مورفولوژی گلبول‌های قرمز بچه ماهیان آمیخته تریپلویید، قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد دریای خزر

ثارالله زارعی[۱]، سالار درافشان[۱*]، فاطمه پیکان‌حیرتی[۱]
[۱]گروه شیلات،دانشکده منابع‌طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان،۸۳۱۱ -۸۴۱۵۶، ایران

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثر آمیخته‌گری بر مورفولوژی گلبول‌های قرمز دربچه ماهیان آمیخته تریپلویید در مقایسه با والدین (قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد دریای خزر) و همچنین مقایسه برخی ناهنجاری های گلبولی در بچه ماهیان آمیخته تریپلویید، قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد دریای خزر بود. به منظور القای تریپلوییدی از شوک حرارتی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و زمان آغاز شوک دهی ۱۰ دقیقه پس از لقاح به مدت ده دقیقه انجام شد. نتایج حاصل از سنجش گلبول های قرمز خون نشان داد که در آمیخته تریپلویید در مقایسه با والدین، محور بزرگ سلول، محور کوچک و بزرگ هسته افزایش معنی‌داری را داشته است. اما محور کوچک سلول گلبول‌های قرمز آمیخته تریپلویید در مقایسه با گروه‌های شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. نتایج حاصل از مقایسه حجم سلول و هسته در آمیخته تریپلویید نسبت به گروه‌های شاهد نشان داد که حجم سلول ، هسته و مساحت هسته در آمیخته تریپلویید در مقایسه با گروه‌های شاهد افزایش معنی‌داری را داشته است ($P<0.05$). اما مساحت سلول در آمیخته در مقایسه با گروه‌های شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P>0.05$). محور بزرگ هسته و یا سلول در مقایسه با عرض متناظر آن به نسبت بیشتری افزایش یافت. گلبول‌های قرمز خون در آمیخته تریپلویید در مقایسه به گروه‌های شاهد، ناهنجاری‌های بیشتری را نشان دادند که عمدتاً شامل حضور سلول‌هایی با هسته تقسیم‌شده، وجود گلبول‌های قرمز بدون هسته و فراوانی بالاتر از انواع گلبول‌های قرمز نابالغ در جریان خون می‌باشد. مرگ سلولی، تخریب غشای سلولی گلبول‌های قرمز بزرگ در حین عبور از مویرگ‌های خونی و یا رهاسازی پیش از موعد گلبول‌های قرمز نابالغ ، به‌عنوان علت اصلی این ناهنجاری‌ها می‌باشد. نتایج حاصل نشان داد که آمیخته گری باعث بروز این ناهنجاری های خونی و در نتیجه منجر به کاهش کارایی زیستی در آمیخته تریپلویید در مقایسه با گروهای دیپلویید شود.

کلمات کلیدی: آمیخته تریپلویید، ناهنجاری های گلبولی، ماهی آزاد خزر، قزل آلای رنگین کمان، دیپلویید

*نویسنده مسئول : sdorafshan@cc.iut.ac.ir

مقدمه

مطالعه ژنتیک ماهی در اوایل قرن بیستم، پس از شناخت و درک صفات کمی و اصول ژنتیک آغاز گردید، اما به دلیل فقدان شناخت کافی از ژنتیک آبزیان به‌ویژه ماهی و عدم علاقه دست‌اندرکاران به مطالعات ژنتیکی در آبزی‌پروری، همچنین محدودیت و جوان بودن صنایع شیلاتی و آبزی‌پروری در آن زمان، عملاً مطالعات چشمگیری در این زمینه تا دهه ۱۹۶۰ انجام نگرفت و در حقیقت تلاش‌های اصلی درزمینه ژنتیک ماهی در مقیاس تجاری درزمینه بهگزینی انواع ماهیان تجاری نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌منظور بهبود ضریب تبدیل غذایی[۱] و رشد به اجرا درآمد. به‌تدریج با درک اصول و قوانین ژنتیک و نیز توسعه آبزی‌پروری به‌عنوان یکی از صنایع مهم زیر بخش کشاورزی، کاربرد روش‌های مدرن و نوین در آبزیان توسعه یافت. در این خصوص روش‌های جدید زیست‌فناوری نظیر دست‌کاری کروموزومی و القای پلوییدی به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر درزمینه تولید آبزیان پرورشی در اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ به‌طور کامل موردپذیرش و کاربرد قرار گرفت. به‌طورکلی می‌تواند گفت که از اوایل دهه ۱۹۸۰، تحقیقات ژنتیکی درزمینه آبزی‌پروری توسعه مداوم خود را آغاز نمود و امروزه این تحقیقات به‌صورت گسترده و چشمگیر در جنبه‌های مختلف آبزی‌پروری در حال آزمایش و تجاری‌سازی است. انواع مختلفی از این فناوری‌ها مانند: بهگزینی، آمیخته گری، تغییر جنسیت، اصلاح نژاد و القای پلوییدی در حال حاضر مقیاس تجاری مورداستفاده قرار می‌گیرند (درافشان ۱۳۸۵). یکی از ابزارهای مهم که همسو با پیشرفت صنعت آبزی پروری کاربرد زیادی در این صنعـــت یافته است، مطالعه خصوصیات خون شناسی ماهیان پرورشی است (Dorafshan et al., 2008). با توجه به افزایش آلودگی آب های طبیعی که ماهی در آن پرورش داده می شود و ارتباط تنگاتنگ موجود آبزی با محیـــــطی که در آن زندگی می کند (آب) به نظر می رسد که تغییرات فیزیکوشیمیایی آب تاثیر فراوانی روی پارامترهای خون ماهی داشته و باعث تغییرات سریع در ترکیبات خون ماهی می گردد (Qiang et al., 2013; Olufayo 2009) . از سویی دیگر بررسی های پارامتر های خون اطلاعات مناسبی در تشخیص و شناسایی بیماری های آبزی فراهم می کند و در واقع خون شناسی، روشی موثر و مناسب جهت نظارت بر کیفیت محیط زیست، سطح سلامت و شرایط فیزیولوژیک موجود آبزی می باشد (Qiang et al. 2013; Olufayo 2009; Svobodova 2005; Kori-Siakpere & Ubogu 2008). در مطالعات خون شناسی بسیار حیاتی است که نمونه خون مناسبی تهیه گردد. که نشان دهنده حقیقی شرایط موجود آبزی باشد تا بتوان بر اساس داده‌های به دست آمده از آن، نتایج را به صورت صحیح تفسیر کرد خون از جمله بافت‌هایی است که تغییرات وسیعی را به سبب القای پلوییدی نشان میدهد. این تغییرات عمدتاً به منظور تطابق بهتر آبزی با شرایط جدید محیط درونی یا بیرونی پدید می‌آید . تاکنون مطالعات زیادی در زمینه بروز تغییر شاخص‌های خونشناسی در انواع آبزیان دستکاری شده کروموزومی خصوصاً انواع تریپلویید در مقایسه با انواع دیپلویید منتشر شده است که از آن جمله می‌توان به افزایش ابعاد گلبولی، کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت در ماهیان تریپلویید آزاد دریای خزر(*Salmo trutta caspius*) وکاهش تعداد گلبول قرمز به همراه افزایش ابعاد آن و در نتیجه عدم تغییر هماتوکریت در قزل‌آلای- رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykis*) اشاره کرد (Dorafshan et al. 2008; Clark et al. 2011). در تحقیقی که در آمیخته بین ماهی هامور معمولی ماده (*Epinephelus coiodes*) و هامور نر منقوط (*Epinephelus lanceolatus*) انجام گرفت، میزان رشد و زنده‌مانی در آمیخته‌های تریپلویید به شکل معنی‌داری بیشتر از آمیخته‌های دیپلویید بود و همچنین از لحاظ موفولوژیکی باهم متفاوت بودند. صحت پلوییدی به سه روش اندازه گیری ابعاد هسته و سلول گلبول قرمز، کاریوتایپ و فلوسایتومتری اندازه گیری شد (Hung et al. 2016). علاوه بر این تغییرات، افزایش ناهنجاری‌های گلبولی در

[۱] Feed Conversion Ratio

انواع آبزیان دستکاری شده کروموزومی خصوصاً آزادماهیان تریپلویید در مقایسه با انواع دیپلویید مورد توجه قرار گرفته است (Benfey 1999). ناهنجاری‌ها عمدتاً شامل افزایش فراوانی گلبول های قرمز بدون هسته (Anucleated Cell) با هسته در حال تقسیم (Segmented nuclei) موقعیت غیر طبیعی هسته (Dislocated nucleus) و وجود ریز هسته ها درون سیتوپلاسم (Micronucleus) یا سلول در حال تقسیم یا دمبلی شکل (Pinched Cell or Amitosis) می باشد(Wlasow et al. 2004; Dorafshan et al. 2008). بروز این ناهنجاری ها می تواند در نهایت منجر به کاهش کارایی آبزی به منظور رشد یا بقا خصوصا تحت شرایط نامساعد پرورشی نظیر درجه حرارت بالا یا تراکم زیاد شود(Antwi-Baffour et al. 2013; Benfey 1999). علی رخم این اهمیت این نوع ناهنجاری ها، تا کنون گزارشی در خصوص بروز یا افزایش آنها در اثر القای تریپلوییدی در آمیخته ها منتشر نشده است. از اهداف این مطالعه بررسی احتمال افزایش انواع ناهنجاری های گلبولی در سلول های خونی در آمیخته تریپلویید در مقایسه با انواع دیپلویید (قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد دریای خزر) به عنوان مهم ترین گونه های آزادماهیان در کشور می باشد.

مواد و روش ها

مکان آزمایش

این تحقیق در مرکز تحقیقاتی گروه شیلات دانشگاه صنعتی اصفهان در خرداد ماه ۱۳۹۶ انجام گرفت. ماهیان دیپلوئید (قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد دریای خزر) و آمیخته تریپلوئید از دسته واحدی از تخم‌های تازه لقاح یافته تولید و انتخاب‌شده‌اند. تریپلوئید از طریق احتباس دومین گویچه قطبی ذر تخم‌های تازه لقاح یافته بوده که با استفاده از شک حرارتی ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در۱۰ دقیقه پس از لقاح، القا شد. صحت پلوئیدی (دیکلو یا تریپلوئیدی) به دو روش سنجش ابعاد گلبولی و فلوسایتو متری بررسی گردید. ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید در دو مخزن به ابعاد ۱/۵×۱/۵×۰/۷ با تراکم یکسان در تراف های کالیفرنیایی در داخل سالن تکثیر گروه شیلات دانشگاه صنعتی اصفهان نگهداری شدند. به ترتیب از ۱۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان و آزاد دریای خزر و آمیخته تریپلویید که به‌طور تصادفی از تراف‌ها صیدشده بودند، به روش قطع ساقه دمی خون-گیری انجام شد.

سنجش ابعاد گلبول‌های قرمز حاصل از بررسی گسترش خونی

سنجش میزان پلوییدی در ماهیان تولیدشده با روش سنجش ابعاد هسته و سلول گلبول قرمز انجام پذیرفت (Benfey & Sutterlin, 1984) به‌منظور اندازه‌گیری ابعاد گلبول‌های قرمز، تهیه گسترش‌های خونی الزامی است. بدین منظور ابتدا ساقه دمی ماهی قطع گردید و یک قطره خون بر روی لام چکانده شد و به‌وسیله لام دیگری بر روی لام گسترانده شد و در معرض هوا خشک گردید. سپس گسترش ایجادشده به‌وسیله متانول تثبیت گردید (Strunjak et al. 2003). گسترش‌های تثبیت‌شده با گیمسای ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند (Daneshvar et al., 2012). گسترش‌ها سپس با بزرگ-نمایی ۴۰× مورد ارزیابی قرار گرفته و گلبول‌هایی که ازنظر شکل ظاهری کاملاً بیضوی بوده، دیواره سیتوپلاسمی و هسته آن‌ها کاملاً سالم و با گلبول‌های دیگر همپوشانی نداشتند، انتخاب شدند. اندازه‌گیری گلبول‌های قرمز که شامل محور بزرگ (a) و محور کوچک (b) هسته‌ها یا سلول‌ها، است به‌وسیله میکرومتر انجام شد. محاسبه‌ی مساحت و حجم هسته و سلول گلبول‌های قرمز با استفاده از روابط زیر (Lemoine & Smith 1980) صورت گرفت.

$$S = a \times b \times \frac{\pi}{4}$$

$$V = \left[\frac{a}{2}\right] \times \left[\frac{b}{2}\right]^2 \times \frac{4\pi}{3}$$

a= محور بزرگ هسته و سلول (µm)

b= محور کوچک هسته و سلول (µm)

s= مساحت هسته و سلول (μm^2)

v= حجم هسته و سلول (μm^3)

نمونه‌برداری ۱۰ قطعه بچه ماهی برای تیمار آمیخته تریپلویید و ۱۰ قطعه ماهی برای هر گروه ازگروه‌های شاهد (قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد خزر) در مرحله بچه ماهی به‌طور تصادفی اجرا گردید و پس از تهیه گسترش خونی، تعداد حداقل ۱۵ عدد گلبول قرمز برای هر نمونه موردسنجش قرار گرفت. تصویر برداری با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل (Nikon Germany) انجام شد.

بررسی محتوای DNA و ناهنجاری‌های محتوای DNAدر گلبول‌های قرمز جهت تعیین صحت پلوییدی (Allen 1983)

در این روش به‌منظور مقایسه مقدار DNA هسته سلول-های گلبول‌های قرمز خون ماهیان گروه‌های دیپلویید و تریپلویید آزمایشی توصیف‌شده توسط (Allen 1983) با کمی تغییرات به شرح زیر مورداستفاده قرار گرفت.

- خون‌گیری از ماهیان پس از بیهوشی با استفاده از قطع ساقه دمی آغشته به هپارین صورت گرفت و نمونه‌ها در مجاورت یخ به بخش فلوسایتومتری پژوهشکده زیست‌فناوری رویان اصفهان منتقل شد.

- مقادیر اندکی از خون هپارینه به همراه ۲۰۰µL از بافر تریس(۶/۴۲g تریس در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر۷/۴ -pH=۷) به‌خوبی شستشو داده شد و پس از هر مرتبه شست‌وشو، سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه، ۲۵۰۰rpm) گردید.

- پس‌ازآنجام سانتریفیوژ نهایی، سوپرناتانت جداسازی شده و رسوب در ۱۰۰µL از بافر تریس به‌خوبی حل شد.

- به‌منظور تخریب رشته‌های RNA، آنزیم RNAase به میزان ۵۰۰ µL (۰/۰۲۵gدر ۵ میلی‌لیتر بافر تریس) اضافه‌شده و به مدت حدود ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

- سپس با ۲ میلی‌لیتر از PBS شسته (pH = ۷/۴) و به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد.

- به خون کامل، بافر لیز کننده گلبول‌های قرمز (۲ میلی‌متر AbD Serotec Erythrolyse) اضافه شد و به‌خوبی هم زده شد. مخلوط حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داشته و پس‌ازآن به مدت ۵ دقیقه در دور۴۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد.

- سپس ۵۰۰µL از یدید پروپیدیوم (۰/۰۰۰۱ در ۱۰ میلی‌لیتر بافر تریس) به محلول فوق اضافه‌شده و به‌خوبی مخلوط شد.

- آنالیز با استفاده از دستگاه (Becton Dickinson USA) BDFACSCalibur با تابش اشعه آرگون در طول‌موج ۴۸۸nm و فیلتر ۶۲۵nm اجرا گردید.

- سیگنال‌های فلورسانس با استفاده از نرم‌افزار (Cell quest pro). به‌صورت هیستوگرام‌هایی بر روی صفحه آشکار شد.

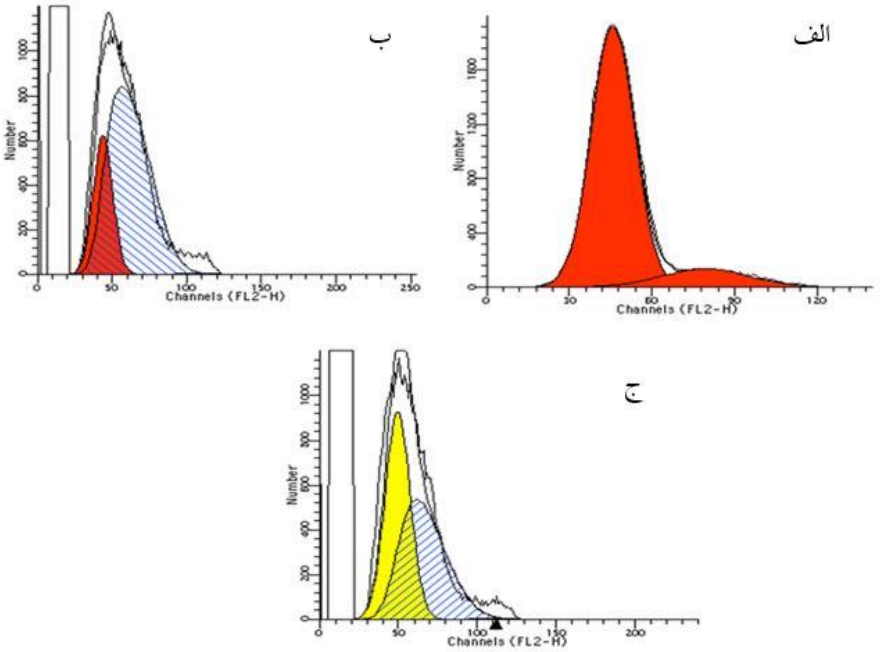
تحلیل آماری

ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگراف-اسمیرنوف بررسی‌شده و سپس آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون دانکن در سطح معنی‌دار ۵٪ درصد اجرا شد. کلیه بررسی‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Excel 2013 و SPSS 22 اجرا شد.

نتایج و بحث

بررسی محتوی DNA و ناهنجاری‌های محتوی DNA در گلبول‌های قرمز خون به‌منظور مقایسه محتوی DNA در ماهیان آمیخته با گروه‌های والدینی توسط دستگاه فلوسایتو متری صورت گرفته است که نتایج حاصل از آن به‌صورت هیستوگرام‌هایی گزارش شده است. شماره کانال گزارش شده در جدول (۱) نشان‌دهنده مقدار DNA گزارش شده از برخورد نور با هسته‌های گلبول‌های قرمز خون ماهیان و گزارش آن توسط دستگاه فلوسایتومتری

می‌باشد.تحلیل اطلاعات در خصوص مقایسه شماره کانال هیستوگرام حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نشان داد که با توجه به شماره کانال تیمار آمیخته تریپلویید در مقایسه با تیمارهای (قزل آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد خزر) دارای شماره کانال بیشتری می‌باشد (شکل۱). نتایج حاصل آنالیز گلبول‌های قرمز خون در تیمارهای آزمایشی نشان داد، با توجه به این‌که مساحت زیر نمودار نشان‌دهنده تعداد سلول‌های خونی می‌باشد، عرض هیستوگرام حاصل از آنالیز گلبول‌های خونی در تیمار آمیخته تریپلویید در مقایسه با گروه‌های والدینی بیشتر می‌باشد، که دلیل آن تعداد بیشتر سلول‌های ناهنجار و نابالغ در آمیخته تریپلویید در مقایسه باگروه‌های والدین می‌باشد که منجر به افزایش فراوانی گستردگی محتوای DNA در اطراف میانگین می‌شود.



شکل۱. هیستوگرام‌های حاصل از آنالیز گلبول‌های قرمز خون بچه ماهیان: الف) آزاد خزر (دیپلویید) ب) قزل آلای رنگین‌کمان (دیپلویید) ج) آمیخته تریپلویید

جدول۱. مقایسه شماره کانال گلبول‌های قرمز در بچه ماهیان آمیخته تریپلویید، قزل آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد خزر

ماهی موردبررسی / ویژگی	ماهی آزاد خزر	قزل آلای رنگین‌کمان	آمیخته تریپلویید
شماره کانال	۴۴	۳۸	۵۹

با توجه به شماره کانال حاصل از آنالیز گلبول‌های قرمز خون، شماره کانال آمیخته تریپلویید (۵۹) می‌باشد و در مقایسه با تیمارهای دیپلویید به دلیل احتباس گویچه قطبی (n کروموزومی) و تولید سلول‌های 3n کروموزومی بیشتر می‌باشد که منجر به افزایش مقدار DNA در سلول‌های تریپلویید می‌گردد. ماهیان آزاد خزر و قزل آلای رنگین‌کمان علی‌رغم اختلافات کاملاً واضح در تعداد کروموزوم‌ها، ازنظر مقدار DNA سلولی به هم نزدیک می‌باشند، به‌طوری‌که مقدار DNA سلولی برای قزل‌آلای رنگین‌کمان (۲n = ۶۰) برابر pg/cell ۵/۳ و برای ماهی آزاد خزر (۲n = ۸۰) حدود pg/cell ۶ گزارش شده است (درافشان ۱۳۸۵). در این خصوص باید عنوان کرد که همواره تعداد کروموزوم‌ها بیانگر مقدار DNA سلولی نمی‌باشد. به‌طوری‌که اسب با دارا بودن ۶۴ کروموزوم، مقدار DNA سلولی تا حدود ۱۰٪ کمتر از انسان با ۴۶ کروموزوم را نشان می‌دهد. همچنین اختلافات جزئی مقدار DNA سلولی جمعیت‌های مختلف و یا حتی افراد مختلف یک جمعیت گزارش شده است که ازجمله مهم‌ترین عوامل مؤثر آن، اختلاف در اندازه‌گیری‌ها، نوع دستگاه‌های مورد استفاده، پلی مورفیسم کروموزومی و نیز وجود کروموزوم‌های جنسی (خصوصاً در بین پرندگان) می‌باشد. مقدار DNA سلولی باتوجه به جدول (۱) در تیمار آمیخته تریپلویید ۱/۵ برابر قزل آلای رنگین‌کمان و ۱/۳ برابر ماهی آزاد خزر می‌باشد. سلول‌های ماهیان تریپلویید به دلیل دارا بودن مقدار DNA بیشتر، ابعاد بزرگ‌تری نسبت به سلول‌های دیپلویید دارند، اگرچه این تفاوت اندازه بسته به نوع بافت یا حتی سن ماهی ممکن است، متغیر باشد، اما عموماً به حدی خواهد بود که به‌عنوان شاخصی برای شناسایی ماهیان تریپلویید مورد استفاده و استناد قرار گیرد. اختلافات جزئی مقدار DNA در ماهیان (قزل آلای رنگین‌کمان و آزاد خزر) می‌تواند به دلیل اختلافات گونه‌ای باشد. همچنین ناهنجاری‌های گلبول‌های قرمز (سلول بدون هسته، اختلاط دو سلول روی هم افتاده) می‌تواند در مقدار DNA و گزارش کانال توسط دستگاه تأثیرگذار باشد، علی‌رغم این، بررسی‌های حاضر نشان داد که روش فلوسایتومتری با دقت و سرعت بالاتری قادر به تشخیص انواع ماهیان تریپلویید در مقایسه با ماهیان دیپلویید می‌باشد، اما کاربرد آن به دلیل نیاز تجهیزات پیشرفته و محدودیت دسترسی به آن‌ها در مکان‌های خاص با دشواری همراه می‌باشد. ولی در کل روش فلوسایتومتری برای تعیین پلوییدی نسبت به بررسی ابعاد گلبولی روش مطمئن‌تری می‌باشد. هیستوگرام‌های حاصل از آنالیز گلبول‌های قرمز خون در آمیخته تریپلویید دارای عرض بزرگ‌تری در مقایسه با تیمارهای دیپلویید دارد، نشان‌دهنده میزان بیشتر DNA می‌باشد. نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج (درافشان ۱۳۸۵) مشابه می‌باشد. همچنین برای اولین بار در ایران سنجش مستقیم مقدار DNA با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری برای سنجش پلوییدی در گروه‌های مختلف ماهیان توسط (درافشان ۱۳۸۵) گزارش شده و به‌عنوان روشی مطمئن اما گران‌قیمت درزمینه آبزی‌پروری برای القای تریپلوییدی و حتی تتراپلوییدی پیشنهاد شده می‌شود.

نتایج حاصل از مقایسه ابعاد گلبولی در بچه ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان، آمیخته تریپلویید و ماهی آزاد خزر نشان داد که القای تریپلوییدی در آمیخته منجر به افزایش معنی‌دار ($P<0.05$) در تمامی ابعاد گلبولی به‌جز محور کوچک سلول، در مقایسه با گروه‌های شاهد (قزل آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد خزر) گردید (جدول ۲ و۳). نتایج حاصل از مقایسه ابعاد گلبولی نشان داد که در آمیخته تریپلویید در مقایسه با گروه‌های شاهد، محور بزرگ سلول و همچنین محور کوچک و بزرگ هسته افزایش معنی‌داری را داشته است (جدول۲). اما محور کوچک سلول گلبول‌های قرمزخون آمیخته تریپلویید در مقایسه با گروه‌های شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. نتایج حاصل از مقایسه حجم سلول و هسته در آمیخته تریپلویید نسبت به گروه‌های شاهد نشان داد که حجم سلول و هسته در آمیخته تریپلویید در مقایسه با گروه‌های شاهد (والدین) افزایش معنی‌داری را داشته است ($P<0.05$) که در (شکل۱) به‌طور واضح مشخص شده است. همچنین مساحت هسته در تیمار آمیخته تریپلویید

افزایش معنی‌داری را نشان داد اما مساحت سلول در آمیخته تریپلویید در مقایسه با گروه‌های شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول۳). محور بزرگ هسته و یا سلول در مقایسه با عرض متناظر آن به نسبت بیشتری افزایش یافت، این امر منجر به کشیدگی گلبول‌های قرمز در آمیخته تریپلویید در مقایسه با گروه‌های شاهد گردید (شکل۱). گلبول‌های قرمز خون در آمیخته تریپلویید در مقایسه به گروه‌های شاهد، ناهنجاری‌های بیشتری را نشان دادند که عمدتاً شامل حضور سلول‌هایی با هسته تقسیم‌شده، تقسیم‌شدگی سیتوپلاسم، وجود گلبول‌های قرمز بدون هسته و فراوانی بالاتر از انواع گلبول‌های قرمز نابالغ در جریان خون می‌باشد (شکل۱).

جدول ۲. ابعاد گلبول‌های قرمز در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، آمیخته تریپلویید و ماهی آزاد خزر حاصل از بررسی گسترش‌های خونی

ابعاد سلول و هسته / تیمار	محور بزرگ سلول (µm)	محور کوچک سلول (µm)	محور بزرگ هسته (µm)	محور کوچک هسته (µm)
قزل‌آلای رنگین‌کمان	۱۴/۴ ±۱/۲۹[b]	۹/۱ ±۱/۲۸[a]	۵/۲۵ ±۱/۲۶[b]	۳/۳۲ ±۰/۸۲[a]
آمیخته تریپلویید	۱۶/۴۷ ±۲/۳۲[a]	۸/۰۵ ±۲/۰۸[b]	۶/۵ ±۱/۲۸[a]	۳/۲۲ ±۰/۸۴[a]
ماهی آزاد خزر	۱۴/۱۲ ±۱/۵۶[b]	۹/۵۷ ±۱/۲۲[a]	۵/۶۲ ±۱/۶۶[b]	۳/۰۷ ±۱/۰۴[a]

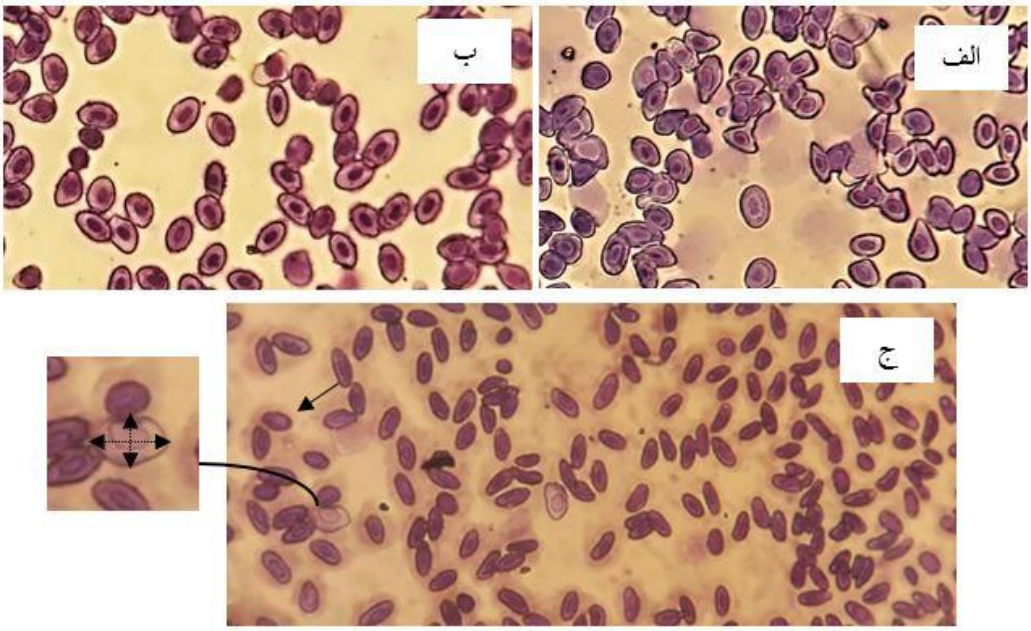
در هر ستون، وجود حداقل یک حرف مشابه، بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P>0.05$)

جدول ۳. مقایسه حجم و مساحت سلول و هسته گلبول‌های قرمز در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، آمیخته تریپلویید و ماهی آزاد خزر دیپلویید حاصل از بررسی گسترش‌های خونی

مساحت سلول و هسته / تیمار	مساحت سلول (μm^2)	حجم سلول (μm^3)	مساحت هسته (μm^2)	حجم هسته (μm^3)
قزل‌آلای رنگین‌کمان	۱۰۲/۸۶ ±۱۸/۷۷[a]	۹۸۷/۵۱ ±۱۹۵/۵۶[b]	۱۳/۶۸ ±۵/۶[b]	۴۷/۶۷ ±۲۱/۴۶[b]
آمیخته تریپلویید	۱۰۴/۰۷±۱۵/۰۸[a]	۱۱۳۹/۹۲ ±۲۴۰/۲۰[a]	۱۶/۴۳ ±۶/۴۷[a]	۷۱/۱۸ ±۲۵/۲۹[a]
ماهی آزاد خزر	۱۰۶/۰۷ ±۱۶/۵۴[a]	۹۹۷/۴۱ ±۱۶۹/۲۸[b]	۱۳/۵۴ ±۸/۰۹[b]	۵۰/۵۴ ±۳۲/۴۶[b]

در هر ستون، وجود حداقل یک حرف مشابه، بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P>0.05$)

گلبول‌های قرمز خون در ماهیان آمیخته تریپلویید به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای نسبت به گلبول‌های قرمز درگروه‌های شاهد (قزل آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد خزر) وسیع و حجیم‌تر بودند. افزایش ابعاد گلبولی در اثر القای پلوییدی، حالتی مرسوم می‌باشد و عموماً به دلیل افزایش میزان محتوی وراثتی هسته رخ می دهد. افزایش مساحت و حجم گلبولی در اثر تریپلوییدی امری محتمل به نظر می‌رسد، اما افزایش نامتقارن این مقادیر، افزایش بیشتر حجم در مقایسه با سطح و نیز افزایش حجم سلول در مقایسه با حجم هسته، ممکن است منجر به بروز محدودیت‌هایی در قابلیت انتقال اکسیژن توسط گلبول‌ها و یا به‌طورکلی ظرفیت هوازی آبزی شود. همچنین کاهش نسبت سطح به حجم سلولی می‌تواند منجر به بروز اختلالاطی در تبادلات یونی و یا جذب مواد مغذی توسط سلول‌ها شود که با نتایج (Cal et al. 2005; Dorafshan et al. 2008) مشابه می‌باشد.



شکل ۲. گسترش خونی در بچه ماهیان: الف) آزاد خزر ب) قزل آلای رنگین‌کمان ج) آمیخته تریپلویید

علامت ↗ گلبول قرمز فاقد هسته درآمیخته تریپلویید علامت ◄.....►افزایش محور بزرگ هسته و سلول و علامت ↕ افزایش محور کوچک هسته و سلول، بزرگنمایی X400.

ناهنجاری‌های ریختی گلبول‌های قرمز در تیمار آمیخته تریپلویید در مقایسه با گروه‌های شاهد(والدین) به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بیشتر بود (شکل۲). مرگ سلولی، تخریب غشای سلولی گلبول‌های قرمز بزرگ در حین عبور از مویرگ‌های خونی و یا رهاسازی پیش از موعد گلبول‌های قرمز نابالغ و همچنین القای شوک دمایی جهت تریپلوییدی کردن آمیخته‌ها، به‌عنوان علت اصلی این ناهنجاری‌ها می‌باشد(Svobodova et al. 1988). به نظر می‌رسد که ماهیان در هنگام تنش با افزایش نیاز اکسیژنی مواجه می‌شوند اما ویژگی‌های خون‌شناسی آن‌ها امکان تأمین این نیاز را فراهم نمی‌کند. بنابراین آن‌ها مجبور به رهاسازی گلبول‌های قرمز نابالغ در جریان خون می‌شوند، تا با افزایش نسبی تعداد گلبول‌های قرمز، قابلیت انتقال اکسیژن را بهبود بخشند (Graham et al. 1985). این عمر منجر به افزایش قابل‌ملاحظه نسبت گلبول‌های قرمز ناهنجار در خون می‌شود. افزایش ناهنجاری گلبولی در اثر تریپلوییدی، پیش از این نیز در گونه‌های مختلف ماهیان نظیر آزاد دریای خزر، آزاد ماهی اطلس و قزل آلای نهری

گزارش شده است. Maxime and Labbe در سال ۲۰۱۰ اثر تغییرات فشار اسمزی اسمزی بر لیز شدن گلبول های قرمز خون ماهیان قزل آلای رنگین کمان دیپلویید و تریپلویید را باهم مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند میزان مقاومت گلبولی و حفظ ساختار سلولی به دلیل اختلاف در ساختار اولیه و متفاوت بودن نسبت سطح به حجم گلبولی در ماهیان تریپلویید بیشتر از ماهیان دیپلویید بود. یعقوبی و همکاران در سال ۱۳۹۰ طی تحقیقی به این نتیجه رسیدند که القای شوک حرارتی بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش معنی دار ابعاد هسته و سلول گلبول قزمز در گروه تریپلویید در مقایسه با دیپلویید شد. O´ keefe و همکاران و Aktins و همکاران در سال ۲۰۰۰ اثر تنش بر ویژگی‌های خون‌شناسی ماهیان تریپلویید آزاد ماهی اطلس و قزل آلای نهری بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که اثر عوامل تنش‌زا حمل نقل و یا دست‌کاری، میزان گلبول‌های قرمز ناهنجار در جریان خون افزایش می‌یابد که با نتایج حاصل از این آزمایش مشابه می‌باشد. به طور کلی می توان بیان داشت که القای تریپلوییدی در بچه ماهی آمیخته در مقایسه با بچه ماهیان دیپلویید (قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد خزر) می تواند منجر به تغییرات قابل ملاحظه ای در برخی ویژگی های ریختی گلبول های قرمز شود. که دلیل اصلی آن احتمالا عدم بیان ژن ها در آمیخته و وجود یک سری کروموزوم اضافی در آمیخته در مقایسه با گروه های دیپلویید (قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد خزر) باشد. چنین تغییراتی ممکن است سلامت عمومی، رشد و یا بازماندگی را تحت شرایط پرورشی متاثر سازد.

توصیه ترویجی

تولید قزل‌آلای رنگین‌کمان به دلیل شیوع بیماری با مشکل مواجه شده است. همین امر نیاز به گونه‌های جایگزین را آشکار می‌سازد. استفاده از گونه‌های بومی که از بازارپسندی مناسبی برخوردار بوده و به‌خوبی قابل تکثیر باشند، در اولویت قرار دارد. از جمله این گونه‌ها می‌توان به ماهی آزاد دریای خزر *Salmo caspius* اشاره نمود. متاسفانه تولید و پرورش ماهی آزاد دریای خزر تا اندازه بازاری در شرایط پرورشی بنا به دلایلی نظیر رشد نسبتاً کند (در مقایسه با قزل آلای رنگین کمان)، بلوغ جنسی زود هنگام خصوصاً در جنس نر، دشواری عادت پذیری به غذای دستی چندان با موفقیت همراه نبوده است. آمیخته-گری یکی از روش‌های اصلاح‌نژادی جهت غلبه بر این مشکلات است. استفاده از آمیخته‌گری در صنعت آبزی‌پروری به دلیل بروز صفات هتروزی (مثبت) ازجمله: بهبود سرعت رشد، بهبود کیفیت گوشت، افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها، تحمل زیست‌محیطی، کاهش تولیدمثل ناخواسته و تولید ماهیان استریل در مقایسه با والدین تحت شرایط خاص محیطی است، توصیه می‌شود.

منابع

درافشان، س.، ۱۳۸۵. دستکاری های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) و قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و مقایسه رشد در نسل F_1، رساله دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس.۱۴۲ص.

یعقوبی، س.، یوسفیان، م. و هدایتی‌فرد، م.، ۱۳۹۰. بهینه سازی زمان شوک گرمایی پس از لقاح برای القا تریپلوییدی در قزل آلای رنگین کمان . مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزاد شهر، ۵ (۴): ۱-۱۶.

Aktins, M. E., O'Keefe, R. A. and Benfey, T. J., 2000. The Effect of exercise on the growth and hematology of diploid and triploid brook trout, *Salvelinus fontinalis*. Bull. Aquaculture. Assoc. Canada.; 4: 19-21.

Allen, S. K., 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. Aquaculture, 33(1-4), 317-328.

Antwi-Baffour, S., Quao, E., Kyeremeh, R. and Mahmood, S. A., 2013. Prolong storage of blood in EDTA has an effect on the morphology and osmotic fragility of erythrocytes. International Journal of

Biomedical Science and Engineering, 1(2): 20-23.

Benfey, T. J. and Sutterlin, A. M., 1984. The hematology of the triploid landlocked Atlantic salmon (*salmo salar*). Journal of Fish Biology, 24: 333-338.

Benfey, T. J., 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. Reviews in Fisheries Science, 7: 39–67.

Cal, R. M., Vidal, S., Camacho, T., Piferrer, F. and Guitian, F. J., 2005. Effect of triploidy on turbot haematology. Comp Biochem Physiol. 141: 35-41.

Clark, T. D., Donaldson, M. R., Drenner, S. M., Hinch, S. G., Patterson, D. A., Hills, J., Ives, V., Carter, J. J., Cooke, S. J. and Farrell, A. P. 2011. The efficacy of field techniques for obtaining and storing blood samples from fishes. Journal of Fish Biology, 79: 1322-1333.

Daneshvar, E., Ardestani, M.Y., Dorafshan, S. and Martins, M. L., 2012. Hematological parameters of Iranian cichlid *Iranocichla hormuzensis*: Coad, 1982 (Perciformes) in Mehran River. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 84 (4): 943-949.

Dorafshan, S., Kalbass, M. R., Pourkazemi, M., Mojazi-Amiri, B. and Soltan- Karimi, S., 2008. Effects of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* haematology. Fish Physiology and Biochemistry, 34: 195-20.

Graham, M. S., Fletcher, G. L. and Benfey, T. J., 1985. Effect of triploidy on blood oxygen content of Atlantic salmon. Aquaculture, 50(1): 133-139.

Huang, W., Liu, Q., Xie, J., Wang, W., Xiao, J., Li, S. and Lin, H., 2016. Characterization of triploid hybrid groupers from interspecies hybridization (*Epinephelus coioides*♀× *Epinephelus lanceolatus*♂). Aquaculture Research, 47(7): 2195-2204.

Kori-Siakpere, O. and Ubogu, E. O., 2008. Sublethal haematological effects of zinc on the freshwater fish, *Heteroclarias sp*. (Osteichthyes: Clariidae). African Journal of Biotechnology, 7:2068-2073.

Lemoine Jr, H. L. and Smith, L. T., 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. Transactions of the American Fisheries Society, 109(6): 626-631.

Maxime, V. and Labbe, L., 2010. The effect of ploidy and sexual maturation on the resistance of erythrocytes to hameolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).Aquaculture, 305(1):159-164.

O'Keefe, R., Stillwell, E. and Benfey, T., 2000. The effect of Transportation and handeling on the hematology of diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. Bull Aquaculture Assoc. Canada.; 4: 25-27.

Olufayo, M. O., 2009. Haematological characteristics of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) juveniles exposed to Derri elliptica root powder. African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development, 9(3):920-933.

Qiang, J., Yang, H., Wang, H., Kpundeh, M. D. and Xu, P., 2013. Interacting effects of water temperature and dietary protein level on hematological parameters in Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* and mortality under Streptococcus iniae infection. Fish & shellfish Immunology, 34(1):8-16.

Strunjak, I., Rakovak, R. and Topic, N., 2003. Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinarni Medicina, 48: 215-219.

Svobodová, Z., Kolářová, J. and Flajšhans, M., 1998. The First Findings on the Differences in Complete Blood Count Between Diploid and Triploid Tench, *Tinca tinca* L. Acta Veterinaria Brno, 67(4): 243-248.

Svobodova, Z., Machova, J., Drastichova, J., Groch, L., Luskova, V. and Poleszczuk, G., 2005. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. Aquaculture Research, 36(2):1177-1184.

Wlasow, T., Kuzminski, H., Woznicki, P. and Ziomek, E., 2004. Blood cell alterations in triploid brook trout *Salvelinus fontinalis*. Acta Veterinarian Brno, 73: 115-118.

Morphology of erytrocyte cells of Triploid hybrid, rainbow trout and Caspian salmon

Sarallah Zarei[1], Salar Dorafshan[1*], Fatemeh Paykan Heyrati[1]

[1]Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan,84156-83111 Iran.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of mixing on the morphology of erytrocyte cells in triploid hybrid fish species compared to parents, as well as comparing some of the abnormalities of the thrombolytic kidney, Rainbow trout and Caspian salmon. In order to induce the triploid, thermal shock at 28 ° C and the time of shock initiation were performed 10 minutes after fertilization for 10 minutes. The results of the measurement of erytrocyte cells showed that in the triploid hybrid mixture compared to the parent, the large axis of the cell had a significant increase in the small and large axis of the nucleus. However, the small axis of the erytrocyte cells of the triploid hybrid showed a significant decrease compared to the control groups. The results of comparing the amount of cells and nuclei in the triploid hybrid combination compared to the control groups showed that the cell, nucleus and nucleus volume in the triploid hybrid increased significantly compared to the control groups ($P < 0.05$). But the area of the cell in the mixture was not significantly different in comparison with the control groups ($P > 0.05$). The major axis of the nucleus or cell increased more relative to its corresponding width. erytrocyte cells in the Triploid hybrid showed more abnormalities in comparison to the control groups, mainly due to the presence of cells with divided nuclei, the presence of red blood cells without nuclei and abundance higher than the type of immature erytrocyte cells in the blood stream. Cell death, cell membrane destruction of large erytrocyte cells through the passage of blood capillaries or early release of immature erytrocyte cells, is the main cause of these abnormalities. The results showed that mixing causes these abnormalities in the blood and thus leads to a decrease in the biological efficiency of the triploid hybrid in comparison with the diploid groups.

Keywords: Triploid hybrid, Rabies anomalies, Caspian Salmon, Rainbow Trout, Diploid

*Corresponding author: sdorafshan@cc.iut.ac.ir