مطالعه فرایند آبگیری تخمک ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی تکوین آن

بهروز حیدری*، نادر شعبانی‌پور و فاطمه زارع

رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۹

چکیده

در مطالعه حاضر، عوامل اسموتیکی موثر بر فرایند آبگیری اووسیت (سدیم، پتاسیم، کلسیم، کلر، فسفر غیرآلی و پروتئین تام) هم در بافت تخمدانی و هم در پلاسمای خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طی تکوین بررسی شد. اووسیت بسیاری از ماهیان استخوانی طی رسیدگی نهایی، افزایش در حجم اووسیت و محتویات آب را نشان می‌دهند، فرایندی که بعنوان آبگیری اووسیت نامیده می‌شود. پلاسمای نمونه‌های در حال رسیدگی بعد از خونگیری و اووسیتها نیز بعد از هموژن شدن در ۲۰°C- جهت آنالیز نگهداری شدند. یونهای سدیم و پتاسیم با شعله‌سنجی، کلر، کلسیم و فسفر غیر آلی با رنگ‌سنجی و پروتئین تام به روش Bradford بهمراه میزان آب، اسمولاریته و قطر اووسیت در سه مرحله پیش زرده سازی، زرده سازی و رسیدگی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که یونهای پتاسیم، سدیم، کلر و فسفر غیرآلی در اووسیت روند صعودی داشتند ($P<0.05$) در حالیکه پروتئین اووسیت و کلسیم پلاسما روند نزولی را نشان دادند ($P<0.05$). همبستگی مثبت بترتیب بین میزان آب اووسیت و پتاسیم، فسفر غیرآلی، سدیم و کلر وجود داشت. بنظر می‌رسد که تغییرات مذکور، همگی نیروی لازم جهت کشش آب به داخل اووسیت جهت آبگیری ایجاد کرده‌اند. بطور کلی، بدلیل حضور تخمهای بنتوفیل در ماهی قزل‌آلا، آبگیری اووسیت درمقایسه با ماهیان دریایی کمتر رخ می‌دهد با این وجود استفاده از یونهایی همچون پتاسیم، سدیم و کلر با توجه به نقش مهم آنها در پدیده آبگیری جهت رسیدگی سریعتر تخمدان ماهی قزل آلا در محیطهای تکثیر مصنوعی می‌تواند مطالعه شود.

واژه های کلیدی: آبگیری، رسیدگی، قزل‌آلا، بنتوفیل

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳-۳۳۲۴۳۶۳۰ ، پست الکترونیکی: Bheidari@guilan.ac.ir

مقدمه

در پاسخ به محرکات محیطی بخصوص دما و فتوپریود اووسیتهای واقع در مرحله ابتدایی تکوین (پیش از زرده-سازی) به فاز زرده‌سازی وارد می‌شوند که در طی آن، اووسیتها بزرگ می‌شوند، لایه‌های فولیکولی توسعه می‌یابند و گرانولهای زرده (ویتلوژنین) در اووسیتهای ماهیان استخوانی انباشته می‌شوند. بدنبال کامل شدن زرده‌سازی، اووسیتهای متوقف شده در مرحله پروفاز میوز یک تحت تاثیر فاکتورهای مناسب محیطی مانند دما که در واقع اولین راه انداز جهت ترشح گنادوتروپینها هستند، میوز را از سر می‌گیرند و وارد فاز رسیدگی می‌شوند (۷ و ۸). فرایند رسیدگی اووسیتها در ماهیان استخوانی مجموعه‌ای پیچیده از تغییرات سیتوپلاسمی و هسته‌ای است که از آن می‌توان به حوادث مورفولوژیکی مانند یکی شدن گرانولهای زرده و یکپارچگی قطرات چربی (در صورت وجود)، مهاجرت هسته زایشی (GVM)، شکسته شدن ژرمینال وزیکول(GVBD)، پارگی فولیکولها، خروج اووسیت از پوشش فولیکولی در زمان تخمک گذاری و شفاف شدن اووپلاسم قبل از تخمریزی نام برد (۳۴). علاوه بر فرآیند زرده سازی که عامل مهم در افزایش حجم اووسیت ماهیان است طی رسیدگی نهایی، اووسیت بسیاری از ماهیان

استخوانی افزایش در حجم اووسیت و محتویات آب را نشان می‌دهند، فرایندی که بعنوان آبگیری اووسیت نامیده می‌شود، بهمین دلیل بیشترین تغییرات اسموتیکی پلاسمای خون هنگام رشد تخمدان در مراحل رسیدگی تکوین اووسیت رخ می‌دهد (۳۴ و ۳۵).

فرایند آبگیری ویژگی منحصر بفرد رسیدگی اووسیتها در بسیاری از ماهیان استخوانی می‌باشد. این تغییرات در محتویات آب اووسیت از نسبت کم در ماهیان آب شیرین و یوری هالین تا چندین برابر در گونه‌های دریایی دیده می‌شود. افزایش زیاد در حجم اووسیت (۳/۱ تا ۸/۴ برابر) به گونه‌های دریایی نسبت داده می‌شود که تخمهای پلاژیک را در آب رها می‌کنند درحالیکه افزایش کمتر در حجم اووسیت (۱ تا ۳ برابر) در گونه‌هایی مشاهده می‌شود که تخمهای غیرشناور تولید می‌کنند. این گونه‌ها بترتیب پلاژوفیل (pelagophil) و بنتوفیل (benthophil) نامیده می‌شوند (۷).

در ماهیان دریایی مانند کفال طلایی و کفال خاکستری که دارای تخمهای شناور و پلاژیک هستند، مسئول اصلی حجیم شدن اووسیتها، پدیده آبگیری است (۳۴). حال آنکه در دیگر ماهیان همچون مارماهی مردابی *Synbranchus marmoratus* که در رودخانه‌ها تخمریزی می‌کنند و دارای تخمهای بنتوفیل هستند مسئول اصلی بزرگ شدن سلول زرده سازی می‌باشد (۲۶). بنظر می‌رسد که عوامل تاثیرگذار در فرایند آبگیری، ۱) اسمولیتهای آلی که به شکل آمینواسیدهای آزاد که عمدتاً از تجزیه پروتئینهای زرده حاصل می‌شود (۳۴ و ۱۲) و۲) عوامل غیرآلی همچون سدیم، پتاسیم، کلر و فسفر غیرآلی هستند که با توجه به گونه ماهی، نقش هر یک از آنها بنظر متفاوت می‌رسد (۱۷). پس عوامل اسموتیک برای آبگیری در همه ماهیان استخوانی مشابه هستند و گونه‌های مختلف بسته به تولید تخم‌های شناور یا غیرشناور و با توجه به زیستگاه آنها بطور متناوب از این فاکتورها استفاده می‌کنند. در زمینه آبگیری مطالعاتی بر روی گونه‌های مختلف ماهیان دریایی و آب شیرین انجام گرفته است (۱۷، ۱۹، ۱۰، ۱۱، ۸، ۳۳) اما در مورد گونه حاضر، مطالعه‌ای توسط Milla و همکاران(۲۰۰۶)، (۲۳). با هدف تاثیر هورمون 17,20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one بر آبگیری در مرحله رسیدگی نهایی صورت گرفته و به نقش عوامل اسموتیک اشاره نکرده است.

فرآیند آبگیری اووسیت بر حیات تخم‌ها و زندگی لاروی ماهیان تأثیر می‌گذارد پس در تکثیر و پرورش کنترل شده ماهی اهمیت بسزایی دارد (۱۵). اووسیت‌هایی با آبگیری کم به جنین‌های سالم و زنده تکامل نمی‌یابند و شواهدی در دست است که میزان آبگیری اووسیت بر قابلیت لقاح اثر دارد (۵). همچنین درصد بالای اووسیت‌های شناور نشانه‌ای از قابلیت باروری خوب آنها است. با این وجود اطلاعات ناچیزی در ارتباط با اساس قابلیت فیزیولوژیکی مناسب یا نامناسب اووسیت‌ها در جهت باروری وجود دارد (۶).

آزاد ماهیان (Salmonids) از مهمترین گونه‌های پرورشی ماهیان در سراسر دنیا می‌باشند و پرورش آنها قرن‌ها است که در جوامع مختلف در حال انجام است (۲۰). از میان این خانواده، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، بومی شمال آمریکا، از اهمیت و ارزش زیادی از نظر کیفیت گوشت، تکثیر و پرورش آسان و همچنین صید ورزشی برخوردار می‌باشد. این گونه در رودخانه تخمریزی کرده و بعنوان گونه بنتوفیل در نظر گرفته می‌شود. بهبود کیفیت مواد تناسلی مولدین و کنترل تولیدمثل آن می‌تواند ما را در دست‌یابی به تقاضای روز افزون و در حال رشد آبزی پروری در جهان کمک کند و یکی از عوامل مهم در لقاح، کیفیت اووسیتهای استحصالی از مولدین است.

هدف از مطالعه حاضر، بررسی عوامل موثر در فرایند آبگیری همچون سدیم، پتاسیم، کلر، فسفر غیر آلی و کلسیم بهمراه اسمولاریته و پروتئین تام در پلاسما و بافت

تخمدانی یک گونه رودخانه‌ای بنتوفیل (قزل آلای رنگین کمان) با توجه اهمیت آن طی تکوین اووسیت می‌باشد.

مواد و روشها

نمونه برداری و خونگیری از ماهی: مولدین ماده قزل‌آلا (در مجموع ۱۰ قطعه) از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی در تنکابن استان مازندران تهیه شدند. بلافاصله پس از صید، نمونه‌ها را با عصاره گل میخک (۰/۳۳ گرم در لیتر) بیهوش کرده و از رگ دمی ماهی خونگیری انجام می شود. سپس خون در آزمایشگاه سانتریفیوژ شده (دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) و پلاسمای آن در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد برای اندازه‌گیری کاتیونها، فسفر غیر آلی، اسمولاریته و پروتئین تام نگهداری شد. پس از تعیین مراحل تکوین اووسیت توسط زارع (۲)، نمونه‌های خونی هر مرحله تکوین از هم تفکیک گردیدند.

هموژن کردن اووسیت‌ها: با مخلوط کردن آب دیونیزه با اووسیت (به نسبت ۱۰۰میلی‌لیتر به یک گرم اووسیت) و با استفاده از دستگاه هموژنایزر، اووسیت‌ها کاملاً هموژن شدند. مایع به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور و در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی توسط سمپلر با دقت جمع‌آوری و اپندورف در دمای ۲۰- قرار داده شد تا آنالیزهای مربوط به اووسیت انجام گیرد. همچنین با اندازه‌گیری وزن مقداری از تخمدان تازه هر ماهی و اندازه‌گیری مجدد آن بعد از خشک شدن کامل، درصد آب اووسیت در هر مرحله به دست آمد.

اندازه گیری کاتیونها: اندازه‌گیری یونهای سدیم و پتاسیم با روش شعله سنجی و با دستگاه Flame photometer 310C انجام شد و کلسیم، آنیون کلر و فسفر غیر آلی به شیوه رنگ سنجی با استفاده از Technicon RA-1000 Analyzer اندازه‌گیری شدند.

اندازه گیری اسمولاریته و پروتئین تام: اندازه‌گیری اسمولاریته توسط دستگاه اسمومتر (Osmometer, Automatic Roebling) در مراحل مختلف رشد تخمدان انجام گرفت. از روش Bradford (۴) برای بررسی و اندازه‌گیری غلظت پروتئین تام با استفاده از آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) به عنوان محلول استاندارد در مراحل مختلف تکوین اووسیت استفاده شد.

آنالیز داده‌ها و مقایسه آماری: برای اندازه‌گیری قطر متوسط اووسیتها توسط میکرومتر چشمی در زیر میکروسکوپ نوری در هر مرحله از تکوین اووسیت، تعداد ۳۰ اووسیت از هر قطعه ماهی مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با روش کولموگراف-اسمیرونف، تغییرات در قطر اووسیت، اسمولاریته، کاتیونها، فسفر غیرآلی پلاسمای خون و اووسیت ماهی بهمراه پروتئین تام بوسیله تست یکطرفه ANOVA و پس آزمون Duncan با سطح اطمینان ۹۵ درصد ارزیابی شدند. همچنین رابطه بین فاکتورها از طریق همبستگی آنالیز شدند. تمام آنالیزها از طریق نرم افزار SPSS و EXCEL در محیط ویندوز کامپیوتر انجام گرفت.

لازم به ذکر است که طبق مشاهدات بافت شناسی زارع (۲)، مراحل رشد تخمدانی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان جهت بررسی فرایند آبگیری، به سه مرحله اصلی پیش زرده سازی [Previtellogenesis (PreVit.)] زرده‌سازی [Vitellogenesis (Vit.)] و رسیدگی [Maturation (Mat.)] تقسیم گردید

نتایج

تمامی پارامترهای ارزیابی شده طی سه مرحله تکوین اووسیت در جدول ۱ آورده شده است.

قطر اووسیت، میزان آب و اسمولاریته : قطر اووسیت بهمراه میزان آب در مراحل رشد تخمدان مرتباً افزایش یافته بطوریکه در مرحله رسیدگی با مراحل قبل اختلاف معنی‌دار داشته ($P< 0.05$) و بترتیب به بیشینه ۶۳,۲۵

درصد و ۵٫۰۴ میلیمتر رسیدند (جدول ۱).

جدول ۱ – داده های ماهی قزل آلا طی مراحل رشد تخمدان.

مراحل تکوینی	قطر اووسیت	محتوای آب سلول(%)	P. Na^+	O. Na^+	P. K^+	O. K^+	O. Pr^-	P. Osm
PreVit.	۳٫۷±۰٫۱^c	۵۸٫۰۱±۲^b	۱۳۵٫۲±۱۹٫۴۴^a	۶٫۲±۰٫۷۵^c	۰٫۴۴±۰٫۰۴	۴٫۷۲±۱^b	۱٫۲±۰٫۰۶^a	۴۴۳٫۴±۱۳٫۸^a
Vit.	۴٫۳۲±۰٫۹۵^a	۵۸٫۳۷±۰٫۵^b	۱۵۰٫۲±۱۲٫۵^a	۱۰٫۲±۰٫۷۵^b	۰٫۴۴±۰٫۰۴	۵٫۲۲±۰٫۳۳^b	۱٫۰۹±۰٫۰۷^b	۴۳۵٫۲±۷٫۷۶^a
Mat.	۵٫۰۴±۰٫۲^a	۶۳٫۲۵±۱^a	۱۲۷٫۸±۱۳٫۸۸^b	۱۲±۱٫۰۵^a	۰٫۴۶±۰٫۰۴	۶٫۵۰±۰٫۳۳^a	۰٫۹۷±۰٫۰۵^c	۳۵۴٫۶±۱۷٫۲۴^b

ادامه جدول ۱ :

O. Osm	O. Ca^{++}	P. Ca^{++}	O. Pi	P. Pi	O. Cl^-	P. Cl^-
۱۹٫۶±۱٫۰۴^c	۱٫۴۲±۰٫۲۵	۱۱٫۸۲±۰٫۶۲^a	۲٫۴۶±۰٫۵^c	۳۶٫۰۳±۴٫۶^a	۲٫۷۴±۰٫۵۷^b	۱۳۰٫۷۸±۴٫۲۱
۲۱٫۸±۱٫۲۵^b	۱٫۵۳±۰٫۰۳	۱۲٫۲۰±۰٫۲۲^a	۳٫۵۳±۰٫۲۵^b	۱۳٫۳۸±۱٫۵۸^c	۴٫۳۲±۰٫۱۶^a	۱۲۶٫۴۴±۵٫۲۶
۲۴±۱٫۴۶^a	۱٫۴۷±۰٫۰۷	۱۰٫۱۲±۱٫۳۳^b	۴٫۱۸±۰٫۲^a	۲۷٫۵۵±۳٫۲۹^b	۴٫۴۵±۰٫۱۶^a	۱۲۴٫۷۶±۴٫۷۴

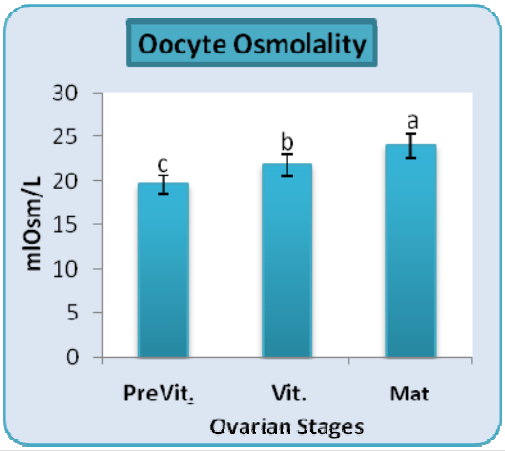
P.Na : سدیم پلاسما (mlEq/L)، O.Na : سدیم اووسیت (mlEq/L)، P.K : پتاسیم پلاسما (mlEq/L)، O.K : پتاسیم اووسیت (mlEq/L)، O.Pr : پروتئین اووسیت (mg/ml)، P.Osm : اسمولاریته پلاسما (mlOsm/L)، O.Osm : اسمولاریته اووسیت (mlOsm/L)، O.Ca : کلسیم اووسیت (mlg/dl)، P.Ca : کلسیم پلاسما (mlg/dl)، O.Pi : فسفات غیر آلی اووسیت (mlg/dl)، O.Cl :کلر اووسیت (mlg/dl)، P.Cl : کلر پلاسما (mlg/dl). مرحله پیش زرده سازی.PreVit، مرحله زرده سازی .Vit، مرحله رسیدگی .Mat. حروف لاتین نشان دهنده معنی دار بودن پارامترها در مراحل مختلف تکوین تخمک می باشد

میزان اسمولاریته در طی مراحل رشد تخمدان بطور معنی-داری در اووسیت افزایش و در پلاسما کاهش یافت (P<0.05) (شکل‌های ۱ و ۲). میزان همبستگی مثبت قویی بین اسمولالیته و میزان آب اووسیت (**r=۰٫۸۲**) و همچنین همبستگی منفی‌قویی بین اسمولاریته پلاسما و میزان آب (r= -۰٫۹۹) وجود داشت.

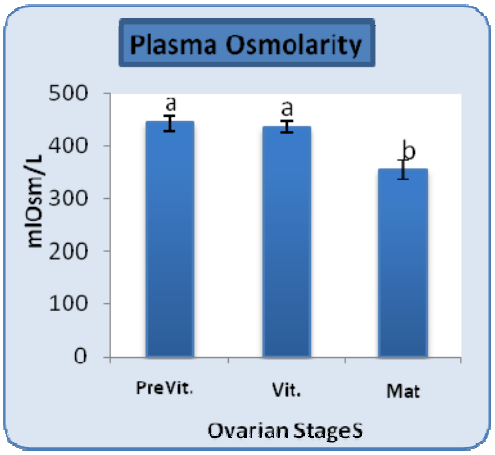
سدیم: میزان سدیم اووسیت روند صعودی داشته و در مرحله زرده‌سازی یکباره افزایش زیادی یافته و در ادامه در مرحله رسیدگی به بیشترین مقدار خود یعنی ۱۲±۱٫۱ میلی‌اکی‌والان در لیتر رسید (P<0.05) (شکل ۳) بر عکس اووسیت، غلظت سدیم در پلاسمای خون سیر نزولی داشته و در مرحله رسیدگی به کمینه ۱۲۷٫۸±۱۳٫۳۳ میلی-اکی‌والان در لیتر رسید (شکل۴). همبستگی مثبت بین میزان سدیم اووسیت و میزان آب اووسیت وجود داشت (r= ۰٫۷۸).

پتاسیم و کلر: بین مقدار پتاسیم و کلر اووسیت در مرحله رسیدگی با مراحل قبل افزایش و اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<0.05) (شکل ۵ و ۶). اما مقدار پتاسیم و کلر پلاسما تغییرات معنی‌داری نداشت (P>0.05) (شکل۷ و ۸). همبستگی مثبت بین پتاسیم و میزان آب اووسیت وجود داشت (r= ۰٫۹۸).

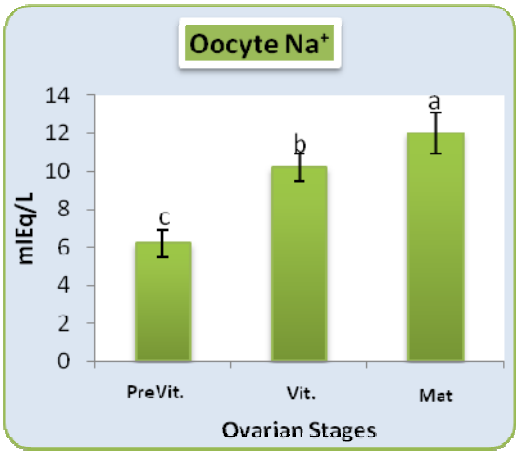
پروتئین، کلسیم و فسفر غیر آلی قزل‌آلا: میزان پروتئین تام اووسیت در هر مرحله بطور معنی‌داری کاهش یافت (P<0.05) و میزان کمینه آن ۰٫۹۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مرحله رسیدگی دیده شد (شکل ۹) و بر خلاف آن، فسفر غیر آلی سیر صعودی داشته (P<0.05) و به بیشینه خود ۱۴٫۱۸ میلی‌گرم در دسی لیتر در مرحله رسیدگی رسید (شکل ۱۰) در حالیکه میزان فسفر غیرآلی پلاسما در مرحله زرده‌سازی کاهش معنی‌داری داشته (P<0.05) و دوباره در مرحله رسیدگی افزایش چشمگیری داشت (P<0.05) (شکل ۱۱).



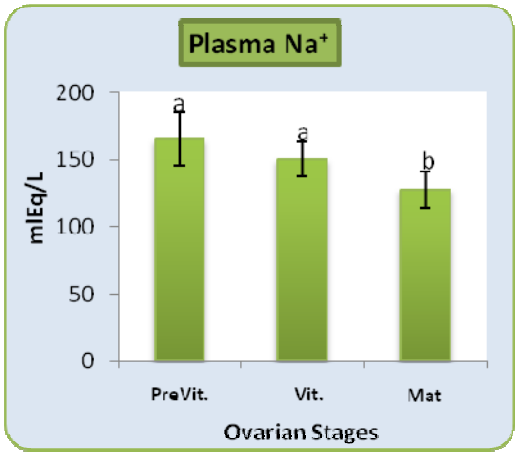
شکل ۱- اسمولاریته اووسیت طی مراحل رشد تخمدان قزل آلا



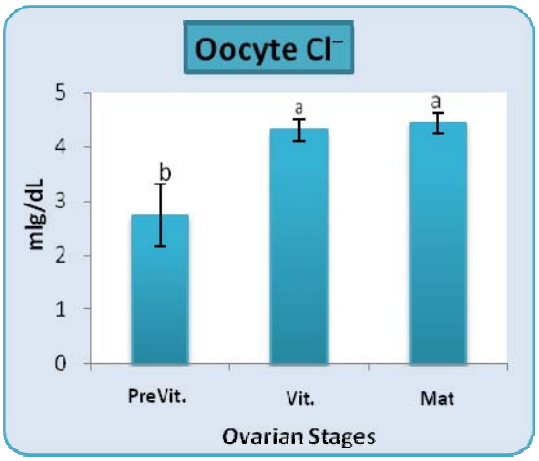
شکل ۲- اسمولاریته پلاسما طی مراحل رشد تخمدان قزل آلا



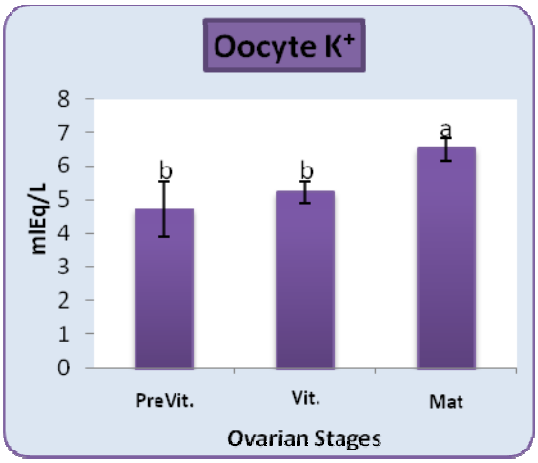
شکل ۳- تغییرات سدیم اووسیت طی مراحل رشد تخمدان قزل آلا



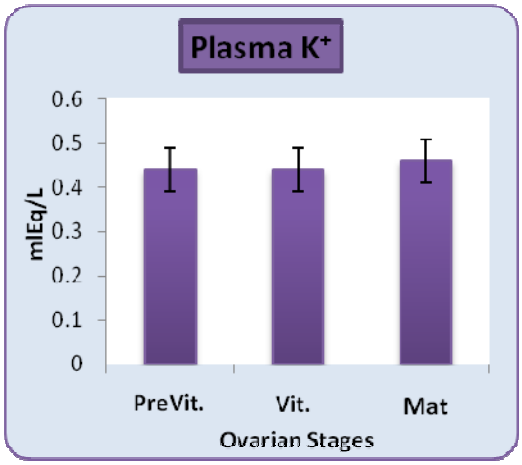
شکل ۴- تغییرات سدیم پلاسما طی مراحل رشدتخمدان قزل آلا



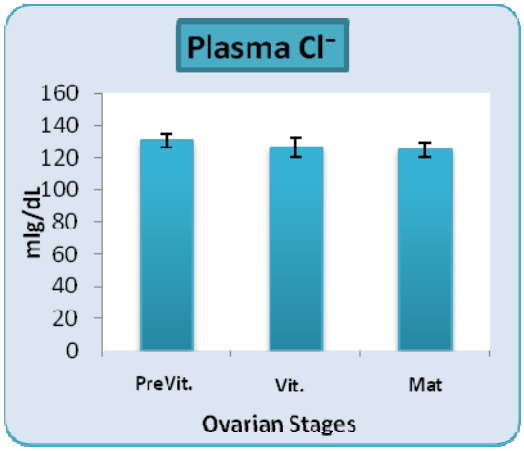
شکل ۵- تغییرات پتاسیم اووسیت طی مراحل رشد تخمدان قزل آلا



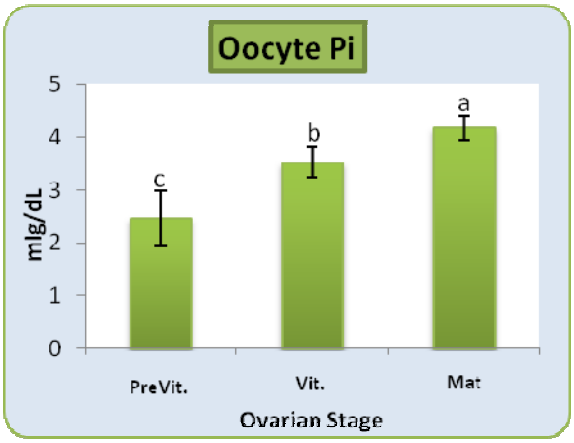
شکل ۶- تغییرات کلر اووسیت طی مراحل رشد تخمدان قزل



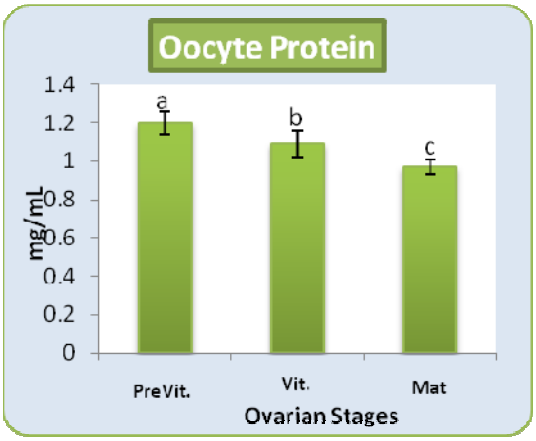
شکل ۷- تغییرات پتاسیم پلاسما طی مراحل رشد تخمدان قزل آلا



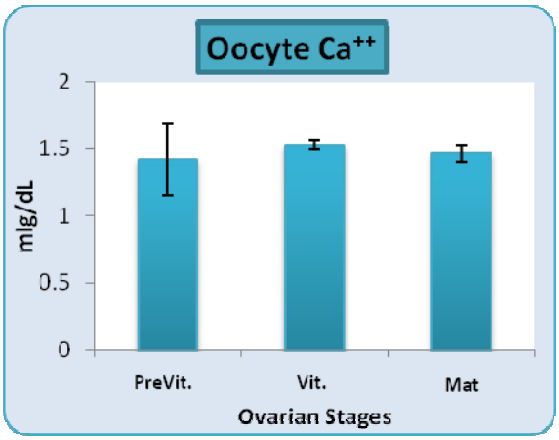
شکل ۸- تغییرات کلر پلاسما طی مراحل رشد تخمدان قزل آلا



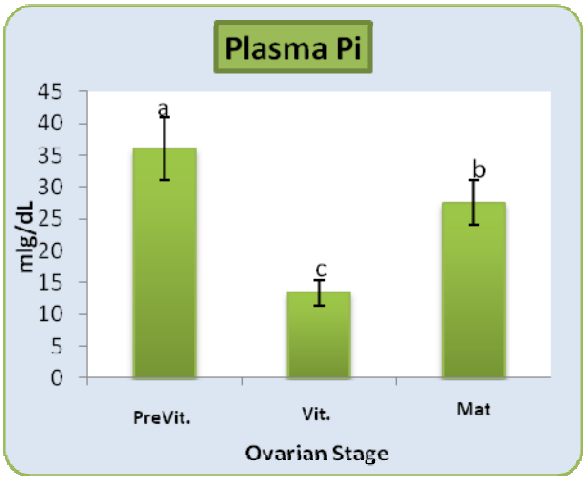
شکل ۱۰- تغییرات پروتئین تام اووسیت طی مراحل رشد تخمدان قزل آلا



شکل ۹- تغییرات فسفر غیر آلی اووسیت طی مراحل رشدتخمدان قزل آلا

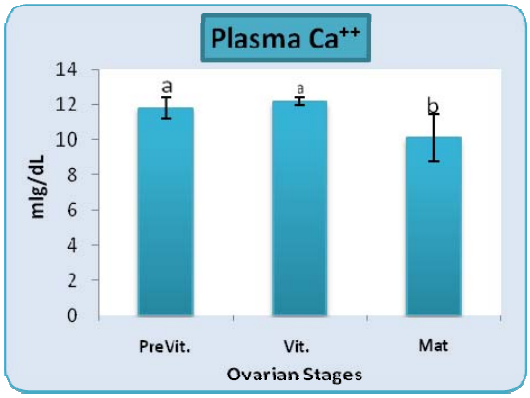


شکل ۱۲- تغییرات کلسیم اووسیت طی مراحل رشد تخمدان قزل



شکل ۱۱- تغییرات فسفر غیر آلی پلاسما طی مراحل رشدتخمدان قزل آلا

همبستگی مثبت بین فسفر غیر آلی اووسیت و میزان آب وجود داشت (r= ۰٫۸۲) در حالیکه بین پروتئین اووسیت و میزان آب و همچنین بین پروتئین و فسفر غیرآلی اووسیت همبستگی منفی‌قویی دیده شد (بترتیب r= -۰٫۹۰ و r= -۰٫۹۸). اختلاف معنی‌داری در غلظت کلسیم اووسیت مشاهده نگردید (شکل ۱۲) ولی کلسیم پلاسما در مرحله رسیدگی کاهش معنی‌دار یافت ($P<0.05$) (شکل ۱۳).



شکل ۱۳- تغییرات کلسیم پلاسما طی مراحل رشد تخمدان قزل آلا

بحث

در مطالعه حاضر عوامل اسموتیکی موثر در فرایند آبگیری اووسیت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان طی مراحل مختلف تکوین اووسیت همراه با تغییرات قطر اووسیت مورد بررسی قرار گرفت.

پدیده آبگیری توسط اووسیت در مرحله رسیدگی باعث بزرگ شدن آنها می‌شود که این فرایند در اووسیتهای پلاژیک نسبت به اووسیتهای بنتوفیل بسیار بیشتر اتفاق می‌افتد. این اتفاق در اووسیتهای پلاژیک حتی به بیش از ۹۰ درصد هم می‌رسد در حالیکه در اووسیتهای بنتوفیل این مقدار خیلی کمتر است (۲۲، ۲۷، ۱۰، ۲۸، ۹، ۱۶). از آنجاییکه اووسیت گونه های بنتوفیل در آب دریا شناور نمی‌باشد، هدف آبگیری در این گونه‌ها چه می‌تواند می باشد؟ یک احتمال توسط Greeley و همکاران(۱۹۹۱) (۱۳). با در نظر گرفتن محل تخمریزی بعضی از این گونه ها، همچون کیلی فیش (Killifish) (*Fandulus heteroclitus*) ارائه شد. کیلی فیش و دیگر اعضای خانواده کپور دندان شکلان (Cyprinodontidae) تخم‌های خود را در شکاف ساقه درختان و صدف‌های خالی ماسل‌ها و یا در بسترهای شنی می‌ریزند، که عموماً فقط در هنگام مد به زیر آب می‌روند (۳۰). بنابراین تخم-های لقاح یافته این ماهی در واقع مراحل تکوین جنینی را در مکانهای تقریباً محافظت شده بیرون از آب انجام می دهند. پس آنها قادر هستند در محیط‌های بدون آب در طی چند ماه زنده بمانند. بنابراین، این استراتژی تولیدمثل منحصر به فرد پیشنهاد می‌کند، که دلیل اولیه آبگیری اووسیت در این گونه‌ها فراهم کردن ذخیره کافی آب برای تکامل جنینی در یک محیط کاملاً نابهنجار و خشک می-باشد (۲۵) . معمولاً ذخیره آب در اووسیت ماهیان بنتوفیل آب شیرین در طی بلوغ میوزی از ٪۷۹-۵۲ به ٪۸۵-۵۶ افزایش می‌یابد. لذا، استفاده از آب توسط تخم‌های پلاژیک جهت رسیدن به شناوری، در گونه‌هایی که در آب شیرین تخمریزی می‌کنند به وضوح غیرممکن خواهد بود، در حالیکه چربی به دلیل کم چگال‌تر بودن برای این مورد ممکن است استفاده گردد (۲۹). برای مثال در ماهیان استخوانی دریایی که در آب شیرین تخمریزی می‌کنند مثل باس مخطط (*Morone saxatilis*) تخم‌ها با اینکه قطرات چربی بزرگی دارند اما آنها به جریان آب برای شناوری و زنده ماندن نیاز دارند (۲۱). همان طور که در نتایج ذکر شد اووسیت قزل‌آلا در مرحله رسیدگی ۶۳٫۲۵ درصد آب دارد. پس آبگیری در اووسیت ماهی قزل‌آلا بعنوان یک گونه بنتوفیل نمی‌تواند عامل موثری در شناوری تخمها باشد و همچنین نمی‌تواند نقش کلیدی در افزایش حجم اووسیت داشته باشد و تنها موجب افزایش ۸٫۳۶ درصدی قطر اووسیت از مرحله زرده‌سازی تا مرحله رسیدگی می شود. با توجه به محیط تخمریزی ماهی قزل‌آلا (بسترهای سنگریزه ای و شنی)، شاید دلیل آبگیری، استفاده از آن بعنوان یک عامل ضربه‌گیر در برابر شرایط خشن محیط باشد.

نیروی کششی جهت جذب آب بوسیله اووسیتهای واقع در مرحله رسیدگی دراثرهایپراسمولاریتی داخل سلول نسبت به پلاسمای خون و یا به عبارتی دیگر اسمولاریته کمتر پلاسمای خون نسبت به داخل سلول ایجاد می‌شود (۱۰). همچنانکه تحقیقات اخیر در ماهیان استخوانی بنتوفیل پیشنهاد می‌کند که افزایش درون سلولی غلظت یونهای غیرآلی بخصوص K^+ و Na^+، ممکن است محرک اسموتیک اولیه برای بازجذب آب به درون اووسیت در حال رشد باشد. روند افزایشی یونهای غیر آلی سدیم و پتاسیم در داخل اووسیت در ماهی هرینگ آتلانتیک *Clupea harengus* (۱۷) و یونهای پتاسیم و کلرید برای هالیبوت آتلانتیک *Hippoglossus hippoglossus* (۱۰)، که موجب اسموز آب به داخل سلول می شود، دیده شد. Wallace و همکاران (۱۹۹۲) (۳۳) در کیلی فیش نشان دادند که آبگیری اووسیت شدیداً وابسته به غلظت K^+ می باشد با این وجود در گونه‌های بنتوفیل که در آب شیرین یا محیط‌های با شوری پایین‌تر تخمریزی می‌کنند مثل ماهی شیرین (Sweetfish, ayu) (*Plecoglossus altivelis*) غلظت Na^+ بیشتر از K^+ در آیو در طی اووسیت گذاری مشاهده شد (۸). افزایش دو برابری غلظت یون پتاسیم نسبت به سدیم در داخل اووسیت ماهی کیلی فیش *Fundulus heteroclitus* (۱۳ و ۳۳) و کاهش تقریباً ۳,۵ برابری پتاسیم نسبت به سدیم در پلاسمای خون ماهی سفید دریای خزر (۱) در هنگام رسیدگی موجب شده که اسمولیت پتاسیم عامل اصلی و تاثیرگذار در آبگیری اووسیت باشد در حالیکه در ماهی شیرین *Plecoglossus altivelis* که یک ماهی آمفی‌دروموس نیز است، یون سدیم، اسمولیت غالب کاتیونی می‌باشد (۸). در گونه پلاژیکی همچون ماهی کادآتلانتیک *Gadus morhua* (۳۱) نقش اسموتیک کلر در آبگیری اووسیت نسبت به پتاسیم بیشتر بوده است. تمامی این تحقیقات نشان می‌دهد که برای آبگیری اووسیت در ماهیان استخوانی بنتوفیل، شوری محل تخمریزی، تعیین کننده نقش کلیدی یونهای غیرآلی در گونه‌های مختلف است (۸). مطابق انتظار در گونه مورد مطالعه، میزان غلظت یونهای سدیم، پتاسیم و کلر در داخل اووسیت بطور معنی‌داری افزایش یافت و این بدین معنی است که نیروی کششی لازم جهت ورود آب به داخل سلول در مرحله رسیدگی ایجاد شده است. همچنین میزان همبستگی یونها با میزان آب اووسیت ماهی قزل‌آلا و تغییرات آنها در اووسیت ماهی می‌تواند بیانگر این نکته باشد که پتاسیم، سدیم و کلر می‌توانند. بعنوان اسمولیتهای اصلی در آبگیری اووسیتها ایفای نقش کنند که از بین آنها پتاسیم می‌تواند نقش کلیدی‌تری داشته باشد (r=۰,۹۸).

تغییرات معنی‌دار رخ داده در یون کلسیم در پلاسمای ماهی قزل‌آلا احتمالاً ناشی از حضور پیش‌ساز زرده یعنی ویتلوژنین در پلاسما است. مولکول ویتلوژنین به لحاظ ساختاری یک پروتئین غنی شده با فسفولیپید و کلسیم است. وقتی که سنتز ویتلوژنین بواسطه هورمونهای استروئیدی القاء شود. مقادیر زیادی از یون کلسیم در این پروتئین شرکت می‌کند و به گروههای منفی فسفات این مولکول پیوند می‌خورد (۲۴). در ماهی قزل آلای رنگین کمان گزارش شده بود که افزایش کلسیم تام پلاسما طی زرده سازی مربوط به اتصال آن به ویتلوژنین است (۳). از طرف دیگر، یون کلسیم یک یون حیاتی در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی رسیدگی نهایی اووسیت بسیاری از جانوران است. پیغام کلسیمی و حضور این یون یکی از این مسیرهای متابولیکی مهم جهت اتفاقات رخ داده از جمله از سرگیری تقسیم میوز، آبگیری سلول، یکپارچه شدن زرده و GVBD در مرحله رسیدگی می‌باشد (۳۲ و ۱۴). افزایش غلظت یون کلسیم در سلول بوسیله دو مکانیسم اصلی در مرحله رسیدگی نهایی صورت می‌گیرد: ۱) شبکه گسترده اندوپلاسمیک درون اووسیت و ۲) ورود از پلاسمای خون بداخل طریق کانالهای یونی حاضر در غشای پلاسما (۳۲). کاهش میزان کلسیم پلاسمای قزل‌آلا در مرحله رسیدگی احتمالاً بدلیل ورود این یون از طریق

کانالهای یونی بداخل سلول و شرکت آن در رسیدگی نهایی اووسیت است.

در ماهیان استخوانی مختلف بهمراه پروتئولیز زرده، کاهشی در فسفر غیرآلی همراه با پروتئین تام در طی رسیدگی اووسیت در پلاسمای خون رخ می‌دهد. چنین به نظر می رسد که فسفات متصل به پروتئین می‌تواند در طی بازجذب شدید آب، منبع انرژی باشد. این نتایج بر دخالت یک پمپ ATPase/Cation برای ورود K^+ از پلاسمای خون به درون اووسیت برخلاف شیب غلظت در بستر مویرگی فولیکول تخمدان، دلالت می‌کند (۱۹). افزایش میزان فسفر غیر آلی بهمراه کاهش پروتئین تام اووسیت ماهی قزل آلا در مرحله رسیدگی می‌تواند همانند آنچه گفته شد شاهدی بر دخالت یک پمپ ATPase/Cation برای ورود K^+ از پلاسمای خون به درون اووسیت برخلاف شیب غلظت و همچنین منبع انرژی باشد.

همچنین یکی از فاکتورهای دخیل در فرایند آبگیری اووسیتها پروتئینهای زرده می‌باشد بطوریکه در گونه‌های بنتوفیل که آبگیری اووسیتها متوسط است، تجزیه محدودتری از پروتئینهای زرده جهت ایجاد نیروی کششی آب به داخل اووسیت صورت می‌گیرد (۱۸). به همین خاطر است که برخلاف تخم ماهیان دریایی، نمای کاملاً شفافی در اووسیتهای رسیده ماهیان رودخانه‌ای دیده نمی‌شود (۱۷). پس شکستن پروتئین‌های زرده به اسیدهای آمینه آزاد در طی رسیدگی اووسیت، فشار اسمزی لازم برای جذب آب به اووسیت را ایجاد می‌کند (۱۱). هرچند تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که تغییر در پروتئین زرده و یا در اسیدهای آمینه آزاد در حین رسیدگی اووسیت در ماهیان بنتوفیل رخ نمی‌دهد که این می‌تواند با کمتر بودن میزان آبگیری در آنها مطابقت داشته باشد (۱۰). با این وجود در بعضی گونه‌های بنتوفیل همچون کیلی فیش (۱۲) و ماهی سفید دریای خزر (۱) پروتئولیز محدودی در پروتئین‌های زرده رخ می‌دهد. این افزایش کم ولی مهم اسیدهای آمینه آزاد در تخم‌های بنتیک قابلیت تأثیر اسمزی در آبگیری اووسیت را دارد.

بطور کلی، بدلیل حضور تخمهای بنتوفیل در ماهی قزل‌آلا، پدیده آبگیری اووسیت درمقایسه با اووسیت ماهیان دریایی به میزان کمتر رخ می‌دهد و فرایند زرده‌سازی عامل اصلی افزایش قطر اووسیت طی مراحل تکوینی اووسیت است. همچنین می‌توان اظهار داشت که جهت رسیدگی سریعتر تخمدان ماهی قزل‌آلا در محیطهای مصنوعی و آزمایشگاهی شاید بتوان از کاتیونهایی همچون پتاسیم و سدیم با توجه به نقش مهم آنها در پدیده آبگیری (که یکی از فرایندهای اصلی جهت رسیدگی اووسیت می‌باشد) استفاده نمود.

منابع

۱. حیدری، ب.، شعبانی‌پور، ن.، سواری، احمد.، ۱۳۸۹. تغییرات اسموتیکی پلاسمای خون طی مراحل تکوینی اووسیت ماهی سفید دریای خزر *Rutilus frisii kutum*. مجله زیست شناسی ایران، ج ۲۳ (۴): ۵۶۰-۵۷۲.

۲. زارع، ف.، ۱۳۸۸. مقایسه فرایند آبگیری بین ماهی پلاژوفیل کفال طلایی (*Liza aurata*)، ماهی بنتوفیل قزل آلا (*Onchorhynchus myliss*) و ماهی آنادروموس سفید (*Rutilus frisii kutum*) طی تکوین اووسیت. تز پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان.

3. Bjornsson, B. J., and Haux, C., 1985. Distribution of calcium, magnesium and inorganic phosphate of estradiol-17b treated rainbowtrout. J. Comp. Physiol (B). 155:347-352.

4. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

5. Carnevali, O., Carletta, R., Cambi, A., Vita, A., and Bromage, N., 1999. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*. Involvement of two

lysosomal proteinases. Biol. Reprod. 60:140–146.

6. Carnevali, O., Mosconi, G., Cardinali, M., Meiri, I., and Polzonetti-Magni, A., 2001. Molecular components related to egg viability in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. Mol. Reprod. Dev. 58:330–335.

7. Cerda, J., Fabra, M., and Raldua, D., 2007. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration. *In*: Babin PJ, Cerda J, Lubzens E (eds), The fish oocyte from basic studies to biotechnological applications. Springer, Dordrecht, The Netherlands. PP: 349-396.

8. Chen, Y-N., Hsieh, S-L., and Kuo, C. M., 2003. Changes in oocyte and blood plasma osmotic components of ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck and Schlegel during oocyte maturation. Aquacult. Res. 34:859–867.

9. Finn, R. N., 2007. The maturational disassembly and differential proteolysis of paralogous vitellogenins in a marine pelagophil teleost: A conserved mechanism of oocyte hydration. Biol. Reprod. 76:936-948.

10. Finn, R. N., Ostby, G. C., Norberg, B., and Fyhn, H. J., 2002. *In vivo* oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hipoglossus*): proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx. J. Exp. Biol. 205:211–224.

11. Fyhn, H. J., Finn, R. N., Reith, M., and Norberg, B., 1999. Yolk protein hydrolysis and oocyte free amino acids as key features in the adaptative evolution of teleost fishes to seawater. Sarsia, 84:451–456.

12. Greeley, M. S., Calder, D. R., and Wallace, R. A., 1986. Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. Comp. Biochem. Physiol. 84B:1–9.

13. Greeley, M. S., Hols, H., and Wallace, R. A., 1991. Changes in size, hydration and low molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus* oocytes *in vivo*. Comp. Biochem. Physiol. 100A:639–647.

14. Hart, N. H., 1990. Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. Int. Rev. Cyto. 121, 1-66.

15. Kjorsvik, E., Mangor-Jensen, A., and Holmefjord, I., 1990. Egg quality in fishes. Adv. Mar. Biol. 26:71–113.

16. Kolarevic, J., Nerland, A., Nilsen, F., and Finn, R. N., 2008. Goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*) is an extreme vtgAa-type pelagophil teleost. Mol. Reprod. Dev. 75:1011-1020.

17. Kristoffersen, A. B., and Finn, R. N., 2008. Major osmolyte changes during oocyte hydration of a clupeocephalan marine benthophil: Atlantic herring (Clupea harengus). Mar. Biol. 154, 683-692.

18. LaFleur, G. J. Jr., Raldua, D., Fabra, M., Carnevali, O., Denslow, N., Wallace, R. A., and Cerda, J., 2005. Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in Fundulus heteroclitus. Biol Reprod. 73:815-824

19. LaFleur, G. J. Jr., and Thomas, P., 1991. Evidence for a role of Na^+, K^+-ATPase in the hydration of atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation. J. Exp. Biol. 258:126–136.

20. Lee, C. S., and Donaldson, E. M., 2001. General discussion on “Reproductive biotechnology in finfish aquaculture. Aquaculture, 197: 303-320.

21. Mangor-Jensen, A., Waiwood, K. G., and Peterson, R. H., 1993.Water balance in eggs of striped bass (*Morone saxatilis*). J. Fish Biol. 43:345–353.

22. Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C. V., and Hara, A., 1999. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. Dev. Biol. 213:18-32.

23. Milla, S., Jalabert, B., Rime, H., Prunet, P., and Bobe, J., 2006. Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and in vitro regulation by 17,20, beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol. J. Exp Biol. 209:1147-56.

24. Mommsen, T. P., and Walsh, P. L., 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. *In*: Hoar WS, Randall VJ (eds), Fish Physiology XIA. Academic Press, New York, USA. PP: 347–406.

25. Podrabsky, J. E., Carpenter, J. F., and Hand, S. C., 2001. Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 280:R123–R131.

26. Ravaglia, M. A., and Maggese, M. C., 2002. Oogenesis in the swamp eel Synbranchus marmoratus (Bloch, 1975) (Teleostei: Synbranchidae). Ovarian anatomy, stages of oocyte development and micropyle structure. Biocell 26:325-337.

27. Reith, M., Munholland, J., Kelly, J., Finn, R. N., and Fyhn, H. J., 2001. Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). J. Exp. Zool. 291:58-67.

28. Sawaguchi, S., Kagawa, H., Ohkubo, N., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V., and Matsubara, T., 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. Mol. Reprod. Dev. 73, 719-736.

29. Skoblina, M. N., 2010. Hydration of Oocytes in Teleost Fishes. Russian J. Dev. Biol. 41(1):1–12.

30. Taylor, M. H., 1984. Lunar synchronization of fish reproduction. Trans. Am. Fish. Soc. 113:484–493.

31. Thorsen, A., Kjesbu, O. S., Fyhn, H. J., and Solemdal, P., 1996. Physiological mechanisms of buoyancy in eggs from brackish water cod. J. Fish Biol. 48:457–477.

32. Tosti, E., 2006. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. Repro. Biol. Endocr. 4:1-9.

33. Wallace, R. A., Greeley, M. S. Jr, and McPherson, R., 1992. Analytical and experimental studies on the relationship between Na+, K+, and water uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation in vitro. J. Comp. Physiol. B 162:241-248.

34. Wallace, R. A., and Selman, K., 1985. Major protein changes during vitellogenesis and maturation of *Fundulus* oocytes. Dev. Biol. 110: 492–498.

35. Watanabe, W. O., and Kuo, C. M., 1986. Water and ion balance in hydrating oocytes of the grey mullet, *Mugil cephalus* (L.), during hormone-induced final maturation. J. Fish Biol. 28:425–437.

Study on hydration process of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte during its development

Heidari B., Shabanipour N. and Zare F.

Biology Dept., Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

A÷bstract

In this study, the osmotic factors affecting oocyte dehydration process (sodium, potassium, calcium, chloride, inorganic phosphorus and total protein) both ovarian tissue and plasma of rainbow trout during oocyte development were investigated. Many teleost oocytes show increasing the oocyte volume and water content during the final maturation, a process known as oocyte hydration. The plasma of developing fish after blooding and also oocyte after being homogenized were kept in -20^{oC} for analysis of parameters. The sodium and potassium ions by a Flamephotometry, chlorine, calcium and inorganic phosphate with a Colorimetry and finally total protein by the Bradford method along with the water content, osmolarity and diameter of oocyte in three developmental stages Previtellogenesis, Vitellogenesis and Maturation were measured. The results showed that potassium, sodium and chlorine with inorganic phosphorus in the oocyte had a significant trend ($P<0.05$) while the oocyte protein and plasma calcium showed a significant decline ($P<0.05$). In addition, the strong positive correlation between the amount of water and potassium, inorganic phosphorus, sodium and chlorine of oocyte, respectively, were present. It seems that all the mentioned changes, provide the force necessary to pull water into oocyte for hydration. In general, due to the presence of benthophil eggs in the rainbow trout, the oocyte hydration process compared to marine fish oocytes occur less nonetheless, the use of ions such as potassium, sodium and chlorine according to their important role in hydration phenomena can be studied for the more rapid maturation of ovarian trout in the artificial centers.

Key words: hydration, maturation, trout, benthophil