

تکه برداری به روش جراحی و مطالعه بافت شناسی گناد تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پرورشی

علی حلاجیان* رضوان‌اله کاظمی محمود محسنی سهراب دژندیان ایوب یوسفی جوردهی محسن بهمنی محمد پوردهقانی
محمد علی یزدانی هوشنگ یگانه

بخش فیزیولوژی و بیوشیمی، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت - ایران.

(دریافت مقاله: ۳۱ تیر ۱۳۸۹، پذیرش نهایی: ۵ دی ماه ۱۳۸۹)

چکیده

سلول‌های جنسی در ماهیان نر کوچک و میکروسکوپی است، در حالی که تخمک‌های رسیده ماهیان ماده را می‌توان با چشم غیر مسلح مشاهده کرد. با توجه به این‌که ماهیان خاویاری در سنین نسبتاً بالایی به بلوغ جنسی می‌رسند، بنابراین یکی از راه‌های مهم و قابل اطمینان جهت تشخیص و جداسازی نر و ماده از همدیگر در سنین پایین، تکه برداری از بافت گناد و عملیات بافت‌شناسی روی گناد فیکس شده می‌باشد. بدین منظور جهت تشخیص و تعیین مراحل رسیدگی جنسی، گناد ۸۱ عدد از تاسماهیان ایرانی پرورشی ۴ ساله پرورش یافته در وان‌های فایبرگلاس از طریق تکه برداری مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌های فیکس شده بعد از عملیات بافت‌شناسی بر اساس روش‌های مرسوم، به کمک میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. در این بررسی بر اساس یافته‌های بافت‌شناسی، ۳۰ عدد از تاسماهی ایرانی نر (۳۷ درصد) و ۵۱ عدد از آنها ماده (۶۳ درصد) بودند. این ماهیان از لحاظ مراحل رسیدگی جنسی، ۱۶ درصد در مرحله I، ۲۳/۵ درصد در I-II، ۵۹/۳ درصد در مرحله II و ۱/۲ درصد در مرحله III رسیدگی جنسی بودند. در این بررسی با توجه به سن و شرایط پرورش یکسان، ماهیان ماده از لحاظ تعداد نسبت به ماهیان نر بیشتر بودند و از نظر رسیدگی جنسی در مرحله پایین تری قرار داشتند.

واژه‌های کلیدی: تاسماهی ایرانی پرورشی، تکه برداری، مراحل رسیدگی جنسی.

وزنی معادل ۶۰ تا ۱۳۰ کیلوگرم دارد و طولش به ۱ تا ۲ متر می‌رسد. سن بلوغ آن در شرایط طبیعی در مولدین نر بین ۶ تا ۹ سال و در مولدین ماده بین ۱۰ تا ۱۴ سال می‌باشد (۱۳).

اولین مطالعات صورت گرفته در زمینه تشخیص و تفکیک مراحل رسیدگی جنسی ماهیان خاویاری در شرایط پرورشی در ایران به پروژه تحقیقاتی مشترک بین انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری و انستیتو کاسپین‌ریخ روسیه در سال ۱۳۷۶ که به بررسی روند رشد و تکامل سیستم تولید مثلی در ماهیان خاویاری پرورش یافته در سنین ۱، ۲ و ۶ سالگی از طریق مطالعات بافت‌شناسی می‌پردازد، باز می‌گردد (۳). ۱۳۸۳ از فیل ماهیان پرورش یافته در کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری نواحی جنوبی دریای خزر و همچنین گزارش‌های Hallajian و همکاران در سال ۲۰۰۵ و ۱۳۸۶ از تاسماهی شیپ پرورشی که از طریق تکه برداری تعیین جنسیت گردیده بودند، از دیگر مطالعات انجام یافته در این خصوص می‌باشد.

این مطالعه با هدف تعیین مراحل رسیدگی جنسی و تفکیک جنسیت تاسماهیان ایرانی پرورشی ۴ ساله پرورش یافته در حوضچه‌های فایبر گلاس به انجام رسید.

مواد و روش کار

مواد مورد نیاز: بافت‌شناسی گناد تاسماهی ایرانی با هدف تشخیص،

مقدمه

تاسماهیان از ماهیان غضروفی - استخوانی (Chondrostei) دوران اولیه هستند و حدود ۲۰۰ میلیون سال پیش از ماهیان استخوانی جدا شدند بطوری‌که به فسیل زنده معروف هستند، تاسماهیان از ماهیان مهاجر به رودخانه (آنادر موس) دریای خزر هستند که عمده عمر خود را در دریا سپری می‌کنند و نسبتاً دیر به سن بلوغ جنسی می‌رسند به طوری‌که بر حسب گونه و جنسیت بین ۵ تا ۱۸ سال به طول می‌انجامد (۱۳) و پس از رسیدن به سن بلوغ جهت تخم‌ریزی وارد رودخانه‌ها می‌شوند. ماهی‌های نر زودتر از جنس ماده به مرحله بلوغ جنسی می‌رسند اصولاً تاس ماهیان از نظر سرعت رشد بطئی بوده و جزو ماهیان با عمر نسبتاً طولانی هستند (۹). دریای خزر از مهم‌ترین حوض‌های آبی است که از لحاظ خاویار شهرت جهانی داشته و مهم‌ترین زیستگاه طبیعی ۵ گونه از تاسماهیان (تاسماهی ایرانی، *Acipenser persicus*، تاسماهی روسی، *Acipenser gueldenstaedtii*، تاسماهی شیپ، *Acipenser nudiventris*، ازون برون، *Acipenser stellatus* و فیلماهی، *Huso huso* می‌باشد که بیش از ۹۰ درصد خاویار جهان را تأمین می‌کند، و بخش اعظمی از خاویار تولیدی ایران مربوط به تاسماهی ایرانی بوده و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۶).

گونه تاسماهی ایرانی از ماهیان فراوان حوزه جنوبی دریای خزر است،



روش های آمار عمومی ANOVA و نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

زیست سنجی: نتایج به دست آمده از زیست سنجی ماهیان جراحی شده نشان می دهد که حداقل، حداکثر و متوسط وزن آنها به ترتیب ۴/۲، ۸/۸ و ۵/۳ کیلوگرم و حداقل، حداکثر و متوسط طول کل آنها به ترتیب ۸۹/۵، ۱۲۹/۳ و ۱۱۲/۵ سانتیمتر بوده است.

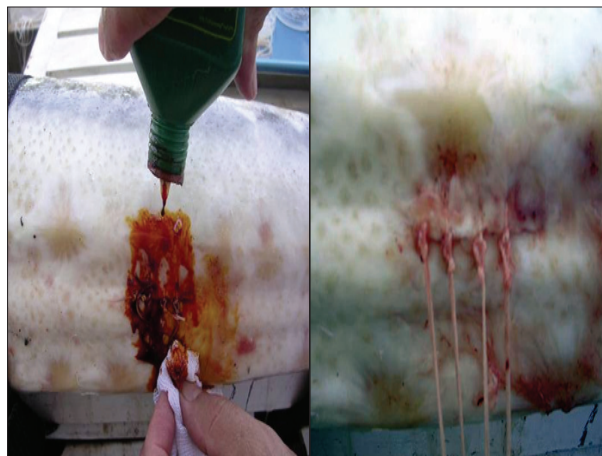
تعیین جنسیت: بررسی های به عمل آمده از تکه برداری ۸۱ عدد از ماهیان ۴ ساله پرورشی نشان داد که ۵۱ عدد از ماهیان ماده بودند و از لحاظ تعداد و مراحل رسیدگی جنسی ۱۱ عدد یعنی ۲۱/۶ درصد در مرحله I، ۱۴ عدد یعنی ۲۷/۴ درصد در مرحله I به II و ۲۶ (تصویر ۲) عدد یعنی ۵۱ درصد در مرحله II رسیدگی جنسی قرار داشتند (تصویر ۳).

۳۰ عدد از ماهیان نر بودند و از لحاظ تعداد و مراحل رسیدگی جنسی ۲ عدد یعنی ۶/۷ درصد در مرحله I، ۵ عدد یعنی ۱۶/۷ درصد در مرحله I به II، ۲۲ عدد یعنی ۷۳/۳ درصد در مرحله II (تصویر ۴) و ۱ عدد یعنی ۳/۳ درصد در مرحله III رسیدگی جنسی قرار داشتند. نمودار ۱ مقایسه درصد مراحل رسیدگی جنسی بین نر و ماده و همچنین نمودار ۲ درصد فراوانی مراحل رسیدگی جنسی در ۸۱ عدد از تاسماهی ایرانی پرورشی را نشان می دهد.

بحث

آگاهی از چگونگی تعیین جنسیت و مراحل مختلف رسیدگی جنسی به منظور رعایت عدم صید ماهیان خاویاری نارس از دریا و یا برنامه ریزی علمی کاربردی به منظور استحصال خاویار و تولید گوشت از ماهیان پرورش یافته در مزارع پرورشی از طریق جدا سازی ماهیان ماده از نر در سنین پایین با توجه به سن رسیدگی جنسی ماهیان خاویاری، به روش تکه برداری بسیار مهم و با اهمیت می باشد (۸). اولین مرحله رسیدگی جنسی با ظهور یاخته های گونی شروع و به رشد پروتوپلاسمیک محل تشکیل سلول های گونی ختم می گردد. مراحل رشد به گندی صورت می گیرد. بنابراین براساس حضور انواع یاخته های گامتوژنیک که به طور غالب در گناد ماهیان یافت می شوند، می توان مراحل رسیدگی جنسی را پیش بینی کرد (۴). تجزیه و تحلیل وضعیت غدد جنسی تاسماهی ایرانی مورد آزمون در شرایط پرورش مصنوعی و مقایسه آنها با ماهیان هم سن در محیط طبیعی (۶) و شرایط پرورشی دیگر (۳، ۵، ۱۱) بیانگر عدم همسانی مراحل رشد غدد جنسی از دیدگاه بافت شناسی است.

تکامل تخمدان ها در ماهیان خاویاری بیشتر از آن که به سن آنها بستگی داشته باشد، تابع اندازه بدن و شرایط محیطی آنها می باشد به طوری که تحقیقات انجام شده روی رسیدگی جنسی ماهیان پرورشی در مقایسه با ماهیان طبیعی به اثبات رسیده است. در طبیعت اولین رسیدگی جنسی بیشتر گونه های ماهیان خاویاری در سنین ۵ تا ۲۰ سالگی (۵) در تاسماهی ایرانی بین ۹ تا ۱۵ سالگی (۱۰) رخ می دهد در حالی که اولین سن



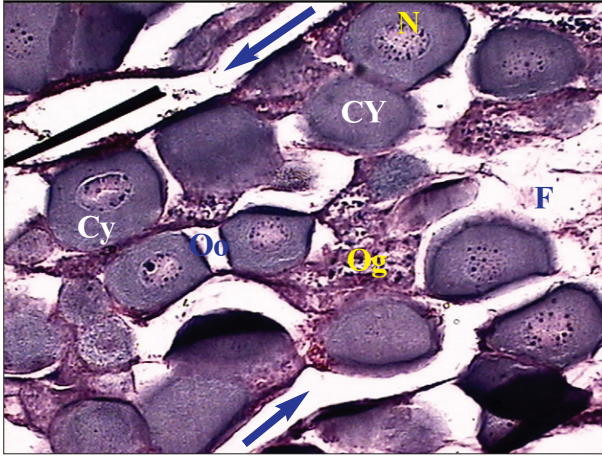
تصویر ۱ - نمایی از بخیه و ضد عفونی کردن محل جراحی شده در تاسماهی ایرانی.

تعیین مراحل و جداسازی ماده از نر در ۸۱ عدد از این ماهیان پرورشی ۴ ساله پرورش یافته در حوضچه های فایبرگلاس کنترل شده در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان که در طول دوره پرورش با غذای کنسانتره (با توجه به نیازمندی های غذایی) تغذیه می شدند، به روش تکه برداری از بافت گناد در ماهی زنده به انجام رسید.

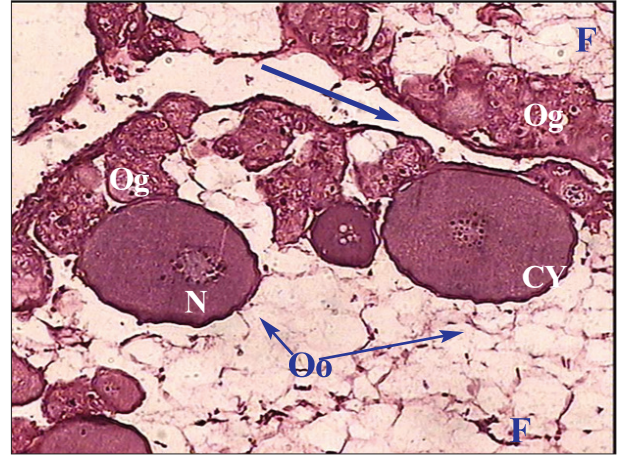
برای تعیین مراحل رسیدگی جنسی تاسماهیان ایرانی علاوه بر پودر گل میخک جهت بیهوش نمودن ماهی، وسایل جراحی (تیغ و دسته اسکالپل، قیچی، پنس، نخ و سوزن جراحی)، سرنگ جهت تزریق آنتی بیوتیک، محلول فیکساتیو بوئن و ظرف نمونه برداری در آزمایشگاه بافت شناسی به مواد شیمیایی (براساس روش های مرسوم بافت شناسی) و میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین می باشد.

ابتدا ماهیان به کمک محلول پودر گل میخک با غلظت ۲۰۰ گرم در ۳۰۰ لیتر آب بیهوش، بیومتری و سپس مورد جراحی واقع شدند. در ماهیان بیهوش شده از ناحیه چهارمین صفحه استخوانی شکمی از سمت دم به طرف سر، با تیغ اسکالپل شکافی به طول ۳ تا ۵ سانتیمتر ایجاد، و تکه کوچکی از گناد به وسیله قیچی و پنس از حفره شکمی ماهی خارج و در محلول بوئن فیکس شدند. پس از تکه برداری از گناد محل شکاف بخیه و ضد عفونی شد (۱۲) (تصویر ۱). نمونه های فیکس شده در محلول بوئن به آزمایشگاه بافت شناسی بخش فیزیولوژی و بیوشیمی انستیتو انتقال یافتند. نمونه ها توسط الکل با درجات مختلف و کلروفرم آب گیری و شفاف سازی شدند. پس از شفاف نمودن، گنادها به وسیله پارافین مذاب پارافینه و قالب گیری گردیدند (۳، ۱۴)، با استفاده از میکروتوم از قالب های پارافینه حاوی بافت گناد برش های بافتی به ضخامت ۷ میکرون (۱) تهیه و برش های بافتی به روش هماتوکسلین - اتوزین رنگ آمیزی شدند. نمونه ها پس از رنگ آمیزی به وسیله میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین و متصل به کامپیوتر مورد مطالعه قرار گرفتند. تجزیه تحلیل داده های حاصل از انجام آزمایشات از

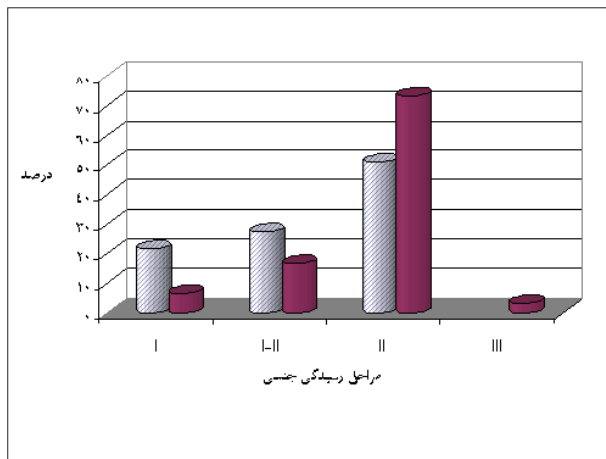




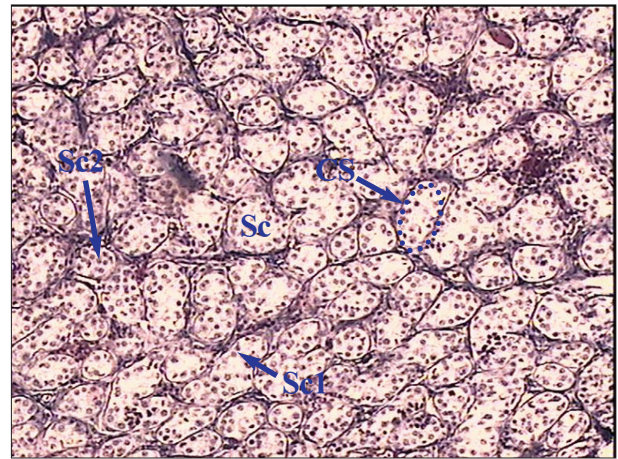
تصویر ۳- برش عرضی بافت تخمدان تاسماهی ایرانی پرورشی در مرحله II رسیدگی جنسی. اووگونی (og)، بافت چربی (F)، اووسیت (Oo)، هسته (N)، سیتوپلاسم (CY)، شیار تخمدانی (پیکان) (H&E, X ۲۵۰).



تصویر ۲- برش عرضی بافت تخمدان تاسماهی ایرانی پرورشی در مرحله II رسیدگی جنسی. اووگونی (og)، بافت چربی (F)، اووسیت (Oo)، هسته (N)، سیتوپلاسم (CY) و شیار تخمدانی (پیکان) (H&E, X ۴۵۰).



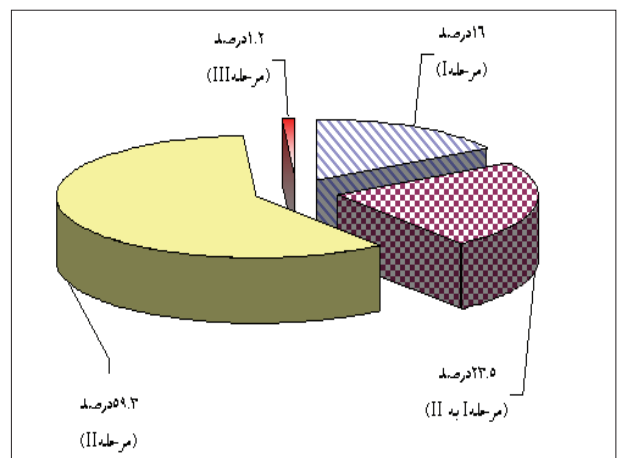
نمودار ۱- مقایسه درصد مراحل رسیدگی جنسی نر و ماده در تاسماهی ایرانی پرورش مورد مطالعه. نر (■) ماده (□)



تصویر ۴- برش عرضی بافت بیضه تاسماهی ایرانی پرورشی در مرحله II رسیدگی جنسی. اسپرماتوسیت (Sc)، اسپرماتوسیت اولیه (Sc1)، اسپرماتوسیت ثانویه (Sc2)، کیسه های اسپرمی (Cs) (H&E, X ۲۲۵۰).

رسیدگی جنسی گونه های پرورشی در مطالعات مختلف در فاصله ۱۰ - ۳ سالگی گزارش شده است (۱۲).

از روی ترکیب اووسیت ها می توان به نوع رشد تخمدانی پی برد و وضعیت رسیدگی جنسی آنها را مورد مطالعه قرار داد. در این پژوهش نیز همانند تحقیقات سایر محققین مشخص شد که تخمدان مرحله I-II رسیدگی جنسی با رشد سلول های اووگونی توام با اووسیت های اولیه همراه بود و وجود هسته بزرگ و سیتوپلاسم کم از نشانه های این مرحله می باشد (تصویر ۲). تخمدان مرحله II رسیدگی جنسی مشاهده شده نیز دارای اووسیت های اولیه، نسبت هسته آنها به سیتوپلاسم در اووسیت بیشتر بود، در این مرحله اووسیت ها گرد نبوده ولی وجود هسته کروی شکل ابتدا در قسمت داخلی غشاء و سپس در سیتوپلاسم از نشانه های این مرحله می باشد (تصویر ۳)، همچنین غشاء اووسیت در این مرحله به طور واضح دیده نمی شود (۸). از نشانه های بارز مرحله II رسیدگی جنسی می توان به بافت چربی، رشد سیتوپلاسم (۲) و کوچک



نمودار ۲- درصد فراوانی مراحل رسیدگی جنسی در تاسماهیان ایرانی پرورشی ۴ ساله مورد مطالعه.



References

1. Akhundov, M. M., Fedorov, K. Ye. (1995). Effect of exogenous estradiolon ovarian development in juvenile sterlet (*Acipenser ruthenus*). J. Ichthyol. 33:109-120.
2. Altufyev, Yu.V., Romanov, A.A., Dakuyul, A.P. (1986). Methods of gonadal study of different species of Acipenseridae. Translated by Sadrayee, S.H., Kazemi, R., Bahmani, M. International Sturgeon Research Institute Publications, Rasht, Iran.
3. Bahmani, M., Kazemi, R. (1998). Histological study on gonad in juvenile reared sturgeon. Iranian Scientific Fisheries Journal. 1:1-16.
4. Crim, L.W., Glebe, B.D. (1990). Reproduction, In: Methods for Fish Biology, Schreck, C.B., Moyle, D.S., eds. American Fisheries Society, Bethesda, USA. p. 529-553.
5. Doroshov, S.L., Moberg, G.P., VanEennamm, J.P. (1997). Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon *Acipenser transmontanus*. Environ. Biol. Fish. 48:265-278.
6. Eliasov, V. (1996). Sexual maturation stages control of sturgeon gonad. Translated by Sadrayee, Kazemi and Bahmani. (1998). International Sturgeon Research Institute Publications, Rasht, Iran.
7. Hallajian, A., Kazemi, R., Mohseni, M., Bahmani, M., Yousefi, A. (2007). Determination of sex and sexual maturation stages in cultured *Acipenser nudiventris* using biopsy method. Iranian Scientific Fisheries Journal. 16: 65-72.
8. Hallajian, A., Kazemi, R., Dejandian, S., Yousefi, A. (2009). Sturgeon Gonad Histology (Detection of sexual maturation stages). International Sturgeon Research Institute Publications, Rasht, Iran.
9. Holcik, J. (1989). The freshwater fishes of Europe. Vol I/II. General Introduction to fishes Acipenseriformes. Aula-Verlag Wiesbaden. Germany.
10. Hoseinzadeh Safi, H. (2001). Reproduction biology of fishes with emphasized on Iranain fishes. Aquaculture development deputy. Administration and promotion office. Jahade Daneshgahi Publication, Tehran, Iran.
11. Kazemi, R., Hallajian, A., Bahmani, M., Parandavar,

شدن هسته اشاره کرد. حفره غدد جنسی نر به شکل یک بیضی کوچک که با خود سلول های اسپرماتوگونی غیر فعال را به همراه دارد می باشد (۱۵) مرحله II رسیدگی جنسی نر با افزایش اسپرماتوگونی، تشکیل حفرات منی که به صورت دسته ای کنار هم قرار دارند تشکیل کیسه های اسپرمی را می دهند (تصویر ۴).

مطالعات انجام شده نشان داد که نسبت ماهیان ماده به نر بیشتر بوده به طوری که مطالعات میکروسکوپی ۶۳ درصد ماده (۲۱/۶ درصد در مرحله I، ۲۷/۴ درصد در مرحله II-I، ۵۰ درصد در مرحله II رسیدگی جنسی) و ۳۷ درصد نر (۶/۷ درصد در مرحله I، ۱۶/۷ درصد در مرحله II-I، ۷۳/۳ درصد در مرحله II و ۳/۳ درصد در مرحله II-III رسیدگی جنسی) بود (نمودار ۱). ماهیان نر در سنین پایین تری نسبت به ماهیان ماده به بلوغ می رسند و چرخه تولید اسپرم ترجیحاً بسرعت و با همزمان شدن سن و اندازه بدن بین نرها و ماهیان ماده رخ داده. در مطالعه حاضر نیز تاسماهی ایرانی نسبت به ماده از لحاظ مرحله رسیدگی جنسی زودتر به سن بلوغ می رسند. مطابق نمودار ۱ تمامی ماهیان ماده تا مرحله II رسیدگی جنسی قرار داشتند و بالاتر از این مرحله در ماهیان ماده مشاهده نشد در حالی که مرحله III رسیدگی جنسی در نرها دیده شده است.

وضعیت ماهیان پرورشی تکه برداری شده مطلوب بوده، به طوری که بیشترین تعداد ماهیان تکه برداری شده با ۴۸ عدد (۵۹/۳ درصد) در مرحله II رسیدگی جنسی بودند (نمودار ۲) که در این بین ماده ها با ۲۶ عدد نسبت به نرها با ۲۲ عدد بیشتر بود در صورتی که مرحله III رسیدگی جنسی تنها در ماهیان نر دیده شده است (نمودار ۱). نتایج نشان داد که در شرایط پرورشی می توان زمان بلوغ جنسی تاسماهی ایرانی را کوتاه کرد و در نرها این زمان را می توان به ۵ سال (در شرایط طبیعی ۹ سال) تقلیل داد.

تاسماهی شکلان دارای سن بلوغ متغییر هستند که ممکن است تحت تأثیر عوامل محیطی و میزان رشد باشند. علت تغییر پذیری وسیع در میزان رشد و نمو تخمدان و بیضه ماهیان پرورشی ممکن است به وسیله استرس های پرورش و تنازع بقا توصیف شده در تراکم های بالای پرورش ماهی که معمولاً در مزارع تجاری به کار می روند، به وجود آید.

همچنین اختلافات وابسته به جنس در مورد سن بلوغ و طول چرخه تولید مثلی قبلاً در تاسماهی شکلان پرورشی و طبیعی گزارش شده بود (۹). به طوری که ماهیان نر در سنین پایین تری نسبت به ماهیان ماده به بلوغ می رسند. در مطالعه حاضر نیز تاسماهی ایرانی نر که ۳/۳ درصد از آنها در مرحله III رسیدگی قرار داشتند زودتر از ماده ها به سن بلوغ جنسی می رسند.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکارانی که به نحوی در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند بویژه آقای بهزاد پور تشکر و قدردانی می نمایم.



- H., Dejandian, S, Pourdehghani, M. and Yousefi, A. (2003). Report on sex determination of farmed *Huso huso* 3 and 4 - year - old in rearing and propagation complex of Shahid Rjaiee. International Sturgeon Research Institute Publications, Rasht, Iran.
12. Kazemi, R; Hallajian, A., Bahmani, M., Parandavar, H., Dejandian, S., Pourdehghani, M., Yousefi, A. (2004). Final report on sex determination of farmed *Huso huso* in sturgeon rearing and propagation complex of Iran by biopsy. International Sturgeon Research Institute Publications, Rasht, Iran.
13. Kohne Shahri, M., Azari Takami, G.(1974). Sturgeon breeding and rearing. University of Tehran Publications, Tehran, Iran.
14. Pousti, I., Adib Moradi, M. (2003). Comparative Histology and Histiotechnique. University of Tehran. Publications, Tehran, Iran.
15. Trosov, V. (1964). Some characteristics of sexual maturation stages in *Acipenser guldenstaedtii*. Translated by Sdraie, Kazemi and Bahmani.(1998). International Sturgeon Research Institute Publications, Rasht, Iran.
16. Vosoghi, Gh., Mostajir, B. (2004). Fresh Water Fishes. University of Tehran publications, Tehran, Iran.



BIOPSY AND HISTOLOGICAL STUDY OF GONADS FROM FARMED *ACIPENSER PERSICUS*

Hallajian, A. *, Kazemi, R., Mohseni, M., Dejandian, S., Yousefi Jourdehi, A., Bahmani, M.,
Pourdehghani, M., Yazdani, M. A., Yeganeh, H.

International Sturgeon Research Institute of Dr. Dadman., Rasht - Iran.

(Received 22 July 2010 , Accepted 26 December 2010)

Abstract:

Sexual cells in male fishes are microscopic and smaller than eggs in females. Due to the late maturation age in sturgeons, the biopsy of gonads and histological studies are one of the most important and reliable ways to detect and separate males and females from each other at early ages. The aim of the present study was to determine and divide the sexes in farmed *Acipenser persicus* reared under artificial conditions. In order to detect and determine sexual maturation stages, gonads of 81 farmed *A. persicus* were sampled by biopsy. Samples were fixed and studied by light microscope. Results showed that males and females were 30 (37%) and 51 (63%) individuals, respectively. The determination of sexual maturation stages in *A. persicus* showed that 16% were at stage I, 23.5% at stage I - II, 59.3% at stage II and 1.2% at stage III. The number of females was higher than that of males, but sexually mature females were at lower maturation stages than males in the same age and rearing conditions.

Key words: *Acipenser persicus*, biopsy, sexual maturation stages.

*Corresponding author's email: Alihallajian@gmail.com, Tel: 0132-5743724, Fax: 0132-7743722