فیزیولوژی آبزیان

بررسی اثرات استرس ناشی از شوک دمایی جهت القای تریپلوئیدی بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

کاوه تقی پور*[1]، سعید کیوان شکوه[2]، امیرپرویز سلاطی[3]، حسین پاشازانوسی[4]، صمد بهرامی[5]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا ، دانشگاه علوم وفنون دریایی، خرمشهر،

ایمیل:k.taghipoor@kmsu.ac.ir، تلفن: ۰۹۱۶۲۱۸۱۶۸۲

۲-دانشیار، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی، خرمشهر

۳-استادیار، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی، خرمشهر

۴-مربی، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی، خرمشهر

۵-دانشجوی دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا ، دانشگاه علوم وفنون دریایی، خرمشهر

واژه‌های کلیدی:تریپلوئید، آنزیم آنتی اکسیدانی، لارو، قزل‌آلای رنگین‌کمان

مقدمه

القای تریپلوئیدی سبب ایجاد تغییراتی در پاره ای از ویژگی های فیزیولوژیک ماهیان می شود، لذا به طور معمول ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید از دیدگاه های متفاوت مقایسه و ارزیابی می شوند.مهمترین قابلیت های بیوتکنولوژی در آبزی پروری شامل کاربرد هورمون های طبیعی و سنتتیک، تولید مثل القائی، تولید انواع آبزیان ترانس ژنیک، ایجاد بانک ژن، مدیریت بهداشت و تولید جمعیت های مختلف می باشد. این قابلیت ها نقش مهمی در اصلاح نژاد آبزیان پرورشی و افزایش تولید آنها در واحد سطح دارند. دستکاری کروموزومی گونه های مختلف آبزیان امروزه در دنیا به عنوان یک روش مفید در بهبود ژنتیکی ماهیان، بسیار رایج می باشد (Omoto *et al.*, 2005).همزمانباالقاءپلیپلوئیدیدربرخیماهیان،پارهای تغییراتفیزیولوژیکنیزممکناستایجادگردد و این تغییرات خصوصاً در آزادماهیان از سابقه ی مطالعاتی بیشتری برخوردار است (Benfey, 1999). اکثر مطالعات نشان می دهد که ماهی تریپلوئید در مقایسه با ماهی دیپلوئید نرخ بقای کمتری در مراحل اولیه زندگی به علت کاهش قابلیت زیستن در تخم و لارو را دارد (Piferrer*et al.*, 2009). شوک های حرارتی و هیدروستاتیک بکار رفته برای القای تریپلوییدی به عنوان عامل ایجاد کننده اثرات نامطلوب که منتج به کاهش بازماندگی به خصوص در مراحل اولیه رشد در نظر گرفته می شود. علاوه بر این تریپلوییدی در یک جانور می تواند مسئول کاهش بازماندگی و رشد در مراحل بعدی حیات به خصوص در شرایط نامناسب زیست محیطی و پرورشی باشد (رزمی و همکاران، ۱۳۸۹).با توجه به اینکه فعالیت

دفاع آنتی اکسیدانی در طول تکامل جنینی و لاروی می تواند به منظور حفاظت سلولی افزایش یابد؛ آگاهی از چگونگی بیان و تغییرات فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانیدر مراحل اولیه جنینی و لاروی بسیار با اهمیت جلوه می کند. لذا به طورمعمول ماهیان دیپلوئیدوتریپلوئید ازدیدگاه های متفاوت مقایسه و ارزیابی می شوند. انجام تحقیق حاضر جهت ارزیابی مکانیسم های ذاتی جهت غالب آمدن بر این تغییرات در گونه های دیپلوئید و تریپلوئید این ماهی صورت گرفت.جهت بررسی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی، فعالیت آنزیم های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در نمونه های لارو دیپلوئید و تریپلوئید این ماهی اندازه گیری شد.

روش

محل انجام آزمایش: این تحقیق در کارگاه تکثیر ماهیچال واقع در استان لرستان، شهرستان الیگودرز در پاییز سال ۱۳۹۳ انجام گرفت. دمای آب کارگاه در طی دوره آزمایش ۱۱-۱۰/۵ درجه سانتی گراد، PH ۸/۶-۷/۷، اکسیژن محلول۸/۵-۸/۲ میلی گرم در لیتر و میزان هدایت الکتریکی آب ۶۱۰-۵۸۰ میکروموس بر سانتی‌متر بود.

تهیه مولد و استحصال تخمک و اسپرم: برای این کار از ۸ مولد ماده با میانگین وزن ۲۴۶±۱۶۰۰گرم و طول کل۱/۸±۵۱/۸۷ سانتی متر و ۶ مولد نر با میانگین وزن ۱۸۶±۱۳۹۳گرم و طول کل۲/۵۸±۵۰/۵۰ سانتی متر که از نظر سنی ۴ ساله بودند استفاده شد. تخم‌گیری از مولدین ماده و با استفاده از روش معمول در کارگاه و با بیهوش کردن مولدین در عصاره گل میخک (۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و به روش دستی صورت گرفت. اسپرم‌گیری از مولدین نر با سرنگ ۱۰۰ سی‌سی به منظور جلوگیری از آلودگی با خون و مدفوع صورت گرفت و از روش خشک برای لقاح استفاده شد (Moccia and Munkittrick,1986).تخم‌هایلقاحیافتهتحتدوحالت زیر به سینی های تراف انتقال داده و سپس نمونه گیری از آنها در مدت زمان ۲۷ روز پس از لقاح (خروج از تخم) جهت انجام آزمایش صورت گرفت:

حالت اول (گروه دیپلوئید): طبق شرایط معمول تکثیر و پرورش قزل‌آلای‌رنگین‌کمان، بعد از آبگیری، تعداد ۴۹۰۰ تخم به سینی‌های تراف منتقل گردید.

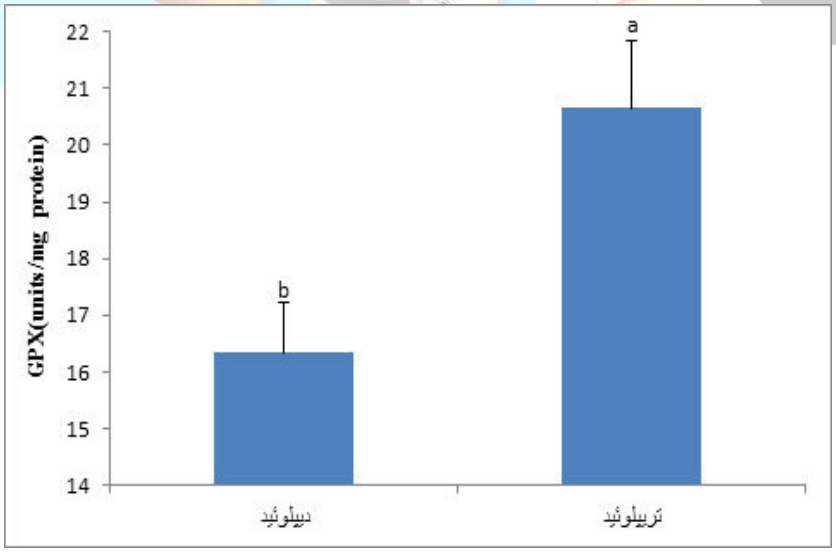
حالت دوم (گروه تریپلوئید): در این آزمایش جهت اعمال شوک تریپلوئیدی تعداد ۴۹۰۰ تخم مانند گروه شاهد لقاح داده شد. ۱۰ دقیقه بعد از لقاح (زمان اعمال شوک) تخم‌های لقاح یافته که در حال آبگیری بودند با استفاده از آبکش پلاستیکی به محفظه عایق دما حاوی آب کارگاه به میزان ۲۰ لیتر با دمای ۲۸ درجه (شدت شوک) انتقال داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه (مدت زمان اعمال شوک) درون محفظه عایق دما قرار داده شدند، سپس به درون سینی تراف انتقال داده شدند (Pandian and Koteeswaran, 1998).

فعالیتCAT به روشGoth(۱۹۹۱) سنجیده شد. در این روش ابتدا ۳ میلی لیتر از بافر فسفات و سپس ۴۰ میکرولیتر مایع رویی جدا شده به لوله آزمایش اضافه شد و به وصورت کامل مخلوط گردید. این مخلوط در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه انکوبه شده. سپس جذب نوری در ۲۴۰ نانومتر قرائت گردید. میزان ۰/۰۵ کاهش در جذب نوری محلول به عنوان یک واحد فعالیت آنزیم بیان شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیمGPXبه روشPaglia وValentine(۱۹۶۷)صورت پذیرفت. در این روش ترتیب ۵۰ میکرولیتر مایع رویی جدا شده، NADPH میلی مولاری، گلوتاتیون احیا شده ۱۵۰ میلی مولاری، گلوتاتیون ردوکتاز($۳۰^{U}/_{ml}$) سدیم آزید ۰/۰۱۲ مولاری، بافرفسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولاری وEDTA ۵ میلی مولاری (PH=۷) به لوله آزمایش اضافه و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول $۲H_2O_2$میلی مولاری به آن اضافه و سریع مخلوط گردید. جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر برای ۵ دقیقه خوانده شد. کاهش جذب نوری محلول بین دومین و چهارمین دقیقه به عنوان فعالیت آنزیم بیان گردید.

نتایج

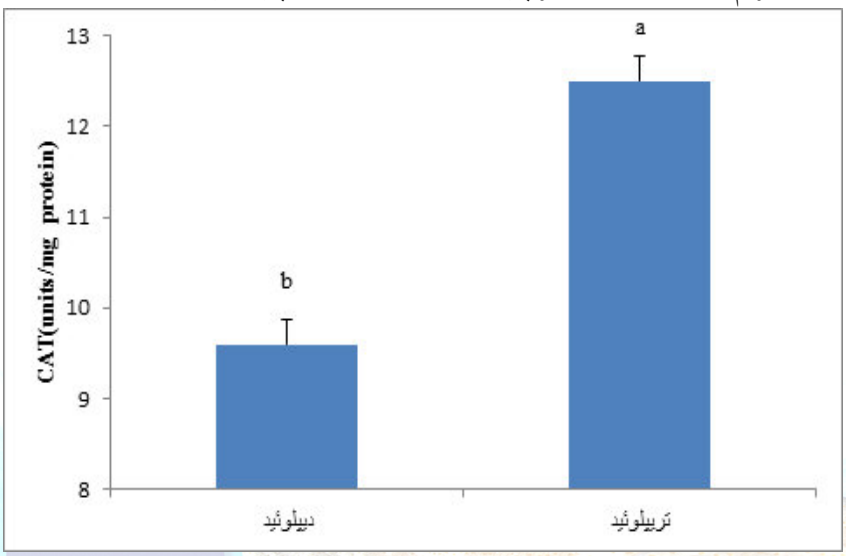
نتایج مربوط به فعالیت آنزیمGPXدر شکل شماره ۱ آورده شده است. بدین ترتیب میزان فعالیت آنزیمGPXبرحسبunits/mg proteinدر لارو دیپلوئید برابر با ۱۶/۳۳±۰/۸۸ و در لارو تریپلوئید (شوک دیده در زمان تخم) برابر با ۲۰/۶۶±۱/۲ محاسبه شد که نشان دهنده ی افزایش معنی دار فعالیت آنزیم GPXدر تیمار لارو تریپلوئید نسبت به تیمار لارو دیپلوئید بود (P<0.05).



حروف غیر مشابه به معنای وجود اختلاف معنی دار بین دو تیمار است (P<0.05)

شکل شماره۱: نتایج مقایسه فعالیت آنزیم GPX بین تیمارهای لارو ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان

نتایج مربوط به فعالیت آنزیمCATدر شکل شماره ۲ آورده شده است. بدین ترتیب میزان فعالیت آنزیمCATبرحسبunits/mg proteinدر لارو دیپلوئید برابر با ۹/۶±۰/۲۶ و در لارو تریپلوئید (شوک دیده در زمان تخم) برابر با ۱۲/۵±۰/۲۸ محاسبه شد که نشان دهنده ی افزایش معنی دار نسبتاً زیادفعالیت آنزیم CATدر تیمار لارو تریپلوئید نسبت به تیمار لارو دیپلوئید بود (P<0.01).



حروف غیر مشابه به معنای وجود اختلاف معنی دار نسبتاً زیاد بین دو تیمار است (P<0.01)

شکل شماره۲:نتایج مقایسه فعالیت آنزیم CATبین تیمارهای لارو ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه شاهد افزایش معنی دار فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در تیمار تریپلوئید بودیم که در زمان تخم به آن استرس دمایی وارد شده بود آنچنان که بررسی نتایج حاصل از مطالعه Subramanianو Arun(۱۹۹۸) در*Macrobrachiummalcolmsonii* افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانیCATوGPXرا نشان داد که شاهدی بر نتایج مطالعه حاضر است و علت آن را ناشی از مواجه شدن ناگهانی با محیط جدید و مصرف بیشتر اکسیژن بیان کردند.

فهرست منابع

۱. رزمی، ک.، ضرغام، د.، نکویی فرد، ع.، محمدپور، م.، کمایی، ک.، مرادیان، ح.، باشتی، ط.، گندمکار، ح. ا.، علیزاده، م وگرجی پور، ع. ا. ۱۳۸۹، تولید جمعیت تریپلوییدقزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به روش القائی. گزارش نهایی طرح، موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۵۹صفحه.

2. Benfey, T.J., 1999. The physiology and behavior of triploid fishes. Review in Fisheries Science, 7, 39–67.

3. Goth, L. (1991) A simple method fpor determination of serum catalase activity and revision of reference range. ClinChimActa. 196: 143-152.

4. Moccia, R.D. and K.R. Munkittrick. 1986. Relationship between the fertilization of rainbow trout (*Salmo gairdeneri*) eggs and the motility of spermatozoa. Theriogenol. 27: 679-688.

5. Omoto, N., M. Maebayashi, SH. Adachi, K. Arai and K. Yamauchi. 2005. Sex ratios of triploids and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Husohuso*female × *Acipenserruthenus*male). Aquaculture, 245: 39-47.

6. Paglia, D.E., Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med.70: 158-169.

7. Pandian, T. J. and Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia, 384: 167–243.

8. Piffere F., Beaumont A., Falguiere J.C., Flajshans M., Haffray P.& Colombo L. (2009) Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture.293.125-156.

9. Subramanian, P. and Arun, S., 1998. Antioxidant enzymes in fresh water prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. Comparative Biochemistry and Physiology . B,121: 273–277.