مقاله کوتاه

بررسی برخی تغییرات سلولهای خونی در ماهیان تریپلوئید قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سید علی جوهری*و محمد رضا کلباس

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی ، گروه شیلات

تاریخ دریافت: ۸٤/۰۵/۰۳ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰٦/۰۵

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تغییرات ساختاری گلبولهای قرمز خون در ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بود. قزل آلای تریپلوئید با استفاده از شوک گرمایی ۲٦/۵° C بمدت ۲۰ دقیقه و پس از گذشت ۲۰ دقیقه از لقاح تخمکها بدست آمد. روی ماهیان دیپلوئید هیچگونه شوکی اعمال نشد. بچه ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید حاصل تحت شرایط کاملاً مساوی، از لحاظ تغذیه و محیط قرار گرفتند. تعیین میزان پلوئیدی با شمارش تعداد هستک سلولهای آبشش (NOR) و اندازه گیری ابعاد گلبولهای قرمز انجام شد. میزان تریپلوئیدی در ماهیان تحت تیمار شوک گرمایی ۸۰/۸٦ درصد است. در این بررسی مشخص شد که درصد گلبولهای قرمز با هسته تقسیم شده در ماهیان تریپلوئید(۱۳/۵۲٪) بطور معنی داری($P<0/01$) بالاتر از مقدار آن در ماهیان دیپلوئید(۱/۰٦ درصد) است. همچنین در ماهیان تریپلوئید تعدادی(۰/۵۷ درصد) گلبول قرمز دمبلی شکل مشاهده گردید که در هیچیک از ماهیان دیپلوئید این حالت مشاهده نشد. بنظر می رسد افزایش تقسیم هسته گلبولهای قرمز، یک خصوصیت بارز در ماهیان تریپلوئید قزل آلای رنگین کمان است.

واژه های کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، تریپلوئید، گلبول قرمز، سلول دمبلی شکل، هسته تقسیم شده.

*نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۲۱-۲۲٤٤۵۰۷٤، پست الکترونی: johari360@gmail.com

القاء تریپلوئیدی امروزه بعنوان یک روش سودمند در پرورش آزاد ماهیان مطرح است. ماهیان تریپلوئید واجد یک سری کروموزوم اضافه در سلولهای سوماتیک خود هستند، که باعث می شوند، کروموزومها در طی تقسیم میوز بصورت صحیح جفت نشوند. سلولهای جنسی ماهیان تریپلوئید نمی توانند گامتوژنز کاملی داشته در نتیجه این نوع ماهیان عموماً عقیم هستند (۹) و انرژی خود را بجای تولید مثل به مصرف رشد سلولهای بدن می رسانند. همچنین سایر مشکلات مربوط به بلوغ جنسی در آزاد ماهیان تریپلوئید مشاهده نمی گردد.

همزمان با القاء پلی پلوئیدی در برخی ماهیان، پاره ای تغییرات فیزیولوژیک نیز ممکن است ایجاد گردد؛ مثلا در آزاد ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید پاره ای تفاوتها بلحاظ ساختار سلولهای خونی مشاهده می شود، از جمله میزان کل هموگلوبین (Total Blood Hemoglobin) (Hb) و میانگین غلظت سلولهای هموگلوبین Mean Cellular Hemoglobin Concentration (MCHC) در ماهی آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar* تریپلوئید کمتر از ماهیان دیپلوئید است (٤). در قزل آلای جویباری *Salvelinus fontinalis*, تفاوت معنی داری در میزان کل هموگلوبین بین ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید مشاهده نمی شود؛ اگرچه تعداد گلبولهای قرمز در ماهیان تریپلوئید کمتر و اندازه آنها بزرگتر بوده است (۵) .در قزل آلای رنگین کمان

Archive of SID
www.SID.ir

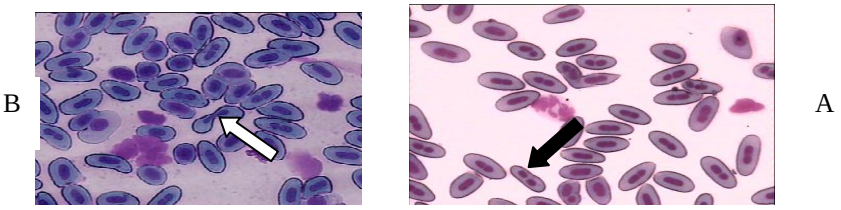
تریپلوئید اندازه گلبولهای قرمز بزرگتر از ماهیان دیپلوئید است ولی تعداد سلولهای قرمز و میزان هموگلوبین خون آنها کمتر از ماهیان دیپلوئید می باشد (۱۰).

در مطالعه اخیر هنگام بررسی گلبولهای قرمز خون ماهیان تریپلوئید حاصل از شوک گرمایی، بعضی از ناهنجاری ساختاری شامل دمبلی شدن(Amitosis) سلولهای قرمز و دو قسمتی شدن هسته (Segmentation) آنها مشاهده شد. این تغییرات اگرچه در مطالعات سایر محققین بر روی ماهیان پلی پلوئید هم گزارش گردیده است (۲), ولی اطلاعات مدونی در مورد فراوانی این سلولهای تغییر شکل یافته در ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلای رنگین کمان در دسترس نیست. از آنجا که تغییرات ساختاری گلبولهای قرمز خون ممکن است بر عملکرد آنها اثر کند، لذا در این بررسی تعیین میزان دقیق این تغییرات مد نظر قرار گرفت.

در این بررسی بمنظور القاء تریپلوئیدی در تخمهای ماهی, ۲۰ دقیقه پس از لقاح آنها, تحت شوک گرمایی ۲۶/۵ درجه سانتی گراد بمدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. ماهیان دیپلوئید(گروه شاهد) بخشی از همان تخمهای لقاح یافته بودند که هیچگونه تیمار گرمایی بر روی آنها انجام نشد. بچه ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید حاصله تحت شرایط کاملاً مساوی، از لحاظ تغذیه و محیط، قرار داده شدند. برای سنجش میزان تریپلوئیدی از روش اندازه گیری ابعاد گلبولهای قرمز (٦) و بررسی تعداد هستکها بوسیله رنگ آمیزی نقاط سازمان دهنده هسته ای (NOR) آنها با نیترات نقره (۷) انجام شد. بمنظور تعیین میزان تغییرات ساختاری گلبولهای قرمز, گسترش خونی ٤۲ عدد ماهی تریپلوئید و ۳۵ عدد ماهی دیپلوئید بررسی گردید. در هر یک از این گسترشهای رنگ آمیزی شده با گیمسا, تعداد ۱۰۰ گلبول قرمز با بزرگنمایی ٤۰۰× مورد مطالعه قرار گرفت. گلبولهایی که هسته آنها تقسیم شده بود و آنهایی که به شکل دمبل درآمده بودند بصورت جداگانه, بعنوان سلولهای قرمز تغییر شکل یافته ثبت شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده ها در نرم افزارSPSS با استفاده از آزمون T غیر جفتی انجام گردید.

سنجش میزان پلوئیدی نشان داد که شوک گرمایی ۲٦/۵ درجه سانتی گراد مورد استفاده بمدت۲۰ دقیقه، در تخمهائی که ۲۰ دقیقه از لقاح آنها می گذشت، باعث القاء تریپلوئیدی به میزان۸۰/۸٦ درصد می گردد.

نتایج بررسی تغییرات ساختاری گلبولهای قرمز خون در ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید نشان داد که تعداد سلولهای قرمز با هسته تقسیم شده (شکل۱، A) در ماهیان تریپلوئید بطور معنی داری بیشتر از ماهیان دیپلوئید است($P<0/01$). این میزان در ماهیان تریپلوئید۱۳/۵۲ درصد و در ماهیان دیپلوئید۱/۰٦ درصد می باشد. هسته این سلولها به دو قسمت تقریبا مساوی تقسیم می شود. همچنین ۰/۵۷ درصد سلولهای قرمز بررسی شده در ماهیان تریپلوئید بصورت دمبلی (شکل۱، B) در آمده اند که این حالت در هیچیک از گلبولهای قرمز ماهیان دیپلوئید مشاهده نمی شود.



شکل۱: A)پدیده تقسیم هسته گلبول قرمز(Segmentation) (پیکان سیاه) و B) دمبلی شدن گلبول قرمز(Amitosis) (پیکان سفید) در ماهی قزل آلای رنگین کمان تریپلوئید(بزرگنمایی٤۰۰*).

Archive of SID
www.SID.ir

در این مطالعه برای تریپلوئیدی حاصل یعنی ۸۰/۸٦ درصد با یافته های Wagner و Coombs (۲۰۰۲) کاملا مطابقت دارد. تقسیم هسته گلبولهای قرمز در ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلای جویباری *Salvelinus fontinalis* توسط Benfey (۱۹۹۹) نیز گزارش شده است. Wlasow و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی دقیق تر سلولهای گلبول قرمز در ماهیان قزل آلای جویباری، دریافتند که فراوانی سلولهای با هسته تقسیم شده در ماهیان تریپلوئید (۱۹/۱ درصد) بطور معنی داری بالاتر از ماهیان دیپلوئید است($P<0/05$). همچنین آن ها مشاهده کردند که تعداد بسیار اندکی از سلولهای گلبول قرمز ماهیان تریپلوئید قزل آلای جویباری بشکل دمبل مانند در آمده اند که این پدیده تحت عنوان Amitosis نامیده می شود.

در مطالعه حاضر انجام شده بر روی ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلای رنگین کمان، نیز مشاهده گردید که تعداد گلبولهای قرمز با هسته تقسیم شده بطور کاملا معنی داری بالاتر از ماهیان دیپلوئید است($P<0/01$). همچنین تعداد ناچیزی (۰/۵۷ درصد) از گلبولهای قرمز مورد مطالعه دمبل شکل می باشند که با نتایج فوق الذکر همخوانی دارد.

اگرچه اثرات احتمالی ناشی از این ناهنجاریهای گلبولهای قرمز هنوز ناشناخته است ولی ممکن است باعث اختلال در بعضی از وظایف آنها از جمله حمل و نقل گازها، در ماهیان تریپلوئید گردد. در مطالعه انجام شده توسط Wlasow و همکاران (۲۰۰۳)، یکی از دلایل احتمالی این ناهنجاریها تکنیکهای بکار رفته برای القاء تریپلوئیدی(همچون زمان بعد از لقاح و مدت شوک دهی) عنوان شده است. در مطالعه این محققین، ۲۰ دقیقه پس از لقاح، از شوک فشار هیدرواستاتیک بمدت ۵ دقیقه برای القاء تریپلوئیدی در قزل آلای جویباری استفاده شد، ولی در بررسی حاضر، ۲۰ دقیقه پس از لقاح، از شوک گرمایی بمدت ۲۰ دقیقه برای القاء تریپلوئیدی در قزل آلای رنگین کمان استفاده گردیده است. بنابر این بنظر می رسد که، نه تنها مدت زمان شوک دهی، بلکه نوع شوک استفاده شده و گونه تحت تیمار نیز در افزایش بروز این پدیده در ماهیان تریپلوئید تأثیری ندارد. از آنجا که در این مطالعه شرایط محیطی که ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید تحت آن قرار داشتند و نیز نوع و میزان تغذیه آن ها کاملاً یکسان است، لذا این پدیده نمی تواند بر اثر شرایط محیطی یا تغذیه ای بوجود آمده باشد. بنابر این بنظر می رسد تقسیم شدن هسته برخی از سلولهای تریپلوئید مسئله ای است که ارتباط مستقیم با افزایش سطوح پلوئیدی دارد.

گلبولهای قرمز خون با هسته تقسیم شده در ماهی کوهو سالمون *Oncorhynchus kistuch* بر اثر کمبود اسید فولیک در جیره نیز مشاهده شده است (۸). وجود اسید فولیک برای شکل گیری طبیعی گلبولهای قرمز خون ضروری است. همچنین این ویتامین در مکانیسمهای انتقال تک کربنه مانند متابولیسم اسیدهای آمینه و بیوسنتز پورینها و پریمیدینها دخیل است. کمبود این ویتامین در ماهی موجب کاهش اشتها و رشد، شکنندگی باله ها، کم خونی، تجمع رنگ دانه های سیاه در پوست، خون مردگی در طحال و کاهش تعداد گلبولهای قرمز می شود (۱). بنابر این مشاهده گلبولهای قرمز غیر طبیعی در ماهیان تریپلوئید ممکن است بر اثر اختلال عملکرد نسخه های ژنی مرتبط با سنتز یا متابولیسم اسید فولیک در ملکول DNA هسته گلبولهای قرمز بوجود آمده باشد. بنابراین بنظر می رسد بمنظور یافتن دلایل مستند در مورد نحوه بروز این ناهنجاریها و ارتباط احتمالی آن با سطوح اسید فولیک در بدن ماهیان تریپلوئید و همچنین اثرات این پدیده ها بر روی این ماهیان، نیاز به بررسی بیشتری دارد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

۱- ۱۳۸۱. راهنمای عملی تغذیه و نهاده های دارویی آبزیان در ایـران. انتشارات سما رنگ.

۲- باقری، ع. ۱۳۸۰. تولید ماهیان قـزل آلای رنگـین کمـان تتراپلوئیـد بوسیله شوکهای گرمایی. پایـان نامـه کارشناسـی ارشـد شـیلات. دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیـت مـدرس. ۷۲ صفحه.

3- Benfey, T. J. (1999). The physiology and behavior of triploid fishes. Reviews in fisheries science. 7(1): 39-67.

4- Benfey, T. J., Suterlin, A. M. (1984). The hematology of triploid landlocked Atlantic salmon *salmo salar*. J. Fish. Biol. 24: 333-338.

5- Benfey, T. J. Biron, M. (2000). Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Aquaculture. 184: 167-176.

6- Perovic, I. S., Coz, R. R., Popovic, N. (2003). Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout. Vet. Med. Czech. 48: 215-219.

7- Phillips, R.B., Zajicek, K. D., Ihseen, P. E., Johnson, O. (1986). Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. Aquaculture. 54: 313-319.

8- Smith, C. E. (1968). Hematological changes in Coho salmon fed a folic acid deficient diet. J. Fish. Res. Bd. Can. 25: 151-156.

9- Smith, D. S., 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.

10- Suresh, A. V., Sheehan, R. J. (1998). Biochemical and morphological correlates of growth in diploid and triploid rainbow trout. Journal of fish biology. 52: 588-599.

11- Wagner, E. G., Coombs, G. (2002). Comparison of the hatchery performance, behavior and post-stocking survival of diploid and triploid fish Lake-Desmet rainbow trout. The ichthyogram. 13(4): 5-8.

12- Wlasow, T., Kucminski, H., Woznicki, P., Ziomek, E. (2003). Blood cell alteration in triploid brook trout *salvelinus fontinalis*. Acta. Vet. Brono. 73: 115-118.

Short paper

Investigation of red blood cell alterations in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Johari., S. A.[1] and Kalbassi., M. R.[2]

[1] Environment Dept., Faculty of Agriculture. Birjand University

[2] Fisheries Dept., Faculty of Marine Sciences. Tarbiat Modares University

Abstract

The subject of this study was investigation of red blood cell alterations in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The triploid rainbow trout were obtained through the application of heat shock of 26.5˚ C for 20 min to eggs 20 min following fertilization. The diploids were not subject to shock. The 3n and 2n fingerlings of rainbow trout were reared under the same condition (environment, feeding). Fish ploidal level was determined by erythrocyte size measurement and gill nucleolus counting (NORs). Triploidy was 80.86% in heat shocked treatment. It was found that the percentage of erythrocytes with segmented nuclei in triploid fish was 13.52% and was significantly higher ($P<0.01$) than that in diploid fish (1.06%). In addition amitosis of red blood cells only seen in triploids (0.57%). It seems that increase of nuclear segmentation is one of the important characteristics for triploid rainbow trout.

Keywords: rainbow trout, triploid, red blood cell, amitotic cell, segmented nuclei.

Archive of SID

www.SID.ir