مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۲، ۱۸۰-۱۷۳
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.132957.2359
Archive of SID

تأثیر القای تریپلوییدی و دستکاری‌های فیزیکی بر شاخص‌های رشد و ترکیب اسیدهای آمینه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

صمد بهرامی باباحیدری[۱] سعید کیوان شکوه[۱*] سالار درافشان[۲] سید علی جوهری[۳]

۱) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
۲) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۳) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

(دریافت مقاله: ۱۷ مرداد ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۹ آبان ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: القای تریپلوییدی که از آن برای تولید ماهیان عقیم استفاده می‌شود در تکثیر و پرورش ماهیان رواج و گسترش زیادی یافته است و می‌تواند منجر به تغییراتی در ویژگی‌های فیزیولوژیک ماهی شود. **هدف:** تأثیر القاء تریپلوییدی به وسیله شوک دمایی بر شاخص‌های رشد و ترکیب اسیدهای آمینه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). **روش‌کار:** این آزمایش در قالب سه تیمار، شاهد، شاهد فیزیکی و تریپلویید طراحی شد. برای این کار از ۸ مولد ماده با میانگین وزن g ۲۴۶±۱۶۰۰ و ۶ مولد نر با میانگین وزن g ۱۸۶±۱۳۹۳، ۴ ساله استفاده گردید. برای القای تریپلوییدی از شوک دمایی استفاده شد. بعد از تخم‌گشایی و جذب کیسه زرده غذای بیومار معادل ۷٪ وزن بدن و در ۱۲ نوبت در روز برای تغذیه لاروها به مدت ۳۸ روز مورد استفاده قرار گرفت. تعیین درصد القای تریپلوییدی از طریق تهیه گسترش خونی در پایان صورت گرفت. **نتایج:** در ماهیان گروه تریپلویید درصد القای تریپلوییدی ۸۷/۱ بود. بین سایر شاخص‌های رشد و تغذیه بین دو گروه شاهد و تریپلویید اختلاف معنی‌دار دیده شد ($p<0/05$). از نظر بازماندگی بین سه گروه اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($p>0/05$). مقدار ایزولوسین و پرولین در گروه تریپلویید افزایش ولی مقادیر لایزین و آرژنین کاهش یافت ($p<0/05$). بین درصد اسیدهای آمینه در دو گروه شاهد و شاهد فیزیکی اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p>0/05$). **نتیجه‌گیری‌نهایی:** القای تریپلوییدی می‌تواند منجر به تغییرات معنی‌دار در رشد و ترکیب اسیدهای آمینه در قزل‌آلای رنگین‌کمان گردد.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، تریپلوییدی، ترکیب اسیدهای آمینه

مقدمه

دستکاری‌های کروموزومی گونه‌های مختلف آبزیان پرورشی اعم از دریایی و آب شیرین امروزه در سراسر دنیا بعنوان یک روش مفید و اقتصادی در بهبود ویژگیهای ژنتیکی آبزیان بسیار رایج می‌باشد (۱۲). اهمیت مطالعات مربوط به ژنتیک و دستکاری کروموزومی بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در ایران به دلیل اینکه تنها گونه در بین ماهیان سردآبی است، که پرورش داده می‌شود دوچندان است. القای تریپلوییدی امروزه بعنوان یک روش سودمند در پرورش آزاد ماهیان مطرح است. ماهیان تریپلویید واجد یک سری کروموزوم اضافه در سلول‌های سوماتیک خود هستند، که باعث می‌شوند، کروموزوم‌ها در طی تقسیم میوز بصورت صحیح جفت نشوند. سلول‌های جنسی ماهیان تریپلویید نمی توانند گامتوژنز کاملی داشته باشند در نتیجه این ماهیان عموما عقیم هستند (۱۷). القای تریپلوییدی علاوه بر عقیم سازی می‌تواند بر روی فیزیولوژی و در برخی از گونه‌ها بر روی ویژگی‌های آناتومیک تأثیرات زیادی داشته باشد (۱۴). تاکنون مطالعات زیادی در جهت تولید ماهیان تریپلویید با استفاده از روش‌های مختلف و همچنین مقایسه آن‌ها با ماهیان دیپلویید از دیدگاه‌های مختلف صورت گرفته است. از جمله این مطالعات می‌توان به تأثیر القای تریپلوییدی بر تغییر ضریب تبدیل غذایی و شاخص‌های مربوط به تغذیه، قابلیت هضم مواد غذایی در لوله گوارش و غلظت آنزیم‌های دخیل در سیستم هضم و جذب مواد غذایی، رشد و بازماندگی ماهی در مراحل مختلف زندگی، شاخص‌های خونی، فعالیت مربوط به سیستم هوازی و قابلیت دریافت اکسیژن در شرایط مختلف، پاسخ به استرس‌های مختلف نظیر تراکم و کمبود اکسیژن، واکنش سیستم ایمنی ماهی به عوامل بیماری زا و تحریک پذیری حواس ماهی و رسیدگی جنسی اشاره کرد (۲۱).

اسیدهای آمینه فعالیت‌های زیستی بسیار متنوعی را در سلول‌های زنده به عهده دارند. کیفیت پروتئین‌های هر نوع ماده غذایی به میزان هضم و جذب اسیدهای آمینه بستگی دارد. امروزه ماهی به عنوان یک منبع با ارزش پروتئینی شناخته شده است. ترکیبات اسیدهای آمینه در ماهیان به عوامل درونی هم چون گونه، اندازه، پلوییدی و رسیدگی جنسی و عوامل خارجی چون منابع غذایی، فصل صید و مقادیر شوری و درجه حرارت آب وابستگی دارد (۵).

تاکنون مطالعات زیادی بر روی کمیت و کیفیت اسیدهای آمینه در بافت‌های مختلف ماهی صورت گرفته است. این مطالعات به طور عمده به تأثیر مواد غذایی با مقدار و نوع پروتئین متفاوت بر روی ترکیب اسیدهای آمینه پرداخته‌اند. پژوهش‌هایی نیز بصورت محدود با هدف بررسی

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۶۱-۵۳۵۳۴۷۲۵ نمابر: ۰۶۱-۵۳۵۳۴۷۲۵ Email: keyvan56@yahoo.com
www.SID.ir

Archive of SID

اسیدهای آمینه پلاسمای خون انجام گرفته است. Kaushik و Luquet در سال ۱۹۹۷، Walton و Wilson در سال ۱۹۸۶، Yokoyama و Nakazoe در سال ۱۹۹۱ و Yokoyama و همکاران در سال ۱۹۹۴ نمونه‌هایی از این مطالعات بود. ترکیب اسیدهای آمینه در برخی از بافت‌ها نظیر مغز و کبد کمتر تحت تأثیر جیره غذایی قرار می‌گیرد ومعمولاً با توجه به گونه ثابت است (۲۴). ترکیب اسیدهای آمینه در بافت عضله ماهیان شباهت زیادی با هم دارند و حتی بین ماهیان و سایر گونه‌ها شباهت‌هایی از نظر نوع اسیدآمینه وجود دارد (۱۱). Fu و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش کردند ترکیب اسیدهای آمینه در ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) که انتقال ژن در آن‌ها صورت گرفته‌است با گروه طبیعی دارای اختلاف معنی‌دار است. تغییرات کمی مقدار DNA در سلول‌های ماهیان تریپلوییید، البته از دیدگاه تئوریک می‌تواند بر ترکیب اسیدهای آمینه بافت عضله تأثیر داشته باشد. این نظریه نیاز به مطالعه و پژوهش دارد تا اثر پلوییدی مانند سن و رسیدگی جنسی بر روی ترکیب اسیدهای آمینه مشخص گردد. در این مطالعه در کنار تولید قزل‌آلای رنگین‌کمان تریپلوییید به وسیله شوک دمایی و بررسی تأثیر آن بر فاکتورهای رشد و بازماندگی، اثر القای تریپلوییدی بر روی الگوی اسیدهای آمینه که در مطالعات صورت گرفته توجه چندانی به آن‌ها نشده و از دیدگاه بازار ، شخص مصرف کننده و همچنین خواص ماهی حائز اهمیت زیادی است بررسی می‌شود.

مواد و روش کار

محل انجام آزمایش: این تحقیق در کارگاه تکثیر ماهی چال واقع در استان لرستان، شهرستان الیگودرز در پاییز سال ۱۳۹۳انجام گرفت. دمای آب کارگاه ۱۰/۵–۱۱°C، pH ۷/۶–۷/۸، اکسیژن محلول ۸/۲–۸/۵ mg/l و میزان هدایت الکتریکی آب ۵۸۰ –۶۱۰ mM/cm بود.

تهیه مولد و استحصال تخم و اسپرم: برای این کار از ۸ مولد ماده با میانگین وزن ۲۴۶±۱۶۰۰ g گرم و طول کل ۱/۸±۵۱/۸۷ cm و ۶ مولد نر با میانگین وزن ۱۸۶±۱۳۹۳ g گرم و طول کل ۲/۵۸±۵۰/۵۰ cm، ۴ ساله استفاده گردید. تخم گیری از مولدین ماده با استفاده از روش معمول در کارگاه و با بیهوش کردن مولدین در عصاره گل میخک (۱۲۰ mg/l) و به روش دستی صورت گرفت. اسپرم گیری از مولدین نر با سرنگ cc ۱۰۰ به منظور جلوگیری از آلودگی با خون و مدفوع انجام شد و از روش خشک برای لقاح استفاده گردید. تخم‌های لقاح یافته تحت دو حالت زیر به سینی‌های تراف انتقال پیدا کردند.

حالت اول (گروه شاهد): طبق شرایط معمول تکثیر قزل‌آلای رنگین کمان یعنی بعد از آبگیری، تعداد ۴۹۰۰ تخم به سینی‌های تراف انتقال داده شدند.

حالت دوم (شاهد فیزیکی n۲): در این آزمایش برای شبیه سازی دستکاری‌های فیزیکی جهت تولید ماهیان تریپلوییید تعداد ۴۹۰۰ تخم مانند گروه شاهد لقاح داده شد. بدین منظور ۱۰ دقیقه پس از لقاح تخم‌های لقاح یافته در حال آبگیری به یک یونولیت حاوی آب کارگاه به میزان ۲۰ لیتر با دمای ۱۲°C (شدت شوک) منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد. تخم‌های شوک داده شده سپس به درون سینی تراف انتقال داده شدند. برای تولید ماهیان این گروه، تمام دستکاری‌هایی لازم برای تولید ماهیان تریپلوئید به استثنای تغییر دمای آب (استفاده از دمای آب ۱۲ °C کارگاه بجای ۲۸ °C) استفاده گردید. علت قرار دادن گروه شاهد فیزیکی در این آزمایش پی بردن به این نکته است که آیا دستکاری‌های فیزیکی لازم برای تولید ماهیان تریپلوییدو استرس ناشی از این دستکاری و جابجایی‌ها هم می‌تواند منجر به بروز تغییرات شود یا فقط تریپلوییدی است که می‌تواند تغییرات احتمالی نسبت به گروه شاهد را ایجاد کند.

حالت سوم (تریپلوییدn۳) در این آزمایش جهت تولید ماهیان تریپلوییدی، تعداد ۴۹۰۰ تخم لقاح یافته در حال آبگیری (۱۰ دقیقه بعد از لقاح) به یونولیت حاوی آب کارگاه به میزان ۲۰ L با دمای ۲۸ °C (شدت شوک) انتقال داده شده و پس از نگهداری به مدت ۱۰ دقیقه درون یونولیت به درون سینی تراف انتقال داده شدند (۱۳).

انکوباسیون: تخم‌ها تا مرحله چشم زدگی تخم‌ها در سینی‌های چشمه ریز سرپوشیده در سالن انکوباسیون نگهداری شد. به منظور جلوگیری از آلودگی قارچی، تخم‌ها یک روز در میان به مدت یک ساعت با مالاشیت گرین (۵ mg/l) ضد عفونی شدند.

پرورش لارو: بعد از اینکه لاروها تقریباً ۷۰ ٪ کیسه زرده خود را جذب کردند، غذا دهی با توجه به بیومس و درجه حرارت آب شروع شد. طول دوره پرورش ۳۸ روز به طول انجامید که لاروها ۱۲ بار در روز و معادل ۷ ٪ وزن بدن تغذیه شدند. غذای مورد استفاده ساخت کارخانه بیومار فرانسه بود (جدول۱). میزان پروتئین غذای مورد استفاده ۵۲٪، چربی ۱۵٪، خاکستر ۶٪، فیبر ۴٪، رطوبت ۷ ٪ و انرژی غذا ۱۰۰g /kj ۶۶۰ بود.

سنجش پلوییدی: برای محاسبه درصد القای تریپلوییدی ابعاد هسته و سلول گلبول‌های قرمز ماهی اندازه گیری شد. بدین منظور ابتدا ساقه دمی ماهیان قطع گردید و یک قطره خون بر روی لام چکانده شد و به وسیله لام دیگر گسترانده شد و سپس در معرض هوا خشک گردید. گسترش تولید شده بعد از خشک شدن بوسیله متانول تثبیت گردید (۲۰). گسترش‌های تثبیت شده با گیمسای ۱۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. ۲۰ گلبول قرمز از هر گسترش خونی به وسیله میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد بررسی قرار داده شد. برای بررسی و محاسبه مساحت و حجم هسته و سلول گلبول‌های قرمز با استفاده از روابط زیر صورت گرفت و مبنای تأیید تریپلوییدافزایش ۱/۵ یا بیش از ۱/۵ برابر حجم هسته و سلول گلبول قرمز در ماهیان تریپلوییدنسبت به ماهیان گروه شاهد بود (۳).

$\Pi/4 \times$ محور کوچک هسته و سلول × محور بزرگ هسته و سلول = مساحت هسته و سلول

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. اجزای تشکیل دهنده جیره مورد استفاده در طول دوره آزمایش.

اجزاء	٪	اجزاء	٪
پودر ماهی	۴۲	دکسترین	۱۳
کازئین	۷	روغن ماهی	۷
ژلاتین	۷/۵	روغن سویا	۳
نشاسته	۱۱	مخمر	۷
سلولز	۶	ویتامین	۷/۵
مواد معدنی	۷/۵	آنتی اکسیدان	۰/۰۴
ویتامین C	۰/۲	ویتامین E	۰/۲

۴/۳×Π×(۲/محور کوچک هسته و سلول)۲×(۲/محور بزرگ هسته و سلول) =حجم هسته و سلول

برای محاسبه درصد القای تریپلوییدی از فرمول زیر استفاده شد (۳).

۱۰۰×(تعداد کل ماهیان/تعداد ماهیان تریپلویید) = تریپلوییدی(٪)

اندازه گیری شاخص‌های رشد و تغذیه: در پایان دوره آزمایش با استفاده از فرمول‌های زیر شاخص‌های رشد و تغذیه اندازه گیری شد (۱۹).

میانگین وزن اولیه (g)–میانگین وزن ثانویه (g) = اختلاف وزن (g)

۱۰۰×(Ln(وزن نهایی)–Ln(وزن اولیه))/دوره پرورش = ضریب رشد ویژه (٪/day)

۱۰۰/طول (cm)۳×وزن نهایی (g) = ضریب چاقی (g/cm۳)

وزن تر (g) / غذای خشک داده‌شده (g) =ضرب تبدیل غذا

دوره پرورش/افزایش وزن (g) = میانگین رشد روزانه (g)

۱۰۰×(تعداد اولیه ماهی/(تعداد ماهی تلف شده)–تعداد اولیه ماهی) = ٪ زنده مانی

اندازه گیری پروفیل اسیدهای آمینه: اندازه گیری پروفیل اسیدهای آمینه با سه تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. ابتدا نمونه عضله در دمای ۱۱۰°C به مدت ۲۴ ساعت در ۶ مولار اسید کلریدریک بطور کامل هیدرولیز شد. برای اندازه گیری پروفایل اسیدهای آمینه از دستگاه اسیدآمینه آنالایزر مدل (Germany ,knauer A۲۰۰) با ستون Vydac C۱۸ استفاده شد. همچنین آشکار ساز از نوع فلورسانس با طول موج برانگیختگی ۴۴۰ nm و طول موج نشری ۵۷۰ nm بود (۵).

آنالیز آماری: هرتراف به‌عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و نتایج به صورت میانگین ±خطای استاندارد گزارش گردید. در این مطالعه کلیه محاسبات آماری در دو نرم افزار SPSS نگارش ۱۹ و Microsoft Office Excel ۲۰۱۰ انجام شد. از آزمون کالگوموروف–اسمیرنوف به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها برای بررسی فاکتورها مربوط به ابعاد گلبول‌های قرمزدر بین دو تیمار شاهد و تریپلویید از آزمون T- test مستقل استفاده شد و برای مقایسه سایر شاخص‌ها از آزمون ANOVA و برای تعیین تفاوت‌ها از پس آزمون Duncan استفاده شد (۱).

نتایج

با توجه به اندازه گیری‌های صورت گرفته بر روی گلبول‌های قرمز خون (تصویر ۱) در ماهیان گروه تریپلویید درصد القای تریپلوییدی ۸۷/۱ ٪ بود. حجم و مساحت هسته و سلول گلبول‌های قرمز (جدول ۲) در گروه تیمار به طور معنی‌داری از گروه شاهد بیشتر بود ($p<۰/۰۱$).

نتایج حاصل از زیست سنجی و شاخص‌های تغذیه‌ای ماهیان در طول دوره ی آزمایش در جدول ۳ ارائه گردیده است. بین گروه‌های آزمایشی از نظر وزن لاروها در زمان هچ اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p<۰/۰۱$) به گونه‌ای که وزن اولیه در گروه‌های شاهد و شاهد فیزیکی با هم اختلافی نداشت اما هر دوی این گروه‌ها با گروه تریپلویید اختلاف معنی‌دار داشتند. در پایان دوره آزمایش، بیشترین وزن نهایی (۰/۰۵±۲/۲۷ g) در گروه شاهد به دست آمد که با گروه شاهد فیزیکی (۰/۰۴±۲/۲۴ g) اختلاف معنی‌دار نداشت ($p>۰/۰۵$) اما با گروه تریپلویید (۰/۰۲±۲/۰۷) اختلاف معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). با توجه به جدول ۴ مشاهده شد که بین گروه‌های شاهد و شاهد فیزیکی با گروه تریپلویید از نظر افزایش وزن بین سه گروه اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p<۰/۰۵$)، ضریب تبدیل غذا در دو گروه شاهد و شاهد فیزیکی فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) ولی هر دو گروه با گروه تریپلویید اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$). ضریب رشد ویژه، میانگین رشد روزانه و ضریب چاقی در گروه‌های شاهد و شاهد فیزیکی اختلافی نداشت ($p>۰/۰۵$) اما هر دو گروه با گروه تریپلویید اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$) از نظر بازماندگی بین سه گروه آزمایشی یعنی گروه شاهد، گروه شاهد فیزیکی و گروه تریپلویید اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($p>۰/۰۵$).

نتایج مربوط به ترکیب اسیدهای آمینه بین سه گروه در جدول ۴ آمده است. با توجه به جدول مشاهده می‌شود که بین درصد اسیدهای آمینه در دو گروه شاهد و شاهد فیزیکی اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p>۰/۰۵$). از نظر درصد اسید آمینه غیر ضروری پرولین بین گروه تریپلویید با دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار دیده شد ($p<۰/۰۵$) و در گروه تریپلویید زیاد شده بود. گروه تریپلویید از نظر اسیدآمینه‌های ضروری ایزولوسین، لایزین و آرژنین با دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). مقدار ایزولوسین در گروه تریپلویید افزایش ولی مقادیر لایزین و آرژنین کاهش یافت.

بحث

تریپلوییدی در مراحل مختلف می‌تواند روی ماهیان اثرات متفاوتی را اعمال کند. از جمله این اثرات می‌توان به تغییر ضریب تبدیل غذایی، قابلیت هضم، رشد، شاخص‌های خونی، فعالیت هوازی و رسیدگی جنسی را نام برد (۹). اثر تریپلوییدی بر روی اندازه گلبول‌های قرمز ماهی به وضوح قابل مشاهده است، تریپلوییدی می‌تواند تا ۴۰٪ حجم گلبول‌های قرمز را افزایش دهد و معیار مناسبی برای جداسازی ماهیان تریپلویید از دیپلویید

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. ابعاد گلبول‌های قرمز در ماهیان دیپلوییید و تریپلوییید قزل‌آلای رنگین‌کمان (میانگین ± خطای استاندارد). وجود حداقل یک حرف مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

شاخص (واحد)	دیپلوییید (D)	تریپلوییید (T)	نسبت (T/D)
مساحت سلول ($m\mu^2$)	۹۶/۷۱±۱/۲۷ a	۱۵۸/۱۲±۱/۳۶ b	۱/۶۳
حجم سلول ($m\mu^3$)	۷۵۴/۴۵±۱۵/۶۰ a	۱۱۳۲/۲۴±۱۷/۲۰ b	۱/۵۰
مساحت هسته ($m\mu^2$)	۱۵/۱۱±۰/۳۷ a	۲۱/۵۸±۰/۶۶ b	۱/۴۲
حجم هسته ($m\mu^3$)	۳۴/۶۵±۱/۱۱ a	۷۱/۳۵±۱/۷۲ b	۱/۹۴

جدول۳. شاخص‌های رشد و تغذیه در انتهای دوره (میانگین ± خطای استاندارد). وجود حداقل یک حرف مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

شاخص	شاهد (n۲)	شاهد فیزیکی (n۲)	تریپلوییید (n۳)
وزن اولیه (g)	۰/۰۹±۰/۰۰ a	۰/۰۹±۰/۰۰ a	۰/۰۸±۰/۰۰ b
وزن نهایی(g)	۲/۲۷±۰/۰۳ a	۲/۲۴±۰/۰۴ a	۲/۰۷±۰/۰۲ b
افزایش وزن(g)	۲/۲۱±۰/۰۶ a	۲/۱۵±۰/۰۴ b	۱/۹۹±۰/c۰۳
ضریب تبدیل غذا	۰/۸۶±۰/۰۷ a	۰/۸۶±۰/۰۹ a	۰/۹۷±۰/۱۱ b
ضریب رشد ویژه (day/٪)	۸/۲۵±۰/۱۲ a	۸/۴۶±۰/a۰۶	۸/۰۱±۰/۱۷ b
میانگین رشد روزانه (g/day)	۰/۰۵±۰/۰۰ a	۰/۰۵±۰/۰۰ a	۰/۰۴±۰/۰۰ b
ضریب چاقی (g/cm^3)	۱/۱۴±۰/۰۶ a	۱/۰۶±۰/۰۶ a	۱/۴۷±۰/۰۵ b
بازماندگی (٪)	۹۴/۱۲±۰/۱۱ a	۹۳/۱۹±۰/۷۴ a	۹۳/۱۴±۰/a۱۹

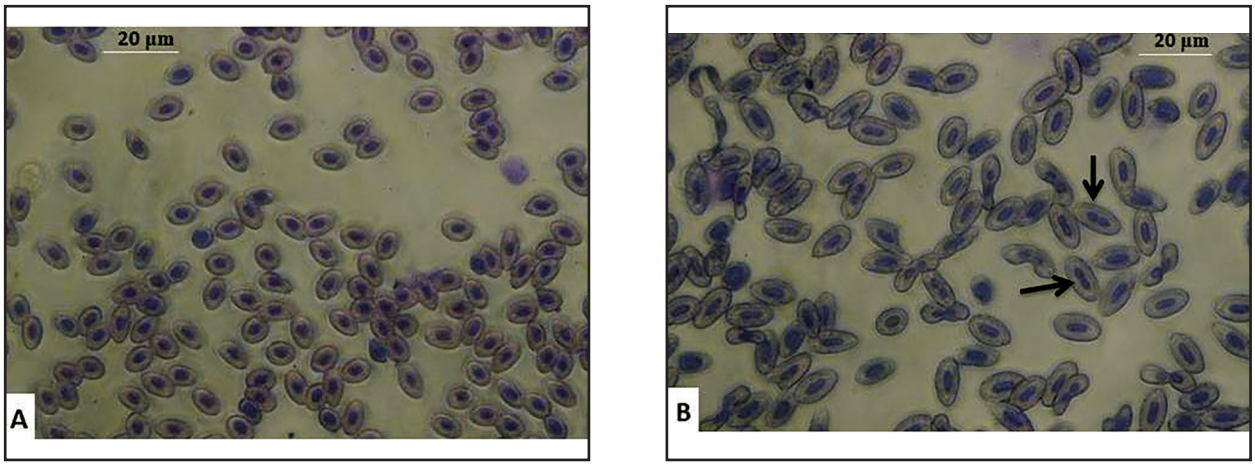
جدول ۴. ترکیب اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری عضله قزل‌آلای رنگین‌کمان (میانگین ± خطای استاندارد. ۳ تکرار). ΣEAA: مجموع اسیدآمینه‌های ضروری. Σ NEAA: مجموع اسیدآمینه‌های غیرضروری. EAA/NEAA: نسبت اسیدآمینه‌های ضروری به اسیدآمینه‌های غیر ضروری. * اسیدآمینه‌های ضروری. وجود حداقل یک حرف مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است(p<۰/۰۵).

اسید آمینه (٪)	شاهد (n۲)	شاهد فیزیکی (n۲)	تریپلوییید (n۳)
اسید آسپارتیک	۸/۵۴±۰/۲۸ a	۸/۳۴±۰/۲۲ a	۸/۴۲±۰/۴۴ a
ترئونین*	۴/۱۸±۰/۲۰ a	۴/۶۲±۰/۳۰ a	۴/۶۰±۰/۲۸ a
سرین	۴/۰۴±۰/۰۸ a	۴/۶۴±۰/۲۲ a	۴/۴۰±۰/۲۳ a
اسیدگلوتامیک	۱۲/۸۵±۰/۱۳ a	۱۳/۱۷±۰/۴۷ a	۱۲/۸۷±۰/۶۵ a
پرولین	۲/۶۶±۰/۲۳ a	۲/۵۶±۰/۱۳ a	۴/۲۶±۰/۳۴ b
گلیسین	۶/۰۰±۰/۳۴ a	۵/۶۸±۰/۶۹ a	۵/۶۵±۰/۳۴ a
آلانین	۵/۹۰±۰/۴۰ a	۵/۸۸±۰/۳۲ a	۵/۶۳±۰/۴۷ a
والین*	۳/۶۴±۰/۳۳ a	۴/۳۰±۰/۵۷ ba	۵/۱۸±۰/۲۴ a
متیونین*	۲/۷۷±۰/۱۹ a	۲/۵۳±۰/۳۳ a	۲/۶۰±۰/۳۱ a
ایزولوسین*	۴/۵۷±۰/۲۷ a	۴/۷۳±۰/۲۵ a	۵/۶۳±۰/۱۹ b
لوسین*	۷/۷۳±۰/۲۰ a	۸/۰۴±۰/۴۷ a	۸/۲۷±۰/۰۸ a
تیروزین	۲/۶۸±۰/۲۱ a	۳/۴۰±۰/۲۶ a	۳/۴۸±۰/۳۳ a
فنیل آلانین*	۴/۰۸±۰/۳۳ a	۴/۲۳±۰/۴۷ a	۴/۵۳±۰/۳۱ a
هیستیدین	۲/۴۲±۰/۵۸ a	۲/۴۳±۰/۲۷ a	۲/۱۳±۰/۰۷ a
لایزین*	۸/۲۳±۰/۱۹ a	۷/۷۸±۰/۱۶ a	۶/۰۶±۰/۳۲ b
آرژنین*	۶/۶۸±۰/۲۲ a	۶/۳۹±۰/۷۰ a	۴/۵۶±۰/۳۱ b
Σ EAA	۳۵/۲۱±۰/۴۶ a	۳۶/۲۵±۰/۴۵ a	۳۶/۱۷±۷/۲۱ a
Σ NEAA	۵۱/۸۰±۰/۳۴ a	۵۲/۵۶±۱/۴۲ a	۵۰/۳۷±۱/۱۵ a
EAA/NEAA	۰/۶۷±۰/۰۵ a	۰/۶۹±۰/۲۵ a	۰/۷۱±۰/۳۰ a

است که اغلب مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). در این مطالعه گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تریپلوییید به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گلبول‌های قرمز در ماهیان دیپلوییید حجیم تر بودند. مطالعات متعددی در زمینه تأثیر القای پلوییدی بر اندازه و تعداد سلول‌های خونی در ماهیان منتشر شده است (۱۴). سلول‌های ماهیان تریپلوییید به دلیل دارا بودن مقدار DNA بیشتر، ابعاد بزرگتری نسبت به سلول‌های دیپلوییید دارند و این اندازه

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱. گلبول‌های قرمز در ماهیان دیپلوید (A) و تریپلوید (B) قزل‌آلای رنگین کمان. نکته: ابعاد بزرگتر گلبول‌های قرمز در انواع تریپلوید و نیز فراوانی بیشتر ناهنجاری‌های خونی از جمله گلبول با هسته در حال نیم شدن.

بسته به بافت و سن ماهی می‌تواند متغییر باشد (۱۳). در مطالعه حاضر بین فاکتورهای رشد و تغذیه به غیر از افزایش وزن بدن بعد از شروع تغذیه خارجی اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و گروه شاهد فیزیکی دیده نشد. این نتایج تا حدودی می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که تنش‌هایی که بر روی تخم اعمال میشود نمی تواند تأثیر آنچنانی بر روی رشد و غذا گیری در مراحل بعدی زندگی داشته باشد . انتظار می‌رود که ماهیان تریپلوییـد به دلیل دارا بودن تعداد سلول‌های کمتر که به دنبال افزایش ابعاد سلولی رخ می‌دهد و همچنین هتروزایگوسیتی بیشتر که به واسطه افزایش تعداد آلل‌ها در هر لوکوس است از سرعت تکامل جنینی بیشتری برخوردار باشند، این افزایش سرعت در روند تکامل می‌تواند به طور نسبی طول دوره انکوباسیون را در قزل‌آلای رنگین کمان تریپلوییدکاهش دهد که این امر منجر به کاهش وزن لاروها در زمان هچ می‌شود (۱۵). تحقیقات جدید نشان می‌دهد که آزادماهیان تریپلوییدبه دلیل کاهش نسبی تعداد سلول‌ها و سطح هوشیاری نسبت به محرک‌های محیطی و نیز عدم تولید هورمون‌های استرویيدی آنابولیک از قابلیت رشد کمتری نسبت به انواع دیپلوییدد در شرایط قبل از بلوغ برخوردار باشند (۶).

اسیدهای آمینه واحد ساختاری پروتئین‌ها بوده و دارای نقش‌های مهم زیستی در ماهی هستند و در اثر جیره‌های مختلف، رشد، رسیدگی جنسی و پلوییدی می‌تواند ترکیب آن‌ها دچار تغییر شود (۱۱). وجود و مقدار اسیدهای آمینه ضروری در ماهی‌های خوراکی به عنوان غذای با ارزش برای انسان دارای اهمیت زیادی است چون می‌تواند تأمین کننده اسیدهای آمینه ضروری برای انسان باشد که باید از طریق تغذیه تأمین شود (۲۳).

اسیدآمینه ضروری ایزولوسین دارای نقش‌های مختلفی در ماهیان است از جمله مهمترین این نقش‌ها شرکت در ساختمان بافت ماهیچه‌ای و کبد ماهی است. اسیدآمینه ایزولوسین برای ساخته شدن اسکلت ماهیچه‌ها نقش ضروری دارد و می‌تواند بر روی وزن نهایی ماهی و سایر پارامترهای مربوط به رشد ماهی تأثیرگذار باشد (۸). Bouchtova و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که در اثر القای تریپلوییدی میزان اسیدآمینه ضروری ایزولوسین به شکل معنی‌داری در لای‌ماهی (*Tinca tinca*) افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر میزان اسیدآمینه ایزولوسین در گروه تریپلوییدبه شکل معنی‌داری زیاد شد که شاید بتوان علت آن را در متفاوت بودن پارامترهای زیستی رشد مانند وزن نهایی با دو گروه دیگر دانست زیرا این اسیدآمینه در حالت عادی در عضلات شکسته شده و برای تولید ATP مورد نیاز مصرف می‌شود این امر موجب می‌شود اسیدهای آمینه دیگر مانند لوسین برای رشد عضله مورد استفاده قرار گیرند ممکن است که افزایش اسیدآمینه ایزولوسین در عضله و به دنبال آن کاهش استفاده از آن به عنوان منبع انرژی باعث شود مقداری از اسیدآمینه مورد نیاز برای تولید پروتئین و افزایش رشد ماهیچه برای تأمین انرژی مورد استفاده قرار گیرند که این عمل ممکن است باعث کاهش رشد شود. البته به دلیل اینکه تا کنون مطالعات بسیار ناچیزی روی پروفیل اسیدهای آمینه ماهیان تریپلوییدصورت گرفته است و حجم اطلاعات در این زمینه بسیار ناچیز است اظهار نظرهای قطعی نیازمند پژوهش‌های بیشتری است.

اسیدآمینه ضروری آرژنین در تکامل طبیعی لاروها در ماهیان آب شیرین نقش دارد. همچنین کاهش میزان این اسیدآمینه می‌تواند منجر به بدشکلی در باله دمی و همچنین دهان لارو شود (۱۸). وجود مقادیر مناسب اسیدآمینه آرژنین در جیره لاروها می‌تواند نه تنها به رشد و تکامل آن‌ها کمک کند، بلکه از بروز بدشکلی در لاروها جلوگیری به عمل می‌آورد (۴). این امکان وجود دارد که کاهش میزان این اسیدآمینه در ماهیان تریپلوییدبا افزایش میزان بدشکلی در این ماهیان ارتباط داشته باشد.

Bouchtova و همکاران در سال ۲۰۰۵ مشاهده کردند که در اثر القاء تریپلوییدی میزان آرژنین در عضله لای ماهی کاهش پیدا می‌کند (۵).

اسیدآمینه ضروری لایزین نیز در تکامل طبیعی لارو، گسترش و تکامل سیستم عصبی و حواس، تکامل و تقویت سیستم بینایی در ماهیان نقش دارد (۲۳). در ماهیان تریپلوییددرک عمومی نسبت به محیط، سیستم

www.SID.ir

Archive of SID

بویایی و بینایی نسبت به ماهیان دیپلوییید کمتر بوده این امر واکنش پذیری این ماهیان را نسبت به غذا و دریافت آن را تا حدودی به تاخیر می‌اندازد (۵). شـاید بتوان اینگونه عنوان کرد که یکی از علل کاهش این درک عمومی نسـبت به محیط کمبود اسیدآمینه ضروری لایزین در این گروه از ماهیان باشـد. Fu و همکاران در سـال ۲۰۰۰ عنوان کردند که میزان اسید آمینه لازین در عضله ماهیان کپور معمولی در اثر دستکاری‌های ژنتیکی نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. آن‌ها علت این امر را تغییرات ایجاد شده در محتوای ژنتیکی ماهیان عنوان کردنـد (۷). Bouchtova و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که القای تریپلوییدی تأثیری در میزان اسیدآمینه ضروری لایزین در لای ماهی ندارد (۵).

اسیدآمینه غیر ضروری پرولین در ساختار فیبرهای ماهیچه‌ای، تکامل تخمدان و همچنین شکل گیری کلاژن نقش دارد (۲۴). همچنین پرولین در فرآیند سـوخت و ساز، تبدیل به هیدروکسی پرولین می‌شود و دیگر به صورت پرولین قابل شناسـایی نمی باشـد (۵). در مطالعه حاضر میزان این اسـیدآمینه غیر ضـروری در ماهیان گروه تریپلوییید به شـکل معنی‌داری افزایش یافت شـاید بتوان علت این امر را این گونه بیان کرد که متفاوت بودن شاخص‌های رشد مانند وزن اولیه و نهایی در ماهیان تریپلوییید و کمتر بودن این شـاخص‌ها نسـبت به دو گروه دیگر تا حدودی به کاهش تبدیل پرولین به هیدروکسی پرولین در خلال رشد و تکامل ماهیان گروه تریپلوییید دانست.

نتیجه‌گیری‌نهایی: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که القای تریپلوییدی و دسـتکاری‌های فیزیکی ناشـی از آن در قـزل‌آلای رنگین کمان علاوه بر کاهـش بازماندگی در مراحل اولیه تکامل ماهی، می‌تواند شـاخص‌های رشد و تغذیه ماهی را تغییر داده و به واسطه تغییر در ترکیب اسـیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری تغییرات زیسـتی خاص را در این گروه از ماهیان ایجاد کند بطوریکه ارزش غذایی ماهی را به واسطه کاهش میزان اسـیدهای آمینه ضروری حائز اهمیت برای انسان تحت تأثیر قرار دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسـیله از همکاری صمیمانه مرکز تکثیـر و پرورش قزل‌آلای رنگین کمان ماهی چال، آقای مهندس خرسندی و مرکز تکثیر و پرورش آبزیان اصفهان آقای مهندس کشت کار تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر بخاطر پشتیبانی مالی از این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Barton, B. A. (2002) Stress in fish: A diversity of responses with particular reference to change in circulating corticosteroids. Integer Comp Biol. 42: 217-225.
2. Benfey, T. J. (1999) The physiology and behavior of triploid fishes. Rev in Fish Sci. 7: 39-67.
3. Benfey, T. G., Sutterlin A.M. (1984) The hematology of the triploid landlocked Atlantic salmon, *Salmo salar*. J Fish Biol. 24: 333-338.
4. Buchtova, H. Svobodova, Z., Flaj, M., Vorlova, L. (2003) Analysis of growth, weight and relevant indices of diploid and triploid population of tench, *Tinca tinca*. Aquac Res. 34: 719-726.
5. Buchtova, H., Smutna, M., Vorlova, L., Svobodova, Z., Flajshans, M. (2005) Amino Acid Composition of Muscle Proteins of Diploid and Triploid Tench, *Tinca tinca*. Acta Vet Brno. 74: 329-337.
6. Dunham, R. A. (2001) Aquaculture and Fisheries Biotechnology, Genetic Approaches. CABI Publishing. p. 22-53.
7. Fu, C., Cui, Y., Hung, S. S. O., Zhu, Z. (2000) Whole-body amino acid pattern of F4 human growth hormone genetransgenic red common carp, *Cyprinus carpio* fed diets with different protein levels. Aquaculture. 189: 287-292.
8. Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (1995) Metabolic Biochemistry (Biochemistry and molecular biology of fishes). (1st ed.) Elsevier, Amsterdam. The Nederlands. 515 p.
9. Ihssen, P. E., McKay, L. R., McMillan, I., Phillips, R. B. (1990) Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. Trans Am Fish Soc. 119: 698-717.
10. Kaushik, S. J., Luquet, P. (1977) Study of free amino acids in rainbow trout in relation to salinity changes: I. Blood free amino acids during starvation. Ann Hydrobiol. 8: 135-144.
11. Mohanty, S. N., Kaushik, S. J. (1991) Whole body amino acid composition of Indian major carp and its significance. Aquat Living Resour. 4: 61-64.
12. Omoto, N., Maebayashi, M., Adachi, S., Arai, K., Yamauchi, K. (2005) Sex ratios of triploids

www.SID.ir

Archive of SID

and gynogenetic diploids induced in the hybrid sturgeon, the bester (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*). Aquaculture. 245: 39-47.

13. Pandian, T. J., Koteeswaran, R. (1998) Ploidy induction and sex control in fish. Hydrobiologia. 384: 167-243.
14. Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J. C., Flajšhans, 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.
15. Quilete, E., Chevassus, B., Krieg, F. (1987) Characterization of auto- and allotriploid salmonids for rearing in seawater cages. Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, vol. 3. In: Tiews, K. (ed.). Heenemann Verlags, Berlin, Germany. p. 239-252.
16. Sezaki, K., Watabe, S., Hashimoto, K. (1983) Comparison of chemical composition between diploids and triploids of ‘‘ginbuna’’ *Carassius auratus*. Bull Japan Soci Sci Fish. 49: 97-101.
17. Smith, D. S., Benfey, T. J. (2001) The reproductive physiology of three age classes of adult female diploid and triploid brook trout, *Salmo trutta*. Fish Physiol Biochem. 25: 319-333.
18. Smutna, M., Vorlova, L., Svobodova, Z. (2002) Pathobiochemistry of ammonia in the internal environment of fish. Acta Vet Brno.71: 169-181.
19. Soosean, C., Marimuthu, K., Sudhakaran, S., Xavier, R. (2010) Effects of mangosteen (Garcinia mangostana.) extracts as a feed additive on growth and haematological parameters of African catfish. *Clarias gariepinus* fingerlings. Eur Rev for Med Pharm Sci. 14: 605-611.
20. Strunjak, I., Rakovak, R.A., Topic, N. (2003) Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Vet Med. 48: 215-219.
21. Tiwary, B. K., Kirubagaran, R., Ray, A. K. (2004) The biology of triploid fish. Rev Fish Biol Fish. 14: 391-402.
22. Walton, M. J., Wilson, R. P. (1986) Postprandial changes in plasma and liver free amino acids of rainbow trout fed complete diets containing casein. Aquaculture. 51: 105-115.
23. Wilson, R.P. (1989) Amino acids and proteins. In: Fish Nutrition. Halver, J.E. (ed.). Academic Press, San Diego, USA. p. 111-151.
24. Yamamoto, T., Unuma, T., Akiyama, T. (2000) The influence of dietary protein and fat levels on tissue free amino acid levels of fingerling rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. 182: 353-372.
25. Yokoyama, M., Nakazoe, J. (1991) Effects of dietary protein levels on free amino acid and glutathione contents in the tissues of rainbow trout. Comp Biochem Physiol A. 99: 203-206.
26. Yokoyama, M., Udagawa, M., Nakazoe, J. (1994) Influence of dietary protein levels on hepatic cysteine dioxygenase activity in rainbow trout. Fish Sci. 60: 229-233.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of Triploidization by Heat Shock Treatment on Growth Performance and Amino Acids Profiles in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Bahrami Babaheydari, S.[1], Keyvanshokooh, S.[1*], Dorafshan, S.[2], Johari, S.A.[3]

[1]*Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology, Khorramshahr, Iran*

[2]*Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran*

[3]*Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran*

(Received 8 August 2017, Accepted 20 November 2017)

Abstract:

BACKGROUND: The induction of triploidy is an effective strategy for the production of sterile fish for aquaculture and has usually been reported to be accompanied by modifications in physiological characteristics. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to assess the effects of triploidy induction on growth performance and amino acid profiles in rainbow trout. **METHODS:** Eight female (total weight 1600 ± 246 g) and six male (total weight 1393 ± 186 g) four-year-old healthy rainbow trout were used in this study. Triploidy was inducted through the application of heat shock of 28 ºC for 10 min to eggs 10 min post fertilization in an aquarium equipped with a heater. During the 38 days of rearing period, the fish were fed a rainbow trout commercial diet (BioMar, France) 12 times a day at the rate of 7% of their body weight. Fish ploidy level was determined by erythrocyte size measurement. **RESULTS:** Based on red blood cell analysis, the overall triploidization success level was 87.1%. Growth performance was significantly higher in diploids as compared to triploids ($p<0.05$). The levels of non essential amino acids increased and the levels of essential amino acids decreased as an effect of triploidy induction. **CONCLUSIONS:** Triploidy induction in rainbow trout affects growth performance and amino acid profiles in rainbow trout.

Keyword: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), triploid, Body biochemical composition

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Ingredients of the diet used in the experiment.

Table 2. Erythrocyte dimensions in diploid and triploid rainbow trout produced by heat shock, as assessed on blood smears by light microscopy.

Table 3. Growth performance and feed utilization of diploid and triploid rainbow trout produced by heat shock during 38 days of rearing.

Table 4. Amino Acid composition of diploid and triploid rainbow trout produced by heat shock at the end of 38 days rearing. ΣEAA: Total essential amino acids. Σ NEAA: Total non-essential amino acids. EAA/NEAA: The proportion of essential amino acids to non-essential amino acids. * essential amino acids.

Figure 1. Red blood cells are diploid (A) and triploid (B) rainbow trout. Note: The larger dimensions and a higher frequency of abnormal red blood cells in the blood triploid variety of core cells are split.

***Corresponding author's email: keyvan56@yahoo.com, Tel: 061-53534725, Fax: 061-53534725**

www.SID.ir