١١٣٦٧١

دانشگاه گیلان
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی
(زیست شناسی دریا- جانوران دریا)

پایان نامه کارشناسی ارشد

مطالعه بافتی ساختار Zona radiata در تخمک دو گونه از کپور ماهیان؛ ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

از:
سیده نرگس حسینی دوکی

۱۳۸۸/۳/۲

استاد راهنما:
دکتر نادر شعبانی پور

مرکز اطلاعات مدارک علمی ایران
شعبه مدارک

بهمن ۸۷

۱۱۳۶۷۱

تقدیم

به دو تکیه گاه استوار زندگیم ،

پدر عزیزم و مادر مهربانم

که وجودشان مایه آرامش است و حضورشان عاشقانه مرا حمایت می کند

به **خواهر دلسوزم**

و

به **تمام کسانی که دوستشان دارم.**

تشکر و سپاس

خدای همیشه همراهم متشکرم ، به خاطر همه لحظاتی که به من اجازه زیستن و آموختن دادی و به خاطر همه انسان های خوبی که در این مسیر پیش رویم قرار دادی.....

از **پدر عزیزم و مادر مهربانم** متشکرم که زیر و بم زندگی را به من آموختند و برکت وجودشان همیشه دلم را گرم و آرام می کند.
از استاد راهنمای بزرگوارم **جناب آقای دکتر نادر شعبانی پور** متشکرم که تجربه بسیار ارزشمندی را کنار ایشان داشتم که هر بار بیشتر و بیشتر از ایشان آموختم و افتخار شاگردی ایشان را تا همیشه همراه خواهم داشت.

از **خواهر دلسوزم** و **شوهر خواهر عزیزم** متشکرم که همیشه مشوق من در این مسیر بوده اند.

از برادر بزرگترم **جناب آقای دکتر مهرداد محمدی** و خانواده محترمشان متشکرم.
از **جناب آقای دکتر حیدری** به خاطر همه راهنمایی ها و زحماتی که برای نمونه برداری ماهی سفید کشیدند متشکرم.
از دوست بسیار عزیزم **خانم مریم عباسی** متشکرم که همیشه خواهرانه همراهیم کردند .

از **جناب آقای مهندس روضاتی** ، **جناب آقای مهندس گلچین** و **جناب آقای مهندس علوی** متشکرم.
از کارشناسان محترم آزمایشگاه های زیست شناسی **سرکار خانم مهندس هادوی** و **سرکار خانم مهندس شایگان** متشکرم.

از کارشناس محترم میکروسکپ الکترونی دانشگاه محقق اردبیلی **جناب آقای مهندس خدایاری** متشکرم.
از دوستان خوبم سرکار خانم ها **شاهی** ، **خدادادی** ، **نظر حقیقی** ، **رحمانی** ، **یاوری** ، **شمسیان** ، **زارع** ، **اعدلیان** ، **بهرامی** ، **یوسفی** ، **شاهنگیان** ، **آقای گودرزی** و دوستان خوبم در آزمایشگاه های سیستماتیک گیاهی ، بیوشیمی و بیولوژی تکوینی کمال تشکر رادارم.

از هم اتاقی های خوبم در خوابگاه کوثر خانم ها **تناور** ، **اسدی** ، **سیفی** ، **هاشمی** ، **غزلی** ، **رفیع پور** و **شعبانی** متشکرم.

و از همه عزیزانی که مرا در انجام این مطالعه یاری نمودند نهایت سپاس و تشکر رادارم.....

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول / مقدمه و کلیات

۱-۱ اپی تلیوم فولیکولی ٤
۱-۲ لایه سلول های تکا ٥
۱-۳ پوشش های اولیه(زونا رادیاتا) ، ثانویه و سوم ٦
۱-٤ پوشش ثانویه (Secondary envelope) ۷
۱-٥ پوشش اولیه (Primary envelope) ۸
۱-٥-۱ ساختار Zona radiata (ZR) ۹
۱-٥-۲ ترکیبات Zona radiata ۱۱
۱-٥-۳ زمان تشکیل Zona radiata ۱۱
۱-٥-٤ تشکیل کوریون ۱۲
۱-٥-٥ منشأ Zona radiata ۱٤
۱-٥-٦ عملکرد Zona radiata ۱٥
۱-٦ بیولوژی ماهی سفید(*Rutilus frisii kutum*) ۱۷
۱-٦-۱ رده بندی ۱۸
۱-٦-۲ تولید مثل طبیعی ۱۸
۱-۷ بیولوژی ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* ۱۹
۱-۷-۱ رده بندی ۱۹

فصل دوم / مواد و روش ها

۲-۱ تهیه مقاطع بافتی ۲۲
۲-۱-۱ مراحل آبگیری و شفاف سازی بافت ها ۲۲
۲-۱-۲ قالب گیری بافت ها ۲۳
۲-۱-۳ مقطع برداری ۲۳
۲-۱-٤ رنگ آمیزی ۲۳
۲-۲ آماده سازی بافت ها برای میکروسکپ الکترونی(SEM) ۲٤

فصل سوم / نتایج

۳-۱ نتایج مربوط به ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) ۲٦
۳-۱-۱ مشاهدات مراحل مختلف رسیدگی اووسیت در ماهی سفید و تغییرات زونا رادیاتا طی آن ۲۷
۳-۱-۲ مشاهدات میکروسکپ الکترونی (SEM) ۳۲

۳- ۲ نتایج مربوط به ماهی کپور(*Cyprinus carpio*) ۳۵
۳-۲-۱ مشاهدات مراحل مختلف رسیدگی اووسیت در ماهی کپور و تغییرات زونا رادیاتا طی آن ۳۶
۳-۲-۲ مشاهدات میکروسکپ الکترونی(SEM) ٤۲

فصل چهارم / بحث

٤- ۱ زمان تشکیل زونا رادیاتا(Zona radiata) ٤۷
٤- ۲ تغییرات ضخامت زونارادیاتا در طی دوره رسیدگی اووسیت ٤۸
٤- ۳ ساختار زونا رادیاتا و انتقال مواد ٤۸
٤-٤ ساختار های سطحی زونا رادیاتا و زیستگاه(بستر تخم ریزی) ۵۱
٤- ۵ ضخامت زونا رادیاتا ۵٤
٤- ٦ ریخت شناسی سطح اووسیت و تاکسونومی ۵۵
٤- ۷ وظایف زونا رادیاتا ۵٦

پیشنهادات ۵۷

منابع ۵۹

ضمائم ٦۹

فهرست جداول

عنوان شماره صفحه

جدول ۳-۱ میانگین قطر اووسیت ، قطر هسته و تعداد هستک در مراحل مختلف رسیدگی اووسیت و پس از تخم ریزی در ماهی سفید ۲۶
جدول ۳-۲ ضخامت زونا رادیاتا در مراحل مختلف رسیدگی اووسیت ماهی سفید ۳۲
جدول ۳- ۳ میانگین قطر اووسیت ، قطر هسته و تعداد هستک در مراحل مختلف رسیدگی اووسیت در ماهی کپور..... ۳۵
جدول ۳- ٤ ضخامت زونا رادیاتا در مراحل مختلف رسیدگی اووسیت ماهی کپور..... ٤١

فهرست تصاویر

عنوان شماره صفحه

شکل ۱- ۱ تصویر شماتیک انواع غشاء پوششی اووسیت ۳
شکل ۱- ۲ ارتباط بین سلول های فولیکولی و اووسیت ۵
شکل ۱- ۳ تصویر شماتیک پوشش ثانویه ۸
شکل ۱- ٤ تصویر شماتیک سنتز و ترشح اجزاء توبولی پوشش ثانویه توسط یک سلول فولیکولی تخمک ۸
شکل ۱- ٥ تصویر شماتیک لایه چسبنده (پوشش ثانویه) ۸
شکل ۱- ٦ تصویر شماتیک شیارهای شعاعی(کانال های منفذ دار) زونا رادیاتا ۱۰
شکل ۱- ۷ تصویر شماتیک یک کانال میکروپیل ۱٤
شکل ۲-۱ ماهی سفید *Rutilus frisi kutum* ۲۲
شکل ۲-۲ ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* ۲۲
شکل ۳-۱ اووسیت ماهی سفید در مرحله I (نابالغ) وII (رشد اولیه) ۲۷
شکل ۳-۲ اووسیت ماهی سفید در مرحله III (واکوئل های قشری) ۲۸
شکل ۳-۳ اووسیت ماهی سفید در مرحله IV (زرده سازی) ۳۰
شکل ۳-٤ اووسیت ماهی سفید در مرحله رسیدگی نهایی ۳۱
شکل ۳-٥ اووسیت ماهی سفید پس از تخم ریزی و لقاح ۳۱
شکل ۳- ٦ تصویر میکروسکپ الکترونی از اووسیت در مرحله رشد اولیه(II) ۳۳
شکل ۳-۷ تصویر میکروسکپ الکترونی زونا رادیاتا (ZR) در مرحله زرده سازی اووسیت ۳٤
شکل ۳- ۸ تصویر میکروسکپ الکترونی از سطح خارجی تخم ماهی سفید ۳٥
شکل ۳- ۹ اووسیت ماهی کپور در مرحله I (نابالغ) ۳٦
شکل ۳- ۱۰ اووسیت ماهی کپور در اوایل مرحله III (واکوئل های قشری) ۳۷
شکل ۳- ۱۱ اووسیت ماهی کپور در اواخر مرحله III (واکوئل های قشری) ۳۸
شکل ۳- ۱۲ اووسیت های ماهی کپور در مرحله IV (زرده سازی) رسیدگی اووسیت ۳۹
شکل ۳- ۱۳ زونا رادیاتا (ZR) در مرحله IV (زرده سازی) رسیدگی اووسیت ماهی کپور ٤۰
شکل ۳- ۱٤ زونا رادیاتا (ZR) در اووسیت مرحله V ماهی کپور ٤۱
شکل ۳- ۱٥ تصویر میکروسکپ الکترونی از اووسیت ماهی کپور در مرحله II (رشد اولیه) ٤۲
شکل ۳- ۱٦ تصاویر میکروسکپ الکترونی از مقاطع زونا رادیاتا (ZR) اووسیت ماهی کپور در مرحله زرده سازی ٤٥

چکیده

مطالعه بافتی ساختار Zona radiata در تخمک دو گونه از کپور ماهیان ؛ ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*).

سیده نرگس حسینی دوکی

اووسیت و تخم ماهیان استخوانی با یک پوشش غیر سلولی به نام Zona radiata (ZR) احاطه شده است. تفاوت ساختاری در ZR ماهی های گروه های اکولوژیکی و سیستماتیکی مختلف وجود دارد. بررسی های فراساختاری نشان داده است که ZR در مرحله previtellogenic شکل می گیرد. ویژگی های ریخت شناسی ZR ، نشان دهنده نحوه احتمالی سازماندهی رشد تخمک و سازگاری تخمک های ریخته شده پس از تخم ریزی در زیستگاه جانور است. در پژوهش حاضر ساختار پوشش اولیه یا ZR در اووسیت ماهی سفید و کپور معمولی در مراحل مختلف رسیدگی تخمدان و رشد اووسیت مورد مطالعه قرار گرفت.

به این منظور جنس ماده ماهی سفید و ماهی کپور جمع آوری شدند و هر بار بخش میانی تخمدان چپ در محلول بوئن تثبیت شد. نمونه ها پس از طی مراحل آماده سازی بافت توسط میکروسکپ نوری و الکترونی مورد مطالعه قرار گرفتند.

مطالعه مقاطع بافتی نشان داد که در هر دو گونه در مراحل I و II رسیدگی اووسیت ،ZR مشاهده نمی گردد. در مرحله III ، ZR به دور اووسیت مشاهده می شود . در مرحله IV (زرده سازی) ضخامت آن افزایش یافته و در مرحله V ضخامت آن در هر دو گونه کاهش می یابد.در ماهی سفید در مرحلهIII زوائد جوانه مانندی برسطح ZR مشاهده شد که در مرحله IV تبدیل به برآمدگی های انگشتی شکل واضحی شد و در مرحله V از تعداد آنها کاسته و به صورت تحلیل رفته مشاهده شدند. در ماهی کپور نیز زوائد بسیار ظریفی در مراحل رسیدگی اووسیت بر سطح ZR مشاهده گردید. ZR دارای شیارها (کانال های منفذ دار) است که در ماهی سفید به صورت نامنظم (موج دار) و در ماهی کپور نرده ای شکل با لبه های کنگره ای مشاهده می شود. در ماهی سفید ، ZR پس از تخم ریزی دارای برآمدگی های انگشتی شکل و منافذ است که بر رأس این برآمدگی ها ساختار های غده مانندی به چشم می خورد که احتمالاً به اتصال تخمک به بستر کمک می کند. ZR در ماهی کپور دارای سطحی تقریباً صاف همراه با منافذ است.

کلمات کلیدی: Zona radiata ، اووسیت ، کپور معمولی ، ماهی سفید دریای خزر

Abstract

Histological study of Zona radiata structure in oocyte of two species of Cypriniformes; Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) and Common Carp (*Cyprinus carpio*).

Oocytes and fertilized eggs of teleosts are enclosed by a non-cellular envelope named Zona radiata(ZR). It has structural differences in various ecological and systematic groups of fish. Ultrastructure analysis has shown that ZR is formed during the previtellogenic stages. Morphological characteristics of ZR suggest the probable organization of oocyte development and adaptation of released oocytes to the fish habitat. In this research , we studied the Zona radiata structure in oocytes of *Rutilus frisii kutum* and *Cyprinus carpio* in different stages of ovarian development and oocyte growth.

For this purpose females of *Rutilus frisii kutum* and *Cyprinus carpio* were collected and middle part of their left ovary was fixed in Bouin's solution. Samples were studied by light and electron microscope after undergoing tissue preparation stages.

ZR was not observed in stage I and II of oocyte development in both species. ZR observed around the oocyte in stage III. It increased in diameter at stage IV (vitellogenesis) and stage V showed lower ZR diameter. In *Rutilus frisii kutum*,bud-like projections were observed at stage III of oocyte development that transformed to finger-like projection at stage IV and they were decreased in number at stage V which later disappeared. In *cyprinus carpio* very fine projections were observed on the surface of ZR in oocyte developmental stages. ZR striations (pore-canals) were distinguished which was irregular (wavy) in *Rutilus frisii kutum* and fence-like with crenated edge in *Cyprinus carpio*. ZR showed finger-like projections and pores in *Rutilus frisii kutum*. Glandiform structures were observed on the head of these projections that probably helped oocytes for attachment to the substrata. In *Cyprinus carpio* ZR demonstrated a nearly smooth surface with pores.

Key words: Zona radiata , Oocyte , Common Carp , Caspian Kutum

فصل اول

مقدمه و کلیات

مقدمه :

بدون شک با رشد روزافزون جمعیت و نیاز به تأمین منابع غذایی ، استفاده و بهره برداری اقتصادی از انواع ماهی های پرورشی و دریایی با استفاده از اصول علمی و شیوه های منطقی ، نیاز به اختیار ابزارهای مناسب و کسب اطلاعات دقیق از خصوصیات زیستی گونه های با ارزش اقتصادی دارد.

امور صید ، تکثیر و پرورش آبزیان در کشور های مختلف دنیا تابع شناخت کلیه خصوصیات زیستی و به خصوص تولیدمثلی آنها بوده که از طریق انجام پژوهش های پایه در این زمینه بر روی گونه های بومی در آبهای داخلی و دریایی مربوطه تحقق یافته است و از مهمترین مسائل تأثیرگذار در روند رشد وتوسعه آبزی پروری هر کشور از جمله ایران می باشد. مطالعه فرآیند تولید مثل ، بهره برداری از الگوهای طبیعی در تکثیر و پرورش آبزیان را فراهم می آورد.

گستردگی ماهی ها در پهنه آبهای اقیانوسی ، دریایی و رودخانه ها و تطابق این گروه از آبزیان به شرایط اقلیمی خاص منطقه باعث گردیده است تا هر گروه از ماهی ها ویژگی های خاص تولیدمثلی را جهت حفظ و بقای نسل خود برگزیده و دراین خصوص نیز سازش و تکامل لازم را به دست آورند[حسین زاده صحافی ،۱۳۸۰].

ماهیان استخوانی شامل بیش از نیمی از گونه های مهره داران می باشند[Baldacci *et al.*,2001]. یک مشخصه کلیدی موفقیت تکاملی ماهیان استخوانی ، سیستم تولیدمثلی آنهاست که همه شرایط محیط آبی را در بر می گیرد [Mekkawy and Osman,2006] . بیولوژی تولیدمثل ماهیان استخوانی از سالها پیش موضوع تحقیقات محققان بوده است که برای آبزی پروری ، اساسی وکاربردی می باشد [Fausto *et al.*,2004] .

چرخه رشد و تکامل تخمدانی در ماهیان استخوانی دریایی به ٤ مرحله تقسیم بندی می شود[Barr,1968]: (۱)تکثیر اووگونی با تقسیمات میتوز (۲) اووژنز یا تبدیل میوزی اووگونیا به اووسیت های اولیه[Tokarz,1978] (۳) رشد اووسیت و (٤) بلوغ

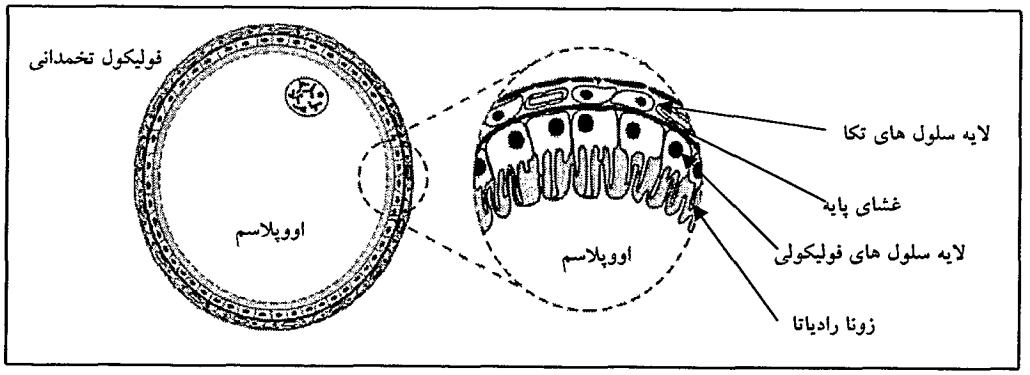
عموماً رشد اووسیت در ۲ فاز مجزا رخ می دهد: فاز رشد اولیه که مستقل از گنادوتروپین است[Khoo,1979] ، شامل رشد اولیه اووسیت که همراه با تغییرات هسته است[Tokarz,1978] و فاز رشد ثانویه که وابسته به گنادوتروپین است و شامل ویتلوژنز[1] (زرده زایی) بوده و با رشد سریع اووسیت مشخص می شود. یک اتفاق بارز فاز رشد ثانویه تشکیل یک پوشش خارج سلولی چند لایه می باشد[Fausto *et al* ., 2004].

[1] vitellogenesis

مطالعه پوشش هایی که در سطح اووسیت ها در مدت بلوغشان تشکیل می شود ، توجه تعداد زیادی از محققان را به خود جلب کرده است [Marza *et al.*,1934;Chaudhry,1956; Raven,1961; Rebhun,1962; Bellairs *et al.*, 1963; Fisher,1963; Hurley and Fisher,1966] . در ساختار غشاء تخمک های گونه های مختلف ماهیان استخوانی تفاوت های بسیاری وجود دارد که خاص گونه می باشد [Anderson,1974; Lonning and hagstrom,1975] . جنبه های مرفولوژیک پوشش تخمک برای اهداف تاکسونومیکی در ماهیان استخوانی مورد استفاده قرار می گیرد[Riehl,1980; Johnson and Werner,1986; Britz *et al.*,1995] . تغییرات در مرفولوژی تخم ماهیان استخوانی مختلف اغلب چالش های اکولوژیکی یک گونه را که در مدت مراحل زندگی جنینی با آن رو به روست، منعکس می کند[Riehl,1996] و بررسی ساختار سطح تخم در حل طبقه بندی فیلوژنیکی تاکسون هایی که در گذشته نا معین بودند، کمک می کند[Johnson and brothers,1993; Gill and Mooi,1993; Britz *et al.*,1995] .

انواع غشاهای پوششی اووسیت(از خارج) به شرح زیر می باشد (شکل ۱- ۱) :

- اپی تلیوم فولیکولی(= لایه سلول های فولیکولی یا گرانولوزا در داخل و لایه سلول های تکا در خارج)
- پوشش ثانویه
- پوشش اولیه(زونا رادیاتا[1])
- اوولما(غشای سیتوپلاسمی اووسیت)



شکل ۱- ۱ – تصویر شماتیک انواع غشاء پوششی اووسیت

[1] Zona radiata

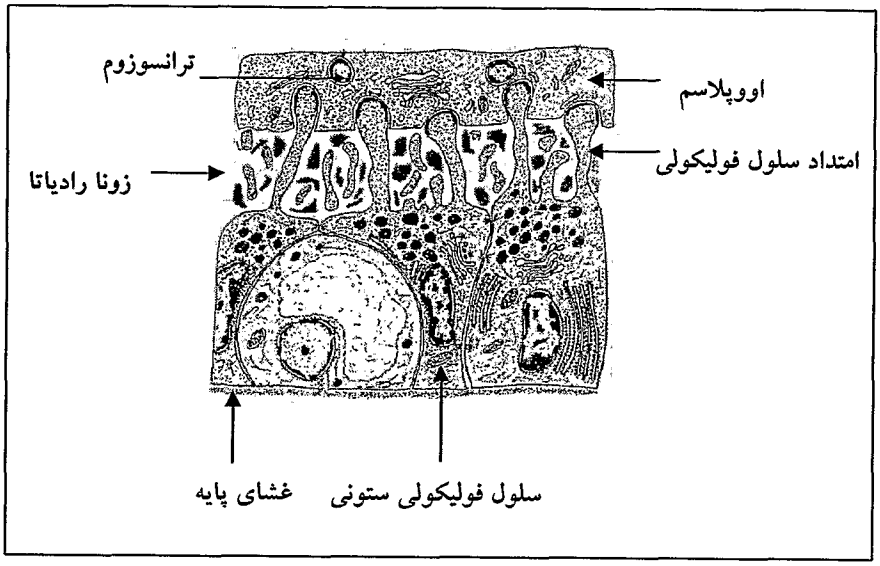
۱- ۱ اپی تلیوم فولیکولی[1]

هنگامی که اووگونی تقسیمات میوزی را آغاز می کند و به یک اووسیت تغییر شکل می دهد، با یک اپی تلیوم نازک از سلول های سنگفرشی پوشیده شده و یک فولیکول جدید تولید می شود. سلول های فولیکولی در غشاء پایه(Basal laminae) خود احاطه می شوند و یک اپی تلیوم پیوسته را شکل می دهند که اووسیت ها را از یکدیگر جدا می کند [McMillan,2007]. در مراحل ابتدایی رشد اووسیت در ماهیان استخوانی ، اپی تلیوم فولیکولی ، سنگفرشی ساده است [Flugel,1964b; Hirose,1972; Nicholls and Maple,1972; Patzner,1974; Busson-Mabillot,1977; Caporiccio and Connes,1977;Tsuneki and Gorbman,1977; Brusle,1980; Nakashima and Iwamatsu,1989] ، سلول ها یک هسته پهن و سیتوپلاسم کمی دارند و اتصالات بین آنها توسط دسموزوم ها تقویت می شود. اپی تلیوم توسط غشاء پایه از بافت پیوندی عروقی تکا جدا می شود. اندامک های کمی در سلول های فولیکولی وجود دارد: به ندرت میتوکندری ، یک دستگاه گلژی کوچک متشکل از ۲ تا ٤ لاملا ، پلی ریبوزوم ها و یک سیسترنا کوچک جدا شده و شبکه اندوپلاسمیک دانه دار . در میان سلول های فولیکولی سنگفرشی بعضی گونه ها سلول های شبه لیپید توسعه یافته ای به چشم می خورد[McMillan,2007].

همچنانکه که اووسیت رشد می کند، با تکثیر میتوزی سلول های فولیکولی جدید تولید می شود و اپی تلیوم فولیکولی ضخیم و مطبق می شود به طوریکه در اواخر ویتلوژنز ممکن است مکعبی یا ستونی به نظر برسد. اندازه سلول های مدور بزرگ در مدت رشد اولیه فولیکول به مقدار زیادی افزایش می یابد و یک هسته مدور و سیتوپلاسم خالی را آشکار می کنند .همانطور که فولیکولوژنز ادامه می یابد، اندازه و تعداد آنها کاهش می یابد و قبل از تخمک گذاری ناپدید می شوند .[McMillan,2007]

دو نوع ارتباط بین زوائد سلول های فولیکولی و سطح اووسیت توصیف شده است . در نوع معمول تر، انتهای پهن شده یک زائده به یک فرورفتگی کوچک اوولما منتهی می شود. انتهای پهن شده این زوائد ، فعالیت اندوسیتوزی را نشان می دهد. تشکیل وزیکل های روپوش دار در این نواحی از اوولما به انتقال مواد از سلول های فولیکولی به اووسیت اشاره می کند. در نوع کمیاب تر، زوائد سلول فولیکولی عمیقاً به فرورفتگی های اوولما می چسبد. در این ارتباط هیچ فعالیت اگزوسیتوزی در زوائد سلول های فولیکولی دیده نمی شود[Kobayashi,1985] (شکل ۱- ۲).

[1] Follicular epithelium



شکل ۱- ۲ - ارتباط بین سلول های فولیکولی و اووسیت در *Urolophus jamaicensis* (Urolophidae)

چندین عملکرد به سلول های فولیکولی نسبت داده می شود که از گونه ای به گونه دیگر تفاوت کرده ، طیفی از استراتژی های تولید مثلی بهره برداری شده توسط ماهی را منعکس می کند. اشاره شده است که سلول های فولیکولی مغذی هستند ، به جذب مواد توسط اووسیت کمک می کنند ، پوشش ثانویه را تولید نموده ،steroidogenic هستند و در خلال تخمک گذاری به خروج تخم کمک می کنند. این عملکردها در زمان های مختلف در مدت رشد فولیکولی رخ می دهد و همه ممکن است در بعضی گونه ها نشان داده نشود.

سلول های فولیکولی ماهی اغلب به عنوان سلول های گرانولوزا[1] نامیده می شوند ، که یک همولوژی با سلول های مترشحه استروژن اطراف اووسیت پستانداران را نشان می دهند[McMillan,2007] .

۱-۲ لایه سلول های تکا[2]

شکل گیری اپی تلیوم فولیکولی به زودی با تمایز یک لایه مشخص تکا متشکل از سلول های دوکی شکل کوچک کشیده در اطراف آن ادامه می یابد[Chaudhry,1956]. تکا ابتدا در مدت پیش از زرده سازی(previtellogenesis) پدیدار می

[1] granulosa
[2] Theca

شود ، زمانی که تعدادی سلول نازک شبیه به فیبروبلاست ، غشاء پایه اپی تلیوم فولیکولی را احاطه می کنند و به تکای خارجی و تکای داخلی تمایز می یابد [Busson- Mabillot,1967; Ulrich,1969; Caporiccio and Connes,1977; Brusle,1985; Begovac and Wallace , 1987; Grier,2000] . تکا شامل بافت پیوندی، ماهیچه صاف و بعضی مواقع رشته های عصبی غیر میلینی می باشد[McMillan,2007] . تکای فولیکول های نا بالغ رگهای خونی کمی دارد، همچنانکه فولیکول رشد می کند، عروقی شدن تکا افزایش می یابد [Nicholls and Maple,1972] ، سلول های اندوتلیال مویرگ ها ، پینوسیتوز فعال را نشان می دهند [McMillan,2007].

سلول های تکایی ظاهراً از فیبروبلاست ها مشتق می شوند و به شدت نازک هستند. در مدت پیش از زرده سازی(previtellogenesis) ، شبکه اندوپلاسمی دانه دار ، دستگاه گلژی و ریز قطره های چربی حجیم در سلول های تکا پدیدار می شوند ، همچنانکه زرده سازی شدت می یابد ، سلول های تکایی تکثیر می شوند و ضخامتشان افزایش می یابد و این اندامک ها تقلیل می یابند.

عملکردهای مختلفی به تکا نسبت داده می شود ، تکا علاوه بر تشکیل یک پوشش حفاظتی در اطراف فولیکول ، اولین مانع بین فضاهای خارج رگی و اپی تلیوم فولیکولی می باشد و ممکن است مواد مجاز به ورود و ترک فولیکول را به گزینی کند. در بعضی گونه ها ، سلول های تکا گواه بر steroidogenic بودن می دهند که یک نقش اندوکرین را بر عهده می گیرند. به علاوه تکا ماهیچه صاف دارد که فرض می شود در مدت تخمک گذاری به خارج کردن تخم کمک می کند[McMillan,2007].

۱-۳ پوشش های اولیه(زونا رادیاتا) ، ثانویه و سوم

اگر پوشش به وسیله اووسیت تولید شود ، به عنوان پوشش اولیه و اگر به وسیله سلول های فولیکولی احاطه کننده اووسیت تولید شود ، به عنوان پوشش ثانویه و اگر به وسیله اویداکت یا دیگر ساختارهای مادری غیر از تخمدان ایجاد شود ، پوشش سوم نامیده می شود[Wilson,1928] .

در ماهیان غضروفی پوشش های سوم مانند لایه های ژله ای یا غلاف های چرم مانند تخم توسط غده هایی در اویداکت یا جای دیگر هنگامی که تخمک به دنیای بیرون راه می یابد ، ایجاد می شوند[McMillan,2007] .

در زیر پوشش اولیه یک غشاء سلولی نازک به نام اوولما وجود دارد که بعضی از مؤلفین تفاوتی بین آن و پوشش اولیه قائل نیستند و ترجیح می دهند که هر دو آنها را به نام غشاء تخم بنامند [حسین زاده صحافی ،۱۳۸۰].

۱-٤ پوشش ثانویه (Secondary envelope)

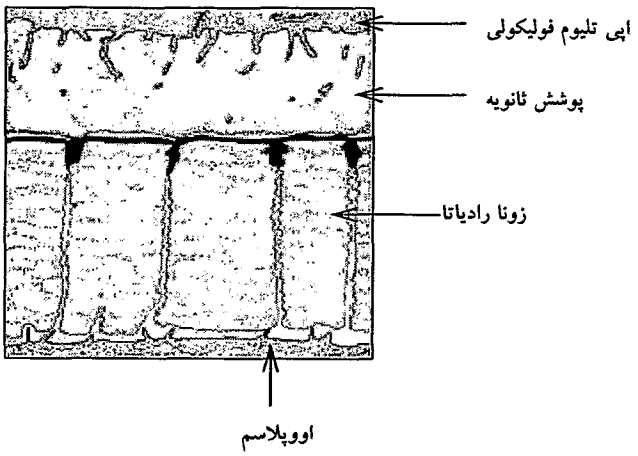
در بسیاری از گونه های ماهیان استخوانی سلول های فولیکولی قبل از تخمک گذاری ممکن است یک پوشش ثانویه تولید کنند که اغلب بسیار آراسته می باشد (دارای شیارها ، رشته ها ، رشته های کوچک یا میله ها می باشد) .[McMillan,2007]

نقش سلول های فولیکولی در تشکیل یک پوشش ثانویه پیرامون زونا رادیاتا در چندین گونه ثابت شده است [Wourms and Sheldon,1976; Busson-Mabillot,1977; Hart *et al*,1984] (شکل ۱- ۳).

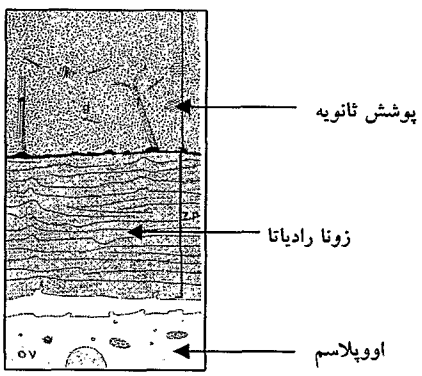
در مدت مراحل اولیه شکل گیری پوشش اولیه ، سلول های فولیکولی یک ظاهر غیر تخصصی را نشان می دهند ، همچنانکه اووسیت رشد می کند ،تعداد سلول های فولیکولی افزایش می یابد و شکل آنها از سنگفرشی به مکعبی تبدیل می شود. زمانیکه شکل گیری پوشش اولیه کامل شد ، سلول های فولیکولی ستونی می شوند و مقادیر فزاینده شبکه اندوپلاسمی دانه دار را از خود نشان می دهد و ممکن است شروع به ترشح پوشش ثانویه در خارج پوشش اولیه کنند[McMillan,2007]. تزئینات پوشش ثانویه ممکن است اشکال بسیاری به خود بگیرد. فراساختار جنس این تزئینات در بسیاری از گونه ها نشان می دهد که آنها از ماده میکروتوبول مانند به دقت بسته بندی شده ای تشکیل شده اند[Wourms,1976]. توبول های کوچک که پوشش ثانویه را می سازند در شبکه اندوپلاسمی دانه دار سلول های فولیکولی سنتز و انباشته شده و توسط اگزوسیتوز خارج و با ماده ژلاتینی پوشیده می شوند[McMillan,2007] (شکل ۱- ٤).

نقش پوشش ثانویه در بسیاری از ماهیان استخوانی ، ایجاد دستگاه چسبنده ایست که تخم های ریخته شده را به بستر ثابت می کند ، یعنی همان پوشش ژله ای موکوسی بی شکل که با رشته ها (مجموعه میکروتوبول ها) به سطح زونا رادیاتا نفوذ می کند ، حضور این توبول های ویژه برای برقرار کردن مسیر احتمالی نقل و انتقال درون سلولی می باشد[Busson-Mabillot,1977] (شکل ۱- ٥). ماده پوشاننده تخم در تخم های چسبنده شامل mucus ، mucin ، mucilage و یا

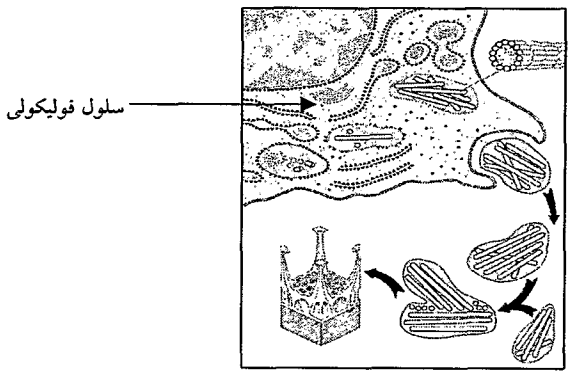
gelatin می باشد که به همراه عوامل دیگر چسبندگی ، تخم ها را قادر می سازد که به پوشش گیاهی ، اشیاء غوطه ور و یا به یکدیگر بچسبند[Laale,1980].



شکل ۱- ۳- تصویر شماتیک پوشش ثانویه در *Salvelinus fontinalis* (Salmonidae)



شکل ۱- ۵- تصویر شماتیک لایه چسبنده (پوشش ثانویه) در *Cichlasoma fasciata* (Cichlidae)



شکل ۱- ٤ - تصویر شماتیک سنتز و ترشح اجزاء توبولی پوشش ثانویه توسط یک سلول فولیکولی تخمک *Cynolebius melanotaenia* (Rivulidae)

۱-۵ پوشش اولیه (Zona radiata)

اووسیت و تخم ماهیان استخوانی با یک پوشش اولیه غیر سلولی Zona radiata احاطه شده است. Zona radiata (ZR) که به آن Zona pellucida ، پوشش زرده(ویتلین[1]) ، غشای زرده، پوشش تخم یا کوریون نیز می گویند ، در

[1] Vitellin

چندین راسته و گونه ماهی مورد مطالعه قرار گرفته است [Gotting,1967; Ivankov and Kurdyayeva,1973; Kulikova and Loshakova,1982; Cruz-Hofling and Cruz-Landim,1993; Evans,1993; Celius and Walther,1998b; Breining and Britz,2000; Andrade *et al.*,2001; Park and Kim,2001; Manuz *et al.*,2002; Ravaglia and Maggese,2002,2003; Brandao *et al.*,2003].

در پژوهش حاضر ، ساختار پوشش اولیه یا Zona radiata در اووسیت دو گونه از کپور ماهیان (ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* و کپور معمولی *Cyprinus carpio*) در مراحل مختلف رسیدگی تخمدان و رشد اووسیت مورد مطالعه قرار گرفت.

۱-۵-۱ساختار Zona radiata (ZR)

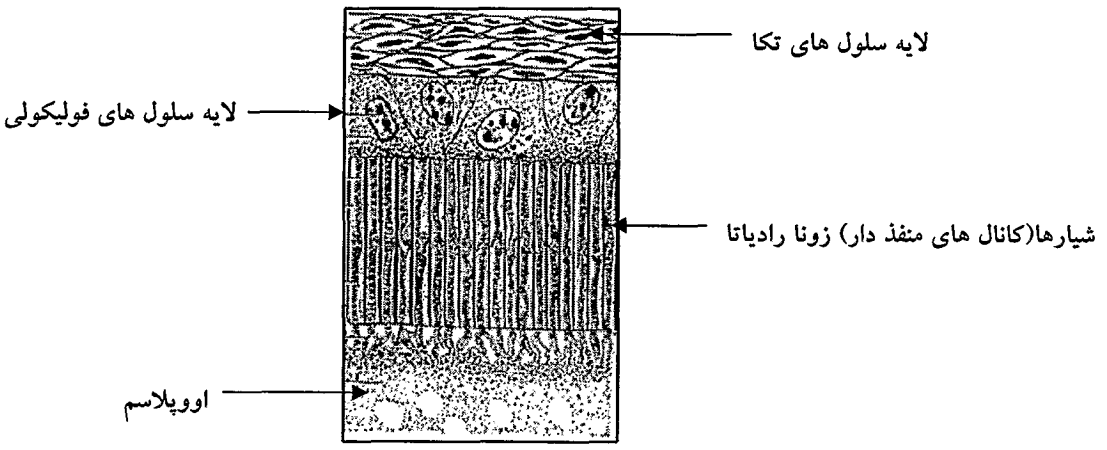
همچنانکه اووسیت بالغ می شود ، روی سطح آن غشایی که از نظر ریخت شناسی و فیزیولوژی تخصص یافته است ، ظاهر می شود که ممکن است هموژن باشد یا معماری پیچیده ای داشته باشد[Anderson,1967]. ساختار و ضخامت پوشش تخمک بسته به مراحل تکاملی آن برای ماهی های مختلف ، متفاوت است وتحت تأثیر محیط ماهی قرار می گیرد [Ivankov and Kurdyayeva,1973; Riehl,1978] .

ZR ماهیان استخوانی از طریق اگزوسیتوز در پیرامون پایه میکروویلی[1] هایی ترشح می شود که از سطح اووسیت امتداد می یابند. این میکروویلی ها همرا با میکروویلی هایی که از سلول های فولیکولی منشأ می گیرند در ZR در حال رشد به دام می افتند ، به طوریکه پوشش اولیه به وسیله کانال های منفذدار(pore-canals) روزنه دار می شود و حاوی میکروویلی هایی است که به طور عمودی به سطح آن امتداد یافته اند. این میکروویلی ها و روزنه ها الگوی مخطط پوشش اولیه را توضیح می دهند و به همین دلیل به آن Zona radiata گویند[McMillan,2007] (شکل ۱- ٦).

در ارتباط با ظهور طرح شعاعی در ZR ، بعضی از محققان شیارهای ناشی از قطع طولی میکروویلی را جهت عبور زوائد سلول های اپی تلیوم فولیکولی و پلاسمای تخمک از میان ZR می دانند [Regaud and Dubreiul,1908; Thing,1918; Gatenby,1922; Champy,1923; Bhattacharya *et al.*,1925,1929]. به نظر می رسد که شیارها از به هم فشردگی ماده اصلیZR (بدون میکروویلی) تشکیل می شوند که احتمالاً برای دلایل مکانیکی و برای تسهیل

[1] Microvilli

انتقال مواد غذایی ازخارج به اووسیت در حال رشد به کار می روند. زیرا زوائد پروتوپلاسمیک سلول های اپی تلیال و پلاسمای تخم درست بعد از شیارهایی ظهور می یابند که قبلاً تشکیل شده بودند[Chaudhry,1956].



شکل۱- ٦- تصویر شماتیک شیارهای شعاعی(کانال های منفذ دار) زونا رادیاتا

تفاوت های ساختاری در ZR ماهی های گروههای اکولوژیکی و سیستماتیکی مختلف وجود دارد [Ivankov and Kurdyayeva,1973] . ولی به طور کلی ZR از ۳ بخش تشکیل شده : خارجی ترین ZR (Z1)، ZR میانی(Z2) و داخلی ترین ZR (Z3).

Z1 و Z2 را ZR خارجی(Zona radiata externa) و Z3 را ZR داخلی (Zona radiata interna) می نامند [McMillan,2007]. Z1 یک ظاهر خارجی دارد که در گونه های مختلف ماهی متفاوت است. Z2 یک لایه همگن است و چگالی الکترونی بالاتری دارد و در میان ۳ بخش نازک ترین است. Z3 شامل چندین لایه است و چگالی های الکترونی متفاوتی را نشان می دهد و بخشی ناهمگن است ، تعداد لایه ها بر حسب گونه متفاوت است [Park and Kim 2001] .

درونی ترین و ضخیم ترین لایه پوشش اولیه (Z3) در بسیاری از ماهیان استخوانی یک ساختار رشته ای سست و آراسته ای را به وجود می آورد [Wourms,1976]. در بعضی گونه ها مانند *Xiphophorus helleri* ، ZR همگن است و هیچ