فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال چهارم/ شماره دوازدهم/ بهار ۹۶/ صفحات ۷۶-۶۹

بررسی تغییرات اسیدهای چرب ترکیب لاشه ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) طی مراحل نمو جنینی و لاروی

شکوفه مهدی زارعی[1*]

چکیده

در سال‌های اخیر تکثیر و پرورش ماهیان و همینچنین ماهیان بومی در جهان مورد توجه خاصی قرار گرفته است ماهی کپور نقره ای با نام علمی *Hypophthalmichthys molitrix* یکی از گونه های مهم بومی پرورشی بوده و در حوضه رودخانه آمور زیست دارد این ماهی در ردیف ماهیان با اهمیت پرورشی است از این رو شناخت شرایط فیزیولوژیک آن از اهمیت خاصی برخوردار است. یکی از اهداف و محورهای مهم توسعه برای مدیریت شیلاتی رویکرد تکثیر ماهیان بومی ایران است لازمه تکثیر و پرورش موفق و تجاری ماهیان بومی که اطلاعات محدودی پیرامونشان موجود است شناخت جنبه های مختلف فیزیولوژیک و زیستی آنها خصوصاً در مراحل رشد و نمو اولیه است. زیرا مراحل جنینی و لاروی از حساسترین و آسیب‌پذیرترین مراحل أبزی به شمار می روند. در طول نمو جنینی و لاروی بیشتر گونه های ماهی، رشد و مهیاسازی انرژی بستگی به ذخایر زرده ای دارد که بوسیله مولدین انتقال می‌یابد. همچنین رشد و بقا لارو بستگی به دسترسی به غذای خارجی در مقادیر کافی و با کیفیت مناسب آن، پس از جذب کیسه زرده دارد. با توجه به مقدار و ترکیب چربی های زرده ، زمان و میزان سوختن چربی، گروهای چربی که برای سوختن یا تولید بافت به کار می روند نقش اسیدهای چرب مختلف ، تغییر می کند. تحقیقات متعددی در مورد روند تغیررات اسید چرب در دوران جنینی و لاروی ماهیان آب شیرین انجام شده است مثلاً تحقیقاتی که در ماهی های سوف حاجی طرخان (*percafluviati*) و ماهی قزل آلای رنگین کمان (*oncorhynchus mykiss*) سیم دریایی سفید انجام شده است. پس با توجه به نقش اسیدهای چرب در رشد و نمو، بقاء و کیفیت لاروی ، شناخت روند تغییرات ترکیب اسیدهای چرب در طول مراحل ابتدایی نمو ماهی کپور نقره ای برای آگاهی از ترکیب مناسب غذادهی با کیفیت مطلوب، برای مراحل تغذیه فعال و همینطور برای مولدین پرورشی لازم است.

کلید واژه: کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)، اسید چرب، رشد و نمو، جنین، لارو.

- تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۴

۱- دانشجوی دکتری، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران(نویسنده مسؤول) zarei@baboliau.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

این پژوهش در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان بومی شهید ملکی اهواز در استان خوزستان صورت پذیرفت کلیه مراحل نمونه برداری اواخر اردیبهشت ماه ۱۳۹۱ انجام گرفته است. از هر مرحله به تعداد ۳نمونه تصادفی برداشت شد. مراحل آزمایش ۵ مرحله که شامل تخم تازه لقاح یافته، تخم ۱۲ساعت پس از لقاح، لارو دارای کیسه زرده، لارو کیسه زرده جذب کرده و لارو تغذیه شده با زرده تخم مرغ بوده است. مولدین با استفاده از کامیونت مجهز به تانک‌های پلاستیکی که با کپسول اکسیژن هوادهی شدند به سالن تکثیر انتقال یافتند و سپس برای کاهش استرس و آرام سازی برای تزریق هورمون ۷ مولدین نر و ماده بصورت جداگانه و با رعایت تراکم در واحد سطح درون حوضچه های آرامش قرارداده شدند برای تحریک تخم ریزی هورمون HCG در طی دو نوبت تزریق شد. بدین ترتیب که در نوبت اول ۰/۱ دوز هورمون و ۱۲ ساعت بعد ۰/۹ باقی مانده به مولد ماده تزریق شد. برای مولد نر تزریق بدین صورت است که مقدار کل هورمون به مقدار ۱/۵ mg/kg وزن بدن و در یک نوبت همزمان با دومین تزریق مولد ماده صورت می-گیرد حدود ۱۲ساعت پس از تزریق نهایی مولدین و با فراهم‌شدن شرایط دمایی لازم ۲۷-۲۵ (درجه سانتی گراد) و اطمینان از رسیدگی جنسی مولدین عملیات تکثیر در صبح انجام پذیرفت. تخم ریزی با حضور ماده‌ها و نرها در حوضچه‌ها رخ داده و پس از آن تخم‌ها در یک انکوباتور ریخته و با خروج آب توسط توری جمع گشته و به انکوباتورهای زوک انتقال پیدا کردند پس از اتمام کلیه مراحل تکثیر و لقاح، اولیه نمونه تخم‌های تازه لقاح یافته پس از توزین به میزان ۵ گرم درون ظرف پلاستیکی درب ار استریل به آزمایشگاه منتقل شدند و بقیه نمونه ها به انکوباتورهای زوک از پیش تعیین شده برای انجام عملیات تخم-گشایی منتقل گردیدند. نمونه دوم از تخم‌ها ۱۲ ساعت پس از لقاح از درون انکوباتورهای زوک برداشه شد نمونه سوم از لاروهای دارای کیسه زرده و نمونه چهارم از لاروهای کیسه زرده جذب کرده نیز به همین صورت از انکوباتورهای زوک برداشته شدند. نمونه چهارم از لاروهایی است که به مدت ۳ روز با زرده تخم مرغ تغذیه شدند، جدا گشتند. در کلیه مراحل آزمایش با استفاده از روش سیفون‌کردن، نمونه‌ها جمع‌آوری شدند. میزان نمونه برداشت شده از کلیه مراحل به میزان ۵ گرم بود که نمونه‌ها بلا فاصله پس از برداشت و توزین با آب مقطر شستشو شده و بروی کاغذ صافی پهن شدند تا آب اضافی آنها گرفته شود و سپس در ظروف پلاستیکی استریل درب دار به آزمایشگاه منتقل می‌شدند نمونه‌های برداشت شده و در درجه حرارت

Archive of SID

www.SID.ir

۳۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده و منجمد شدند (Abi-Ayad et al . , 2004). برای ارسال نمونه ها به آزمایشگاه جهاد دانشگاهی ارومیه از فلاسک نیتروژن استفاده شد بدین ترتیب نمونه ها در نیتروژن مایع و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منجمد شدند.

استخراج چربی به روش Folch و همکاران (۱۹۵۷) صورت پذیرفت به منظور استری کردن چربی از روش Firestone و همکاران (۱۹۹۸)استفاده شد.

برای بررسی و شناسایی اسیدهای چرب موجود در نمونه‌ها از دستگاه گاز گروماتوگراف (GC) Agilent-6890 مجهز به ستون کاپیلاری از نوع BPX70 SGE (120m*0/25mm ID*0/25) و اشکارساز و نوع (FID) Flame ionization detector استفاده گردید دمای آشکارساز و محل تزریق به ترتیب برروی ۱۶۰ و ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد ۱ میکرولیتر از نمونه استری با استفاده از سرنگ میکرولیتری به دستگاه گاز کروماتوگراف تزریق شد دمای اولیه ستون روی ۱۶۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد بعد از مدت ۱۰ دقیقه دمای ستون با سرعت ۲ درجه سانتی گراد در دقیقه به دمای ۱۸۰ درجه رسانده شد به مدت ۷۵ دقیقه دما در این درجه باقی می ماند.

از مقایسه زمان بازداری کروماتوگراف‌های نمونه مجهول با کروماتوگرام های بدست آمده از محلول استاندارد اسیدهای چرب متیل استو، اسیدهای چرب موجود در تخم و لارو ماهی فیتوفاگ شناسایی شد و نتیجه به صورت درصد گزارش گردید. پردازش داده‌های دستگاه با استفاده از نوع افزار chemstatiom در محیط ویندوز انجام شد نتایج حاصل از تجزیه اسیدهای چرب توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی به کمک نرم افزار SPSS15 در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و توسط آزمون دانکن در سطح اعتماد ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت داده‌ها به صورت میانگین +- خطای استاندرد (Mean +- SE) آورده شده است.

۲- نتایج

تغییرات کمی اسیدهای چرب در مراحل نمو جنینی و لاروی ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthysmolitrix*) برحسب درصد از کل اسیدهای چرب اعداد بصورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار (Mean±SD) آورده شده اند.

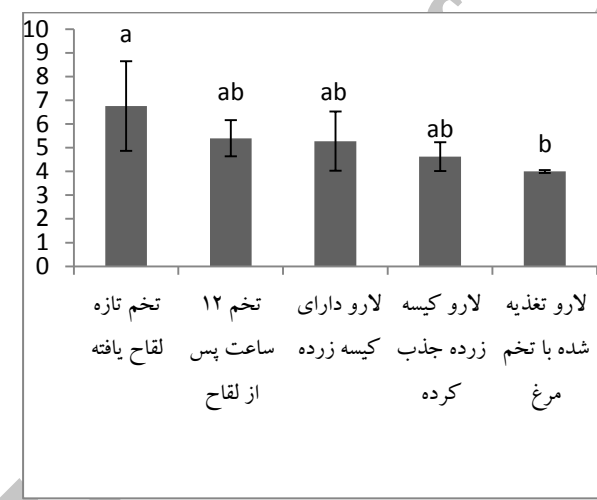
Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱. تغییرات کمی اسیدهای چرب در مراحل نمو جنینی و لاروی ماهی کپور نقره‌ای

نام اسید چرب	فرمول اسید چرب	تخم تازه لقاح یافته	تخم ۱۲ ساعت بعد از لقاح	لارو دارای کیسه زرده	لارو کیسه زرده جذب کرده	لارو تغذیه شده با تخم مرغ
ایکوزا پنتانوئیک اسید	C20:5n-3	۲/۷۸^{a}±۰/۷	۳/۲۸^{ab}±۰/۱۳	۳/۱۷^{ab}±۰/۸۱	۴/۰۳^{b}±۰/۳۱	۵/۳۴^{c}±۰/۰۹
دکوزا هگزانوئیک اسید	C22:6n-3	۱۷/۹۶^{ab}± ۰/۳۳	۱۷/۶۷^{ab}±۱/۸۷	۱۶/۰۷^{a}±۰/۱۵	۱۸/۵۱^{b}±۱/۰۱	۲۱/۳۸^{c}±۰/۵۸
نسبت دکوزاهگزانوئیک به ایکوزاپنتانوئیک	DHA/EPA	۶/۷۶^{a}±۱/۹۰	۵/۴۰^{ab}±۰/۷۶	۵/۲۸^{ab}±۱/۲۵	۴/۶۲^{ab}±۰/۶۰	۴/۰۰^{b}±۰/۰۶

اعداد دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری ندارند (p>۰/۰۵)



نمودار ۱. نسبت DHA/EPA در مراحل مختلف نمو جنینی و لاروی ماهی کپور نقره‌ای

حروف متفاوت بر روی ستونها نشانگر وجود تفاوت معنی دار بین داده‌هاست (P<۰/۰۵)

بررسی مقادیر میانگین دکوزاهگزانوئیک اسید (22:6n–3) یا DHA بیانگر روند کاهشی غیر معنی‌دار از تخم تازه لقاح یافته تا مرحله لارو دارای کیسه زرده می باشد. سپس در مراحل لارو کیسه زرده جذب کرده و لارو تغذیه شده با زرده تخم مرغ مقادیر DHA افزایش می یابد که بالاترین میزان DHA در این مرحله از آزمایش با مقدار ۲۱/۳۸ درصد از کل اسیدهای چرب مربوط به لارو تغذیه شده با زرده تخم مرغ می باشد. نمودار DHA نیز روند افزایشی را از ابتدا تا انتها نشان می دهد. نسبت این دو اسید چرب

www.SID.ir

(EPA/DHA) دارای روندی کاهشی است و به صورت غیرمعنی داری از ابتدا تاانتها کاهش می یابد. ($p<0/05$). میزان نسبت DHA به EPA (DHA/EPA) همانطوریکه در جدول دیده می شود بیانگر مقادیر بالاتر DHA نسبت به EPA می باشد. مقادیر این اسید چرب از مرحله اول به مرحله آخر روند کاهشی را طی نموده است. مقادیر این نسبت توسط آزمون دانکن از مرحله تخم تازه لقاح یافته تا لارو کیسه زرده جذب کرده با یکدیگر تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد ($p<۰/۰۵$). در مرحله لارو تغذیه شده با زرده تخم مرغ مقدار نسبت DHA به EPA کاهش معنی داری نسبت به مرحله اول در مرحله لارو تغذیه شده با زرده تخم مرغ مقدار نسبت DHA به EPA کاهش معنی داری نسبت به مرحله اول یافته است و به مقدار ۴/۰۰ رسیده است.

۳- بحث

از میان اسیدهای چرب چند غیراشباع دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) و ایکوزاپنتانوئیک اسید(EPA) مهمترین اسیدهای چرب‌اند که جزء اسیدهای چرب ضروری محسوب می شوند که با بررسی روند این دو در می‌یابیم که از ابتدا تا انتها روندی ابقایی و صعودی را طی می کنند. همانگونه که در جدول ملاحظه می‌شود، میزان اسید چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید (20:5n–3) در تخم تازه لقاح یافته برابر ۲/۷۸ درصد از کل اسیدهای چرب و ۳/۲۸ درصد از کل اسیدهای چرب در تخم ۱۲ ساعت بعد از لقاح می‌باشد که نشان دهنده روند افزایشی این اسید چرب در این مدت از نمو جنینی می باشد. ولی میزان اسید چرب ایکوزاپنتانوئیک در لارو کیسه زرده دار به ۳/۱۷ درصد از کل اسیدهای چرب کاهش غیر معنی داری می یابد و دوباره روند افزایشی در لارو کیسه زرده جذب کرده با مقدار ۴/۰۳ درصد از کل اسیدهای چرب و لارو تغذیه شده با زرده تخم مرغ با مقدار ۵/۳۴ درصد از کل اسیدهای چرب مشاهده می شود در واقع از ابتدا تا انتها روند افزایشی دارد.

مقایسه میانگین اسیدهای چرب 20:5n-3 (EPA) توسط آزمون دانکن همانگونه که در جدول شماره مشاهده می‌شود، نشان می‌دهد که میزان این اسید چرب در طی مراحل لاروی و جنینی افزایش معنی داری را نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$).

Archive of SID

www.SID.ir

EPA در لیپیدهای ساختاری نقش برجسته ای دارد و می تواند تولید ایکوزانوئیدهای بدست آمده از آرشیدونیک اسید (20:4n-6) را تعدیل کند (Sargent, 1995). مقادیر DHA و EPA روند افزایشی (ابقایی) و صعودی چشمگیری داشته است.که احتمالا بدلیل اهمیت نقش این دو به عنوان یک جزء ساختاری در غشاء سلول و خصوصا در رشد و نمو مغز و شبکیه چشم و سلول‌های عصبی، این اسید چرب ضروری در دوران رشد لاروی ماهی می باشد (Weigand,1996; Halilogl*u et al*., 2002 ; Zengin*et al*., 2006). نتایج بدست‌آمده از DHA و EPA در مورد ماهی کپور نقره‌ای(Hypophthalmichthys molitrix) با نتایج بدست آمده Zengin در سال ۲۰۰۶ که روند این اسید چرب را در دوران جنینی و لاروی قزل آلای رنگین کمان (*O.mykiss*) بررسی کرده است و مغایر با نتایج حسین نژاد در سال ۱۳۸۷ بر روی ماهی آزاد دریای خزر(Salmotrouttacaspius) و Cejas و همکاران در سال ۲۰۰۴ دربررسی تغییرات مجموع اسیدهای چرب در دوران نمو جنینی و لاروی سیم دریایی سفید (*D.sargus*) می باشد.

این دو اسید چرب به عنوان یک جزء ساختاری در غشاء سلول برای کنترل سیالیت غشاء، انتقال یونی در آبشش و کلیه‌ها، فعالیتهای آنزیمی و فرآیندهای سیناپس‌زایی مغز و نیز در ساختار شبکیه چشم به شمار می رود (Ishizaki et al., 2007).

عموماً DHA, EPA برای عملکردهای فیزیولوژیک مصرف می شوند (D costanzo et al 1983) این روند ابقایی و افزایشی این اسیدهای چرب در ماهیان حوض (*Carassius autatus*) و قزل آلای رنگین کمان (*Oncolorhynchus my kiss*) هم دیده شده است (Haliloglu, 2006)

بعنوان نتایج کلی می‌توان اظهار نمود که اسیدهای چرب DHA , EPA جزء اسیدهای چرب ضروری درماهی کپور نقره‌ای بوده و روند ابقایی طی نمو جنینی و لاروی این ماهی نقش ساختاری دارند.

فهرست منابع

۱. **احمدی، س.، (۱۳۸۷)**، بررسی مراحل جنینی و لاروی ماهی بنی، پایانامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات استان خوزستان ، صفحات ۱ تا ۳.

۲. **حسین‌نژاد، ف، (۱۳۷۸)**، تغییرات کمی اسیدهای چرب در مراحل نمو اولیه ماهی آزاد دریای خزر، پایانامه ی کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ۷۶ صفحه.

Archive of SID

www.SID.ir

۳. **حسینی، ف.، (۱۳۹۰)**، بررسی تغییرات اسیدهای چرب در طی مراحل اولیه ی تکامل ماهی سفید دریای خزر(*Rutilusfrisii kutum*). پایانامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ۷۵ صفحه.

۴. **کردانی، ا.، (۱۳۸۹)**، بررسی تغییرات کمی اسیدهای چرب در مراحل نمو جنینی ولاروی ماهی بنی(*Barbus sharpeyi*)، پایانامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات استان خوزستان، ۱۰۳ صفحه.

۵. **کاهکش، ب.، یاوری، و.، اسکندری، غ.، محمدی، غ.،(۱۳۸۹)**، اثر وزن و طول مولدین ماهی شیربت (*Barbusgrypus*) روی تولید مثل و رشد بچه ماهی تا مرحله انگشت قد، مجله علمی شیلات، سال نوزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹.

6.**Abi-Ayad, S. M.E.A., Melard, C., Kestemont, P., (1997**). Effects of n-3 fatty acid in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) brood stock diet on egg fatty acid composition and larve stress resistance.Aquaculture. 5, 131-133.

7. **Abi-Ayad,S.M.E.A., Melard, C., Kestemont, P.,(2000**). Dynamics of total lipids and fatty acid during embryogenesis and larval development of Eurasiam perch(*Perca Fluviatitis*). Fish physiology and Biochemistry. 23, 233-243.

8. **Abi- Ayad,S.M.E.A, Boutiba, Z., Melard, C.,(2004**). Dynamics of total body Fatty acids during early ontogeny of pikeperch (*Sander Lucioperca*) larvae. Fish physiology and Biochemistry, 30, 129 – 136.

9**. Bell, J.G., Castell, J.D.,Tocher, R.G., MacDonald,F.M. Sargent, J.R. (1995**). Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on *phospholipids fatty acid* compositons and prostaglandin production in juvenile turbot (Scophthalmusmaximus). Fish physiol.Biochem, 14, 139- 149.

10. **Coad , B.W. (2002).** The Fresh water Fishes of Iran. The Academy of Science of the Czech Republic, Bran ,pp: 5-19.

11.**Di Costanzo, G., Florentz, A., and Leray, C., (1983)**. The brush border membrane of trout intensive: influence of its lipid composition on ion permeability, enzyme activity and membrane fluidity.mol. Physiol. 4, 279-290.

12. **Farhhoudi, A., Abedin-Kenari,A. M., Nazari, R.M., Makhdoomi, C. H. (2011)**. Study composition, lipid and fatty acid profile during larval development in Caspian sea carp (*Ciprinuscarpio*). Journal of Fisheries and Aquatic Sciences., 6(4),417-428.

13. **Firestone, D., (1989).** Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (4^{th} ed.). Champaign: American Oil Chemist Society Press.

14. **Folch , H. Less , M. Standley , H.A., (1957**). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues journal of biological chemistry 266,497-499.

Archive of SID

www.SID.ir

15. **Gunasekera, R.M.,Desilva,s.s., and Ingram,b.a.,(2002**).Chemical changes in fed and starved larval trout cod, *Maccullochell amacquarensis* during early development.fish physiol.Biochem.25, 255-268.
16. **Henderson,R.J and Sargent,J.R.(1985**). fatty acid metabolism in fish.In: nutrition and feeding in fish.Blackwell Sciences Ltd.,Oxford, 349-364.
17. **Ishizaki, Y., Masuda, R., Uematsu, K., Shimizu, K., Arimoto, M. and Takeuchi, T. (2001)**. The effect of docosahexaenoic acid on schooling behaviour and brain development in larval yellowtail.Journal of Fish Biology. 58, 1691-1703.
18. **Mourente, G. and Tocher, D.R. (1992**). Effects of weaning onto a pelleted diet on docosahexaenoic acid (22:6n-3) levels in brain of developing turbot (Scophthalmusmaximus L.). Aquaculture 105: 363- 377.
19. **Mourente, G., Vasquez, R., (1996**). Changes in the content of total, lipid classes and their fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the Senegal sole (Soleasenegalensis). Fish Physiol. Biochem. 15,221- 235.
20. **Sargent, J.R., (1995)**. Origins and functions of egg lipids: nutritionalimplications. Inbromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds), Broodstock management and eggs and larval qulity.Blackwell science,London,pp.353-372.
21. **Sargent,J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., (1999**). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. Aquaculture 179, 217- 229.
22. **Springate, J.R.C., Bromage, N.R., (1984)**. Broodstock management. Fish farmer, 7, 30- 31.
23. **Van Der Kraak, G., Biddiscombe, S., (1999)**. Polyunsaturated fatty acids modulate the properties of the sex steroid binding protein in goldfish. Fish Physiol. Biochem. 20, 69- 74.
24. **Watanabe, T., (1993)**. Importance of docosahexanoic acid in Marin Larval fish. Journal of World Aquaculture Society. 24, 152- 161.
25. **Zengin, H., Akpinar, M.A., (2006)**. Fatty acids composition of Oncorhnchusmykiss during emberyogenesis and other developmental Aquaculutre. 29, 61-71.

Archive of SID

www.SID.ir