

تریپلوئید و دیپلوئید

ایمان سوری نژاد^۱، محمدرضا کلباسی^۲

چکیده

نظر به اهمیت اقتصادی تولید آزاد ماهیان تمام ماده تریپلوئید در آبی پروری و اثرات القاء تریپلوئیدی بر بعضی تغییرات ریخت شناسی سلولهای مثل گلبول قرمز خون، در مطالعه حاضر، تغییرات ریخت شناسی این سلول ها در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان تمام ماده دیپلوئید و تریپلوئید در دومین سال پرورش در 20 ماهگی در فصل زمستان مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نهایی بررسی 43 گسترش خونی ماهی تریپلوئید و 46 گسترش خونی ماهی دیپلوئید که با محلول گیمرسا 10 درصد رنگ آمیزی شده بودند تفاوت معنی داری ($P < 0/01$) را در حدود 5/18٪ برای تقسیم هسته گلبول قرمز و 0/27٪ برای گلبولهای به هم پیوسته در جمعیت تمام ماده تریپلوئید در مقایسه با صفر درصد در همتای دیپلوئید نشان داد. تصور می شود که این اشکال غیر نرمال، مراحل یک فرایند تقسیم گلبول قرمز جهت افزایش میزان هماتوکریت و ظرفیت انتقال اکسیژن در ماهیان تریپلوئید دچار استرس تنفسی باشد.

کلمات کلیدی:، ناهنجاری، گلبول قرمز، تمام ماده تریپلوئید، قزل آلاهی رنگین کمان

¹ - دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، گروه شیلات

² - دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، گروه شیلات

بیوتکنولوژی القاء تریپلوئیدی به عنوان یک ابزار ژنتیکی در آبی پروری توجه زیادی را در سال های اخیر جلب کرده است. استفاده از موجودات تریپلوئید $3n$ کروموزومی عقیم که دلیل اختلال در تقسیم میوز ایجاد می شوند کاربردهای مهمی در زیست شناسی مولکولی بواسطه محتوای DNA بیشتر، حجم سلولی بزرگتر و کاهش نسبت سطح به حجم دارد(2). یک نوع سلول که ظاهراً با القاء تریپلوئیدی متاثر می شود گلبول قرمز خون است. اگرچه این سلول ها در ماهیان تریپلوئید هسته کشیده تر و حجم بزرگتری دارند، اما تعداد کل آنها در خون کاهش می یابد که منجر به کاهش ظرفیت حمل اکسیژن بوسیله هموگلوبین می گردد(8). همچنین، این سلول ها خصوصیات ریخت شناسی غیر نرمال را با تعداد بیشتری در تریپلوئیدها نسبت به همای دیپلوئید نشان می دهند که از آن جمله می توان به پدیده های تقسیم هسته، گلبول های به هم پیوسته و در مجموع فرایندی شبیه به یک عمل تقسیم سلولی اشاره کرد(6) که مراحل آن در ماهی طلائی پلی پلوئید شرح داده شد(3). این مطالعات بیان می نمایند که چنین سلول های غیر نرمالی، گبول های قرمز نابالغ اند و سنتز هموگلوبین را نشان می دهند. بیان شده است که تعداد این سلول های غیر نرمال در واکنش به استرس تنفسی افزایش می یابد که این مشاهده منجر به این فرضیه توسط محققان شد که گلبول های قرمز نابالغ، فرایند تقسیمی را در واکنش به استرس تنفسی در تلاش برای افزایش هماتوکریت و بنابراین افزایش ظرفیت حمل اکسیژن خون انجام می دهند. همچنین میزان تغییرات شکلی گلبول های خون در ماهی قزل آلی جویباری تریپلوئید در سال 2004 بررسی گردید(9). با توجه به توضیحات ارائه شده، هدف اصلی مطالعه حاضر، بررسی گلبول های قرمز با اشکال غیر نرمال در ماهی قزل آلی رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* تمام ماده دیپلوئید و تریپلوئید در 20 ماهگی برای مقایسه تعداد آنها به عنوان یک متغیر مهم منعکس کننده شرایط تنفسی ماهیان بود.

جمعیت تمام ماده تریپلوئید از ترکیب اسپرم نرهای تغییر جنسیت یافته (Neomale) با تخمک ماده‌های معمولی همراه با شوک گرمایی $26/5$ درجه سانتیگراد به مدت 20 دقیقه و پس از گذشت 20 دقیقه از عملیات لقاح و جمعیت تمام ماده دیپلوئید نیز به طریق مشابه و بدون شوک دهی از یک گروه یکسان از تخمک ها تولید شدند. ماهیان انگشت قد در تانک های مربع شکل جداگانه به ابعاد $1/5 \times 1/5 \times 0/7$ متر با تراکم مطلوب در هر تانک تحت شرایط یکسان محیطی و تغذیه ای تا مرحله پیش از بلوغ تا 20 ماهگی در شرایط معمول پرورش این گونه پرورش یافتند. از آنجا که کاربرد شوکهای دمایی در ماهیان منجر به القاء درصدهای متفاوتی از تریپلوئیدی می‌شود در نمونه برداری از هر دو تیمار ماهیان، باید نسبت به سنجش سطح پلوئیدی اقدام نمود. سنجش میزان پلوئیدی در ماهیان مورد بررسی، با استفاده از روش تهیه گسترشهای خونی و محاسبه حجم و مساحت هسته و سلول گلبولهای قرمز خون انجام پذیرفت (5). بدین منظور، پس از بی هوشی ماهیان و خونگیری از ساقه دم، از هر ماهی، دو لام گسترش خونی تهیه و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $1000 \times$ و از طریق میکرومتر، ابعاد سلول و هسته پانزده عدد از گلبولهای قرمز اندازه-گیری شده و با استفاده از روابط مربوط، مساحت و حجم هسته و سلول گلبولهای قرمز محاسبه می‌گردید. با توجه به حدود $1/5$ برابر شدن ابعاد گلبول قرمز در ماهیان تریپلوئید نسبت به ماهیان دیپلوئید (2)، ماهیانی که بین $1/4$ تا $1/6$ برابر افزایش در ابعاد گلبولهای قرمز نشان می‌دادند به عنوان ماهیان تریپلوئید قلمداد شدند. از 2 گسترش خونی تهیه شده برای هر ماهی (در مجموع شامل 43 ماهی تریپلوئید و 46 ماهی دیپلوئید)، تعداد 350-400 گلبول قرمز با بزرگنمایی $400 \times$ جهت تعیین اشکال غیر نرمال گلبول ها شمارش می شدند (9). تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصله در نرم افزار SPSS با استفاده از آزمون T غیر جفتی انجام گردید.

نتایج

نتایج محاسبه مساحت و حجم هسته ای و سلولی گلبول های قرمز خون نشان داد که ابعاد هسته و سلول گلبول های قرمز $1/46$ تا $1/6$ برابر در ماهیان تمام ماده تریپلوئید بزرگتر از دیپلوئید بود؛ اما بعضی از آنها تغییرات غیر نرمال سلولی و هسته ای مثل تقسیم هسته به دو قسمت تقریباً مساوی (segmentation) (شکل 1) نشان می دادند که میزان آن $5/18\%$ در تریپلوئیدها در مقایسه با 0% در دیپلوئیدها بود (جدول 1). همچنین پدیده ای شبیه به تقسیم سلولی که با دمبلی شکل شدن سلول ها همراه است (linked erythrocytes) (شکل 1) به میزان $0/27\%$ در تریپلوئیدها در مقایسه با 0% در دیپلوئیدها قابل مشاهده بود (جدول 1).



جدول 1 درصد تقسیم هسته و گلبولهای قرمز به هم پیوسته در ماهیان تمام ماده دیپلوئید و

تریپلوئید قزل آلا در 20 ماهگی ($P < 0/05$)

شاخص	تقسیم هسته	گلبولهای به هم پیوسته
تمام ماده تریپلوئید	$5/18^a\%$	$0/27^a\%$
تمام ماده دیپلوئید	$0/00^b\%$	$0/00^b\%$

شواهد زیادی دال بر وجود استرس تنفسی ذاتی در ماهیان تریپلوئید نسبت به دیپلوئیدها وجود دارد(2). بیان شده است که تعداد کل گلبول های قرمز، میزان هماتوکریت و هموگلوبین ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل آلی رنگین کمان پایین تر از دیپلوئیدهاست(1). همچنین قزل آلی رنگین کمان تریپلوئید نسبت به دیپلوئید بیشتر در معرض اثرات مزمن درجه حرارت بالا با میزان اکسیژن محلول کمتر بود(4). بنابراین اگر ماهیان تریپلوئید از استرس تنفسی مزمن رنج می برند، منطقی است تصور کنیم که اشکال غیر نرمال گلبول قرمز در نتیجه فرایند تقسیمی اند که تلاش می کند با افزایش تعداد کل گلبول قرمز، ظرفیت حمل اکسیژن خون را افزایش دهد. در این فرایند تقسیم، پدیده تقسیم هسته و گلبول های به هم پیوسته، مراحل اول و سوم این فرایند 5 مرحله ای اند و در انتها دو سلول مجزا تولید می شوند(3و6). گلبول های به هم پیوسته با توجه به پیشرفت سریع این مرحله تجمع زیادی ندارند و بنابراین این پدیده کمتر از پدیده تقسیم هسته مشاهده می گردد (6). دلیل احتمالی دیگر برای افزایش تعداد گلبول غیر نرمال در ماهیان تریپلوئید کمبود اسید فولیک جیره است. ماهی آزاد coho تغذیه شده با جیره دچار کمبود اسید فولیک، تعداد زیادی گلبول های قرمز به هم پیوسته همانند تحقیق حاضر نشان داد (7). از آنجا که میزان اسید فولیک در جیره های غذایی تحقیق حاضر تعیین نشد، بنابراین برای نقش احتمالی این اسید، تحقیقات بیشتری نیاز است. در نتیجه گیری کلی، گلبول های قرمز خون در ماهیان تریپلوئید تغییرات ریخت شناسی قابل توجهی را در واکنش به استرس تنفسی ناشی از القاء تریپلوئیدی نشان می دهند. از آنجا که شواهد فزاینده دلالت می نمایند این واکنش های سلولی یک فرایند تقسیم جهت افزایش میزان هماتوکریت خون می باشند، این فرضیه که گلبول های قرمز هسته دار در واکنش به استرس تنفسی جهت افزایش ظرفیت حمل اکسیژن خون تقسیم می گردند یک پدیده جالب است و داده های تحقیق حاضر موید این مطلب می باشد. این فرایند نوظهور می تواند سکوی پرتاب بزرگی برای تحقیقات آینده در زمینه زیست شناسی و فیزیولوژی مولکولی باشد.

- 1- سوری نژاد ا، کلباسی م ر، سلطان کریمی س. بررسی تاثیر القاء تریپلوئیدی بر برخی شاخص های خون شناسی ماهیان نابالغ تمام ماده قزل آلاهی رنگین کمان در فصل زمستان. مجله علوم دریایی، دوره پنجم، شماره اول و دوم، بهار و تابستان 1385.
2. Benfey TJ (1999) The physiology and behavior of triploid fishes. *Reviews in fisheries science*. 7: 39-67
3. Murad A., Houston AH., Samson L (1990) Haematological response to reduced oxygen-carrying capacity, increased temperature and hypoxia in goldfish, *Carassius auratus* L. 36: 289-305
4. Ojolick EJ., Cusack R., Benfey TJ., Kerr SR (1995) Survival and growth of all female diploid and triploid rainbow trout (*Orncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture* 131: 177-187
5. Perovic IS., Coz RR., Popovic N (2003) Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout. *Vet. Med. Czech*. 48: 215-219
6. Piercy S (2005) The circulating erythrocytes of triploid brook trout. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of bachelor of science. Department of Biology, The University of New Brunswick. 40P
7. Smith CE., Halver JE (1969) Folic acid anemia in coho salmon. *J. Fish. Res. Bd. Canada*. 26: 111-114
8. Stillwell EJ., Benfey TJ (1999) The blood hemoglobin concentration of triploid brook trout. *Fish Performande Studies*. Department of Fisheries and Oceans, Vancouver, British Columbia, and Towson University, Baltimore, Maryland, pp: 1155-1159
9. Wlasow T., Kuzminski H., Woznicki P., Ziomek E (2004) Blood cell alterations in triploid brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Acta Vet. Brno*. 73: 115-118

Study of Erythrocyte Morphological Abnormalities in All Female Triploid and Diploid Rainbow Trout

Sourinezhad I., Kalbassi M.R.

I_sourinezhad@yahoo.com

Tarbiat Modares University, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Department of Fisheries

Abstract

Regarding economical importance of producing all female triploid populations of salmonid fish in aquaculture and consequent effects of triploidy induction on some morphological alterations of some cells like blood erythrocyte, in present study, erythrocyte structural alterations were investigated in all female diploid and triploid rainbow trout in the second year of culture at 20 months of age in winter. Final results on the 43 triploid and 46 diploid fish blood smears stained with 10% giemsa showed significant differences ($P < 0.01$) about 5.18 % erythrocyte nuclei segmentation and 0.27 % linked erythrocytes in all female triploids in compare to 0.00 % in diploid counterparts. It is hypothesized the peculiar abnormalities are the stages of an erythrocyte division process to increase blood hematocrite and oxygen carrying capacity of respiratory stressed triploid fish.

Keywords: Abnormality, Erythrocyte, All Female Triploid, Rainbow Trout