

## بررسی فراساختار زونا ردیاتا در اووسیت و زیگوت تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

علی مقدم درودخانی<sup>۱\*</sup>، شهربانو عریان<sup>۲</sup> و نادر شعبانی پور<sup>۳</sup>

۱- دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران (Moghaddam7@yahoo.com)

۲- دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده ی علوم، دانشگاه گیلان، رشت

### چکیده

ZR (زونا ردیاتا یا ناحیه ی شعاعی) ناحیه ای بدون سلول است که در بیرون اوولما پدید می آید، به تدریج از سوی اوولما و اپیتلیوم فولیکولی رشد کرده و بر ضخامت و پیچیدگی آن افزوده می شود. ساختار این ناحیه به عنوان شناسنامه ی تخمک، گویای جایگاه زندگی، تخم ریزی ماهی و چگونگی گرفتن مواد می باشد. بررسی میکروسکوپی برش های بافتی نشان داد که ZR در مراحل نخستین رشد و نمو اووسیت تاس ماهی ایرانی دیده نمی شود ولی در مرحله ی آلوتول های قشری پدیدار می گردد. در مرحله ی زرده سازی بیش ترین ضخامت و پیچیدگی و سیمایی مخطط دارد که گمان می رود این خطوط (گذرگاه ها) باید در ترابری ترکیبات زرده به درون تخمک کاربرد داشته باشند. در تخمک رسیده و پس از لقاح از ضخامت و پیچیدگی این ناحیه کاسته می شود و معماری متفاوتی به خود می گیرد که این دگرگونی ها نتیجه ی کاهش کارکرد تغذیه ای و آغاز کارکرد حفاظتی است. از داده های این بررسی می توان در برطرف کردن چالش های بیوسیستماتیکی و فراهم کردن محیط مناسب برای زندگی و تخم ریزی ماهی ها به ویژه ماهی های زینتی و خوراکی با ارزش اقتصادی بهره برد.

واژگان کلیدی: زونا ردیاتا، اووسیت، زیگوت، تاس ماهی ایرانی

## مقدمه

شرایط کنونی کره ی زمین ادامه ی زندگی بسیاری از ماهی ها را به چالش کشیده است. شناخت دقیق پوشش های پیرامون اووسیت ماهی ها (ZR) پژوهشی پایه ای است که می تواند زمینه ساز دانش لازم برای حفظ و افزایش آن ها باشد. ZR ناحیه ای بدون سلول است که پس از پیدایش، به تدریج از سوی اوولما و اپیتلیوم فولیکولی رشد کرده، ضخیم تر و پیچیده تر می شود. معماری آن در بیشتر ماهی ها متفاوت است (۷). کارکردهای عمده ی ZR عبارتند از: ثابت کردن اووسیت ها ها روی بستر تخم ریزی، جذب اسپرم، جلوگیری از پلی اسپرمی، محافظت ضد باکتریایی و مکانیکی. برای رویان در حال نمو، این ناحیه تبادل گاز، دفع و ترابری مواد از محیط بیرون را امکان پذیر می سازد. در توتیای دریایی مواد آزاد شده از پوشش های اووسیت، جنبش اسپرم را افزایش داده و باعث آزاد شدن یون کلسیم می شوند (۸). در پژوهش حاضر، مراحل گوناگون رشد و نمو اووسیت تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) - یکی از ارزشمندترین ماهی های بومی و آسیب پذیر کرانه های جنوبی دریای خزر از خانواده ی ماهیان خاویاری - و فراساختار ZR پیرامون اووسیت های آن، پیش و پس از لقاح شناسایی و به صورت کاربردی رابطه ی معماری این ناحیه با محیط ارزیابی می شود. از دستاوردهای اینگونه پژوهش ها می توان در مدیریت درست و حفظ ذخایر ارزشمند این ماهیان، همچنین افزایش و پرورش آن ها بهره جست.

## مواد و روش ها

زمان تخم ریزی تاس ماهی ایرانی روزهای پایانی زمستان تا روزهای آغازین بهار است (۲). در نیمه ی دوم فروردین ماه، اووسیت های لقاح نیافته و لقاح یافته و لاشه ی تخمدان از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت دریافت شدند و به آن ها محلول پایدار کننده ی بوئن افزوده شد. نمونه ها پس از ۲۴ ساعت به الکل ۷۰ درصد انتقال و چند بار الکل ۷۰ درصد آن ها تعویض شد. در راستای آماده سازی برای بررسی، نمونه ها به ترتیب به الکل ۹۰ و ۱۰۰ درصد، گزیدل و حمام پارافین انتقال داده شده و سپس درون قالب های پارافین جای گرفتند. از این قالب ها با دستگاه میکروتوم روتاری (Feitz. WETZLAR) برش های ۵ میکرونی گرفته شده و برش ها به روی لام انتقال داده شدند. لام های رنگ آمیزی شده با روش هماتوکسیلین-ائوزین، با میکروسکوپ نوری Olympus و نرم افزار TSVIEW بررسی شدند.

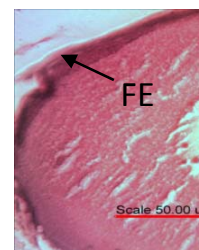
## نتایج و بحث

### مراحل پیش از زرده سازی:

الف- مرحله ی I یا اووسیت نارس: در این مرحله اووسیت ها اندازه های گوناگونی داشتند (میانگین، ۱۲۰ میکرون) و ویژگی های ریختی آن ها مانند اووسیت ماهی های دیگر بود.

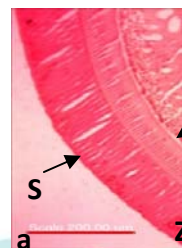
ب- مرحله ی II یا رشد نخستین: میانگین قطر اووسیت ها در این مرحله ۱۸۳/۲۲ میکرون بوده، یک هسته در میانه ی آن ها و چند هستک پیرامون نوکلئوپلاسم دیده شدند. بیرون اوولما یک اپیتلیوم فولیکولی دیده شد ولی ZR هنوز پدید نیامده بود (ریزننگار ۱).

ب- مرحله ی III یا آلوتول های قشری: در این مرحله میانگین قطر اووسیت ها به ۲۰۷/۱۸ میکرون رسید. هسته گرایش به قطب جانوری داشت. شماری هستک بیش تر در دسته های چند تایی در نوکلئوپلاسم دیده شدند. از ویژگی های بارز این مرحله پیدایش آلوتول های قشری در اووپلاسم و ZR به صورت لایه ای نازک با قطر ۲ میکرون پیرامون اووسیت بود (ریزننگار ۲).



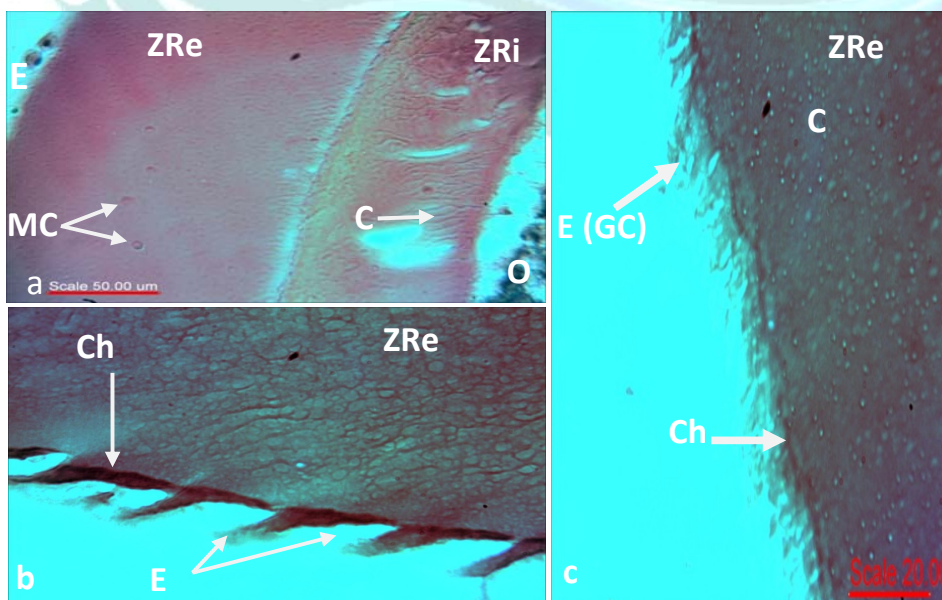
ریزننگار ۱: اووسیت در مرحله ی II؛ N: هسته، ns: هستک ها، O: اووپلاسم، FE: اپیتلیوم فولیکولی (×۴۰۰).  
ریزننگار ۲: اووسیت در مرحله ی III؛ N: هسته، ns: هستک ها، CA: آلوتول های قشری، ZR: زونا ردیاتا، FE، اپیتلیوم فولیکولی، O: اووپلاسم (×۱۰۰۰).

مرحله ی IV یا زرده سازی: در این مرحله میانگین اندازه ی اووسیت ها ۱۷۶۵/۸۹ میکرون بود. هسته دیده نشد. اندازه ی گویچه های زرده در قطب جانوری کوچک تر از قطب گیاهی بود. ZR بیش ترین ضخامت (۲۰۱/۵۳ میکرون) و پیچیدگی را داشت و از دو لایه ی مشخص درونی (ZRi) و بیرونی (ZRe) تشکیل شده بود. خطوط یا کانال های بسیاری در هر دو لایه دیده شدند. از سلول های ریزپرزهای فراوانی به سوی اووسیت دیده می شدند. حتی روزن های فراوانی با قطر ناهمسان که در واقع سطح مقطع کانال ها و گذرگاه ریزپرزهای اووسیت و سلول های فولیکولی هستند، دیده شدند (Pore - canal system). به نظر نمی رسد این گذرگاه ها مسیر مستقیمی را در ZR بپیمایند. در بیرون ZR، لایه ی باریک تر، رنگ پذیرتر و ناهمواری به نام کوریون دیده شد و در سطح و میان برجستگی های این لایه، پوششی ژله ای به نام Extrachorion پدیدار بود که سیمایی برس مانند به اووسیت می دهد (ریزننگار ۳a و ۳b).



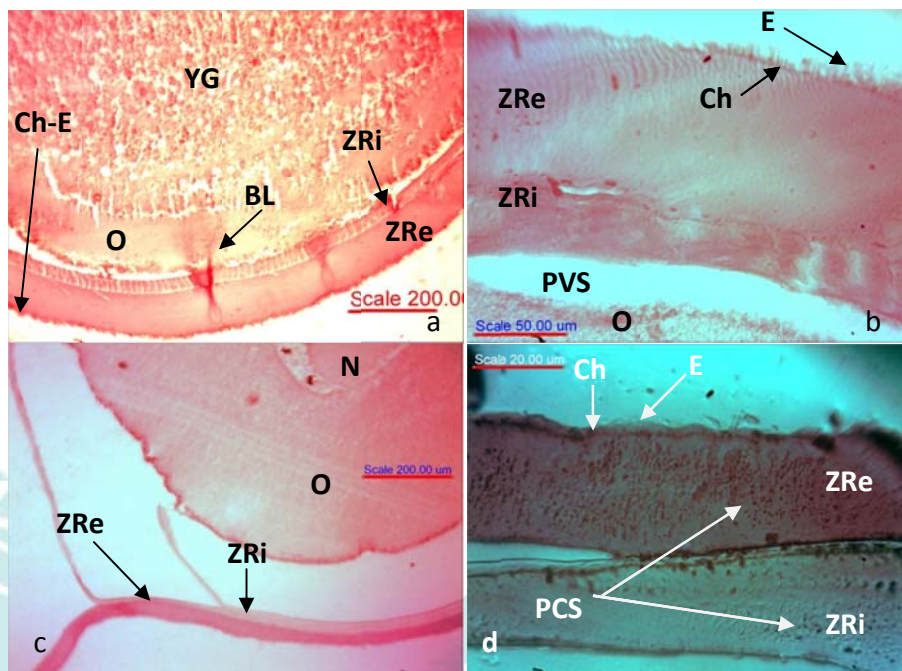
ریزننگار ۳: اووسیت در مرحله ی زرده سازی؛ a - قطب گیاهی اووسیت آزاد شده (بدون اپیتلیوم فولیکولی)؛ ZR: ZRe: بیرونی، ZR: ZRi: درونی، S: خطوط (کانال ها) YG: گرانول های زرده، PVS: فضای دور زرده ای (۱۰۰×) - فراساختار ZR در اووسیت آزاد نشده از تخمدان؛ PCS: سیستم روزن- کانال، FC: ریزپرز سلول فولیکولی، FE: اپیتلیوم فولیکولی، PPO: اوپلاسم پیرامونی پیگمان دار (۱۰۰×)

مرحله ی V، رسیدگی یا پس از زرده سازی: اووسیت ها در این مرحله به بیشینه اندازه ی خود رسیدند و میانگین قطر آن ها ۲۱۱۲ میکرون بود. گویچه های زرده به هم پیوستند و سیتوپلاسم حالت یکنواخت تری به خود گرفت. قطب جانوری تیره تر از قطب گیاهی بود. ضخامت ZR و شمار کانال های آن کاهش یافت (میانگین، ۱۶۱/۸۲ میکرون) (ریزننگار ۴a-c).



ریزننگار ۴؛ اووسیت رسیده؛ a - ZR: ZRe: بیرونی، ZR: ZRi: درونی، MC: مقطع ریزپرز و کانال، C: کانال، E: اکستراکوریون (۴۰۰×). b, c - مقطع کانال ها (نقاط روشن) Ch: کوریون، E: اکستراکوریون (۱۰۰×). (اکستراکوریون پوشش ژله ای (E (GC):

مرحله ی پس از لقاح: کاهش ضخامت (میانگین، ۱۴۱/۰۲ میکرون) و پیچیدگی ZR ادامه یافت. ZRi در قطب جانوری زیگوت نسبت به قطب گیاهی بسیار تغییر کرد، سیمای مخطط خود را از دست داد و برآمده شد. دو ساختار بالون مانند در عرض ZR قطب گیاهی دیده شدند و تا درون اوپلاسم ادامه داشتند. پس از ۳۰ دقیقه به هم زدن زیگوت ها درون مخلوط رس در آب، از ضخامت ZR باز هم کاسته (میانگین، ۶۳/۴۳ میکرون) و به ناحیه ای ساده تر تبدیل شد. روزن ها و ریزپرها باز هم دیده شدند (ریزننگار Δa-d).



ریزننگار ۵- a- قطب گیاهی زیگوت (بی درنگ پس از لقاح)؛ ZRi: ZR درونی، ZRe: ZR بیرونی، O: اوپلاسم، YG: گرانول های زرده، BL: ساختارهای بالون مانند و چگونگی ارتباط آن ها با اوپلاسم، Ch: کوریون، E: اکستراکوریون (۱۰۰×). b- قطب جانوری زیگوت؛ PVS: فضای دور زرده ای، E: اکستراکوریون (لایه ی ژله ای برس مانند) (۴۰۰×). (زیگوت ۳۰ دقیقه پس از لقاح؛ c- N: هسته (ZR درونی پاره و دولایه شده است). d- PCS: سیستم روزن-کانال (۱۰۰×)).

در پژوهش حاضر، در مرحله ی III، ZR به صورت یک لایه ی نازک پیرامون اووسیت پدیدار شد که به تدریج بر ضخامت و پیچیدگی ساختار آن در درازای دوره ی گذر از مرحله ی III به مرحله ی IV افزوده شد. Ma پیدایش این ناحیه را در مرحله ی II (۴) و شعبانی پور در مرحله ی III (۸، ۹) گزارش کرده است. افزایش تدریجی در ضخامت و پیچیدگی ZR کارکرد مهم آن در انتقال مواد ضروری در زرده سازی را به نمایش می گذارد. زرده سازی، رسیدگی اووسیت و تخم گشایی فرآیندهای بسیار پیچیده ای هستند که به انتقال مواد خام به اووسیت و سنتز فعال نیاز دارند (۵). روزن ها قطر متفاوت دارند که ناهمسان بودن کانال ها را نشان می دهد، ولی این که ناهمسان بودن کانال ها و روزن ها و غیرمستقیم بودن کانال ها چگونه در انتقال مواد نقش بازی می کند، هنوز روشن نشده است. شاید این ویژگی ها نشانگر نوعی انتقال گزینشی باشند. ZR (غشای زرده ای) که توسط اووسیت ساخته می شود، پوشش نخستین ولی کوریون و اکستراکوریون که به وسیله ی سلول های فولیکولی ساخته شده اند، پوشش دومین نامیده می شوند (۱۰). لایه ی ژله ای در چسباندن تخم ها به بستر تخمیزی نقش دارد (۱۰). بر خلاف تاس ماهی، معمولا در تلووست ها ساختارهای چسبنده ی پرزمانند در اتصال تخم ها به سطوح کاربرد دارند و کپور معمولی مانند تاس ماهی چنین ساختارهایی ندارد (۱، ۳). در مرحله ی رسیدگی و پس از لقاح، از ضخامت ZR و شمار کانال های آن کاسته شد که گمان می رود کاهش کارکرد تغذیه ای و آغاز کارکرد حفاظتی آن را نشان می دهد. به نظر می رسد دگرگونی ZRi نیز نتیجه ی واکنش قشری و برای

جلوگیری از پلی اسپرمی باشد (۱۰). یافته های ما نشان می دهند که ساختار ZR در تاس ماهی ایرانی قابل مقایسه با تاس ماهی روسی (۱۰) و تفاوت ها بسیار اندک است که با توجه به هم سرده (Genus) بودن دو گونه، دور از انتظار نیست (۶). ساختارهای بالون مانند دیده شده در قطب گیاهی زیگوت تاس ماهی ایرانی تا کنون شناسایی و گزارش نشده اند و کارکرد آن ها دانسته نیست. ۳۰ دقیقه پس از لقاح ZR به ناحیه ای باریک و ساده تبدیل شد. روزن ها و ریزپرزها هنوز دیده می شدند. گمان می رود پس از زرده سازی و تغییر نقش ZR، ریزپرزها کاهش می یابند و تا ساعت ها پس از لقاح ناپدید می گردند که نقش آن ها را در انتقال مواد یادآوری می کند. در پژوهش حاضر، با بررسی مراحل تخمدانی تاس ماهی ایرانی نتیجه گرفته شد که ZR پیش از زرده سازی پدید می آید، در مرحله ی زرده سازی به اوج می رسد و پس از زرده سازی از ضخامت و پیچیدگی آن کاسته می شود.

## منابع

1. Esmaili, H. R. and Johal, M. S. (2005). Ultrastructural features of the egg envelope of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* (Osteichthyes, Cyprinidae). *Environ. Biol. Fish.* 72: 373-377.
2. Hoseinzadeh, M., Imanpour, M. R., Aghilinejad, S. M. and Shabany, A. (2012). Histology of ovarian development and investigated some biological aspects of Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, in Caspian sea Iran. *World Appl. Sci. J.* 18(9): 1198-1202.
3. Huysentruyt, F. and Adriaens, D. (2005). Adhesive structures in the eggs of *Corydoras aeneus* (Gill, 1858; Callichthyidae). *J. Fish Biol.* 66: 871-876.
4. Kaviani, F., Shabanipour, N. and Mirnategh, S. B. (2013). Light and electron microscope structural study of the Zona Radiata in the oocytes of zebrafish (*Danio rerio*). *Microscopy (Tokyo)*. 62(3): 377-381.
5. Keyvanshokoo, S. and Vaziri, B. (2008). Proteome analysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) Ova. *Anim. Reprod. Sci.* 109: 287-297.
6. Li, Y. H., Wu, C. C. and Yang, J. S. (2000). Comparative ultrastructural studies of the Zona Radiata of marine fish in three genera in perciformes. *J. fish Biol.* 56: 615- 621.
7. McMillan, D. B. (2007). *Fish histology; female reproductive systems*. Springer, P: 219.
8. Shabanipour, N. and Heidari, B. (2004). A histological study of the Zona Radiata during late oocyte developmental stages in the Caspian sea Mugilid (*Liza aurata*). *Brazil. J. Morphol. Sci.* 21(4): 191-195.
9. Shabanipour, N. and Hossayni, S. N. (2010). Histological and ultrastructural study of Zona Radiata in oocytes of common carp, *cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Micron.* 41(7): 877-881.
10. Zelazowska, M. (2010). Formation and structure of egg envelopes in Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseriformes: Acipenseridae). *J. Fish Biol.* 76: 694- 706.