تاثیرات دوره‌های نوری بلند مدت بر تاخیر روند تکامل گناد در ماهی ماده قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)
۱. (بررسی جنبه‌های ساختاری)

احمد نوری[۱*]، باقر مجازی امیری[۲]، علیرضا میرواقفی[۳]، غلامرضا رفیعی[۳] و بی‌تا کلوانی نیتلی[۴]

[۱]گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندر عباس، ایران، صندوق پستی ۳۹۹۵
[۲]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران، صندوق پستی ۴۳۱۴-۳۱۵۸۵
[۳]گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران، صندوق پستی ۴۳۱۴-۳۱۵۸۵
[۴]دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران، صندوق پستی: ۳۵۶-۴۶۴۱۴

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۳ - تاریخ تصویب:۱۳۹۰/۱۲/۲۷)

چکیده

در این مطالعه، اثرات دو رژیم نوری با روشنایی بلند مدت بر روند تکامل تخمک و تغییرات ساختاری آن در ماهی ماده قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان دوساله غیر بالغ با میانگین وزن اولیه ۲/۲۵ ± ۲۷۹/۹۴ (SE ±) گرم از تیرماه ۱۳۸۷ به مدت پنج ماه تحت تاثیر دوره‌های نوری ۲۴ ساعت روشنایی و بدون تاریکی (روشنایی-تاریکی ۲۴:۰)، ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی (روشنایی-تاریکی ۱۸:۶) و همچنین دوره روشنایی و تاریکی طبیعی (به عنوان گروه کنترل) قرار گرفتند. در انتهای دوره آزمایش، بررسی نتایج بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در روند تکامل تخمک در بین گروه‌های آزمایشی بود. گروه کنترل که تحت تاثیر دوره روشنایی-تاریکی طبیعی قرار گرفته بود بیشترین قطر تخمک را نشان داد به نحوی که به طور معنی‌داری این مقدار (۰/۰۷ ± ۲/۳۴ میلیمتر) بیش از مقادیر به دست آمده در دو گروه تیماری دیگر بود ($P < 0.05$). استفاده از دوره روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ باعث گردید تا ماهیان این گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری در انتهای آزمایش تکامل کمتری را در لایه‌های فولیکولی تخمک‌ها نشان دهند. در گروه‌های روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ و به ترتیب تعداد سلول‌های گرانولوزا ۲۱ ± ۳۴۹ و ۲۳ ± ۴۰۶ عدد به دست آمد که به طور معنی‌داری کمتر از این مقدار (۲۰ ± ۷۷۳) در گروه کنترل بود ($P < 0.05$). مساحت سلول‌های گرانولوزا نیز در گروه‌های تیماری روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. این مقدار در گروه‌های روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ به ترتیب ۰/۶۰ ± ۱۶/۵۸ و ۰/۳۳ ± ۱۶/۷۳ میکرومتر مربع بود در حالیکه در گروه کنترل، این مقدار ۰/۴۲ ± ۱۹/۲۸ میکرومتر مربع ثبت شد که به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$) و بیانگر تکامل بیشتر و فعالیت بیشتر این سلول‌ها در این گروه بود. در نتیجه، کاربرد دوره‌های نوری با مدت زمان روشنایی طولانی در مرحله رشد و تکامل گنادها، می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های موثر و عملی در تاخیر روند تکامل گنادها در ماهی ماده قزل‌آلای رنگین کمان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، دوره‌های نوری بلند مدت، قطر تخمک، سلول‌های فولیکولی، رسیدگی جنسی

* نویسنده مسئول: تلفن:۰۹۱۲۵۱۸۶۰۳۱ فاکس:۰۷۶۱۷۶۶۰۰۱۴ E-mail: Noori@hormozgan.ac.ir

مقدمه

بلوغ و رسیدگی جنسی در ماهیان، یک روند تکاملی است که گذر از مرحله نوجوانی به مرحله بلوغ را شامل می‌شود که مشخصه اصلی آن، شروع مراحل تولید گامت‌ها و تکامل آنها می‌باشد. در ماهیان ماده مهمترین و بارزترین مرحله تکاملی، تولید زرده در کبد و جذب و ذخیره آن در اووسیت‌های در حال رشد و تکامل است. در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) همانند سایر ماهیان استخوانی، این روند تحت تاثیر فعالیت هورمون‌های عصبی و درون ریز محور مغز-هیپوفیز-گناد صورت می‌گیرد. در طی روند تکامل گنادها، علاوه بر این محور که نقش اصلی و عمده کنترل کننده را بر عهده دارد، اندام‌های دیگری همچون کبد نیز در تولید ویتلوژنین یا پیش ماده تولید زرده که در طی روند رشد تخمک‌ها در داخل آنها ذخیره می‌شوند نقش حیاتی را بر عهده دارند. فاکتورهای محیطی و خارجی با تاثیر بر محور مغز-هیپوفیز-گناد، ترشح هورمون‌های عصبی و درون ریز موثر از این بخش را کنترل نموده و به دنبال آن مراحل و روند تکامل تخمک‌ها را تسریع و یا به تأخیر می‌اندازد. در این راستا تغییرات ساختاری قابل ملاحظه‌ای در اووسیت‌ها و گنادها دیده می‌شود که لازمه پیشرفت این مراحل تکاملی می‌باشد. از جمله این تغییرات ساختاری می‌توان به تغییرات صورت گرفته در اندازه قطر تخمک و نیز اندازه و تعداد سلول‌های فولیکولی اشاره نمود. با پیشرفت این مراحل تکاملی، به دلیل افزایش فعالیت‌های استروئید زایی سلول‌های فولیکولی، تعداد و اندازه این سلول‌ها تغییر می‌کند. همچنین به دلیل تاثیر این استروئیدهای تولیدی (به خصوص هورمون استروئیدی ۱۷ بتا استرادیول) بر سلول‌های کبدی و تحریک این بخش به تولید زرده و تجمع آن در داخل اووسیت‌ها، اندازه اووسیت‌ها به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد که به دنبال آن گنادها رشد قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهند.

فاکتورها و عوامل خارجی نظیر دوره روشنایی، درجه حرارت، وجود غذا در محیط، وجود بستر مناسب تخمریزی و غیره در تنظیم روند رسیدگی جنسی از طریق تاثیر بر محور مغز-هیپوفیز-گناد عمل می‌نمایند. بسته به اینکه این عوامل در چه زمان و به چه صورت بر این سطوح تاثیر میگذارند ممکن است نقش تحریک کنندگی و یا بازدارندگی بر این سطوح فیزیولوژیکی اعمال نموده و در نتیجه روند تکامل گنادی را تسریع کرده و یا به تاخیر اندازند. از میان تمام عوامل محیطی، دوره روشنایی مهمترین تاثیر را بر روند تولید مثل در ماهیان اعمال می‌نماید (Bromage *et al.*, 2001; Carrillo *et al.*, 1993). دوره‌های روشنایی مختلفی تاکنون با موفقیت به منظور تغییر روند رسیدگی جنسی و زمان تخم‌دهی در گونه‌های اقتصادی به کار گرفته شده است (Bromage *et al.*, 2001; Kissil *et al.*, 2001; Taranger *et al.*, 1999; Zanuy *et al.*, 2001). با وجود مطالعات صورت گرفته بر روی ماهیان مختلف، اطلاعات محدودی در ارتباط با تاثیر رژیم‌های بلند مدت روشنایی بر روند رشد تخمک و تکامل تخمدان در ماهی قزل آلای رنگین کمان موجود است (Randall *et al.*, 2001). خصوصاً کمبود این اطلاعات در رابطه با تاثیرات ساختاری بر سلولهای سوماتیک و جنسی صورت گرفته بیشتر احساس می‌شود. همچنین با توجه به اینکه در بحث تولید ماهیان بازاری تمایل به سوی تولید ماهیانی با گوشت بیشتر وجود دارد و در این راستا، جلوگیری از بروز رسیدگی جنسی در ماهیان با هدف تولید گوشت بیشتر نیز مطلوب می‌باشد، در این تحقیق سعی بر آن شده است تا با استفاده از دوره‌های نوری مصنوعی بلند مدت، در مرحله حساس رشد و زرده گیری تخمک ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، به بررسی تاثیرات ساختاری صورت گرفته شامل تغییرات به وجود آمده بر تعداد و اندازه سلول‌های گرانولوزا و نیز قطر تخمک به عنوان شاخص رشد تخمک پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

ماهیان مورد مطالعه

جهت اجرای این تحقیق، ماهیان قزل آلای رنگین کمان ماده دو ساله با میانگین وزن ۲/۲۵ ± ۲۷۹/۹۴ گرم و مشابه از نظر مرحله رسیدگی جنسی مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور از میان ماهیان مورد آزمایش تعداد ۱۰ عدد ماهی به طور تصادفی نمونه گیری شده و بعد از کالبد شکافی و نمونه برداری از گناد، مرحله رسیدگی تخمک‌ها مورد بررسی قرار گرفت. این ماهیان همگی همسن بوده و تا قبل از شروع آزمایش، همگی در شرایط طبیعی در مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر کلاردشت پرورش داده می‌شدند.

نحوه اجرای تحقیق

مدت زمان اجرای این مطالعه ۵ ماه و از تیرماه تا آذر ماه سال ۱۳۸۷ به طول انجامید. در این بررسی ماهیان تحت تاثیر دو رژیم روشنایی بلند مدت مصنوعی، شامل گروه ۲۴ ساعت

روشنایی (گروه روشنایی-تاریکی ۲۴:۰) و ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی (گروه روشنایی-تاریکی ۱۸:۶) و نیز یک رژیم نوری طبیعی به عنوان گروه کنترل قرار گرفتند. تعداد ۱۰۰ عدد ماهی در هر یک از گروه‌های تیمار در نظر گرفته شد که به این ترتیب در این مطالعه از ۳۰۰ قطعه ماهی استفاده گردید. ماهیان به منظور سازگار شدن با شرایط آزمایشی، به مدت ۲ هفته بدون هیچگونه دستکاری در گروه‌های آزمایشی قرار گرفتند. در این مطالعه از استخرهای مربع شکل سیمانی با ابعاد ۲ متر در ۲ متر و به عمق ۱/۲ متر استفاده شد. جریان ورودی آب نیز توسط یک لوله عمودی و در راستای یکی از دیواره‌های استخر تامین شد. این استخرها همگی مجهز به سیستم تخلیه مرکزی بودند و تنظیم آب هر یک توسط یک لوله عمودی که در بیرون از استخر نصب شده بود کنترل می‌شد. به منظور خروج بهتر مواد دفعی، آب هر استخر از کف آن تخلیه می‌شد. دو استخر به گروه‌های تحت تاثیر دوره‌های نوری مصنوعی اختصاص یافت و استخر سوم به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. در طول آزمایش، عمق آب هر استخر در حد ۰/۵ متر و حجم آب هر استخر در حدود ۲ متر مکعب تنظیم شد. جهت جلوگیری از تاثیر نور محیط و یا نور گروه‌های آزمایشی بر یکدیگر، این استخرها مجزا از هم در نظر گرفته شدند و با استفاده از یک پوشش سیاه رنگ و غیر قابل عبور نور، به طور کامل پوشیده شدند. استخر گروه شاهد بدون هیچکدام از این تجهیزات، به طور طبیعی در شرایط محیطی قرار گرفت. در هر یک از گروه‌های آزمایشی، نور مورد نیاز توسط دو عدد لامپ فلورسانت ۳۶ وات که در فاصله ۷۰ سانتیمتری بالای سطح آب نصب شده بودند، تامین شد. در گروه روشنایی-تاریکی ۲۴:۰، در تمام مدت آزمایش این لامپ‌ها روشن بودند اما در گروه روشنایی-تاریکی ۱۸:۶، با استفاده از یک تنظیم کننده اتوماتیک (Camsco TB-370,100/250 V AC-50/60 HZ, Taiwan) زمان روشن شدن و خاموش شدن لامپ‌ها در طول آزمایش تنظیم گردید. میزان شدت نور به طور روزانه در سطح آب و در مرکز هر استخر با استفاده از یک دستگاه لوکس متر (Digital Instrument MS6610, Taiwan) اندازه گیری شد که در هر یک از گروه‌های آزمایشی تحت تاثیر رژیم نوری مصنوعی، این میزان در حدود ۱۰۰۰ لوکس تنظیم شد. مدت زمان روشنایی و تاریکی در شرایط طبیعی در اوایل آزمایش از ۱۴/۵ ساعت روشنایی و ۹/۵ ساعت تاریکی تا ۱۰/۵ ساعت روشنایی و ۱۳/۵ ساعت تاریکی در انتهای آزمایش در نوسان بود. درجه حرارت آب پرورش نیز از ۰/۲۳ ± ۱۳ درجه سانتیگراد در شروع کار تا ۰/۱۹ ± ۵ درجه سانتیگراد در انتهای آزمایش در نوسان بود. آب مورد استفاده در تمام گروههای آزمایشی از یک منبع تهیه شد.

مراحل اجرای آزمایش و نمونه برداری

در زمان شروع آزمایش، ماهیان از نظر مرحله رسیدگی جنسی با هم مقایسه شدند. برای این منظور از هر گروه تعداد ۵ عدد ماهی نمونه برداری شد و بعد از کالبد شکافی، بخشی از گناد آنها در محلول بوئن (۷۵ میلی لیتر محلول اشباع شده اسید پیکریک، ۲۵ میلی لیتر فرمالین، ۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال)، (Busacker *et al.*, 1990) فیکس شد. سپس در آزمایشگاه، نمونه‌ها بر طبق روش متداول بافت شناسی آماده شده و لام از آنها تهیه شد (Busacker *et al.*, 1990). بعد از تهیه لام و رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین، با توجه به تقسیم بندی صورت گرفته توسط Bromage و همکاران در مورد ماهی قزل آلای رنگین کمان (Bromage *et al.*, 1988)، مراحله تکاملی گنادها مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد. همچنین به منظور بررسی میزان رشد تخمک و افزایش حجم آن به واسطه ذخیره شدن زرده در آن، قطر اووسیت‌ها به عنوان معیار مقایسه اندازه گیری شد. در اینجا بعد از انجام بافت شناسی، با استفاده از میکروسکوپ نوری و با میکرومتر چشمی در مقیاس بزرگنمایی ۴۰ عکس‌های دیجیتالی از نمونه‌ها گرفته شد و سپس با استفاده از برنامه Image Analyser قطر تخمک‌های نمونه برداری شده از هر گروه اندازه گیری گردید.

جهت بررسی روند تکامل سلول‌های لایه فولیکولی، شمارش تعداد و اندازه گیری مساحت سلول‌های گرانولوزا به عنوان معیار مقایسه در نظر گرفته شد. برای این منظور نیز بعد از نمونه برداری ماهانه به تعداد ۵ عدد ماهی از هر گروه آزمایشی و انجام عمل بافت شناسی و تهیه لام از نمونه‌ها، تعداد و مساحت سلول‌های گرانولوزا بعد از تهیه عکس دیجیتالی از نمونه‌های توسط میکروسکوپ نوری، توسط نرم افزار Image Analyser اندازه گیری شد.

آنالیز آماری

در ابتدا نرمال بودن تمام داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف - اسمیرنف مورد بررسی قرار گرفت. همچنین همگن بودن واریانس داده‌های حاصل, قبل از انجام تست

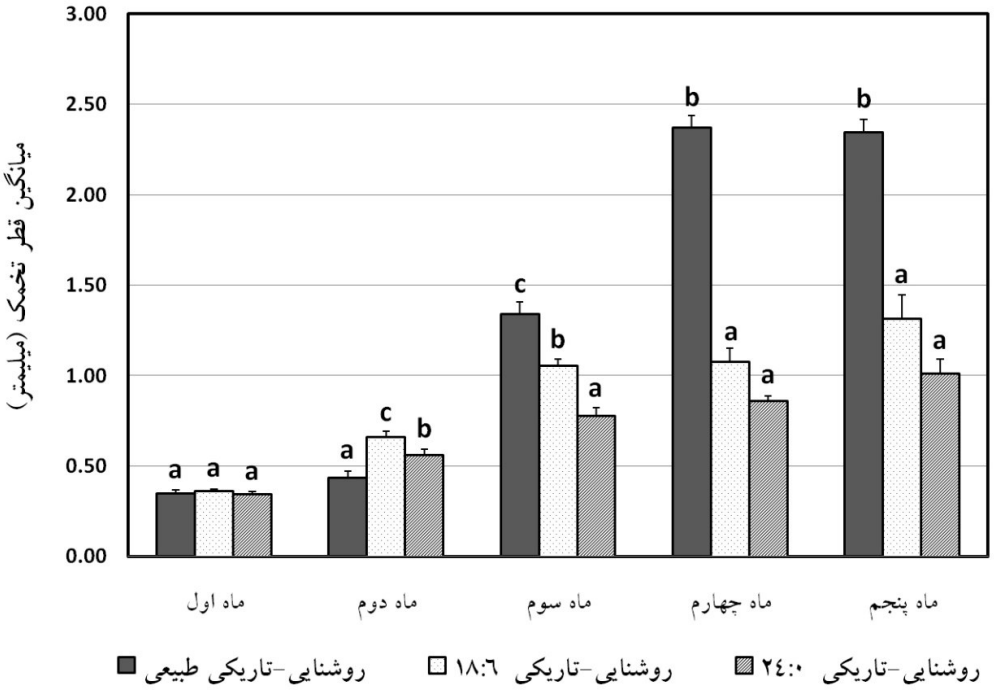
آماری ANOVA با استفاده از آزمون Leven's و یا آزمون‌های ناپارامتریک بررسی شد. زمانی که داده‌ها نرمال نبودند و یا واریانس آنها همگن نبود، با استفاده از روش‌های آماری از قبیل استفاده از لگاریتم داده‌ها و یا استفاده از ریشه داده‌ها، اقدام به نرمال کردن و یا همگن کردن واریانس داده‌ها شد. سپس به منظور مقایسه میانگین گروه‌های مختلف آزمایشی با هم و بررسی تاثیر دوره‌های نوری متفاوت بر فاکتورهای مورد نظر، آنالیز یک طرفه مقایسه واریانس‌ها (ANOVA) اجرا شد. جهت تعیین تفاوت موجود در بین گروه‌های آزمایشی، آزمون چند مقایسه‌ای دانکن مورد استفاده قرار گرفت. در مواردی که شرط‌های آزمون‌های پارامتریک در مورد برخی از داده‌ها صادق نبود، از آزمون‌های غیرپارامتریک نظیر مان-ویتنی استفاده شد. تمام بررسی‌های آماری انجام شده در این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۵) اجرا شد. خطای نوع اول با سطح دقت ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و تمام مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شد.

نتایج

اندازه گیری قطر تخمک

در طول پنج ماه مطالعه، قطر تخمک در تمام گروه‌ها، افزایش یافت اما این افزایش در تمام گروه‌ها از یک روند یکسان پیروی نکرد (شکل ۱). همانطور که قبلاً نیز اشاره شد، در شروع آزمایش ماهیان گروه‌های مختلف آزمایشی از نظر جنسی در مرحله مشابه‌ای قرار داشتند. بعد از گذشت یک ماه از آزمایش، تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های آزمایشی از نظر قطر تخمک مشاهده نشد ($P>0.05$) و تمام گروه‌ها دارای میانگین قطر تخمک مشابه‌ای بودند. در دومین ماه آزمایش، گروه کنترل که تحت شرایط روشنایی طبیعی قرار داشت با میانگین ۰/۰۴ ± ۰/۴۳ میلیمتر، کمترین میزان قطر تخمک را داشت ($P<0.05$) در این حال گروه روشنایی-تاریکی ۱۸:۶ و ۲۴:۰ به ترتیب دارای میانگین قطر تخمک ۰/۰۳ ± ۰/۶۶ و ۰/۰۳ ± ۰/۵۶ میلیمتر بودند که این میانگین در گروه روشنایی-تاریکی ۱۸:۶ به طور معنی‌داری بیش از دو گروه دیگر بود ($P>0.05$).

در ماه سوم آزمایش روند تغییرات به صورتی بود که میانگین قطر تخمک در گروه کنترل (۰/۰۷ ± ۱/۳۴ میلیمتر) به طور معنی‌داری بیش از دو گروه آزمایشی دیگر بود ($P<0.05$). در گروه آزمایشی روشنایی-تاریکی ۱۸:۶، این میزان با میانگین ۰/۰۴ ± ۱/۰۵ میلیمتر به طور معنی‌داری بیش از گروه روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ بود ($P<0.05$) و در این مدت گروه روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ با میانگین ۰/۰۵ ± ۰/۷۷ میلیمتر کمترین مقدار قطر تخمک را به خود اختصاص داد ($P<0.05$).



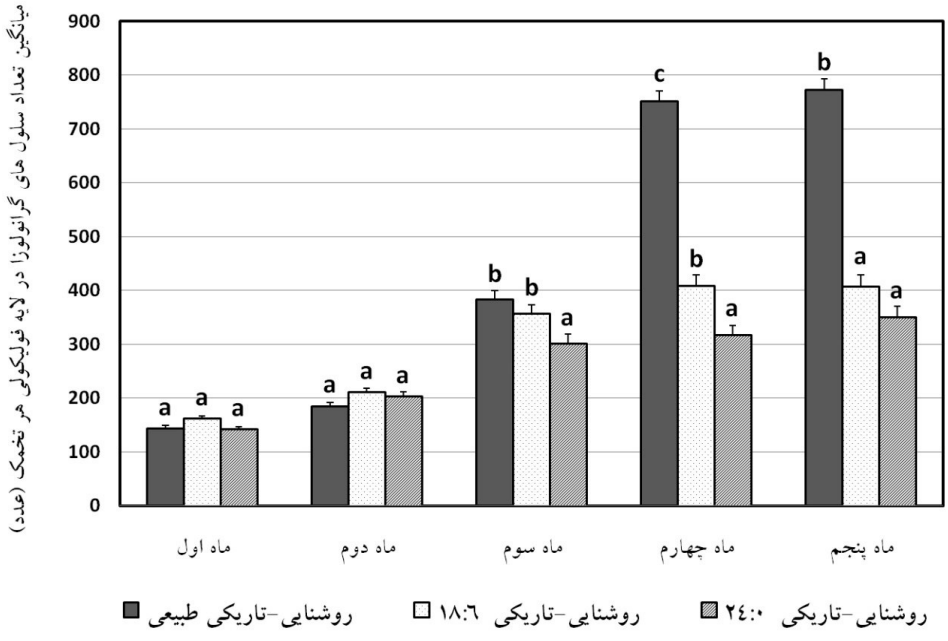
شکل ۱- میانگین قطر تخمک (میلیمتر) در گروههای مختلف تیماری

در چهارمین ماه آزمایش گروه کنترل با میزان ۲/۳۷ ±۰/۰۷ میلیمتر بیشترین قطر تخمک را دارا بود ($P<0.05$). دو گروه آزمایشی روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ به ترتیب، با میانگین ۰/۸۶ ± ۰/۰۳ و ۱/۰۸ ± ۰/۰۸ میلیمتر به طور معنی‌داری کمترین میانگین قطر تخمک را به خود اختصاص دادند ($P<0.05$). در این ماه، گروه آزمایشی روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ($P>0.05$).

در آخرین ماه آزمایش، همچنان روندی مشابه با ماه قبل مشاهده شد. دو گروه آزمایشی روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ کمترین میانگین قطر تخمک را به ترتیب با میانگین ۱/۰۱ ± ۰/۰۸ و ۱/۳۱ ± ۰/۱۴ میلیمتر نشان دادند ($P<0.05$) و گروه کنترل که تحت شرایط روشنایی طبیعی بود، بیشترین میانگین قطر تخمک را با مقدار ۲/۳۴ ± ۰/۰۷ میلیمتر دارا بود ($P<0.05$). لازم به ذکر است که در این ماه نیز میانگین قطر تخمک در گروه‌های آزمایشی روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P>0.05$).

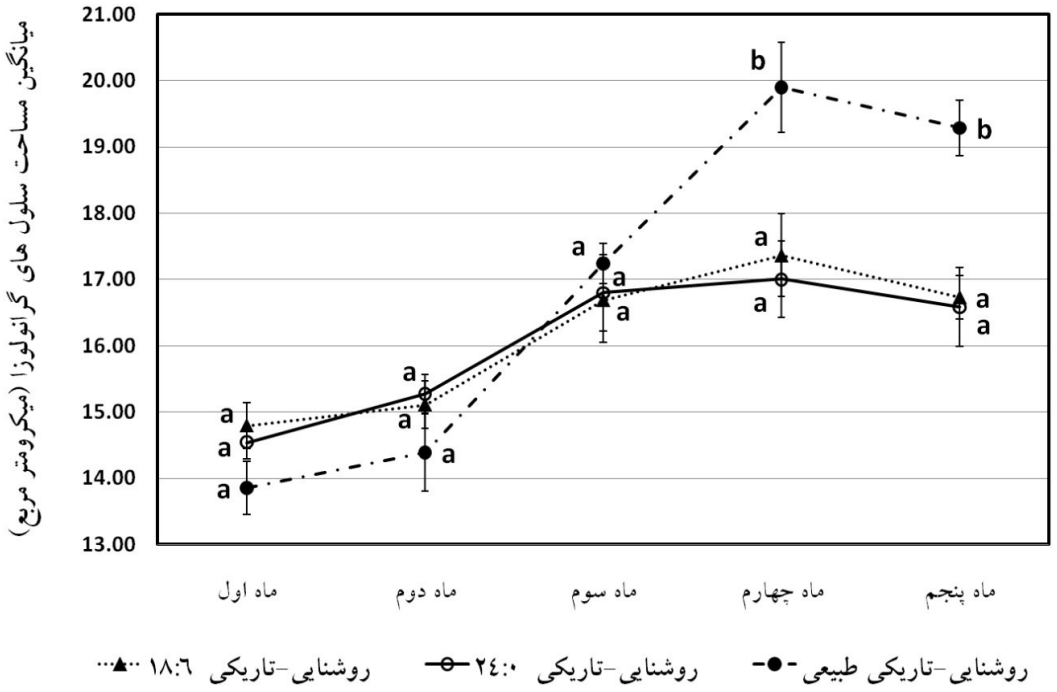
تعداد و مساحت سلول‌های گرانولوزا

بررسی و نمونه‌برداری ماهانه از ماهیان گروه‌های مختلف آزمایشی نشان می‌دهد که در طول ۵ ماه آزمایش, تعداد سلول‌های گرانولوزا در تمام گروه‌ها افزایش داشته ولی این روند افزایشی در گروه‌های مختلف آزمایشی مشابه هم نمی‌باشد (شکل۲و۴). بیشترین روند افزایشی در گروه کنترل مشاهده شد و کمترین روند افزایشی در گروه روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ وجود داشت. در دو ماه اول آزمایش تفاوت معنی‌داری از نظر تعداد سلول‌های گرانولوزا در بین گروه‌های مختلف آزمایشی دیده نشد ($P>0.05$). در ماه سوم آزمایش، گروه روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ با میانگین ۱۸ ± ۳۰۱ عدد, کمترین تعداد سلول‌های گرانولوزا را در بین گروه‌های آزمایشی دارا بود ($P<0.05$) و دو گروه دیگر تفاوت معنی‌داری را با هم نشان ندادند ($P>0.05$). در ماه چهارم آزمایش، مجدداً گروه روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ به طور معنی‌داری تعداد سلول‌های گرانولوزای کمتری را با میانگین ۱۹ ± ۳۱۶ عدد در لایه فولیکولی خود داشت ($P<0.05$) و گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشترین تعداد سلول‌های گرانولوزا (۲۰ ± ۷۵۱ عدد) را دارا بود ($P<0.05$). تعداد سلول‌های گرانولوزا در گروه روشنایی- تاریکی ۱۸:۶ نیز با میانگین ۲۱ ± ۴۰۸ عدد به طور معنی‌داری بیش از گروه روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و کمتر از گروه کنترل بود ($P<0.05$). مجدداً در ماه پنجم آزمایش، گروه کنترل با میانگین ۲۰ ± ۷۷۳ عدد، بیشترین تعداد سلول‌های گرانولوزا را به خود اختصاص داد ($P<0.05$) و دو گروه دیگر بدون داشتن تفاوت معنی‌دار با هم، از گروه کنترل تعداد سلول‌های کمتری را در لایه فولیکولی خود دارا بودند ($P<0.05$).



شکل ۲- میانگین تعداد سلول‌های گرانولوزا در لایه‌های فولیکولی تخمک (تعداد) در گروه‌های مختلف آزمایشی

نتایج حاصل از بررسی مساحت سلول‌های گرانولوزا نشان می‌دهد که در سه ماه اول آزمایش تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های آزمایشی وجود نداشت ($P>0.05$) (شکل۳و۴). در ماه چهارم آزمایش، این روند تغییر کرد به نحوی که مساحت سلول‌های فولیکولی در گروه کنترل با میانگین ۰/۶۸ ± ۱۹/۹۰ میکرومترمربع به طور معنی‌داری بیش از این مقدار در دو گروه آزمایشی روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ (۰/۵۷ ± ۱۷/۰۰ میکرومترمربع) و ۱۸:۶ (۰/۶۳ ± ۱۷/۳۶ میکرومترمربع) بود ($P<0.05$). لازم به ذکر است که این دو گروه آزمایشی تفاوت معنی‌داری را با هم نداشته ($P>0.05$) و سلول‌های فولیکولی در این دو گروه دارای مساحت مشابه‌ای بودند. در ماه پنجم نیز روندی مشابه روند ماه چهارم دیده شد. به این صورت که مساحت سلول‌های گرانولوزا در گروه کنترل (۰/۴۲ ± ۱۹/۲۸ میکرومترمربع) به طور معنی‌داری بیش از مساحت این سلول‌ها در دو گروه آزمایشی دیگر بود ($P<0.05$).



شکل ۳- میانگین مساحت سلول‌های گرنولوزا (میکرومتر مربع) در گروههای مختلف آزمایشی

بحث و نتیجه گیری

بررسی نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که روند تکامل تخمک‌ها در ماهیان ماده قزل آلای رنگین کمان در گروه‌های روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ در مقایسه با گروه کنترل به تاخیر افتاده و در نتیجه ماهیان این گروه‌های آزمایشی دارای تخمک‌هایی با قطر کمتر و نیز در لایه فولیکولی تخمک دارای سلول‌های گرانولوزای کوچکتر و به تعداد کمتری می‌باشند. نتایج حاصل از این بررسی تائید کننده نتایج به دست آمده از کاربرد دوره‌های نوری مداوم در ماهیان دیگر از جمله ماهی آزاد اقیانوس اطلس می‌باشد (Peterson and Harmon, 2005). در مطالعه مذکور، قرار دادن ماهیان به مدت ۶ ماه در معرض روشنایی مداوم باعث گردید تا افزایش میزان شاخص رشد گناد در این ماهیان متوقف شود. همچنین در یک مطالعه دیگر که بر روی ماهی کاد صورت گرفت، استفاده از دوره روشنایی مداوم باعث شد که قطر تخمک‌ها در مقایسه با گروه کنترل کمتر باشد و تخمک این ماهیان در مرحله تکاملی کورتیکال آلوئولای متوقف شوند (Hansen *et al.*, 1995).

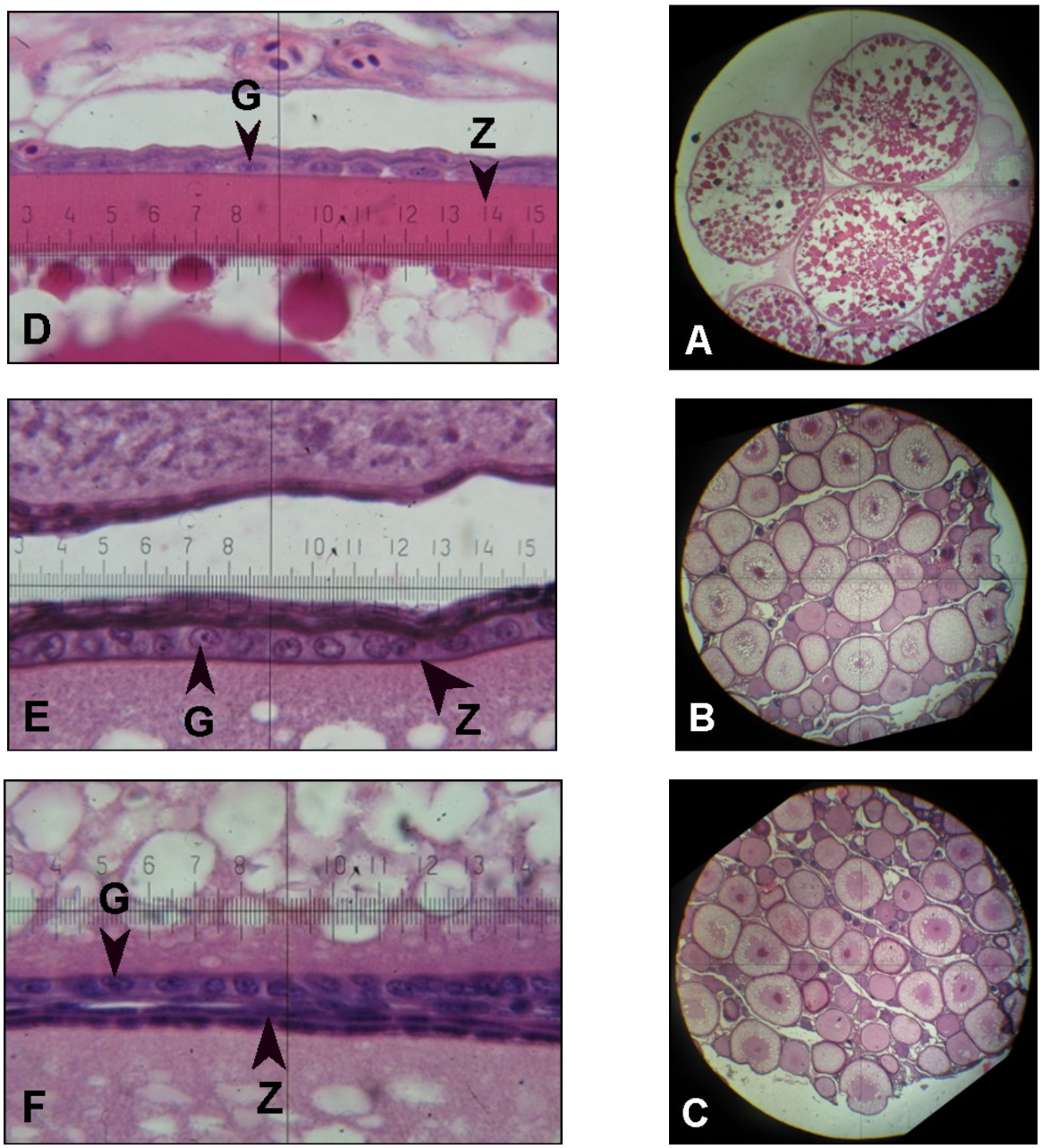
در بررسی حاضر نیز نتایج نشان می‌دهند که در گروه‌های آزمایشی که تحت تاثیر دوره‌های روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ بودند، میانگین قطر تخمک به طور معنی‌داری کمتر از گروه آزمایشی روشنایی-تاریکی طبیعی بود. همچنین در این دو گروه مساحت سلول‌های گرانولوزا به طور معنی‌داری کمتر از این مقدار در گروه کنترل بود. این امر می‌تواند بیانگر رشد

بیشتر تخمک در گروه کنترل به دلیل انباشته شدن ترکیب گلیکو لیپو فسفو پروتئینی بیشتر در داخل تخمک‌های در حال رشد باشد. با توجه به اینکه میانگین قطر تخمک‌ها در گروه کنترل بیش از میانگین قطر تخمک‌ها در دو گروه آزمایشی روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ می‌باشد، می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که روند زرده سازی و به دنبال آن جذب زرده توسط تخمک‌های در حال رشد در این گروه احتمالاً بیشتر صورت گرفته و یا آن که این مراحل مهم رشد تخمک در دو گروه آزمایشی روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ به تاخیر افتاده است. به دلیل اینکه یکی از عوامل تاثیر گذار بر پیشرفت مراحل رشد تخمک, هورمون‌های جنسی بوده و محل تولید این هورمون‌ها نیز سلول‌های فولیکولی تخمک می‌باشد، می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری نمود که احتمالاً بیشتر بودن تعداد و نیز بزرگتر بودن سلول‌های گرانولوزا در گروه روشنایی-تاریکی طبیعی به دنبال افزایش فعالیت استروئیدزایی این سلول‌ها در این گروه در مقایسه با دو گروه روشنایی-تاریکی ۲۴:۰ و ۱۸:۶ می‌باشد. در بسیاری از مطالعات تا کنون کاربرد دوره‌های نوری مختلف باعث کاهش سطوح هورمون‌های استروئیدی جنسی شده (Prat *et al.*, 1999; Migaud *et al.*, 2003, 2004; Shimizu, 2003) که به دلیل آنکه تولید این هورمون‌ها در سلول‌های فولیکولی و به طور دقیق در سلول‌های تکال و گرانولوزا صورت می‌گیرد، می‌توان اینگونه نتیجه گیری نمود که کاهش میزان تولید این هورمون‌های استروئیدی به دلیل تاثیر این عوامل بر محل تولید این هورمون‌ها و به عبارت دیگر تاثیر بر سلول‌های فولیکولی تخمک‌های در حال رشد می‌باشد. در بسیاری از مطالعات، کاربرد دوره‌های نوری بلند مدت و همچنین دوره‌های نوری مداوم باعث گردیده تا روند تکامل گنادی در ماهیان تحت تاثیر، به تاخیر بیافتد و در واقع در این ماهیان تخمک‌ها تنها تا مرحله قبل از زرده سازی (پری ویتلوژنیک) رشد نمایند و سپس روند رشد در این تخمک‌ها به شدت افت نماید (Hansen *et al.*, 1995; Mandiki *et al.*, 2007; Taranger *et al.*, 2007). با توجه به اصول و مراحل ساخت زرده و تجمع آنها در داخل اووسیت‌ها, وقتی روند تکاملی تخمک در مراحل قبل از زرده سازی به نحوی متوقف شود، می‌توان این‌گونه نتیجه گیری نمود که با توجه به تاثیر القایی هورمون‌های استروئیدی و به خصوص تاثیر هورمون استروئیدی ۱۷ بتا استرادیول تولیدی در سلول‌های گرانولوزا بر سلول‌های کبد جهت تولید ترکیبات گلیکو لیپو فسفو پروتئینی، این هورمون و نیز فعالیت سلول‌های تولید کننده آن در این گروه‌ها به نحوی به تاخیر افتاده که در نتیجه سایر فرایندهای فیزیولوژیکی مرتبط نیز به دنبال آن تحت تاثیر قرار گرفته و به تاخیر افتاده است. احتمالاً دلیل اصلی این روند را می‌توان در مدت زمان روشنایی و تاریکی و در نتیجه تغییر در ترشح هورمون‌های عصبی و یا انتقال دهنده‌های عصبی و نیز هورمون‌های درون ریز مرتبط با تکامل روند تولید مثل تحت تاثیر هورمون‌های ترشح شده در پاسخ به وجود دوره‌های نوری مختلف دانست. در بسیاری از مطالعات، ماهیانی که در تحت شرایط نوری با مدت زمان روشنایی طولانی مدت قرار گرفته اند، روند تکامل گنادی در آنها کاهش یافته است. در برخی از این مطالعات، قرار دادن ماهیان در تحت شرایط نوری با روشنایی مداوم باعث گردیده تا تخمک‌ها تنها تا مرحله قبل از زرده سازی رشد کنند (Taranger *et al.*, 2007) که نتایج حاصل از این مطالعه تائید کننده این مطلب است. نکته مشترک در تمام این بررسی‌ها این مورد است که اعمال نمودن دوره‌های نوری با مدت زمان روشنایی طولانی مدت یک تاثیر کند کننده در روند تکامل تخمک و رسیدگی آن دارد.

این نتایج به خوبی نشان می‌دهند که استفاده از دوره‌های نوری با مدت زمان روشنایی بلند باعث تاخیر در روند تکامل و رشد گنادها در ماهی ماده قزل آلای رنگین کمان می‌شود که به واسطه آن هم قطر تخمک و هم تعداد و اندازه سلول‌های گرانولزا کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان اینگونه نتیجه گیری نمود که استفاده از دوره‌های نوری با مدت زمان روشنایی طولانی مدت در مرحله رشد و تکامل گنادها، می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های موثر در تاخیر روند رشد و تکامل گنادها در ماهی ماده قزل آلای رنگین کمان مورد استفاده قرار گیرد و به این ترتیب تکامل روند تولید مثل را در ماهیان پرورشی تا رسیدن به وزن مورد نظر به تأخیر انداخت.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای مهندس رضوانی، رئیس مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر کلاردشت، جناب آقای مهندس عیسی گلشاهی کارشناس و مسئول بخش قزل آلای رنگین کمان مرکز و سایر دوستان، که در انجام این تحقیق به نحوی ما را یاری نمودند، کمال تشکر را داریم.



شکل ۴- شکل‌های A ، B و C به ترتیب نشان دهنده قطر تخمک در گروه‌های آزمایشی روشنایی طبیعی، ۱۸ ساعت روشنایی و ۲۴ ساعت روشنایی می‌باشد (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر). شکل‌های D ، E و F نیز به ترتیب نشان دهنده لایه‌های فولیکولی در گروه‌های آزمایشی ذکر شده است (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر). حرف G بیانگر سلول‌های گرانولوزا و حرف Z بیانگر لایه زونارادیاتا است. (رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین صورت گرفت).

منابع

Bromage, N., Cumaranatunga, R., 1988. Egg production in the rainbow trout. In: Muir, J.F., Roberts, R.J. (Eds.), Recent advances in aquaculture. Timber Press. 999 S.W. 9725, U.S.A., pp. 63-138.

Bromage, N., Porter, M., Randall, C., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture 197, 63-98.

Busacker, G.P., Adelman, I.R., Goolish, E.M., 1990. Growth. In: Schereck, C.B., Moyle, R.B. (Eds.), Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, pp. 684.

Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Serrano, R., Bromage, N.R., 1993. Environmental induction of spawning in sea bass. In: Roberts, R.J., Muir, J. (Eds.), Recent Advances in Aquaculture. Blackwell, Oxford, pp. 43–54.

Hansen, T., Kjesbu, O.S., Holm, J.C., Karlsen, O., 1995. Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. In: Goetz, F.W., Thomas, P. (Eds.), Proceeding of Proceeding of the 5th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Austin. pp. 186.

Imsland, A.K., Foss, A., Gunnarsson, S., Berntssen, M.H.G., FitzGerald, R., Bonga, S.W., Ham, E.V., Nævdal, G., Stefansson, S.O., 2001. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 198, 353-367.

Kissil, G.W., Lupatsch, I., Elizur, A., Zohar, Y., 2001. Long photoperiod delayed spawning and increased somatic growth in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture 200, 363-379.

Mandiki, S.R., Hubermont, P., Rougeot, C., Mélard, C., Kestemont, P., 2007. In vivo and in vitro ovarian sensitivity to gonadotropin in Eurasian perch *Perca fluviatilis* maintained under constant photothermal conditions. In: Roudaut, G., Labbé, C., Bobe, J. (Eds.), Proceeding of 8th international symposium on reproductive physiology of fish, Saint Malo - France. pp. 214.

Migaud, H., Mandiki, R., Gardeur, J.N., Kestemont, P., Bromage, N., Fontaine, P., 2003. Influence of photoperiod regimes on the Eurasian perch gonadogenesis and spawning. Fish Physiology and Biochemistry 28, 395-397.

Migaud, H., Fontaine, P., Kestemont, P., Wang, N., Brun-Bellut, J., 2004. Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. Aquaculture 241, 561-574.

Peterson, R.H., Harmon, P.R., 2005. Changes in condition factor and gonadosomatic index in maturing and non-maturing Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Bay of Fundy sea cages, and the effectiveness of photoperiod manipulation in reducing early maturation. Aquaculture Research 36, 882-889.

Prat, F., Zanuy, S., Bromage, N., Carrillo, M., 1999. Effects of constant short and long photoperiod regimes on the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass. Journal of Fish Biology 54, 125-137.

Randall, C., North, B., Futter, W., Porter, M., Bromage, N., 2001. Photoperiod effects on reproduction and growth in rainbow trout. Trout News 32, 12-16.

Shimizu, A., 2003. Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of its annual reproductive cycle. General and Comparative Endocrinology 131, 310-324.

Taranger, G.L., Haux, C., Stefansson, S.O., Björn Thrandur, B., Walther, B.T., Hansen, T., 1998. Abrupt changes in photoperiod affect age at maturity, timing of ovulation and plasma testosterone and oestradiol-17[beta] profiles in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 162, 85-98.

Taranger, G.L., Haux, C., Hansen, T., Stefansson, S.O., Björnsson, B.T., Walther, B.T., Kryvi, H., 1999. Mechanisms underlying photoperiodic effects on age at sexual maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 177, 47-60.

Taranger, G.L., Mittelholzer, C., Karlsen, O., Andersson, E., Schulz, R., Norberg, B., 2007. Mechanisms controlling the onset of puberty in female Atlantic Cod - Effects of photoperiod (*Gadus morhua*). In: Roudaut, G., Labbé, C., Bobe, J. (Eds.), Proceeding of 8th international symposium on reproductive physiology of fish, Saint Malo - France. pp. 117.

Zanuy, S., Carrillo, M., Felip, A., Rodríguez, L., Blázquez, M., Ramos, J., Piferrer, F., 2001. Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Aquaculture 202, 187-203.

Effects of Long Light Photoperiods on the Delay of Gonadal Development in Female Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): 1. Structural Changes

A. Noori[1*], B. Mojazi Amiri[2], A. Mirvaghefi[3], G. Rafiee[3] and B. Kalvani Neitali[4]

[1] Faculty of Marine Sciences and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
[2] Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[3] Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[4] Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, University of Tarbiat Modarres, Noor, Iran

(Received: 25-Sep.2011 – Accepted: 17-Mar.-2012)

Abstract

Effects of two long-light photoperiod regimes on oocyte development and structural changes in female rainbow trout ovary were investigated. Two-years old females with a mean initial weight of 279.94 ± 2.25 g were subjected to 24L:0D and 18L:6D as long light photoperiods and also natural photoperiod (as control) for 5 months. Fish were fed formulated pellet food from a local factory in 2% BW daily. The oocytes of control group were significantly larger than those of the other groups ($P< 0.05$) with a mean diameter of 2.34 ± 0.07 mm (mean ± SE). Application of 24L:0D and 18L:6D caused the lowest development in follicular layer compared to the control group. The number of granulose cells were 349 ± 21 and 406 ± 23 in 24L: 0D and 18L:6D, respectively, which were significantly lower ($P<0.05$) than the control group (773 ± 20). Similarly, granulose cell area of both artificial regimes were significantly lower ($P<0.05$) than the control. The mean granulose cell area were recorded 16.58 ± 0.60 and 16.73 ± 0.33 μm^2 in 24L:0D and 18L:6D, respectively and 19.28 ± 0.42 μm^2 in control. In conclusion, in the period of gonadal growth and development, artificial long-light photoperiods can be used as an effective managerial tool to delay the reproduction of female rainbow trout.

Keywords: rainbow trout, long-light photoperiod, oocyte diameter, follicular cells, gonadal development.

*Corresponding author: Tel: +98 912 5186031 Fax: +98 761 7660014 Email: noory@hormozgan.ac.ir