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

ایمان سوری نژاد[1]، محمدرضا کلباسی[1,*]، صابر خدابنده[2] و مسعود رضایی[1]

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

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

تاریخ دریافت: 86/7/22 تاریخ پذیرش: 87/8/15

چکیده

تولید و پرورش جمعیتهای تمام ماده تریپلوئید از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در صنعت آبزی‌پروری 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 می توان بیان نمود القای تریپلوئیدی بر روی جمعیتهای تمام ماده ماهیان قزل آلای رنگین کمان، باعث توقف قابل توجه روند تکامل تخمدان در این ماهیان و به تبع این امر افزایش رشد پیکری در مقایسه با جمعیت مشابه دیپلوئید می گردد.

واژه های کلیدی: تکامل تخمدان، بافت شناسی, تمام ماده، القای تریپلوئیدی، قزل آلای رنگین کمان*Oncorhynchus mykiss*

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

مقدمه

بلوغ جنسی یکی از مهمترین مشکلات پرورش‌دهندگان در تولید تجاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می باشد (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 گنادها، بروز صفات ثانویه جنسی و ایجاد رفتارهای تولید مثلی خواهد شد(18). همچنین رشد غدد جنسی تغییراتی را در دستگاه گوارش ماهیان به وجود می‌آورد 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 نموده اند 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 گنادهایشان می باشد. 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

خود، 3n کروموزومی محسوب گردیده و بواسطه اختلال در تقسیم میوز به هنگام گامتوژنز 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 آلای رنگین کمان تریپلوئید بسیار بطئی است و بلوغ جنسی حاصل نمی گردد؛ ولی در ماهیان نر تریپلوئید بیضه تکامل یافته و حتی گامت تولید می شود. لذا در این جنس بروز این فرآیند موجب صرف انرژی و در نتیجه کاهش رشد خواهد گردید (20). بنابراین، هدف اصلیِ دستکاریهای کروموزومی، تولید جمعیت تمام ماده تریپلوئید می‌باشد که در آن تکامل گنادها به شدت کاهش یافته است(18).

در سال1999، Sheehan و همکاران با بررسی ماهیان قزل‌آلایی 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 نمی نمایند، 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 می شود 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 می باشند، این امر مورد آزمون و مقایسه قرار گیرد (10). اگر چه در خصوص تغییرات فیزیولوژیکی ناشی از القای تریپلوئیدی در آزاد ماهیان گزارشاتی مشاهده می شود (3 و 9) لیکن تاکنون گزارشی در مورد روند تکامل تخمدان ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل‌آلای 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-آلای رنگین‌کمان شامل جمعیت تمام ماده تریپلوئید (All Female Triploid)(AFT) و جمعیت تمام ماده دیپلوئید (All Female Diploid) (AFD) 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. ماهیانِ 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 معنی‌داری را بین تیمارها نشان نمی‌داد، در 3 حوضچه مربع شکل (ابعاد 1/5× 1/5 × 0/7 متر) به عنوان 3 تکرار برای هر تیمار با تراکم حدود 70 ماهی در هر استخر (حدود 4 کیلوگرم در متر مکعب)، ذخیره‌سازی شدند. تغییرات دمای آب در طول دوره پرورش در محدوده 1 الی 11 درجه سانتی گراد بود (جدول 1). دفعات غذادهی 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 نمی‌گرفت غذادهی قطع می‌گردید.

جدول1 میانگین دمای آب در بخش پرورش قزل‌آلای کارگاه کلاردشت در طول دوره بررسی

ماههای سال	مرداد	شهریور	مهر	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر
میانگین دمای آب (°C)	11	8	6	3	2	1	3	4	7	9	10	11

نحوه سنجش پلوئیدی ماهیان: از آنجا که کاربرد شوکهای دمایی در ماهیان منجر به القای درصدهای متفاوتی از تریپلوئیدی می‌شود 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.

رابطه 1 $S = a \times b \times \pi/4$ (15)

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

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

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 قزل‌آلای رنگین‌کمان 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 می‌شد. این رنگ به وسیله غدد جنسی به آسانی جذب می‌شود. سپس یک عدد لامل بر روی بافت حاصل قرار گرفته و رنگ به همراه بافت به کمک کمی فشار له می‌شد و لام تهیه شده در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار می‌گرفت.

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 (Total Length)(TL)، طول چنگالی (Fork Length)(FL) ، طول استاندارد (SL) Standard Length و عرض بدن (Body Depth)(BD) 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 محلـول بوئـن (Bouin's Solution) تثبیت شد. آزمایشات بافت‌شناسی کلاسیک نمونه‌ها در آزمایشگاه هیستولوژی و مطالعات میکروسکوپیک دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. مطالعات بافت شناسی نمونه ها شامل مراحل آبگیری، شفاف‌سازی، پارافینه‌کردن، قالب‌گیری، برش‌برداری، چسباندن برشها بر روی لام و رنگ‌آمیزی بود. رنگ آمیزی نمونه ها با استفاده از هماتوکسیلین-ائوزین 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(Oil) Droplet Stage، مرحله وزیکول (آلوئلهای کناری)Vesicle (cortical alveoli) Stage ، مرحله زرده سازی(Vitelogenesis Stage) ، مرحله بلوغ یا مهاجرت هسته(Migratory Nucleus Stage) ، مرحله شکست ژرمینال وزیکول و تخمک‌گذاری (Germinal Vesicle Breakdown and Ovulation) و در نهایت مرحله باز جذب(Degeneration Stage) می باشد. مطالعات میکروسکوپیک 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 قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص / تیمار	دیپلوئید تمام ماده	تریپلوئید تمام ماده	نسبت تریپلوئید به دیپلوئید
مساحت سلول μm^2	109/29	180/44	1/46
مساحت هسته μm^2	18/04	26/21	1/46
حجم سلول μm^3	701/87	1370/26	1/6
حجم هسته μm^3	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 نمونه‌برداری 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 قزل‌آلای رنگین‌کمان،

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

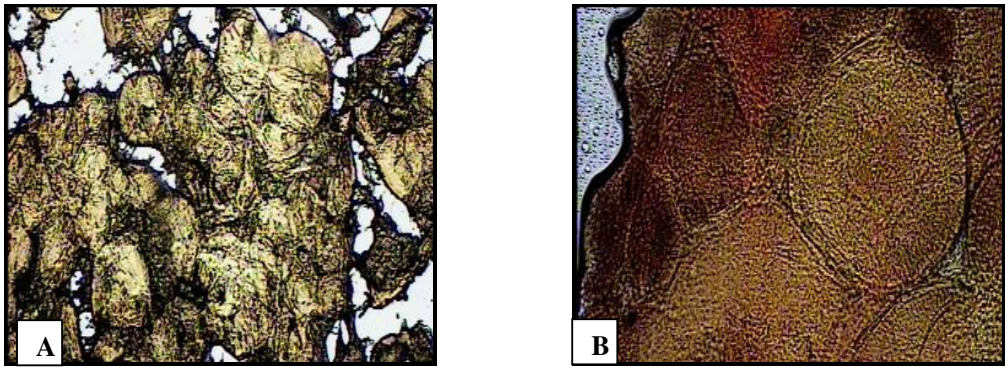
نتایج اندازه گیری ابعاد گلبولهای قرمز نشان داد که روند افزایش حجم هسته نسبت به سایر پارامترها، در هر دو تیمار مورد بررسی از نظم دقیق‌تری پیروی می‌کرد، بنابراین براساس میزان افزایش حجم هسته، درجه پلوئیدی ماهیان در ابتدای آزمایشها مشخص شد.

تعیین جنسیت ماهیان: نتایج استفاده از روش استوکارمن بر گناد ماهیانِ مورد نمونه برداری اگرچه وضوح بالایی نداشت، نشان داد که تولید ماهیان تمام ماده به طور کامل با 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 (شکل1).

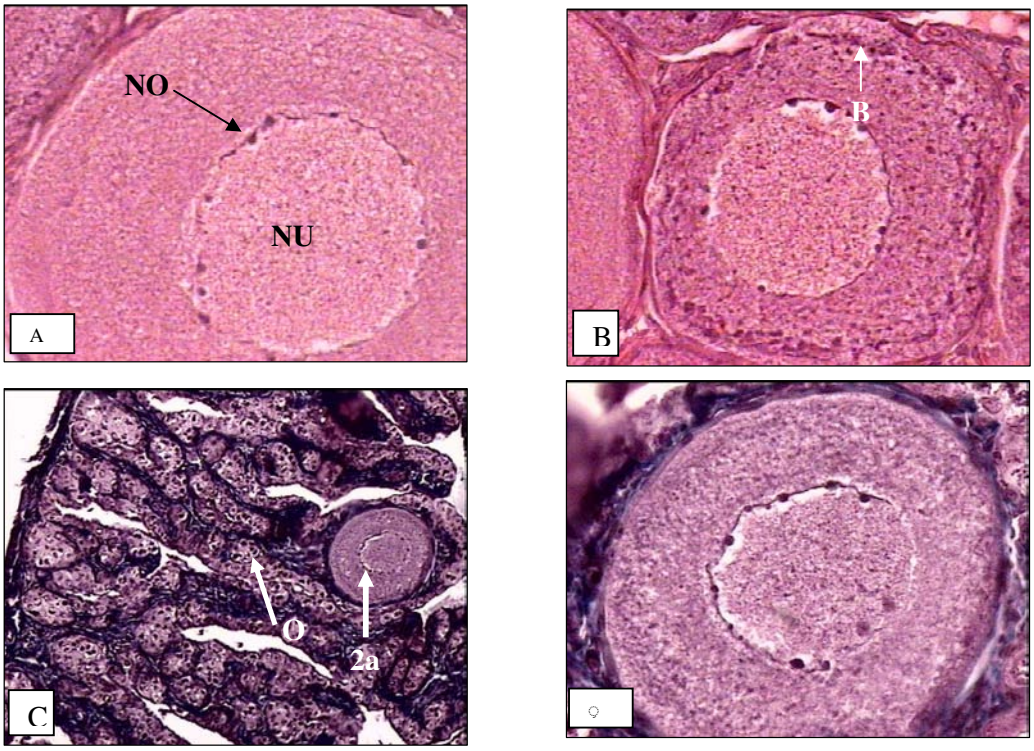
زیست سنجی نمونه ها: نتایج زیست‌سنجی ماهیانِ تمام ماده دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی در جدول3 آمده است. همانگونه که در جدول مذکور مشاهده می شود شاخصهای زیست سنجی نمونه های تریپلوئید از سه ماهه آخر دوره رشد نسبت به ماهیان دیپلوییید افزایش یافته است.

جدول 3 نتایج زیست‌سنجی ماهیانِ تمام ماده تریپلوئید و دیپلوئید قزل آلای 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 قزل‌آلای رنگین‌کمان در رنگ آمیزی با روش استوکارمن A: (100×)؛ B : (400×)



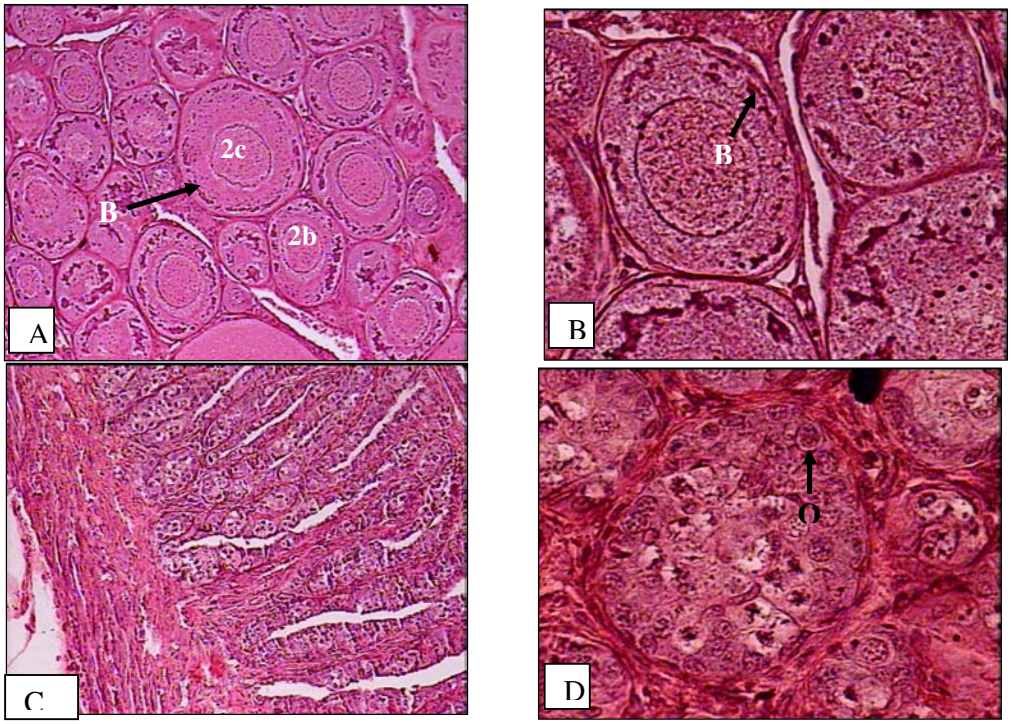
شکل 2 – **اووسیت ماهیان دیپلوئید قزل‌آلا در مرحله 2a** (A) **و 2b** (B) (H&E, ×400) **و اووسیت ماهیان تریپلوئید قزل‌آلا در مرحله 2a** (C) (H&E, ×100) **و** (D) (H&E, ×400) **در مرحله اول نمونه‌برداری (اووگونیا: O , هسته: NU , هستک: NO , جسم بالینی: B)**

تکامل گناد: در تحقیق حاضر و در پایان دوره نمونه-برداری (اردیبهشت)، تخمدان ماهیان دیپلوئید تا مرحله 4 (زیرمرحله 4b) و در ماهیان دیپلوئیدِ نزدیک به بلوغِ 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 مرحله‌ای (6 و 20) تا مرحله 5 که پیشرفته‌ترین تخمدانها را شامل می شود در 6 مرحله مختلف نمونه‌برداری به شرح زیر می باشد:

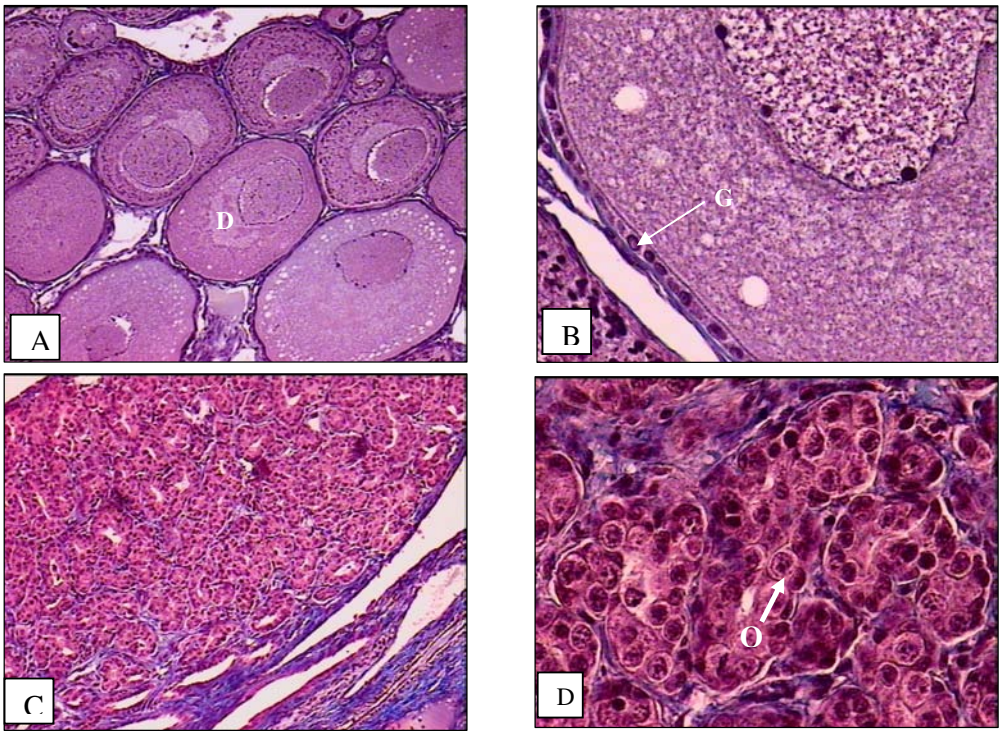
مرحله اول نمونه‌برداری: نظر به اینکه ماهیان تیمار دیپلوئید در ابتدای دوره نمونه‌برداری گنادها حدود 16 ماه سن داشته و همچنین انتقال اووگونیا به مرحله 1 و سپس 2 اووسیتی فرآیندی سریع می باشد، مرحله هستک کروماتینی در این ماهیان مشاهده نشد. اما در ماهیان تریپلوئید اغلب سلولهای جنسی در مراحل ابتدایی و در حد اووگونیا بودند که بیانگر این مرحله می باشد. تنها در یک مورد در مرحله اول، اووسیت مرحله 2a در تخمدان ماهیان تریپلوئید مشاهده گردید(شکل2) و در سایر مراحل نمونه‌برداری، 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 (شکل2). در مرحله 2a سیتوپلاسم

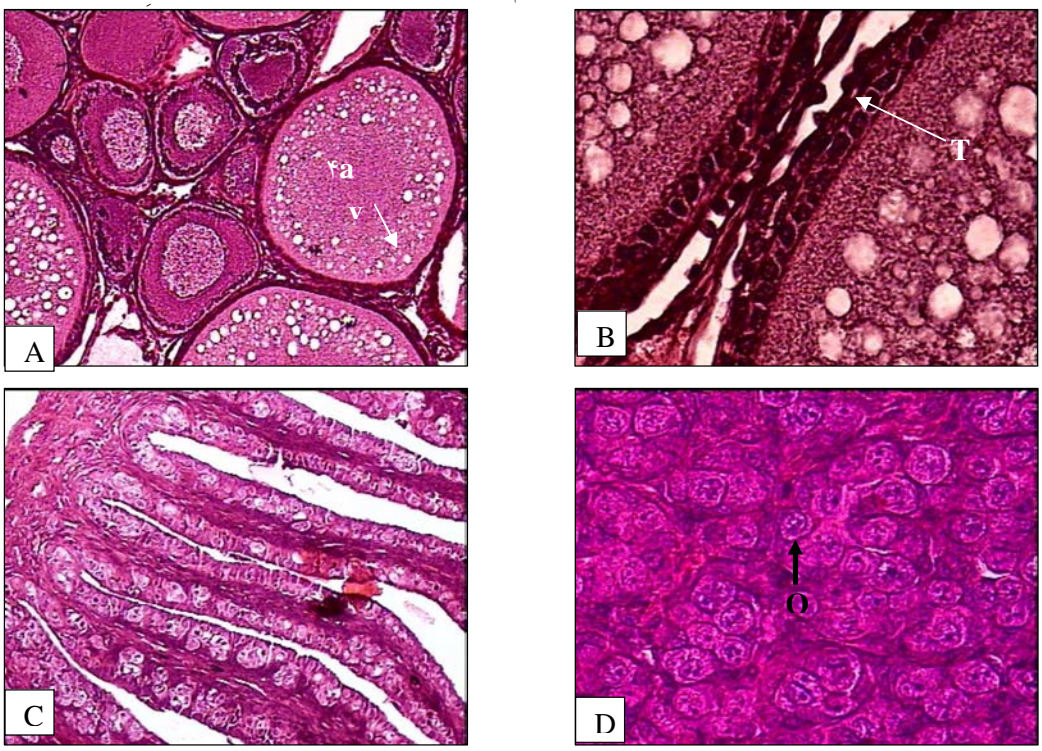
اووسیتها شدیداً باز دوست می‌باشد، در مرحله 2b جسم بالینی در مجاورت هسته ظاهر می‌شود.



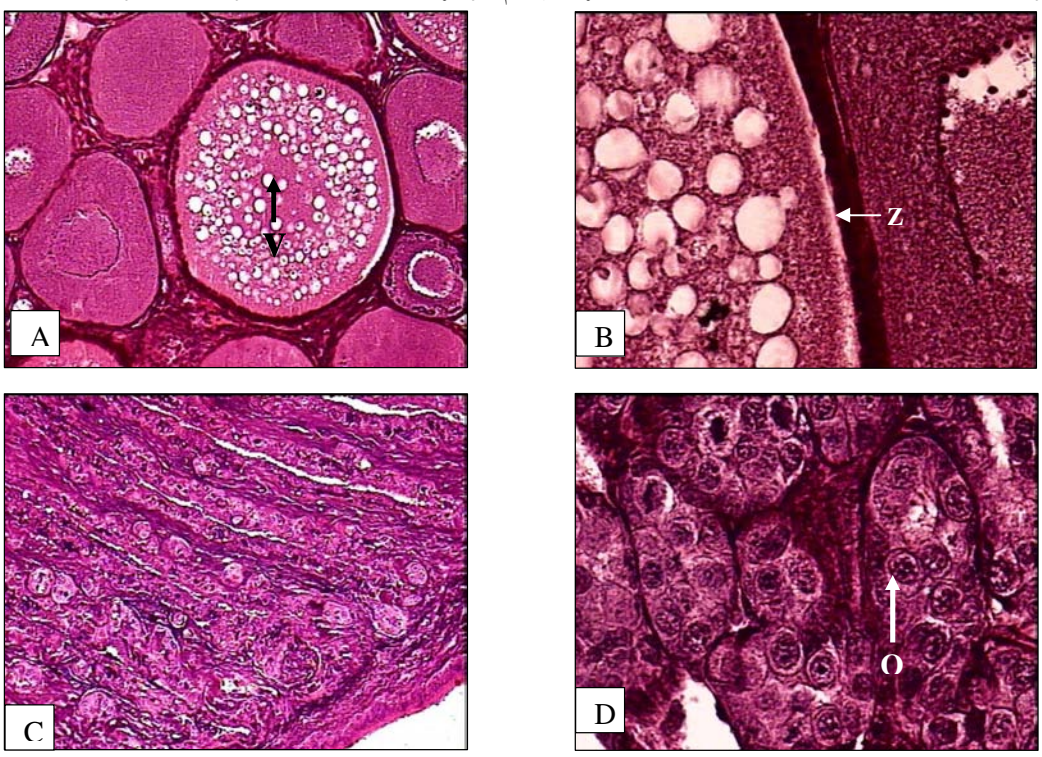
شکل 3 – اووسیت ماهیان دیپلوئید قزل‌آلا در مراحل 2b و 2c (A) (H&E, ×100) و 2b (B) (H&E, ×400) و اووسیت ماهیان تریپلوئید قزل‌آلا در مرحله اووگونیا (C) (H&E, ×100) و (D) (H&E, ×400) در مرحله دوم نمونه‌برداری (جسم بالینی: B , اووگونیا: O)



شکل 4- اووسیت ماهیان دیپلوئید در مرحله 3 تکامل (A) (H&E, ×100) و لایه گرانولوزا (B) (H&E, ×400) و اووسیت ماهیان تریپلوئید در مرحله اووگونیا(C) (H&E, ×100) و (D) (H&E, ×400) در مرحله سوم نمونه‌برداری (لایه گرانولوزا: G , قطرات چربی:D , اووگونیا: O)



شکل 5- اووسیت ماهیان دیپلوئید در مرحله4a (A) (H&E, ×100) و لایه تکا (B) (H&E, ×400) و اووسیت ماهیان تریپلوئید در مرحله اووگونیا(C) (H&E, ×100) و (D) (H&E, ×400) در مرحله چهارم نمونه‌برداری (لایه تکا: T , وزیکول: V , اووگونیا: O)

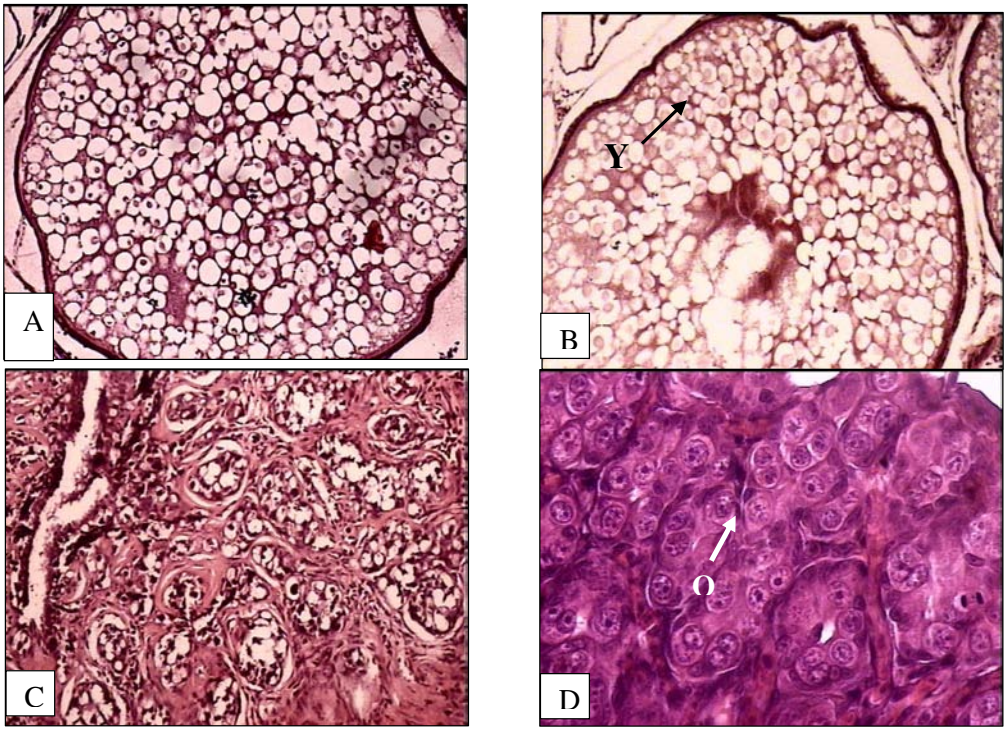


شکل6- اووسیت ماهیان دیپلوئید در مرحله 4b (A) (H&E, ×100) و لایه شفاف (A) (H&E, ×400) و اووسیت ماهیان تریپلوئید در مرحله اووگونیا(C) (H&E, ×100) و (D) (H&E, ×400) در مرحله پنجم نمونه‌برداری (وزیکول:V , لایه شعاعی:Z , اووگونیا: O)

مرحله دوم نمونه‌برداری: در این مرحله تخمدان ماهیان دیپلوئید در مراحل 2b و 2c قرار داشتند (شکل3). در مرحله 2c جسم بالینی به سمت کناره اووسیت حرکت می‌کند. تخمدان ماهیان تریپلوئید در مراحل ابتدایی قرار داشت و اغلب سلولهای جنسی در حد اووگونیا بودند (شکل3).

مرحله سوم نمونه‌برداری: در این مرحله از نمونه‌برداری، اغلب اووسیت ماهیان دیپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان در مرحله 3 تکامل قرار داشتند و قطرات چربی به صورت هلالی و دایره‌وار در اطراف هسته قابل مشاهده بودند. لایه گرانولوزا بخوبی قابل تشخیص بود (شکل4). تخمدان ماهیان تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان در این مرحله از نمونه‌برداری در مراحل ابتدایی تکامل قرار داشتند و اغلب سلولهای جنسی در حد اووگونیا بودند (شکل4).

مرحله چهارم نمونه‌برداری: در این مرحله، اغلب اووسیت ماهیان دیپلوئید در مرحله وزیکول (آلوئلهای کناری) قرار داشتند. انتقال اووسیتها به مرحله 4 بوسیله ظهور وزیکولهای سیتوپلاسمی مشخص می‌شود، این وزیکولها در هنگام رنگ‌آمیزی، اغلب محتویات خود را از دست داده و به صورت حفره‌های توخالی قابل مشاهده بودند. این مرحله به دو زیر مرحله 4a و 4b بر اساس محل و تعداد وزیکولها تقسیم شد. در مرحله چهارم نمونه‌برداری، وزیکولها در کناره سیتوپلاسم سلول ظاهر شدند (زیر مرحله 4a) و لایه تکا نیز قابل مشاهده بود (شکل5). تخمدان ماهیان تریپلوئید همانند مراحل پیشین نمونه-برداری، در مراحل ابتدایی تکامل قرار داشت و اغلب سلولهای جنسی در حد اووگونیا بودند (شکل5).



شکل7- اووسیت ماهیان دیپلوئید قزل‌آلا در مرحله 5 (A) (H&E, ×100) و (B) (H&E, ×400) و اووسیت ماهیان تریپلوئید در مرحله اووگونیا(C) (H&E, ×100) و (D) (H&E, ×400) در مرحله ششم نمونه‌برداری (گرانول زرده:Y , اووگونیا: O)

مرحله پنجم نمونه‌برداری: در این مرحله، اووسیت ماهیان دیپلوئید در زیرمرحله 4b قرار داشتند و وزیکولها نسبت به مرحله پیشین به‌تدریج به سمت هسته امتداد یافته بودند. لایه شعاعی بین لایه گرانولوزا و سیتوپلاسم اووسیت قابل مشاهده بود. پیشرفته‌ترین تخمدان ماهیان تیمار دیپلوئید در زیرمرحله 4b قرار داشتند (شکل6). تخمدان ماهیان تریپلوئید همچنان در مراحل ابتدایی تکامل قرار داشت و اغلب سلولهای جنسی در حد اووگونیا بودند (شکل6).

مرحله ششم نمونه‌برداری: در نمونه‌های این مرحله که مربوط به تیمار خرداد می‌باشد، اووسیت ماهیان دیپلوئید در مرحله زرده‌سازی 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 می‌یابد. اووسیتهای 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. پیشرفته‌ترین تخمدان ماهیان دیپلوئید مرحله آخر در مرحله 5 قرار داشتند (شکل7). تخمدان ماهیان تریپلوئید همچنان در این ماه نیز در مراحل ابتدایی تکامل قرار داشت و اغلب سلولهای جنسی در حد اووگونیا بودند (شکل7).

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 قزل‌آلای رنگین‌کمان، Nakamura و همکاران در سال1987 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 آلای 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 آلای رنگین کمان اشاره می نمایند(5،14). 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 ویتلوژنین و رشد اووسیت در مقایسه با همتای 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 قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به تخمدان ماهیان دیپلوئید در مراحل پایین‌تری 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 نمونه‌برداری 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 می‌گرفت و تا مرحله آخر دوره نیز هیچ گونه پیشرفتی با افزایش سن ماهی دیده نشد. وجود اووسیتهایی در مرحله 2 در ماهیان تریپلوئید در کنار اووگونیا شاهد دیگری بر وجود تخمدانهای دسته ای در ماهیان قزل‌آلای

رنگین‌کمان می‌باشد که حداقل دو گروه متمایز و متفاوت از اووسیتهای در حال رشد در تخمدان آنها قابل مشاهده است که در مورد ماهیان دیپلوئید نیز همانگونه که بیان گردید این مطلب صدق می‌کرد. در ماهیان دیپلوئید پیشرفت مراحل تکاملی تخمدان به وضوح قابل مشاهده بود و با ادامه مراحل نمونه‌برداری و افزایش سن ماهیان تا زمان آخرین نمونه‌برداری در انتهای دوره، اووسیتها پیشرفت زیادی را از نظر مراحل تکاملی نشان می‌دادند و تا مراحل بالاتر پیش رفتند.

عموماً در ماهیان تریپلوئید رشد تخمدان به مقدار زیادی متوقف می‌شود ولی در ماهیان ماده دیپلوئید اووسیتهای بزرگ تولید می شود. بدین صورت که در ماهیان دیپلوئید، اووسیتهایی که در مرحله متافاز میوز یک به سر می برند در طی زرده سازی رشد زیادی می‌کنند ولی اغلب سلولهای جنسی در ماهیان تریپلوئید در مرحله پروفاز میوز یک بواسطه اختلال در تقسیم میوز و جفت نشدن صحیح کروموزومهای هومولوگ متوقف شده و رشد زیادی از خود نشان نمی‌دهند و بنابراین منجر به تخمدانهای کوچک با تعداد کمی اووگونیای قبل از مرحله زرده سازی و اووسیتهای اولیه می‌گردد(5). رشد زیاد اووسیتها قبل از اوولاسیون در دیپلوئیدها به علت جذب پروتئینهای زرده است که از ویتلوژنین مشتق می‌گردند. ویتلوژنین بوسیله کبد با تحریک استروژنهای تخمدان سنتز می‌شود. مقادیر کم استروژنها در ماهیان ماده تریپلوئید به دلیل عدم پیشرفت مراحل تکاملی تخمدان در این ماهیان و سنتز هورمونها از لایه فولیکولی می‌باشد. اووسیتهای اولیه به طور معمول در ماهیان دیپلوئید در فولیکولهایی احاطه می‌شوند که دارای سلولهای تخصصی برای سنتز و ترشح استروئیدها می‌باشند. اغلب اووسیتها تا این مرحله در ماهیان تریپلوئید رشد نکرده و در نتیجه ماهیان ماده تریپلوئید به طور معمول علائم ترشح هورمونهای غدد درون ریز مرتبط با بلوغ جنسی را نشان نداده و نسبت به ماده‌های دیپلوئیدِ در حال بلوغ، ویتلوژنین پلاسمایی بسیار کمتر (5 و13) دارند که باعث می‌شود پروتئینهای زرده به مقدار کافی تولید نشده و در نهایت منجر به عدم رشد اووسیتها در مرحله زرده سازی می‌گردد.

در جمع بندی نهایی یافته های این تحقیق مؤید این مطلب است که تکامل اووسیت در ماهیان تریپلوئید قزل آلای 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 آبزی 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 آزادماهیان شهید باهنر کلاردشت مهندس پاشا زانوسی و جناب آقایان مهندس رضوانی، مهندس ادیب، مهندس گلشاهی، مهندس میار، مهندس اکبرآبادی و سایر پرسنل زحتمکش 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.

منابع

1- جوهری، سید علی، 1384، تولید و پرورش جمعیت تمام ماده دیپلوئید و تریپلوئید قزل آلای رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه تربیت مدرس، 75 صفحه.

2- درافشان، سالار، 1385، دستکاریهای کروموزومی ماهی ازاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* و مقایسه رشد در نسل F_1، رساله دکتری شیلات، دانشگاه تربیت مدرس، 142 صفحه.

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 آلای رنگین کمان در

فصل زمستان، مجله ژنتیک نوین، دوره دوم، شماره 2، صفحه 51-58.

4- طلا، مریم، 1380، بهینه سازی تیمار هورمون 17 آلفا متیل تستوسترون به منظور ایجاد تغییر جنسیت و عقیمی در ماهی قزل- آلا، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران، 250 صفحه.

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 Cumaranatunga, 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 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 Phisiology of Three Age Classes of Adult Female Diploid and Triploid Brook Trout. Fish Phisiology 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, Kirubagaran, 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. Stadies 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.

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*