و تا پایان دوره بررسی تا مرحله 4b و 5 توسعه یافت. در نتیجه گیری کلی می‌توان بیان نمود القای تریپلوئیدی بر روی جمعیت‌های تمام ماده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان، باعث توقف قابل توجه روند تکامل تخمدان در این ماهیان و به تبع این امر افزایش رشد پیکری در مقایسه با جمعیت مشابه دیپلوئید می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: تکامل تخمدان، بافت شناسی، تمام ماده، القای تریپلوئیدی، قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 09112204336، پست الکترونیک: kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

آورد که رغبت ماهی به تغذیه و بازده تبدیل غذا را در لوله گوارش کاهش داده و ماهی لاغر می‌شود (6). بر همین اساس، محققان سعی نموده‌اند به روشهای مختلف موجبات تأخیر در بلوغ و یا حذف آن را در ماهیان امکان پذیر نمایند. از جمله روشهای مناسب در این راستا بهره برداری از ماهیان عقیم به واسطه عدم رشد گندهایشان می‌باشد. امروزه بهترین روشی که برای عقیم سازی ماهیان توصیه گردیده و مورد استفاده نیز قرار می‌گیرد القای تریپلوئیدی در ماهیان است. ماهیان تریپلوئید به دلیل افزایش یک سری کروموزومی در تعداد کروموزومهای

بلوغ جنسی یکی از مهمترین مشکلات پرورش دهندگان در تولید تجاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد (8). روند تکامل گناد در جنس نر و ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان قبل از رسیدن به وزن بازاری (300-500 گرم) شروع می‌شود. بلوغ جنسی در اغلب ماهیان و از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان، باعث کاهش رشد بدن می‌گردد (17). زیرا منابع انرژی به جای رشد پیکری و تولید گوشت صرف توسعه و تکامل گندها، بروز صفات ثانویه جنسی و ایجاد رفتارهای تولید مثلی خواهد شد (18). همچنین رشد غدد جنسی تغییراتی را در دستگاه گوارش ماهیان به وجود می-

خود، $3n$ کروموزومی محسوب گردیده و بواسطه اختلال در تقسیم میوز به هنگام گامتوزنز عقیم تلقی می‌شوند که ناشی از عدم جفت شدن صحیح کروموزومهای هومولوگ در مراحل تقسیم میوز می‌باشد (19). القای تریپلوئیدی زمانی به حداکثر کارایی خود خواهد رسید که بر روی جنس ماده اعمال شود. زیرا تکامل تخمدانی در جنس ماده قزل آلائی رنگین کمان تریپلوئید بسیار بطئی است و بلوغ جنسی حاصل نمی‌گردد؛ ولی در ماهیان نر تریپلوئید بیضه تکامل یافته و حتی گامت تولید می‌شود. لذا در این جنس بروز این فرآیند موجب صرف انرژی و در نتیجه کاهش رشد خواهد گردید (20). بنابراین، هدف اصلی دستکاریهای کروموزومی، تولید جمعیت تمام ماده تریپلوئید می‌باشد که در آن تکامل گنادها به شدت کاهش یافته است (18).

در سال 1999، Sheehan و همکاران با بررسی ماهیان قزل آلائی که به وزن اولیه 100 گرم رسیده بودند بیان نمودند که میزان شاخص رشد گناد در جمعیت تمام ماده دیپلوئید بیشتر از تمام ماده تریپلوئید بود. تخمدانهای دیپلوئیدها متشکل از اووسیت‌هایی بودند که اغلب در مرحله پری‌ویتلوژنیک بودند اما تخمدانهای ماهی تریپلوئید این تکامل را نشان ندادند (18).

در سال 2001 توسط Smith و Benfey عنوان شد که آزادماهیان تریپلوئید ماده همزمان با ماهیان دیپلوئید اووسیت بالغ تولید نمی‌نمایند، چرا که مقادیر کافی هورمون استروئیدی برای پشتیبانی از سنتز ویتلوژنین (VTG) و رشد اووسیت تولید نمی‌کنند و معمولاً اووسیت بالغ تنها در ماده‌های تریپلوئید مسن‌تر تولید می‌شود و ماهیان جوان قادر به تولید آن نیستند (19). از آنجاکه بررسی نتایج چنین تحقیقاتی در کشورهای مختلف جهان متغیر بوده و بعضاً گزارشهای متناقضی در این خصوص منتشر شده است (12)، بنابراین لازم است در هر کشوری با توجه به عوامل تأثیرگذار بر رشد ماهیان تریپلوئید که

عمدتاً شامل شرایط خاص آب و هوایی و تغذیه، ویژگیهای ژنتیکی مولدان مورد استفاده و تعامل متقابل محیط و ژن می‌باشند، این امر مورد آزمون و مقایسه قرار گیرد (10). اگر چه در خصوص تغییرات فیزیولوژیکی ناشی از القای تریپلوئیدی در آزاد ماهیان گزارشاتی مشاهده می‌شود (3 و 9) لیکن تاکنون گزارشی در مورد روند تکامل تخمدان ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل آلائی رنگین‌کمان همزمان با شروع بلوغ جنسی در مقایسه با ماهیان تمام ماده دیپلوئید در کشور ایران منتشر نشده است، لذا در مطالعه حاضر این مهم در طول سال دوم پرورش مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

تیمارهای مورد تحقیق: پژوهش حاضر در کارگاه تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر واقع در رودبارک شهرستان کلاردشت انجام گردید. دو تیمار مختلف از ماهیان قزل-آلائی رنگین‌کمان شامل جمعیت تمام ماده تریپلوئید (AFT) (All Female Triploid) و جمعیت تمام ماده دیپلوئید (AFD) (All Female Diploid) گروههای مورد بررسی را تشکیل دادند. جمعیت تمام ماده تریپلوئید از طریق روش مستقیم (القایی) از ترکیب اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته (Neomale) با تخمک ماده‌های معمولی همراه با شوک گرمایی $26/5$ درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه و پس از گذشت 20 دقیقه از عملیات لقاح (1) و جمعیت تمام ماده دیپلوئید از طریق ترکیب اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته (4) با تخمک ماده‌های معمولی بدون شوک دهی تولید و تا 14 ماهگی پرورش داده شدند. در اواخر دوره تحقیق (خرداد ماه) برای کامل شدن مدت زمان تکامل گناد ماهیان، از ماهیان تمام ماده تریپلوئید و دیپلوئید موجود در کارگاه (2) که از لحاظ سنی 6 ماه بزرگتر بودند نیز برای مقایسه روند تکامل تخمدان یک نوبت نمونه-برداری شد. ماهیان دو تیمار مختلف که در ابتدای دوره 70-80 گرم وزن داشتند پس از هم اندازه‌سازی اولیه و

رسیدن به وزن حدود 77 گرم که تفاوت معنی داری را بین تیمارها نشان نمی داد، در 3 حوضچه مربع شکل (ابعاد $1/5 \times 1/5 \times 0/7$ متر) به عنوان 3 تکرار برای هر تیمار با تراکم حدود 70 ماهی در هر استخر (حدود 4 کیلوگرم در متر مکعب)، ذخیره سازی شدند. تغییرات دمای آب در طول دوره پرورش در محدوده 1 الی 11 درجه سانتی

گراد بود (جدول 1). دفعات غذاهای در این مرحله روزی 3 بار با استفاده از غذای مصنوعی ساخت کارخانه چینه بود. در روزهایی که دمای آب زیر 8 درجه سانتی گراد بوده و یا گل آلودگی آب به حدی بالا بود که ماهی غذا نمی گرفت غذاهای قطع می گردید.

جدول 1 میانگین دمای آب در بخش پرورش قزل آلا کارگاه کلاردشت در طول دوره بررسی

ماههای سال	۱۱	۸	۶	۳	۲	۱	۳	۴	۷	۹	۱۰	۱۱
میانگین دمای آب (°C)	11	8	6	3	2	1	3	4	7	9	10	11

محور بزرگ هسته یاسلول گلبول قرمز $b=$

نحوه سنجش پلئویدی ماهیان: از آنجا که کاربرد شوکهای دمایی در ماهیان منجر به القای درصدهای متفاوتی از تریپلوئیدی می شود لازم بود قبل از نمونه برداری از گناد ماهیان، از دیپلوئید و یا تریپلوئید بودن ماهیان اطمینان حاصل گردد. لذا با استفاده از روش تهیه گسترشهای خونی و محاسبه حجم و مساحت هسته و سلول گلبولهای قرمز خون، این امر انجام پذیرفت (21). در این خصوص از هر ماهی دو گسترش خونی تهیه و تعداد پانزده عدد از گلبولهای قرمز سالمی که از نظر شکل ظاهری کاملاً بیضوی بودند و دیواره سیتوپلاسمی و هسته سیتوپلاسم آنها کاملاً سالم بود انتخاب شده و مورد سنجش قرار گرفتند. برای محاسبه مساحت و حجم هسته و سلول گلبولهای قرمز به ترتیب از روابط 1 و 2 استفاده گردید.

$$\text{رابطه 1} \quad S = a \times b \times \pi / 4 \quad (15)$$

1

$$\text{رابطه 2} \quad V = [a/2] \times [b/2]^2 \times \pi \times 4/3 \quad (15)$$

مساحت هسته یا سلول گلبول قرمز $S=$
محور کوچک هسته یاسلول گلبول قرمز $a=$
حجم هسته یا سلول گلبول قرمز $V=$

با توجه به حدود $1/5$ برابر شدن ابعاد گلبول قرمز در ماهیان تریپلوئید نسبت به ماهیان دیپلوئید، ماهیانی که بین $1/4$ تا $1/6$ برابر افزایش در ابعاد گلبولهای قرمز نشان می دادند به عنوان ماهیان تریپلوئید قلمداد شدند (4).

تعیین جنسیت ماهیان: اگرچه در پژوهش حاضر از ماهیان تمام ماده دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلا رنگین کمان استفاده شد، به منظور حصول اطمینان از ماده بودن همه ماهیان مورد بررسی، روش مستقیم استوکارمن به کار رفت (11). برای این منظور تکه کوچکی از غدد جنسی پس از کالبد شکافی به کمک پنس برداشته شده و بر روی یک لام قرار می گرفت و 2-3 قطره رنگ استوکارمن بر روی آن ریخته می شد. این رنگ به وسیله غدد جنسی به آسانی جذب می شود. سپس یک عدد لامل بر روی بافت حاصل قرار گرفته و رنگ به همراه بافت به کمک کمی فشار له می شد و لام تهیه شده در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار می گرفت.

نحوه نمونه برداری از نمونه های ماهی و گنادها: در طول دوره پرورش در ابتدا به صورت ماهانه در طی ماههای شهریور، مهر و آبان و سپس به دلیل پایین بودن

درجه حرارت آب و عدم تغذیه و رشد ماهیان در فصل زمستان، با فواصل زمانی بیشتر و طی ماههای دی و اردیبهشت از دو تیمار تمام ماده تریپلوئید و تمام ماده دیپلوئید و نهایتاً در خرداد از تیمارهایی که سن بیشتری داشتند، پنج قطعه ماهی بصورت تصادفی توسط ساچوک گرفته شد. ابتدا طول کل (TL) (Total Length)، طول چنگالی (FL) (Fork Length)، طول استاندارد (SL) (Standard Length) و عرض بدن (BD) (Body Depth) با استفاده از تخته زیست سنجی با دقت 0/1 سانتیمتر اندازه گیری و ثبت شد. وزن کل ماهی با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت پنج گرم اندازه گیری و ثبت شد. سپس ماهیان تشریح گردیده و گناد آنها در محلول بوئن (Bouin's Solution) تثبیت شد. آزمایشات بافت شناسی کلاسیک نمونه ها در آزمایشگاه هیستولوژی و مطالعات میکروسکوپی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. مطالعات بافت شناسی نمونه ها شامل مراحل آگیری، شفاف سازی، پارافینه کردن، قالب گیری، برش برداری، چسباندن برشها بر روی لام و رنگ آمیزی بود. رنگ آمیزی نمونه ها با استفاده از هماتوکسیلین-اوتوزین صورت پذیرفت که شامل مراحل پارافین زدایی،

خارج نمودن حلال پارافین و آب دهی، رنگ آمیزی و در نهایت آب گیری، الکل گیری و شفاف کردن و چسباندن لامل بود. تشخیص مراحل تکاملی تخمدان با استفاده از روش تقسیم بندی 8 مرحله ای (7 و 22) انجام گرفت. این تقسیم بندی شامل مراحل هستک کروماتینی (Chromatin Nucleolus Stage)، مرحله کناری شدن هستک (Perinucleolus Stage)، مرحله قطرات چربی (Droplet Stage (Oil)، مرحله وزیکول (آلوتلهای کناری) (Vesicle (cortical alveoli) Stage)، مرحله زرده سازی (Vitelogenesis Stage)، مرحله بلوغ یا مهاجرت هسته (Migratory Nucleus Stage)، مرحله شکست ژرمینال وزیکول و تخمک گذاری (Germinal Vesicle Breakdown and Ovulation) و در نهایت مرحله باز جذب (Degeneration Stage) می باشد. مطالعات میکروسکوپی نمونه ها توسط میکروسکوپ نوری معمولی با بزرگنمایی 100 و 400 صورت گرفت و عکسبرداری از نمونه ها نیز توسط دوربین سونی مدل SSC-DC58AP نصب شده روی میکروسکوپ و با استفاده از نرم افزار ASUS LIVE انجام شد.

جدول 2 میانگین و نسبت ابعاد سلول و هسته گلبولهای قرمز خون در ماهیان تمام ماده دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلاهی رنگین کمان

شاخص تیمار	دیپلوئید تمام ماده	تریپلوئید تمام ماده	نسبت تریپلوئید به دیپلوئید
مساحت سلول $m^2 \mu$	109/29	180/44	1/46
مساحت هسته $m^2 \mu$	18/04	26/21	1/46
حجم سلول $m^3 \mu$	701/87	1370/26	1/6
حجم هسته $m^3 \mu$	42/40	63/55	1/54

روش آماری مورد استفاده: در تحقیق حاضر، روند تکامل گنادی بین جمعیت تمام ماده تریپلوئید و جمعیت تمام ماده دیپلوئید طی 6 بار نمونه برداری و هر بار با 5 تکرار از هر تیمار بررسی گردید. برای مقایسه روند تکامل گنادی در این تحقیق با توجه به اینکه قطر و ابعاد اووسیتها اندازه-

گیری نشد، نیازی به محاسبات آماری نبوده و از مشاهدات توصیفی استفاده گردید.

نتایج

سنجش پلوئیدی: نتایج بررسی گسترشهای خونی نشان داد که در ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل آلاهی رنگین کمان،

موفقیت همراه بوده است و در نتیجه، آزمایشهای انجام شده با اطمینان کامل بر روی ماهیان تمام ماده صورت پذیرفته است. در این روش تخمکها به شکل اجسام کروی در تخمدان دیده شدند (شکل 1).

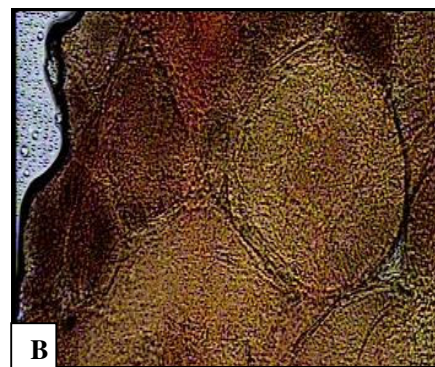
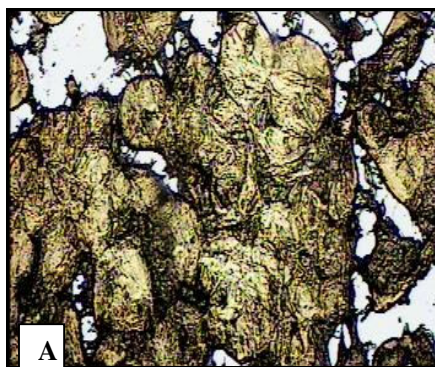
زیست سنجی نمونه ها: نتایج زیست سنجی ماهیان تمام ماده دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلائی رنگین کمان مورد بررسی در جدول 3 آمده است. همانگونه که در جدول مذکور مشاهده می شود شاخصهای زیست سنجی نمونه های تریپلوئید از سه ماهه آخر دوره رشد نسبت به ماهیان دیپلوئید افزایش یافته است.

ابعاد سلول و هسته گلبولهای قرمز حدود $1/46$ تا $1/60$ برابر نسبت به ماهیان تمام ماده دیپلوئید افزایش داشته است (جدول 2).

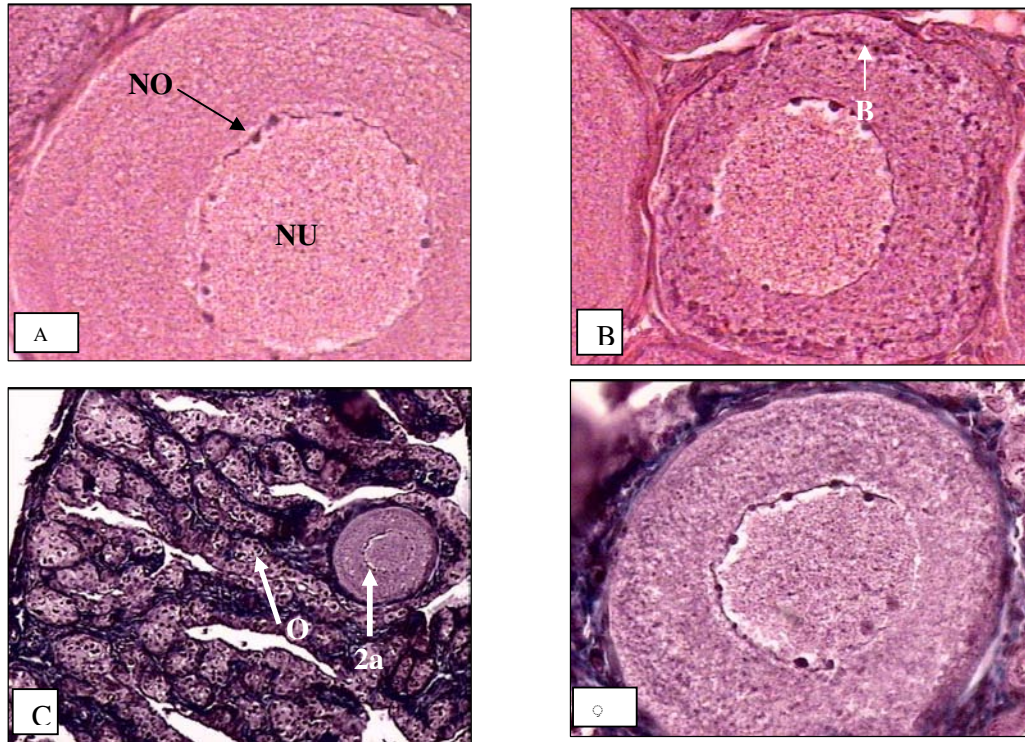
نتایج اندازه گیری ابعاد گلبولهای قرمز نشان داد که روند افزایش حجم هسته نسبت به سایر پارامترها، در هر دو تیمار مورد بررسی از نظم دقیق تری پیروی می کرد، بنابراین براساس میزان افزایش حجم هسته، درجه پلوئیدی ماهیان در ابتدای آزمایشها مشخص شد.

تعیین جنسیت ماهیان: نتایج استفاده از روش استوکارمن بر گنادهای ماهیان مورد نمونه برداری اگرچه وضوح بالایی نداشت، نشان داد که تولید ماهیان تمام ماده به طور کامل با

جدول 3 نتایج زیست سنجی ماهیان تمام ماده تریپلوئید و دیپلوئید قزل آلائی رنگین کمان مورد بررسی							
شاخص	ماه	شهریور	مهر	آبان	دی	اردیبهشت	خرداد
طول کل (cm)	3n	22/6	24/6	26/6	30/6	33/4	41/6
	2n	23/5	25/3	26/4	29/6	30/1	39/1
طول چنگالی (cm)	3n	21/9	24	25/8	30/1	32/8	41
	2n	22/9	24/7	25/8	29/1	29/6	38/2
طول استاندارد (cm)	3n	20/5	22/6	24/4	28/6	30/7	38/4
	2n	21/4	23/4	24/6	27/6	28/1	36/1
عرض بدن (cm)	3n	3/8	5/13	6/6	7	7/6	10/75
	2n	4/1	5/26	6/8	7/2	7/3	9/4
وزن (گرم)	3n	192/5	232	311/2	327/5	431/6	1140
	2n	175	201/6	287/5	328/7	371/6	771/6



شکل 1 تخمدان ماهیان تمام ماده قزل آلائی رنگین کمان در رنگ آمیزی با روش استوکارمن A: (×100); B: (×400)



شکل 2 - اووسیت ماهیان دیپلوئید قزل آلا در مرحله 2a (A) و 2b (B) (H&E, ×400) و اووسیت ماهیان تریپلوئید قزل آلا در مرحله 2a (C) (H&E, ×100) و (D) (H&E, ×400) در مرحله اول نمونه برداری (اووگونیا: O، هسته: NU، هستک: NO، جسم بالینی: (B)

تریپلوئید اغلب سلولهای جنسی در مراحل ابتدایی و در حد اووگونیا بودند که بیانگر این مرحله می باشد. تنها در یک مورد در مرحله اول، اووسیت مرحله 2a در تخمدان ماهیان تریپلوئید مشاهده گردید (شکل 2) و در سایر مراحل نمونه برداری، تخمدان ماهیان تریپلوئید در مرحله هستک کروماتینی قرار داشتند.

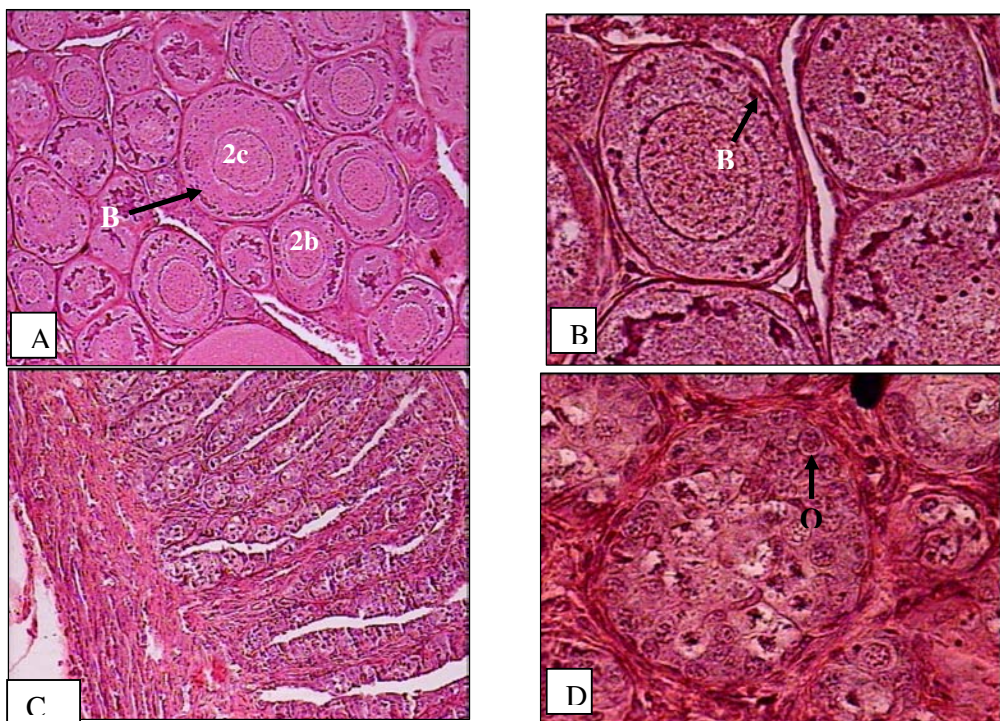
تخمدان ماهیان دیپلوئید در ماه اول در مرحله کناری شده هستک قرار داشتند. در این مرحله هستکها در قسمت داخلی غشاء هسته قابل مشاهده بودند. این مرحله به سه زیر مرحله 2a، 2b و 2c بر اساس درجه باز دوستی سیتوپلاسم و موقعیت جسم بالینی در سیتوپلاسم تقسیم شد. در ماه اول، تخمدان ماهیان دیپلوئید در مراحل 2a و 2b قرار داشتند (شکل 2). در مرحله 2a سیتوپلاسم

تکامل گناد: در تحقیق حاضر و در پایان دوره نمونه برداری (اردیبهشت)، تخمدان ماهیان دیپلوئید تا مرحله 4 (زیر مرحله 4b) و در ماهیان دیپلوئید نزدیک به بلوغ تیمار آخر تا مرحله 5 و تخمدان ماهیان تریپلوئید حداکثر تا مرحله 2 (زیر مرحله 2a) پیش رفتند. مراحل تکامل تخمدان در ماهیان پرورش یافته بر اساس تقسیم بندی 8 مرحله ای (6 و 20) تا مرحله 5 که پیشرفته ترین تخمدانها را شامل می شود در 6 مرحله مختلف نمونه برداری به شرح زیر می باشد:

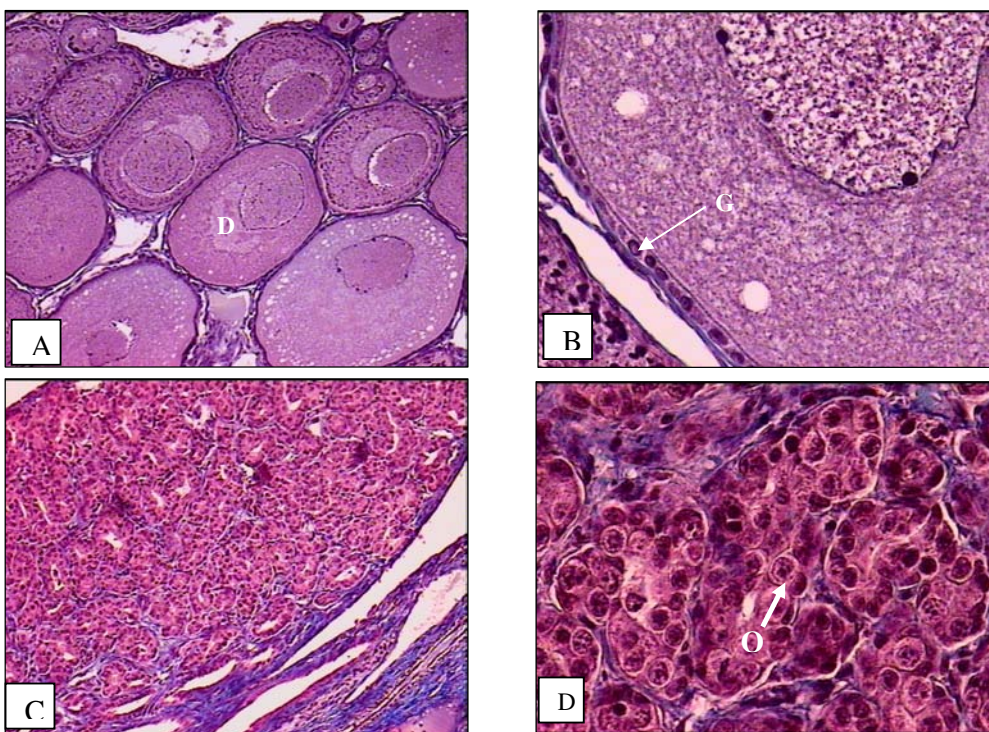
مرحله اول نمونه برداری: نظر به اینکه ماهیان تیمار دیپلوئید در ابتدای دوره نمونه برداری گنادها حدود 16 ماه سن داشته و همچنین انتقال اووگونیا به مرحله 1 و سپس 2 اووسیتی فرآیندی سریع می باشد، مرحله هستک کروماتینی در این ماهیان مشاهده نشد. اما در ماهیان

بالینی در مجاورت هسته ظاهر می شود.

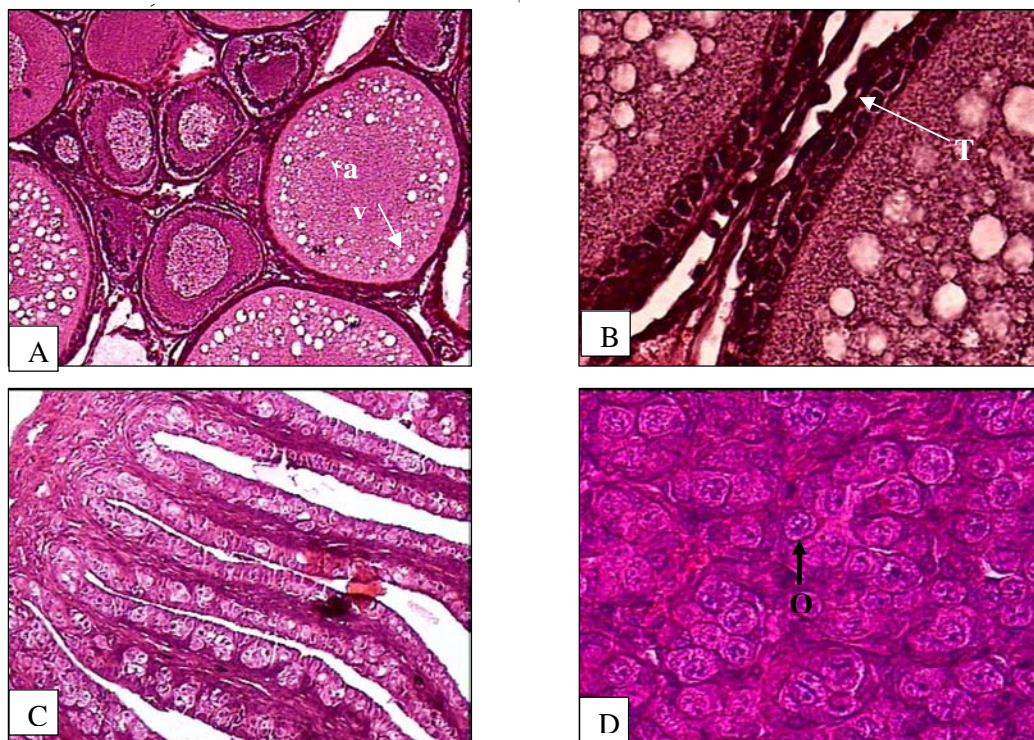
اووسیتها شدیداً باز دوست می باشد، در مرحله 2b جسم



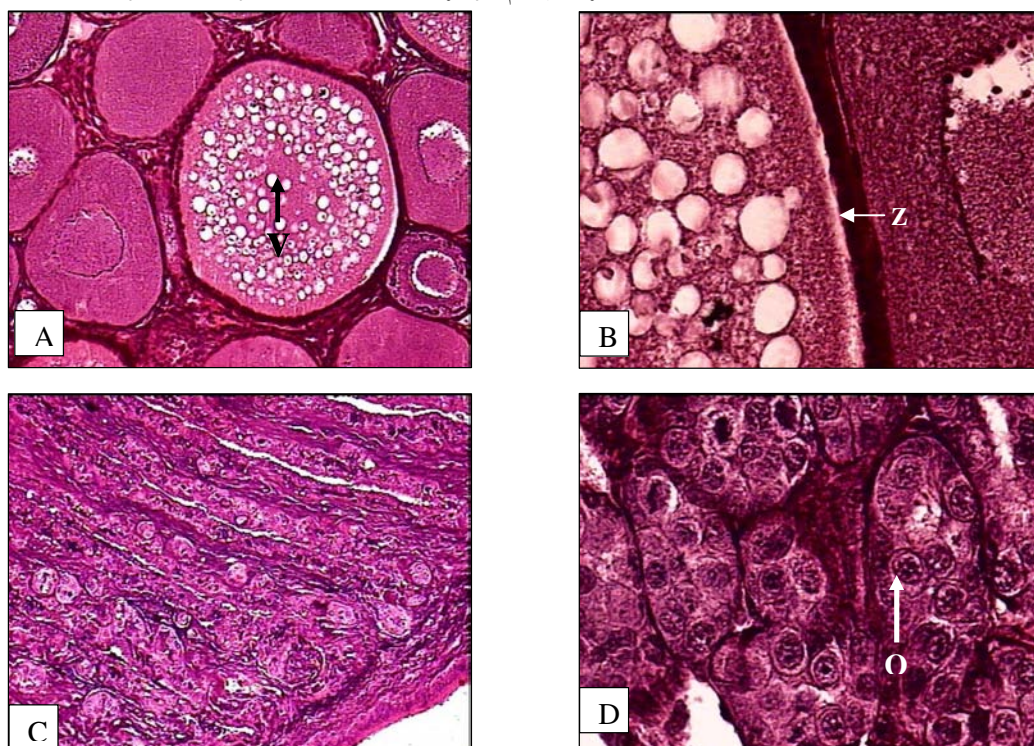
شکل 3 - اووسیت ماهیان دیپلوئید قزل آلا در مراحل 2b و 2c (A) (H&E, ×100) و 2b (B) (H&E, ×400) و اووسیت ماهیان تریپلوئید قزل آلا در مرحله اووگونی (C) (H&E, ×100) و (D) (H&E, ×400) در مرحله دوم نمونه برداری (جسم بالینی: B, اووگونی: O)



شکل 4- اووسیت ماهیان دیپلوئید در مرحله 3 تکامل (A) ($\text{H\&E}, \times 100$) و لایه گرانولوزا (B) ($\text{H\&E}, \times 400$) و اووسیت ماهیان تریپلوئید در مرحله اووگونیا (C) ($\text{H\&E}, \times 100$) و (D) ($\text{H\&E}, \times 400$) در مرحله سوم نمونه برداری (لایه گرانولوزا: G, قطرات چربی: D, اووگونیا: O)



شکل 5- اووسیت ماهیان دیپلوئید در مرحله 4a (A) ($\text{H\&E}, \times 100$) و لایه تکا (B) ($\text{H\&E}, \times 400$) و اووسیت ماهیان تریپلوئید در مرحله اووگونیا (C) ($\text{H\&E}, \times 100$) و (D) ($\text{H\&E}, \times 400$) در مرحله چهارم نمونه برداری (لایه تکا: T, وزیکول: V, اووگونیا: O)

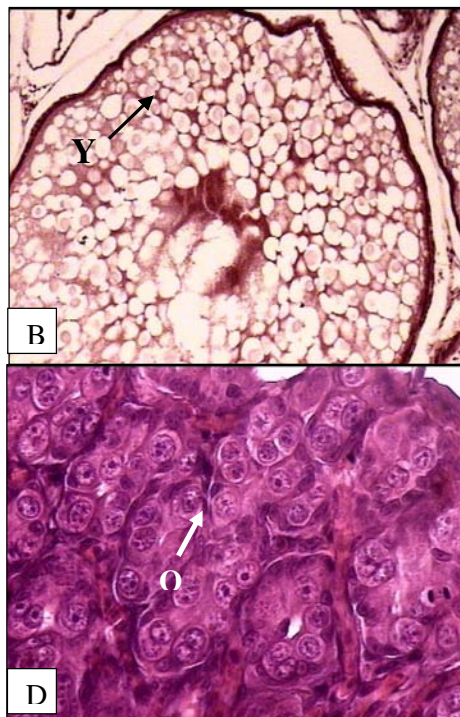
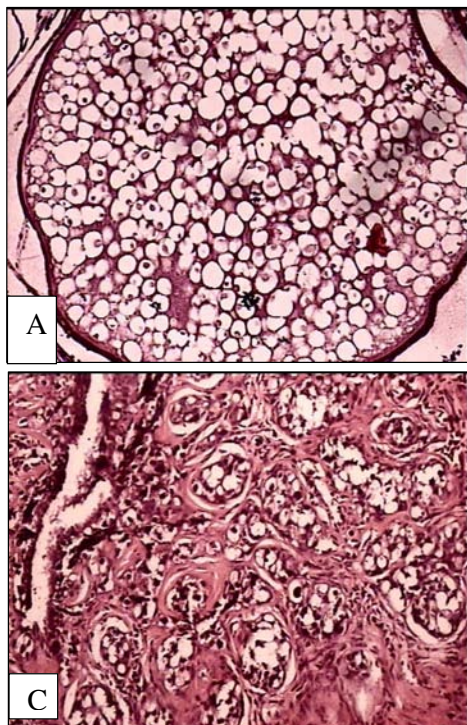


شکل 6- اووسیت ماهیان دیپلوئید در مرحله 4b (A) ($\times 100$ H&E) و لایه شفاف (A) ($\times 400$ H&E) و اووسیت ماهیان تریپلوئید در مرحله اووگونیا (C) ($\times 100$ H&E) و (D) ($\times 400$ H&E) در مرحله پنجم نمونه برداری (وزیکول: V, لایه شعاعی: Z, اووگونیا: O)

مرحله چهارم نمونه برداری: در این مرحله، اغلب اووسیت ماهیان دیپلوئید در مرحله وزیکول (آلولهای کناری) قرار داشتند. انتقال اووسیتها به مرحله 4 بوسیله ظهور وزیکولهای سیتوپلاسمی مشخص می شود، این وزیکولها در هنگام رنگ آمیزی، اغلب محتویات خود را از دست داده و به صورت حفره های توخالی قابل مشاهده بودند. این مرحله به دو زیر مرحله 4a و 4b بر اساس محل و تعداد وزیکولها تقسیم شد. در مرحله چهارم نمونه برداری، وزیکولها در کناره سیتوپلاسم سلول ظاهر شدند (زیر مرحله 4a) و لایه تکا نیز قابل مشاهده بود (شکل 5). تخمدان ماهیان تریپلوئید همانند مراحل پیشین نمونه برداری، در مراحل ابتدایی تکامل قرار داشت و اغلب سلولهای جنسی در حد اووگونیا بودند (شکل 5).

مرحله دوم نمونه برداری: در این مرحله تخمدان ماهیان دیپلوئید در مراحل 2b و 2c قرار داشتند (شکل 3). در مرحله 2c جسم بالینی به سمت کناره اووسیت حرکت می کند. تخمدان ماهیان تریپلوئید در مراحل ابتدایی قرار داشت و اغلب سلولهای جنسی در حد اووگونیا بودند (شکل 3).

مرحله سوم نمونه برداری: در این مرحله از نمونه برداری، اغلب اووسیت ماهیان دیپلوئید قزل آلائی رنگین کمان در مرحله 3 تکامل قرار داشتند و قطرات چربی به صورت هلالی و دایره وار در اطراف هسته قابل مشاهده بودند. لایه گرانولوزا بخوبی قابل تشخیص بود (شکل 4). تخمدان ماهیان تریپلوئید قزل آلائی رنگین کمان در این مرحله از نمونه برداری در مراحل ابتدایی تکامل قرار داشتند و اغلب سلولهای جنسی در حد اووگونیا بودند (شکل 4).



شکل 7- اووسیت ماهیان دیپلوئید قزل آلا در مرحله 5 (A) (H&E, $\times 100$) و (B) (H&E, $\times 400$) و اووسیت ماهیان تریپلوئید در مرحله اووگونیا (C) (H&E, $\times 100$) و (D) (H&E, $\times 400$) در مرحله ششم نمونه برداری (گرانول زرده: Y, اووگونیا: O)

مرحله پنجم نمونه برداری: در این مرحله، اووسیت ماهیان دیپلوئید در زیرمرحله 4b قرار داشتند و وزیکولها نسبت به مرحله پیشین به تدریج به سمت هسته امتداد یافته بودند. لایه شعاعی بین لایه گرانولوزا و سیتوپلاسم اووسیت قابل مشاهده بود. پیشرفته ترین تخمدان ماهیان تیمار دیپلوئید در زیرمرحله 4b قرار داشتند (شکل 6). تخمدان ماهیان تریپلوئید همچنان در مراحل ابتدایی تکامل قرار داشت و اغلب سلولهای جنسی در حد اووگونیا بودند (شکل 6).

مرحله ششم نمونه برداری: در نمونه های این مرحله که مربوط به تیمار خرداد می باشد، اووسیت ماهیان دیپلوئید در مرحله زرده سازی قرار داشت. زرده سازی نشانه انتقال اووسیت زیرمرحله 4b به مرحله 5 می باشد و این روند به طور فعال در طول مرحله 6 نیز ادامه می یابد. اووسیت های مرحله 5 به وسیله گرانولهای زرده کوچک در مجاورت لایه شعاعی به راحتی قابل تشخیص بودند. در این مرحله هسته در مرکز اووسیت قرار دارد. پیشرفته ترین تخمدان ماهیان دیپلوئید مرحله آخر در مرحله 5 قرار داشتند (شکل 7). تخمدان ماهیان تریپلوئید همچنان در این ماه نیز در مراحل ابتدایی تکامل قرار داشت و اغلب سلولهای جنسی در حد اووگونیا بودند (شکل 7).

بحث

با توجه به نمونه های مورد استفاده در این تحقیق و شرایط محیطی حاکم بر آنها، نحوه تکامل تخمدان در ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید تمام ماده با وضعیت متفاوتی مشاهده گردید. اصولاً درجه تکامل اووسیت در آزادماهیان تریپلوئید در میان تحقیقات گزارش شده نیز متفاوت است. در ماهی قزل آلا رنگین کمان، Nakamura و همکاران در سال 1987 اووسیت در مرحله بلوغ را در تخمدان ماهیان بزرگتر از 2 سال مشاهده نمودند (16). در سال 2001 نیز

Smith و Benfey اووسیت بالغ را در تخمدان ماهیان قزل آلا جویباری تریپلوئید بالاتر از 2 و 3 سال مشاهده نمودند (19)؛ اما Benfey در سال 1999 و Krisfalusi و همکاران در سال 2000 به عدم وجود هر گونه تکامل اووسیت در ماهیان تریپلوئید قزل آلا رنگین کمان اشاره می نمایند (14، 5). به طور کلی در آزاد ماهیان تریپلوئید ماده، اووسیت بالغ همزمان با ماهیان دیپلوئید تولید نمی شود چون تولید هورمونهای استروئیدی جهت حمایت از سنتز ویتلوزنین و رشد اووسیت در مقایسه با همای دیپلوئید ناکافی است. عموماً اووسیت در حال بلوغ در آزادماهیان تریپلوئید جوان مشاهده نمی گردد. همچنین اووسیت های مرحله زرده سازی این ماهیان در زمان اولین بلوغ جنسی در دیپلوئیدها نیز قابل مشاهده نیستند. بنابراین اووسیت های در مرحله زرده سازی و اووسیت های بالغ معمولاً فقط در تریپلوئیدهای مسن تر تولید می شوند (19). در تحقیق حاضر تخمدان ماهیان تریپلوئید قزل آلا رنگین کمان نسبت به تخمدان ماهیان دیپلوئید در مراحل پایین تری از نظر پیشرفت مراحل تکامل تخمدان قرار داشت. در این راستا ماهیان تریپلوئید حداکثر تا زیر مرحله 2a تکاملی توسعه یافتند ولی ماهیان دیپلوئید تا مرحله 4b تا زمان نمونه برداری مرحله پنجم و تا مرحله 5 تکامل در ماهیان تیمار آخر تا انتهای دوره تحقیق حاضر پیش رفتند. مرحله 2 در ماهیان تریپلوئید فقط در یک مورد در ماه اول مشاهده گردید و در این یک مورد نیز فقط یک اووسیت در این مرحله از یکی از لامهای تهیه شده مشاهده شد و اغلب شامل سلولهای جنسی در مراحل بسیار ابتدایی در حد اووگونیا بودند که قسمت عمده لامهای تهیه شده را در بر می گرفت و تا مرحله آخر دوره نیز هیچ گونه پیشرفتی با افزایش سن ماهی دیده نشد. وجود اووسیت های در مرحله 2 در ماهیان تریپلوئید در کنار اووگونیا شاهد دیگری بر وجود تخمدانهای دسته ای در ماهیان قزل آلا

رنگین کمان می باشد که حداقل دو گروه متمایز و متفاوت از اووسیت های در حال رشد در تخمدان آنها قابل مشاهده است که در مورد ماهیان دیپلوئید نیز همانگونه که بیان گردید این مطلب صدق می کرد. در ماهیان دیپلوئید پیشرفت مراحل تکاملی تخمدان به وضوح قابل مشاهده بود و با ادامه مراحل نمونه برداری و افزایش سن ماهیان تا زمان آخرین نمونه برداری در انتهای دوره، اووسیت ها پیشرفت زیادی را از نظر مراحل تکاملی نشان می دادند و تا مراحل بالاتر پیش رفتند.

عموماً در ماهیان تریپلوئید رشد تخمدان به مقدار زیادی متوقف می شود ولی در ماهیان ماده دیپلوئید اووسیت های بزرگ تولید می شود. بدین صورت که در ماهیان دیپلوئید، اووسیت هایی که در مرحله متافاز میوز یک به سر می برند در طی زرده سازی رشد زیادی می کنند ولی اغلب سلول های جنسی در ماهیان تریپلوئید در مرحله پروفاز میوز یک بواسطه اختلال در تقسیم میوز و جفت نشدن صحیح کروموزوم های هومولوگ متوقف شده و رشد زیادی از خود نشان نمی دهند و بنابراین منجر به تخمدان های کوچک با تعداد کمی اووگونیای قبل از مرحله زرده سازی و اووسیت های اولیه می گردد (5). رشد زیاد اووسیت ها قبل از اوولاسیون در دیپلوئیدها به علت جذب پروتئین های زرده است که از ویتلوژنین مشتق می گردند. ویتلوژنین بوسیله کبد با تحریک استروژن های تخمدان سنتز می شود. مقادیر کم استروژن ها در ماهیان ماده تریپلوئید به دلیل عدم پیشرفت مراحل تکاملی تخمدان در این ماهیان و سنتز هورمون ها از لایه فولیکولی می باشد. اووسیت های اولیه به طور معمول در ماهیان دیپلوئید در فولیکول های احاطه می -

منابع

- 1- جوهری، سید علی، 1384، تولید و پرورش جمعیت تمام ماده دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلائی رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه تربیت مدرس، 75 صفحه.
- 2- درافشان، سالار، 1385، دستکاری های کروموزومی ماهی ازاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و قزل آلائی رنگین کمان در
- 3- سوری نژاد، ایمان، کلباسی، محمدرضا، سلطان کریمی، ساحل. 1386، بررسی تاثیر القای تریپلوئیدی بر تغییرات برخی شاخص های خون شناسی ماهیان تمام ماده قزل آلائی رنگین کمان در
- Oncorhynchus mykiss* و مقایسه رشد در نسل F_1 ، رساله دکتری شیلات، دانشگاه تربیت مدرس، 142 صفحه.

شوند که دارای سلول های تخصصی برای سنتز و ترشح استروئیدها می باشند. اغلب اووسیت ها تا این مرحله در ماهیان تریپلوئید رشد نکرده و در نتیجه ماهیان ماده تریپلوئید به طور معمول علائم ترشح هورمون های غدد درون ریز مرتبط با بلوغ جنسی را نشان نداده و نسبت به ماده های دیپلوئید در حال بلوغ، ویتلوژنین پلاسمایی بسیار کمتر (5 و 13) دارند که باعث می شود پروتئین های زرده به مقدار کافی تولید نشده و در نهایت منجر به عدم رشد اووسیت ها در مرحله زرده سازی می گردد.

در جمع بندی نهایی یافته های این تحقیق مؤید این مطلب است که تکامل اووسیت در ماهیان تریپلوئید قزل آلائی رنگین کمان تولید شده در شرایط کارگاهی حاضر به مقدار زیادی متوقف شده و همزمان با ماهیان دیپلوئید در حال بلوغ، قادر به تولید اووسیت بالغ نمی باشند که این مطلب احتمالاً اثرات چشمگیری بر روند رشد و کیفیت گوشت این ماهیان خواهد داشت که در بحث آبی پروری این گونه، حائز اهمیت کاربردی می باشد.

قدردانی: نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند از همکاری رئیس محترم وقت کارگاه تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت مهندس پاشا زانوسی و جناب آقایان مهندس رضوانی، مهندس ادیب، مهندس گلشاهی، مهندس میار، مهندس اکبرآبادی و سایر پرسنل زحمتکش مجموعه قدردانی نمایند. همچنین از زحمات جناب آقای مهندس مهدی نقدی که در طی مراحل مختلف نمونه برداری همکاری زیادی داشتند تقدیر و تشکر می گردد.

- آلا، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران، 250 صفحه.
- فصل زمستان، مجله ژنتیک نوین، دوره دوم، شماره 2، صفحه 58-51
- 4- طلا، مریم، 1380، بهینه سازی تیمار هورمون 17 آلفا متیل تستوسترون به منظور ایجاد تغییر جنسیت و عقیمی در ماهی قزل- Female Diploid Gynogenetic and Triploid Rainbow Trout. Exp. Zool. 286: 505-512.
- 15- Lemoine, L. H, and Smith, T.L. 1980. Polyploidy Induced in Brook Trout by Cold Shock. Transaction of the American Fisheries Society. 109: 626-631.
- 16- Nakamura, M, Nagahama, Y, Iwahashi, M, and Kojima, M. 1987. Ovarian Structure and Plasma Steroid Hormones of Triploid Female Rainbow Trout. Nippon Suisan Gakkaishi. 53: P:1105.
- 17- Purdom, C. E. 1993. Genetics and Fish Breeding. Chapman and Hall, London.
- Seraki, k, Kobayasi, H, and Nakamura, M. 1977. Size of Erythrocytes in the Diploid and Triploid Specimens of *Carassius auratus*. Janssdrofi Jap. J. Ichthyol. 24/2.
- 18- Sheehan, R. J, Shasteen, S. P, Suresh, A. V, Kapuscinski, A. R, and Seeb, J. E. 1999. Better Growth in All Female Diploid and Triploid Rainbow Trout. Transaction of the American Fisheries Society. 129: 491-498.
- 19- Smith, D. S, and Benfey, T. J. 2001. The Reproductive Physiology of Three Age Classes of Adult Female Diploid and Triploid Brook Trout. Fish Physiology and Biochemistry. 25: 319-333.
- 20- Thorgaard, G. H, and Gall. G. A. E. 1979. Adult Triploids in Rainbow Trout Family. Genetics. 93: 961-973.
- 21- Tiwary, B. k, Kirubakaran, R, and Ray, A. K. 1997. Induction of Triploidy by Cold Shock in Catfish *Heteropneustes fossilis*. Asian Fisheries Science. 10: 123-129.
- 22- Yamamoto, K, Oota, I, Takano, K, and Ishikawa, T. 1965. Studies on the Maturing Process of the Rainbow Trout *Salmo gairdneri irideus*-I. Maturation of the Ovary of a One-Year Old Fish. Jap. Soc. Scien. Fish. 31: 123-132.
- 5- Benfey, T. J. 1999. The Physiology and Behavior of Triploid Fishes. Reviews in Fisheries Science. 7: 39-67.
- 6- Billard, R, Richard, M, and Breton, B. 1977. Stimulation of Gonadotropin Secretion after Castration in Rainbow Trout. General and Comparative Endocrinology. 33: 163-165.
- 7- Bromage, N, and Cumarantunga, R. 1988. Egg Production in the Rainbow Trout. Recent Advances in Aquaculture. 3: 63-138.
- 8- Bye, V.J, and Lincoln, R. F. 1986. Commercial Methods for the Control of Sexual Maturation in Rainbow Trout. Aquaculture. 57: 299-309.
- 9- Dorafshan, S, Kalbassi, MR, Pourkazemi, M, Amiri, BM, and Karimi, SS. 2008. Effects of Triploidy on the Caspian Salmon *Salmo trutta caspius* Haematology. Fish Physiol Biochem. 34(3):195-200.
- 10- Dunham, R. A. 2004. Aquaculture Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches. CABI Publishing. 372: 22-53.
- 11- Guerrero, R. D, and Shelton, W. L. 1974. An Aceto-Carmine Squash Method for Sexing Juvenile Fishes. Progressive Fish Culturist. 36: P:56.
- 12- Guo, X, Cooper, K, and Hershberger, W. K. 1989. Aneuploid Pacific Oyster Larvae Produced by Treating with Cytochalasin B during Meiosis. Shellfish Research. 8: 448.
- 13- Hussain, M. G, Rao, G. P. S, Humayun, N. M, Randall, C. F, Penman, D. J, Kime, D, Bromage, N. R, Myers, J. M, and McAndrew, B. J. 1995. Comparative Performance of Growth, Biochemical Composition and Endocrine Profiles in Diploid and Triploid Tilapia *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture. 138: 87-97.
- 14- Krisfalusi, M, Wheeler, P, Thorgaard, G. H, and Cloud, J. G. 2000. Gonadal Morphology of

Comparative study of ovary development of all female diploid and triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in the second year of culture

Sourinezhad I.¹, Kalbassi M.R.², Khodabandeh S.³, and Rezaei M.⁴

¹ Fisheries Dept., Faculty of Marine sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of IRAN

² Marine Biology Dept., Faculty of Marine sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of IRAN

Abstract

Production and rearing of all female triploid populations of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, has great importance in aquaculture. Decrease or suppression of ovary development of all female triploid populations results in increasing growth and flesh quality. Hence, in this research, ovary development of all female triploid rainbow trout was investigated and analyzed by classic histology in compare to all female diploid population in the second year of culture. One year investigation results during 6 stages of sampling showed that germ cells of triploid fish ovary developed at most up to 2a stage and then their development was suppressed until the end of sampling period but the ovary of diploid fish normally developed and reached to 4b and 5 stages until the end of sampling. In conclusion it can be stated that triploidy induction on all female populations of rainbow trout results in considerable suppression of ovary development in these fish and consequently increasing somatic growth in compare to diploid counterparts.

Keywords: Ovary Development, Histology, All Female, Triploidy Induction, Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*