



مقایسه اثرات قطع پایه چشمی و تزریق هورمون اوپریم بر روند رسیدگی جنسی، مطالعات بافت‌شناسی و ترکیبات بیوشیمیایی میگوی مولد وانامی

حسین آدینه^{۱*}، محمد سوداگر^۱، حسن صالحی^۲، سید عباس حسینی^۱، حُسنی قلی پور^۳

^۱ گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲ ریاست سازمان شیلات ایران، تهران

^۳ گروه شیلات، دانشگاه گنبد کاووس

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۴/۰۹/۰۱

اصلاح: ۹۴/۰۹/۲۷

پذیرش: ۹۴/۱۰/۰۳

کلمات کلیدی:

بافت‌شناسی

پایه چشمی

هورمون

وانامی

در مطالعه حاضر اثرات قطع پایه چشمی، تزریق هورمون اوپریم و تزریق سرم فیزیولوژی (شاهد) بر روی بلوغ جنسی، بافت تخمدان و تغییرات بیوشیمیایی میگوی وانامی بررسی شد. تزریق سرم فیزیولوژی و تزریق هورمون (دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن) با حجم ۱۰۰ میکرولیتر در سه مرحله (روزهای ۰، ۷ و ۱۴) انجام شد. تعداد ۶۰ مولد ماده در ۴ تیمار آزمایشی به مدت ۳۰ روز مورد آزمایش قرار گرفتند. مشاهدات ظاهری و مطالعات بافت‌شناسی تخمدان نشان داد که بیشترین درصد مولدین رسیده و اووسیت‌های بالغ مربوط به تیمار قطع پایه چشمی می‌باشد. ترکیبات بیوشیمیایی (پروتئین، چربی و کربوهیدرات) همولنف و عضله بدن در سه مرحله نمونه‌برداری (قبل از بلوغ، بلوغ کامل جنسی و بعد از تخم‌ریزی) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در مراحل مختلف جنسی، مقدار پروتئین همولنف و عضله بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌دار داشت ($p < 0.05$). در هر سه مرحله نمونه‌برداری، بیشترین مقدار پروتئین همولنف و عضله در تیمارهای قطع پایه چشمی و تزریق هورمون و کمترین آن در تیمار تزریق سرم فیزیولوژی به دست آمد. در هر مرحله نمونه‌برداری، مقدار چربی همولنف و عضله بین تیمارهای مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). مقدار کربوهیدرات همولنف تنها در زمان رسیدگی جنسی تفاوت معنی‌دار داشت ($p < 0.05$).

مقدمه

افزایش تقاضا جهت بهره‌برداری از منابع آبی باعث شده تا تکثیر و پرورش میگو در کنار سایر فعالیت‌های آبی‌پروری به عنوان یکی از مهم‌ترین فعالیت‌های پرورش آبزبان در جهان و ایران توسعه و گسترش یابد. میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های تجاری خانواده پنائیده است (Wyban and Sweeney, 1991)، که با بروز بیماری لکه سفید در ایران، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران آن را جایگزین میگوی سفید هندی نمود.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: Adineh.h@gmail.com

از آن جایی که تولید مولدین میگو نتوانسته تقاضای جهانی به این آبری را تأمین نماید، بنابراین برای افزایش تولید میگو در کارگاه‌های تکثیر، از تکنیک قطع یک‌طرفه پایه چشمی استفاده می‌شود (Panouse, 1943). قطع یک‌طرفه پایه چشمی می‌تواند تحریک‌کننده بلوغ تخمدان باشد، اما این امر باعث به‌خطر افتادن فرآیند رشد، کوتاه شدن چرخه پوست‌اندازی و افزایش سوخت و ساز بدن شده (Browdy and Samocha, 1985)، که در نتیجه این واکنش‌ها تغییرات بافتی تخمدان و همچنین تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی همچون زرده‌سازی، پوست‌اندازی، تعادل مواد معدنی، بازسازی و تولید رنگدانه، متابولیسم چربی‌های، تنظیم قند و پروتئین رخ می‌دهد (Benzie, 1998). موجودات زنده من جمله سخت‌پوستان بر اساس نوع تغذیه، فصل تولیدمثل، شرایط محیطی، مراحل بلوغ جنسی، وجود یا عدم وجود استرس‌های فیزیولوژیکی (مانند قطع پایه چشمی و تزریق هورمون) دست‌خوش تغییراتی در بافت تخمدان و ترکیبات بیوشیمیایی می‌گردند. بنابراین در دوره بلوغ جنسی اطلاعات در مورد تغییرات فرآیندهای بیوشیمیایی و متابولیکی جهت درک فرآیند تولیدمثل میگوها حائز اهمیت می‌باشد، چراکه گنادها مکان سنتز و تمرکز مواد بیوشیمیایی در طی فرآیند تولیدمثل می‌باشند (FAatima et al., 2013). با پیشرفت مراحل رسیدگی جنسی جهت تولید زرده در تخمک‌ها نیاز به پروتئین، چربی و کربوهیدرات می‌باشد. زرده‌سازی یک فرآیند مهم فیزیولوژیکی است که ارتباط هم‌سویی با رسیدگی جنسی حیوان ماده دارد و از ویژگی‌های آن سنتز و تجمع پروتئین زرده در تکامل اووسیت‌ها می‌باشد و این پروتئین منبع غذایی برای تکامل جنین‌ها محسوب می‌شود (Charniax-Cotton, 1985). در سخت‌پوستان و دیگر حیوانات، چربی‌ها هم‌سو با پروتئین‌ها به شکل لیپوپروتئین وجود دارند که در زمان رسیدگی جنسی به صورت زرده ظاهر می‌شوند (Komatsu et al., 1993). کربوهیدرات‌ها منبع اصلی انرژی برای همه حیوانات هستند، بنابراین میگوها برای تأمین انرژی مورد نیاز خود در فرآیند تولیدمثل از کربوهیدرات‌ها استفاده می‌نمایند. تغییرات بیوشیمیایی در گنادها، هیپاتوپانکراس، همولنف و لاشه بدن در طول دوره رسیدگی جنسی و پوست‌اندازی در برخی گونه‌های میگو همچون؛ *Metapenaeus affinis* (Pillay and Nair, 1973)، *Penaeus duorarum* (Gehring, 1974)، *Parapenaeopsis hardwickii* (Kulkarni and Nagabhushanam, 1979)، *Penaeus indicus* (Read and Caulton, 1980)، *Penaeus setiferus* و *Penaeus aztecus* (Castille and Lawrence, 1989)، *Litopenaeus vannamei* (Arcos et al., 2003) و *Fenneropenaeus merguensis* و *F. penicillatus* (FAatima et al., 2013) گزارش شده است.

به طور کلی هدف بلند مدت در صنعت میگو به دست آوردن توانایی پیش‌بینی و تحریک بلوغ مولدین پرورش یافته در محیط‌های محصور بدون اعمال قطع پایه چشمی می‌باشد (Quackenbush, 1991). پژوهش حاضر به منظور مقایسه اثر قطع پایه چشمی و تزریق هورمون اواپریم بر روند تکامل، ساختار تخمدان و ترکیبات بیوشیمیایی همولنف و عضله بدن میگوی وانامی در سه مرحله جنسی (قبل از رسیدگی، رسیدگی کامل جنسی و بعد از تخم‌ریزی) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مولدین

مولدین جنس ماده با میانگین وزنی ۴۴ گرم و جنس نر با میانگین وزنی ۳۸ گرم تهیه و پس از بررسی ظاهری از نظر عدم بیماری و سالم بودن قطعات بدن در کارگاه سنتدرف واقع در بندر جاسک ذخیره سازی شدند. این آزمایش در فروردین و اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۴ به مدت ۳۰ روز به طول انجامید.

شرایط عمومی هچری

تانک‌های نگهداری مولدین مدور و سیاه رنگ با حجم آبگیری ۲ تن آب با تراکم ۱۵ قطعه مولد بود. تعویض آب ۱۰۰ درصد در روز انجام شد. در طی دوره آزمایش، شوری به میزان ۳۰ تا ۳۱ گرم در لیتر، درجه حرارت ۲۹-۳۱ درجه سانتی گراد، pH حدود ۷/۵ تا ۸/۵، میزان آلکالینیتی حدود ۱۷۵-۱۵۰ و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم گردید. نسبت جنسی نر و ماده ۲:۱ بود. تغذیه مولدین با اسکوئید، صدف ملالیس و همچنین پودر کرم با نام تجاری (ZM mate) به میزان ۱۵ درصد وزن بدن (سیری) در ۵ وعده برنامه ریزی شد.

تیمارهای آزمایشی

هورمون اوپریم^۱ که ترکیبی از هورمون آنالوگ آزادکننده گنادوتروپین ماهی آزاد^۲ و ضد دوپامین به نام دومپریدون^۳ است از آزمایشگاه سیندل^۴ شرکت علوم زیستی آبزبان^۵ کشور کانادا تهیه گردید. تعداد ۶۰ مولد ماده در ۴ تیمار آزمایشی به ترتیب تیمار قطع یک طرفه پایه چشمی، تیمار تزریقی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن و تیمار تزریق سرم فیزیولوژی (شاهد)، جایابی شدند. تزریق هورمون و سرم فیزیولوژی با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر (۰/۱ میلی گرم) در سه زمان (روزهای صفر، ۷ و ۱۴) توسط سرنگ انسولین ۱ میلی لیتری با سرسوزن شماره ۲۶ در ناحیه پشتی بین اولین و دومین حلقه شکمی میگوها انجام شد.

مشاهدات فیزیکی تخمدان و بررسی روند تکامل

بلوغ تخمدان توسط مشاهدات ظاهری اندازه و رنگ تخمدان بر اساس توصیفات صورت گرفته مورد ارزیابی قرار گرفت، بنابراین مراحل مختلف رسیدگی جنسی شامل (Yano, 1988): مرحله ۱ (نارس): تخمدان تازه در حال شکل گیری است که به صورت یک خط ممتد بسیار نازک و به رنگ قهوه‌ای تیره است. مرحله ۲ (در حال توسعه): تخمدان در طول محور مرکزی پشتی مانند یک خط نازک است که زیر کاراپاس حجم تخمدان بیشتر شده و به رنگ قهوه‌ای تیره قابل مشاهده است. مرحله ۳ (تقریباً توسعه یافته): در طول محور مرکزی پشتی تخمدان به رنگ قهوه‌ای روشن که به صورت ۷ کوچک در ناحیه کاراپاس و در ادامه به شکل یک نوار ضخیم تا انتهای دم کشیده شده است. مرحله ۴ (بلوغ کامل): تخمدان در محور مرکزی پشتی بسیار پر و کشیده و از زیر کاراپاس تا تلسون به رنگ قهوه‌ای روشن متمایل به نارنجی می‌باشد. در این مرحله جفت‌گیری صورت می‌گیرد و در صورت عدم وجود جنس نر، تخم‌ریزی خود به خودی انجام می‌شود. مرحله تخم‌ریزی: تخمک بدون هیچ گونه زرده در سیتوپلاسم شفاف است. در صورتی که تخم‌ریزی به‌طور کامل انجام گرفته باشد تنها اثر شبح ماندگی از تخمدان‌ها دیده می‌شود.

بررسی بافت‌شناسی تخمدان

مطالعه بافت‌شناسی (قبل از بلوغ، بلوغ کامل و بعد از تخم‌ریزی) بر اساس پروتکل Brancraft and Stevens (۱۹۸۲)، انجام شد. بدین منظور مولدین مورد نظر از هر تیمار انتخاب و قطعاتی از بخش میانی تخمدان جدا و پس از تثبیت در محلول فرمالین ۴٪ به مدت ۲۴ ساعت و طی مراحل معمول، قبل از تهیه مقاطع بافتی (شامل مراحل آبگیری با الکل اتیلیک، شفاف سازی و پارافینه کردن در محلول‌های گزلیول، پارافین نرم و پارافین سخت و در نهایت قالب‌گیری)، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون توسط دستگاه میکروتوم تهیه گردید. مقاطع تهیه شده پس از انتقال به روی لام به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. تهیه عکس از

¹ Ovaprim

² Salmon Gonadotropin Releasing Hormone Analogue

³ Domperidone

⁴ Syndel Laboratories

⁵ Aquatic Life Sciences Company

تعدادی از این لام‌ها توسط میکروسکوپ استریو مجهز به دوربین عکاسی Nikon مدل E100-ECLIPSE در آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه گنبدکاووس انجام شد.

آنالیز بیوشیمیایی همولنف و عضله بدن

در ۳ دوره تولیدمثلی (قبل از بلوغ، بلوغ کامل و بعد از تخم‌ریزی) نمونه‌برداری جهت آنالیز پروتئین، چربی و کربوهیدرات همولنف و عضله میگوی مولد انجام پذیرفت. نمونه همولنف به وسیله سرنگ انسولین با سر سوزن شماره ۲۶ از طریق سینوس شکمی (حفره پریکاردیال) در فاصله بین سفالوتراکس و اولین بند شکمی خارج و سپس در لوله های کوچک (میکروتیوپ) حاوی ۰/۱ ماده ضد انعقاد الزور (Alsever) که شامل (۱۱۵ میلی مول گلوکز، ۳۳۶ میلی مول کلرید سدیم، ۲۷ میلی مول سیترات سدیم و ۹ میلی مول EDTA با پی اچ برابر با ۷) تخلیه گردید. همولنف استخراجی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی آن در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد جهت سنجش برخی فاکتورهای بیوشیمیایی ذخیره سازی شد. نمونه‌برداری از عضله بدن میگو مولد ماده در مراحل فوق الذکر انجام شده و برای آنالیز برخی فاکتورهای مهم بیوشیمیایی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره سازی شد. پروتئین کل بافت بدن توسط روش Bradford (۱۹۷۶)، همراه با آلومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد و پروتئین کل همولنف با روش بیورت تعیین گردید. چربی عضله بدن و همولنف میگو براساس دستورالعمل Folch and Bloane-Stanley (۱۹۵۷)، استخراج و ارزیابی آن طبق روش Barnes and Blackstock (۱۹۷۳)، انجام شد. سنجش کربوهیدرات عضله بدن به صورت محاسباتی و مقدار کربوهیدرات همولنف با برآورد مقدار گلیکوژن از روش Dubois و همکاران (۱۹۵۶)، صورت پذیرفت.

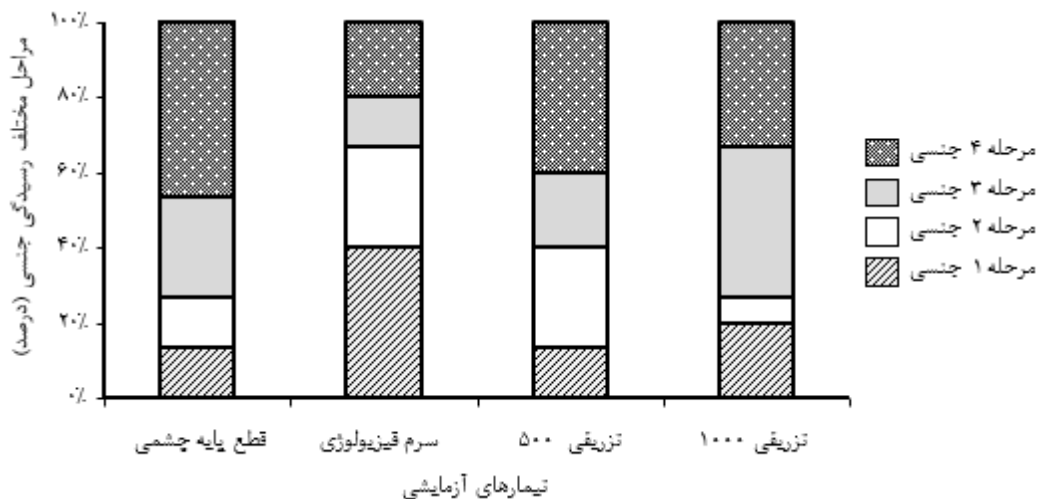
آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way Anova) و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS12 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد (Zar, 1984).

نتایج

بررسی روند تکامل و رسیدگی جنسی

میانگین دوره بلوغ مولدین در تیمار قطع پایه چشمی، تزریق هورمون با دوز ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن و تیمار شاهد به ترتیب ۹/۰۰، ۱۸/۳۲، ۲۰/۱۶ و ۲۶/۴۰ روز بود. مشاهدات فیزیکی و بررسی مراحل مختلف جنسی مولدین ماده میگوی وانامی تحت تیمارهای آزمایشی ثبت شده نشان داد که، تیمار قطع یکطرفه پایه چشم و تیمار تزریقی ۵۰۰ از شرایط مناسب‌تری نسبت به دیگر تیمارها برخوردار هستند (شکل ۱). آنالیز آماری مشخص کرد که مولدین در مرحله ۱ جنسی در تیمار سرم فیزیولوژی (۴۰/۰۰) از درصد بالایی برخوردار هستند در حالی که درصد مولدین مرحله ۱ جنسی در تیمار قطع پایه چشم و تزریقی ۵۰۰ کمتر است. مولدین مرحله ۲ جنسی در تیمارهای سرم فیزیولوژی و تزریقی ۵۰۰ از درصد برابری برخوردار بودند (۲۶/۶۶). بیشترین درصد وجود مولدین در مرحله ۳ رسیدگی جنسی مربوط به تیمار تزریقی ۱۰۰۰ برابر با ۴۰/۰۰ و کمترین درصد وجود مولدین در این مرحله مربوط به تیمار سرم فیزیولوژی برابر با ۱۳/۳۳ بود. بیشترین درصد مولدین مرحله ۴ رسیدگی جنسی (بلوغ نهایی) در تیمار قطع پایه چشمی (۴۶/۶۶) و کمترین آن در تیمار تزریق سرم فیزیولوژی (۲۰) مشاهده شد.



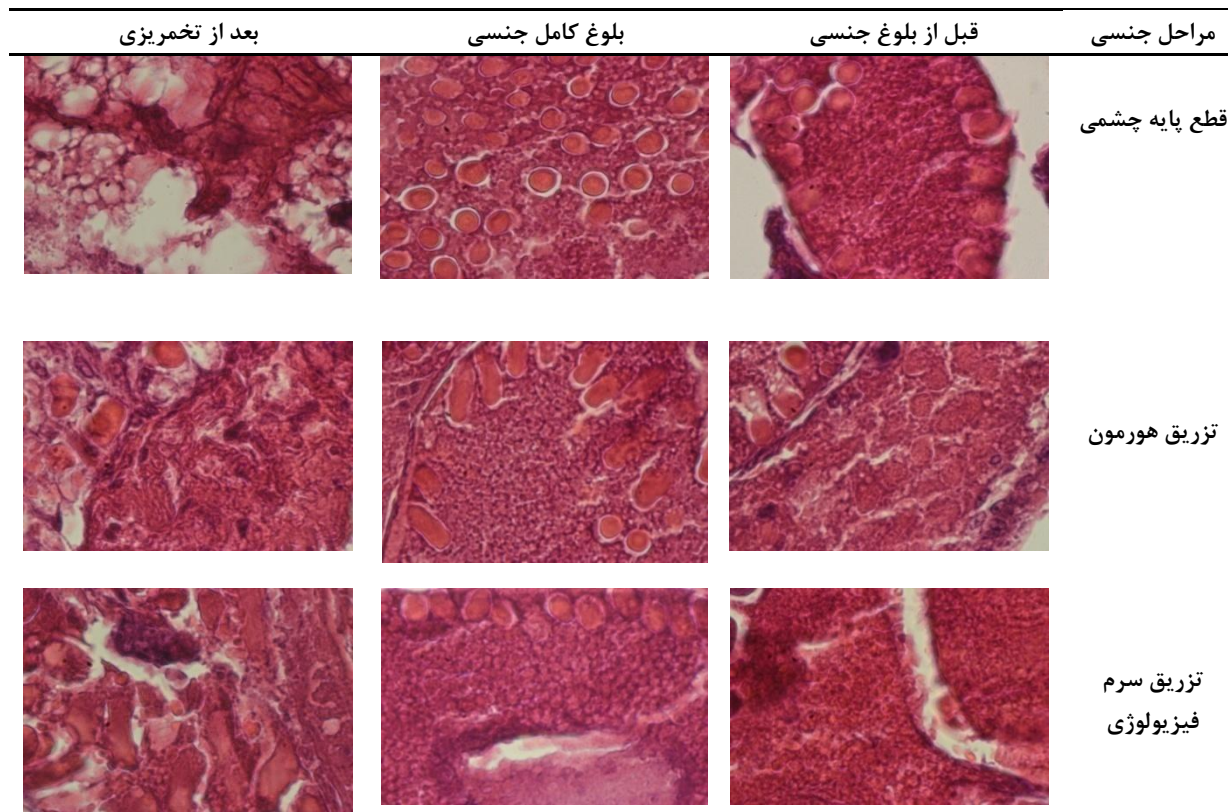
شکل ۱. مقایسه درصد تغییرات مراحل مختلف جنسی در تیمارهای آزمایشی

مطالعات بافت‌شناسی

نمونه برداری قبل از بلوغ جنسی، بلوغ کامل جنسی و بعد از تخم‌ریزی مقاطع تخمدان میگوی مولد وانامی در سه گروه آزمایشی (قطع یک‌طرفه پایه چشمی، تزریق هورمون و تزریق سرم فیزیولوژی) انجام و پس از مطالعه با میکروسکوپ نوری و تهیه عکس از آنها در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ملاحظه می‌گردد، بین گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه، نسبت اووسیت‌های بزرگ و بالغ نسبت به اووسیت‌های نارس از درصد فراوانی کمتری برخوردار هستند. قبل از رسیدگی کامل جنسی، اندازه اووسیت‌ها با جذب زرده یا ویتلین افزایش می‌یابد که چنین وضعیتی در تیمار قطع پایه چشمی و تزریق هورمون به خوبی مشاهده می‌گردد. مقطع تخمدان در مرحله چهار باروری به حالت رسیده و آماده تخم‌ریزی بود به طوری که مولدین در گروه قطع پایه چشمی نسبت به دو گروه دیگر از وضعیت بهتری برخوردار بودند. در این گروه اووسیت‌های رسیده بیشتری وجود دارند که آماده خروج از تخمدان، جهت لقاح با اسپرم می‌باشند. معمولاً در زمان تخم‌ریزی اگر شرایط فیزیولوژیکی و همچنین شرایط محیطی مناسب باشد درصد بالایی از اووسیت‌های بالغ از تخمدان خارج می‌شوند. مشاهدات مقطع بافتی نشان می‌دهد، مولدینی که تحت تیمار قطع پایه چشمی قرار گرفته بودند، توانستند در زمان تخم‌ریزی، بیشتر از دیگر تیمارها اووسیت‌ها را از تخمدان خارج نمایند. در تیمار تزریق هورمون و تزریق سرم فیزیولوژی، تخلیه اووسیت‌ها به صورت ناقص صورت پذیرفت.

آنالیز بیوشیمیایی همولنف

میزان تغییرات برخی ترکیبات بیوشیمیایی همولنف در قبل از بلوغ، بلوغ کامل و بعد از تخم‌ریزی میگوی مولد وانامی تحت آزمایش قطع یک‌طرفه پایه چشمی، تزریق سرم فیزیولوژی، تزریق ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن از هورمون اوپریم در جدول ۱ نشان داده شده است. آنالیز آماری نشان داد که، مقدار پروتئین در سه مرحله نمونه برداری از اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) بین تیمارهای مختلف آزمایشی برخوردار بود به طوری که بیشترین میزان پروتئین قبل از بلوغ مربوط به تیمار تزریقی ۱۰۰۰ و زمان رسیدن به بلوغ کامل و بعد از تخم‌ریزی مربوط به تیمار قطع پایه چشمی بود. تیمار بدون هورمون (شاهد) از کمترین مقدار پروتئین همولنف در هر سه مرحله جنسی برخوردار بود. مقدار پروتئین همولنف در زمان بلوغ کامل جنسی و بعد از تخم‌ریزی بین تیمارهای آزمایشی تزریق هورمون اوپریم تفاوت معنی‌دار آماری نداشت ($P > 0.05$).



شکل ۲. مقطع تخمدان میگوی مولد وانامی قبل از رسیدگی جنسی، بلوغ کامل جنسی و بعد از تخم‌ریزی در تیمارهای مختلف آزمایشی با درشت‌نمایی X ۱۰۰۰ و رنگ آمیزی E&H

مقدار چربی همولنف بین همه تیمارهای آزمایشی در سه مرحله جنسی از اختلاف آماری معنی‌داری برخوردار بود ($P < 0.05$). بیشترین میزان چربی قبل و زمان بلوغ در تیمار قطع پایه چشمی به‌دست آمد اما بعد از تخم‌ریزی در تیمار تزریقی ۱۰۰۰ مشاهده گردید. در بین تیمارهای آزمایشی قبل از بلوغ جنسی و بعد از تخم‌ریزی، کربوهیدرات همولنف تفاوت آماری معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$) اما در زمان بلوغ جنسی این فاکتور بیوشیمیایی در تیمار سرم فیزیولوژی به کمترین حد خود رسید.

بررسی میزان تغییرات پروتئین، چربی و کربوهیدرات عضله بدن مولد میگوی وانامی در سه مرحله جنسی (قبل رسیدگی، بلوغ کامل و بعد از تخم‌ریزی) در تیمارهای قطع پایه چشمی، تزریق سرم فیزیولوژی، تزریق ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن از هورمون اوپریم در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج به دست آمده از آنالیز ترکیبات بیوشیمیایی عضله بدن نشان داد که میزان پروتئین قبل از بلوغ جنسی از تفاوت آماری معنی‌داری برخوردار نبود ($P > 0.05$). در زمان رسیدگی کامل جنسی بین تیمار قطع پایه چشمی و تیمارهای تزریقی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$) اما بین تیمارهای تزریقی بدون هورمون، تزریقی هورمونی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ هیچ‌گونه تفاوت آماری وجود نداشت ($P > 0.05$). به‌طورکلی در سه مرحله نمونه‌برداری در تیمارهای مختلف آزمایشی بیشترین میزان پروتئین در تیمار قطع پایه چشمی مشاهده گردید. نتایج مربوط به چربی قبل از بلوغ نشان داد که، تیمارهای مختلف از نظر میزان چربی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند ($P < 0.05$). مقدار چربی عضله بدن در زمان بلوغ جنسی بین تیمار تزریق سرم فیزیولوژی و تزریقی ۱۰۰۰ و بعد از تخم‌ریزی بین تیمارهای سرم فیزیولوژی و تزریقی ۵۰۰ تفاوت آماری نداشت ($P > 0.05$). بنا به نتایج به دست آمده

می توان اظهار داشت که، بیشترین و کمترین میزان چربی عضله بدن در سه مرحله نمونه برداری به ترتیب مربوط به تیمارهای قطع پایه چشمی و تیمار تزریقی سرم فیزیولوژی است (جدول ۲).

درصد کربوهیدرات عضله مولدین وانامی در مرحله قبل از بلوغ جنسی از اختلاف آماری معنی داری برخوردار بود ($P < 0.05$) به طوری که، بیشترین درصد این معیار در تیمار قطع پایه چشمی برابر 1.08 ± 0.05 و کمترین آن در تیمار سرم فیزیولوژی برابر 0.44 ± 0.02 به دست آمد. درصد کربوهیدرات عضله مولدین در مرحله بلوغ کامل جنسی در بین تیمارهای تزریقی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن تفاوت آماری نداشت و تنها اختلاف بین تیمارهای قطع پایه چشمی و تیمار تزریق سرم فیزیولوژی بود. کربوهیدرات پس از تخم ریزی کاهش داشت به طوری که کمترین درصد این معیار در تیمار تزریق سرم فیزیولوژی مشاهده شد.

جدول ۱. نتایج مقایسه میانگین های پروتئین، چربی و کربوهیدرات همولنف میگوی وانامی در تیمارهای مختلف آزمایشی

تیمار				فاکتورهای بیوشیمیایی همولنف	
تزریقی ۱۰۰۰	تزریقی ۵۰۰	سرم فیزیولوژی	قطع پایه چشم		
$177/26 \pm 7/72^a$	$168/10 \pm 4/95^b$	$144/06 \pm 12/59^c$	$171/15 \pm 5/82^b$	قبل از بلوغ	پروتئین (میلی گرم بر میلی لیتر)
$190/09 \pm 8/39^b$	$191/21 \pm 9/04^b$	$131/58 \pm 9/09^c$	$200/48 \pm 15/12^a$	بلوغ کامل	
$158/10 \pm 8/03^b$	$156/18 \pm 10/16^b$	$130/23 \pm 6/06^c$	$168/11 \pm 3/15^a$	بعد از تخم ریزی	
$98/02 \pm 9/23^c$	$120/19 \pm 12/54^b$	$88/36 \pm 10/30^d$	$135/55 \pm 7/09^a$	قبل از بلوغ	چربی (میلی گرم بر دسی لیتر)
$144/40 \pm 3/12^b$	$132/17 \pm 5/48^c$	$116/08 \pm 8/43^d$	$155/06 \pm 13/23^a$	بلوغ کامل	
$98/68 \pm 10/05^a$	$90/34 \pm 7/12^{ab}$	$85/15 \pm 9/56^b$	$95/80 \pm 4/53^{ab}$	بعد از تخم ریزی	
$24/14 \pm 1/33^a$	$25/37 \pm 1/02^a$	$20/10 \pm 1/89^a$	$25/06 \pm 1/23^a$	قبل از بلوغ	کربوهیدرات (میلی گرم بر دسی لیتر)
$34/82 \pm 1/10^a$	$35/22 \pm 2/08^a$	$21/69 \pm 1/12^b$	$38/15 \pm 0/99^a$	بلوغ کامل	
$20/77 \pm 1/18^a$	$19/20 \pm 0/82^a$	$18/13 \pm 1/05^a$	$22/90 \pm 1/09^a$	بعد از تخم ریزی	

در هر ردیف اعدادی که دارای حروف غیرمشابه هستند از نظر آماری اختلاف معنی دار دارند ($p < 0.05$).

جدول ۲. نتایج مقایسه میانگین های برخی فاکتورهای بیوشیمیایی عضله بدن مولدین در تیمارهای آزمایشی

تیمار				فاکتورهای بیوشیمیایی عضله بدن	
تزریقی ۱۰۰۰	تزریقی ۵۰۰	سرم فیزیولوژی	قطع پایه چشم		
$65/00 \pm 0/44^a$	$65/23 \pm 0/36^a$	$64/88 \pm 0/79^a$	$65/78 \pm 0/55^a$	قبل از بلوغ	پروتئین (درصد)
$65/32 \pm 0/72^b$	$65/29 \pm 0/55^b$	$65/04 \pm 0/52^b$	$66/10 \pm 0/89^a$	بلوغ کامل	
$65/08 \pm 0/61^{ab}$	$64/80 \pm 0/13^{bc}$	$64/53 \pm 0/38^c$	$65/23 \pm 0/28^a$	بعد از تخم ریزی	
$2/96 \pm 0/13^b$	$2/08 \pm 0/19^d$	$2/27 \pm 0/17^c$	$3/45 \pm 0/25^a$	قبل از بلوغ	چربی (درصد)
$2/15 \pm 0/05^c$	$2/99 \pm 0/14^b$	$2/22 \pm 0/21^c$	$3/69 \pm 0/10^a$	بلوغ کامل	
$2/07 \pm 0/22^c$	$2/87 \pm 0/19^b$	$2/58 \pm 0/06^b$	$3/19 \pm 0/18^a$	بعد از تخم ریزی	
$0/89 \pm 0/09^b$	$0/22 \pm 0/02^d$	$0/44 \pm 0/02^c$	$1/05 \pm 0/08^a$	قبل از بلوغ	کربوهیدرات (درصد)
$0/90 \pm 0/02^b$	$1/01 \pm 0/06^b$	$0/32 \pm 0/04^c$	$2/14 \pm 0/08^a$	بلوغ کامل	
$0/71 \pm 0/03^a$	$0/69 \pm 0/01^{ab}$	$0/05 \pm 0/006^c$	$0/68 \pm 0/07^b$	بعد از تخم ریزی	

در هر ردیف اعدادی که دارای حروف غیرمشابه هستند از نظر آماری اختلاف معنی دار دارند ($p < 0.05$).

بحث

در میگوها بلوغ گندهای ماده به طور ویژه بر اساس اندازه تخمدان و رنگ آنها (Brown and Patlan, 1974) یا بررسی تغییرات بافت‌شناسی تخمدان‌ها ارزیابی می‌گردد (Yano, 1988). علاوه بر این رسیدگی جنسی می‌تواند براساس تغییرات بیوشیمیایی در همولنف، هپاتوپانکراس، عضله بدن و گندها مورد مطالعه قرار گیرد چراکه همولنف به صورت حد واسط در انتقال مواد و ترکیبات عمل می‌کند و گندها نیز مکان سنتز و تمرکز مواد بیوشیمیایی در طی گامتوژنیز می‌باشند (FAatima et al., 2013).

مطالعات بافت‌شناسی در کنار مشاهدات ظاهری می‌تواند در تأیید مراحل توسعه تخمدان‌ها در هر تیمار حائز اهمیت باشد از این رو در این تحقیق برای تأیید مراحل جنسی (قبل از رسیدگی جنسی، بلوغ کامل و بعد از تخم‌ریزی) علاوه بر بررسی‌های ظاهری، مقطع بافتی تخمدان و آنالیز بیوشیمیایی عضله بدن و همولنف نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا، Ikhwanuddin و همکاران (۲۰۱۲)، برای بررسی تحریک بلوغ تخمدان با استفاده از هورمون سروتونین در میگوی *Fenneropenaeus merguensis* به مطالعه بافتی و مشاهدات ظاهری تخمدان پرداختند. علاوه بر این صفایی (۱۳۸۷)، به مطالعه تغییرات ساختار بافت تخمدان میگوی سفید (سرتیز) *Metapenaeus affinis* که یکی از گونه‌های مهم صیادی در آب‌های استان هرمزگان است پرداخت. مشاهدات مقاطع بافتی نشان داد که اووسیت‌های رسیده و نارس در هر مرحله قابل رویت هستند اما درصد فراوانی آنها در هر تیمار متغیر است. مطالعات بافت‌شناسی صورت گرفته در مورد چرخه رسیدگی اووسیت‌ها در تخمدان میگوهای پنائیده نشان می‌دهد تخمک‌های رسیده به وسیله تعداد زیاد اووسیت‌های نارس که به صورت دستجات کوچک قرار دارند، احاطه شده‌اند و این عقیده وجود دارد که اووسیت‌های نارس ممکن است در مرحله نهایی رسیدگی به سرعت افزایش یافته و سپس به طور خیلی سریع در اطراف اووسیت‌های رسیده قرار گرفته و فوراً عمل تخم‌ریزی آغاز گردد. این احتمال هم وجود دارد که اووسیت‌های نارس عمل رهاسازی اووسیت‌های رسیده از تخمدان را تسهیل نمایند (Yano, 1995).

ترکیبات بیوشیمیایی حیاتی بدن مانند پروتئین، چربی و کربوهیدرات می‌توانند در فرآیندهای بیولوژیکی و به‌ویژه تولیدمثل نقش چشمگیری داشته باشند. در این پژوهش، ترکیبات بیوشیمیایی همولنف در زمان بلوغ کامل جنسی به بیشترین حد خود رسید که مقایسه آماری بین تیمارها نشان داد که مولدین قطع پایه چشمی شده از نظر میزان پروتئین، چربی و کربوهیدرات نسبت به دیگر تیمارها از مقدار بیشتری برخوردار بودند. افزایش میزان پروتئین، کربوهیدرات و چربی در همولنف نشان می‌دهد که میگوها به سمت بلوغ جنسی در فرآیند تولیدمثل پیش می‌روند. آنالیز آماری نشان داد که ترکیبات بیوشیمیایی عضله بدن بین تیمارهای مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌دار داشت به طوری که بیشترین میزان این ترکیبات در تیمار قطع پایه چشمی مشاهده شد ($p < 0.05$).

Varalakshmi and Reddy (۲۰۱۰)، گزارش کردند که قطع یک‌طرفه و دو طرفه پایه چشمی منجر به افزایش پروتئین، کربوهیدرات و انرژی در تخمدان و کاهش آنها در لاشه و هپاتوپانکراس، افزایش غذای دریافتی، ارتقاء رشد و بلوغ تخمدان در میگوی *Macrobrachium lanchesteri* (de Man) در مقایسه با تیمار شاهد بدون قطع پایه چشمی شد. در مطالعه حاضر مشخص شد که ترکیبات بیوشیمیایی از افزایش معنی‌داری در تیمار قطع یک‌طرفه پایه چشمی نسبت به دیگر تیمارها برخوردار است. پژوهش صورت گرفته بر عملکرد تولیدمثل از طریق مطالعات مورفومتریکی، بافت‌شناسی و ترکیبات بیوشیمیایی میگوی وانامی *Litopenaeus vannamei* نشان داد که ترکیبات بیوشیمیایی در مراحل مختلف تخم‌ریزی تفاوت معنی‌داری نداشت به طوری که بیشترین مقدار پروتئین در مرحله چهارم تخم‌ریزی (۱۲۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، چربی و کربوهیدرات در مرحله دوم تخم‌ریزی به ترتیب (۹۰/۰ و ۵۹/۷ میلی گرم بر میلی لیتر) بود (Arcos et al., 2003). FAatima و همکاران (۲۰۱۳)، در مطالعه‌ای غلظت پروتئین، کربوهیدرات و چربی در همولنف، تخمدان، هپاتوپانکراس و ماهیچه میگوی *Fenneropenaeus merguensis* و *F. penicillatus* را در طول دوره بلوغ تخمدان مورد بررسی قرار دادند. از این رو نتایج نشان داد که مقادیر چربی، کربوهیدرات و پروتئین در تخمدان هر دو گونه در زمان بلوغ تخمدان افزایش یافت که این نشان از عملکرد تخمدان در جهت رسیدن به بلوغ

می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش می‌توان اظهار داشت که تزریق هورمون اوپریم تنها باعث تحریک بلوغ جنسی می‌شود اما تکنیک جایگزین به جای قطع پایه چشمی نمی‌تواند باشد بنابراین ممکن است اعمال هر دو تکنیک به صورت توأم بر بهبود عملکرد تولیدمثل میگوی وانامی کمک نماید و منجر به افزایش سطح ترکیبات بیوشیمیایی و در نتیجه افزایش سطح زرده سازی و بلوغ اووسیت‌ها در تخمدان شود.

تشکر و قدردانی

نگارنده مقاله بر خود لازم می‌داند تا از زحمات و حمایت‌های دکتر محمد گرگیج ریاست محترم شرکت تعاونی تکثیر لارو میگو سندرف و پردیس بندرجاسک و همچنین از همکاری کارشناسان محترم آن واحدها تشکر و قدردانی نماید.

منابع

- Arcos, F.G., Ibarra, A.M., Palacios, E., Vazquez-Boucard, C., Racotta, I.S. 2003. Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. *Aquaculture*. 228: 335-349.
- Barnes, H., Blackstock, J. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulfophosphanillin method for total lipid analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 12: 103-118.
- Benzie, J.A.H. 1998. Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture*. 164: 23-47.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Brancraft, J.D., Stevens, A. 1982. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 2nd edition. Churchill Livingstone, New York. 662 p.
- Browdy, C.L., Samocha, T.M. 1985. The effect of eyestalk ablation on spawning, molting and mating of *Penaeus semisulcatus* de Haan. *Aquaculture*. 49: 19-29.
- Brown, A. J.R., Patlan, D. 1974. Colour changes in the ovaries of penaeid shrimps as a determinant of their maturity. *Marine Fisheries Review*. 36: 23-26.
- Castille, F.L., Lawrence, A.L. 1989. Relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *Penaeus aztecus* and *Penaeus setiferus*. *Journal of Crustacean Biology*. 9: 202-211.
- Charniax-Cotton, C.H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan crustacea. *American Zoology*. 25: 197-206.
- Dubois, M.K., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28 (3): 350-356.
- FAatima, H., Ayub, Z., Ali, S.A., Siddiqui, G. 2013. Biochemical composition of the hemolymph, hepatopancreas, ovary, and muscle during ovarian maturation in the penaeid shrimps *Fenneropenaeus merguensis* and *F. penicillatus* (Crustacea: Decapoda). *Turkish Journal of Zoology*. 37: 334-347.
- Folch, J., Lees, M., Bloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 497-509.
- Gehring, W.R. 1974. Maturation changes in the ovarian lipid spectrum of the pink shrimp *Penaeus duorarum* Burkenroad. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*. 49: 511-524.
- Ikhwanuddin, M., Lyana, N.A., Bakar, N.H.A., Jasmani, S., Bolong, A.M.A. 2012. Stimulation of ovarian maturation using Serotonin (5-Hydroxytryptamine) hormone on Banana Shrimp, *Fenneropenaeus merguensis* (De Man, 1888). *World Applied Sciences Journal*. 18 (3): 436-445.
- Komatsu, M., Ando, S., Teshima, S.I. 1993. Comparison of hemolymph lipoproteins from four species of Crustacea. *Journal of Experimental Zoology*. 266: 257-265.

- Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R. 1979. Mobilization of organic reserves during ovarian development in a marine penaeid prawn *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidea). *Aquaculture*. 18: 373-377.
- Panouse, J.B. 1943. Influence of eyestalk ablation on the growth ovarian of cancer shrimp *Leander serratus*. *Renderings of the Academy of Sciences Paris*. 217: 553-555.
- Pillay, K.K., Nair, N.B. 1973. Observations on the biochemical changes in gonads and other organs of *Uca annulipes*, *Portunus pelagicus* and *Metapenaeus affinis* (Decapoda: Crustacea) during the reproductive cycle. *Marine Biology*. 18: 167-198.
- Quackenbush, L.S. 1991. Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimp. In: DeLoach, P.F., Dougherty, W.J., Davidson, M.A. (eds.). *Frontiers in Shrimp Research*. Elsevier, Amsterdam. pp. 125-140.
- Read, G.H.L., Caulton, M.S. 1980. Changes in mass and chemical composition during the moult cycle and ovarian development in immature and mature *Penaeus indicus* Milne Edwards. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part B*. 66: 431-437.
- Safaie, M. 2008. Histological study of singa shrimp ovaries (*Metapenaeus affinis*) in coastal water of The Hormozgan provinc. Pajouhesh and Sazandegi. 81: 168-171. (in Persian).
- Varalakshmi, K.N., Reddy, R. 2010. Effects of Eyestalk Ablations on Growth and Ovarian Maturation of the Freshwater Prawn *Macrobrachium lanchesteri* (de Man). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 10: 403-410.
- Wyban, J.A., Sweeney, J.N. 1991. *The oceanic institute shrimp manual, intensive shrimp production technology*. The Oceanic Institute, Honolulu, HI, USA. 158 p.
- Yano, I. 1988. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Marine Biology*. 99: 547-553.
- Yano, I. 1995. Final oocyte maturation, spawning and mating in penaeid shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 193: 113-118.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 718 p.