دانشکده منابع طبیعی

پایان نامه کارشناسی ارشد

شاخص ویتلوژنین و نسبت جنسی در اردک ماهی (*Esox lucius*) در تالاب انزلی

از:

مرضیه عباسی

استاد راهنما:

دکتر علی بانی

بهمن ۱۳۹۲

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده منابع طبیعی

گروه شیلات- بوم شناسی آبزیان

شاخص ویتلوژنین و نسبت جنسی در اردک ماهی (*Esox lucius*) در تالاب انزلی

از:

مرضیه عباسی

استاد راهنما:

دکتر علی بانی

بهمن ۱۳۹۲

تقدیم به

پدر و مادرم

به خاطر تمام سال های دور از خانه

و

استاد راهنمای عزیزم

که به من نیاموخته های بسیاری آموخت

تشکر و قدردانی

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت. اکنون در آستانه راهی نو به پاس نعمات بی حد پروردگار بر خود لازم می دانم سپاس گزار تمام عزیزانی باشم که در این راه مرا یاری نمودند.

بدین وسیله از زحمات بی دریغ استاد گرانقدر و مهربانم جناب آقای دکتر علی بانی که به عنوان استاد راهنما در این پایان نامه، اینجانب را یاری نمودند صمیمانه قدردانی می نمایم. همچنین از سرکار خانم مهوش هادوی که در انجام تمام مراحل آزمایشگاهی این پایان نامه پشتیبان و راهنمای من بودند بسیار سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر ستاری و دکتر شعبانی پور که داوری این پایان نامه را پذیرفتند کمال تشکر را دارم.

از استاد عزیزم جناب آقای دکتر موسوی به جهت همکاری ها و تلاش هایشان در جهت پیشبرد این پایان نامه کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از جناب آقای دکتر عبدالملکی به جهت راهنمایی های ارزنده علمی و محیط بانان تالاب انزلی (آقای پورمجیب) و تالاب امیرکلایه (آقایان درند، قانع و سرپناه) و آقایان قربان زاده، اسماعیلی و علی نژاد به جهت همکاری در صید ماهی کمال تشکر را دارم. همچنین از جناب آقای مهندس زمانی و سرکار خانم مهندس فاطمه طاری بخاطر تمام مساعدت ها یشان بی نهایت سپاسگزارم.

از دوستان عزیزم خانم ها مهندس الدوز باقرپور، محبوبه موهبی، فاطمه گلمحمدی، رقیه بابایی، عاطفه کریمیان، ساره قیاسی و سکینه شیروان و آقایان مهندس حبیبی و میرزایی که در تمام لحظات سخت کنارم بودند سپاسگزارم.

از حامیان همیشگی ام خانواده ی عزیزتر از جانم (پدر و مادر و خواهرها و برادرهایم) که در تمام لحظات سخت یاری ام نمودند تشکر می کنم.

مرضیه عباسی

فهرست مطالب

عنوان .....صفحه

چکیده فارسی .....ر

چکیده انگلیسی .....ز

فصل اول: مقدمه، کلیات و مرور منابع

۱-۱- مقدمه.....۲

۱-۲- کلیات.....۴

۱-۲-۱- جایگاه سیستماتیک.....۴

۱-۲-۲- بوم شناسی.....۵

۱-۲-۲-۱- مناطق زیستی و پراکنش.....۵

۱-۲-۲-۲- مهاجرت و تولیدمثل.....۵

۱-۳- تالاب انزلی.....۶

۱-۴- تالاب امیرکلایه.....۶

۱-۵- آلاینده‌های EDCs و اثرات آنها بر ماهیان.....۷

۱-۶- ویتلوژنین.....۷

۱-۷- هورمون ۱۷بتا- استرادیول.....۸

۱-۸- کلسیم کل و فسفر کل.....۹

۱-۹- نسبت جنسی.....۱۰

۱-۱۰- بافت شناسی.....۱۱

۱-۱۱- مرور منابع..... ۱۱

۱-۱۱- ۱- مطالعات انجام شده در داخل کشور..... ۱۱

۱-۱۱-۲- مطالعات انجام شده در خارج از کشور ۱۲

۱-۱۲- اهداف و فرضیه‌ها..... ۱۶

۱-۱۲-۱- اهداف..... ۱۶

۱-۱۲-۲-فرضیه‌ها..... ۱۶

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱-جمع آوری ماهیان..... ۱۸

۲-۲- خونگیری ۱۹

۲-۳- آماده سازی نمونه‌ها ۱۹

۲-۴- نسبت جنسی..... ۱۹

۲-۵- بافت شناسی ۱۹

۲-۵-۱-مراحل آماده سازی بافت جهت تهیه اسلایدهای بافتی ۲۱

۲-۵-۱-۱- آبگیری..... ۲۱

۲-۵-۱-۲- شفاف سازی..... ۲۱

۲-۵-۱-۳- پارافینه کردن..... ۲۱

۲-۵-۱-۴- قالب گیری..... ۲۱

۲-۵-۱-۵- برش دادن..... ۲۲

۲-۵-۱-۶- رنگ آمیزی و مونته کردن..... ۲۲

۲-۶- اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و هورمون..... ۲۲
۲-۶-۱- اندازه‌گیری پروتئین کل پلاسما به روش برادفورد..... ۲۲
۲-۶-۱-۱- تهیه معرف رنگ برادفورد..... ۲۲
۲-۶-۱-۲-تهیه محلول ذخیره (استوک) پروتئین..... ۲۲
۲-۶-۱-۳- جذب نوری و اندازه‌گیری..... ۲۳
۲-۷- اندازه گیری ALP..... ۲۳
۲-۷-۱-محلول‌های مورد نیاز..... ۲۳
۲-۷-۲- روش کار..... ۲۴
۲-۷-۳- منحنی استاندارد و اندازه‌گیری..... ۲۵
۲-۸- اندازه‌گیری کلسیم کل..... ۲۶
۲-۸-۱- محلول‌های مورد نیاز واکنش..... ۲۶
۲-۸-۲- محلول رنگ..... ۲۶
۲-۸-۳- محلول رقیق کننده..... ۲۶
۲-۸-۴- محلول معرف کاری..... ۲۶
۲-۸-۵- استاندارد کلسیم..... ۲۶
۲-۸-۶- روش کار..... ۲۷
۲-۹- اندازه‌گیری هورمون ۱۷بتا- استرادیول..... ۲۷
۲-۱۰- آنالیزهای آماری..... ۲۷

فصل سوم: نتایج

۳-۱- زیست سنجی..... ۲۹

۳-۲- نسبت جنسی..... ۳۰

۳-۳- بافت شناسی..... ۳۱

۳-۴- میزان Alkali –Labile Phosphoprotein(ALP)..... ۳۳

۳-۵- میزان هورمون ۱۷ بتا- استرادیول..... ۳۵

۳-۶- میزان پروتئین کل..... ۳۶

۳-۷- میزان کلسیم کل..... ۳۸

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴- ۱- بحث..... ۴۰

۴-۲- نتیجه‌گیری کلی..... ۴۶

۴-۳- پیشنهادات..... ۴۷

۴-۳-۱- پیشنهاد اجرایی..... ۴۷

۴-۳-۲- پیشنهادهای پژوهشی..... ۴۷

فصل پنجم: منابع

۵- منابع..... ۴۹

فهرست جداول

جدول ۲-۱- مشخصات رسیدگی جنسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی برای ماهیان ۲۰

جدول ۲-۲- رقت‌های مختلف استوک پروتئین جهت تهیه منحنی استاندارد ۲۳

جدول ۲-۳- رقت‌های مختلف استوک فسفات جهت تهیه منحنی استاندارد ۲۵

جدول ۳- ۱- مشخصات زیستی اردک ماهیان نر و ماده صید شده از تالاب انزلی و تالاب امیرکلایه ۲۹

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱- نسبت جنسی اردک ماهی جمع آوری شده از کل تالاب انزلی و منطقه آبکنار ۳۰

نمودار ۳-۲-الف- میانگین شاخص ALP (± خطای معیار) در اردک ماهیان نر و ماده نابالغ، (زرده سازی- اسپرم سازی)، در حال تخمریزی و کاملا تخمریزی کرده در تالاب انزلی ۳۴

نمودار ۳-۲- ب- میانگین شاخص ALP (± خطای معیار) در اردک ماهیان نر نابالغ و در مرحله اسپرم سازی در تالاب انزلی و تالاب امیرکلایه ۳۴

نمودار۳-۳- الف- میانگین هورمون ۱۷بتا- استرادیول (± خطای معیار) در اردک ماهیان نر (مرحله اسپرم سازی) و ماده (مرحله زرده سازی) در تالاب انزلی ۳۵

نمودار۳-۳- ب- میانگین هورمون ۱۷بتا- استرادیول (± خطای معیار) در اردک ماهیان نر در مرحله اسپرم سازی در تالاب انزلی و تالاب امیرکلایه..... ۳۵

نمودار ۳-۴- الف- میانگین شاخص پروتئین کل (± خطای معیار) در اردک ماهیان نر و ماده نابالغ و (زرده سازی- اسپرم سازی) در تالاب انزلی ۳۷

نمودار ۳-۴- ب-میانگین شاخص پروتئین کل (± خطای معیار) در اردک ماهیان نر نابالغ و در مرحله اسپرم سازی در تالاب انزلی و تالاب امیرکلایه ۳۷

نمودار ۳-۵-الف- میانگین شاخص کلسیم کل (± انحراف معیار) در اردک ماهیان نر و ماده (مرحله اسپرم سازی و زرده سازی) در تالاب انزلی..... ۳۸

نمودار ۳-۵- ب-میانگین شاخص کلسیم کل (± انحراف معیار) در اردک ماهیان نر در مرحله اسپرم سازی در تالاب انزلی و تالاب امیرکلایه ۳۸

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱- اردک ماهی(*Esox lucius* (Linnaesus, 1758 ..... ۴

شکل ۱-۲- فرایند تولید استرادیول، تستوسترون و ویتلوژنین در ماهیان ماده ۹

شکل ۲-۱- تور مخروطی برای صید اردک ماهی ۱۸

شکل ۳-۱-الف- برش عرضی از بافت بیضه اردک ماهی نابالغ در تالاب امیرکلایه و تالاب انزلی و برش عرضی از بافت بیضه اردک ماهی در مرحله اسپرم سازی در تالاب امیرکلایه و تالاب انزلی ۳۱

شکل ۳-۱-ب- برش عرضی از بافت تخمدان اردک ماهی نابالغ در تالاب امیرکلایه و تالاب انزلی و برش عرضی از بافت تخمدان اردک ماهی در مرحله زرده سازی در تالاب امیرکلایه و تالاب انزلی ۳۲

فهرست فرمول‌ها

فرمول ۲-۱ محاسبه غلظت کلسیم ۲۷

فهرست نقشه‌ها

شکل ۱-۱ نقشه پراکنش اردک ماهی در ایران ۵

شکل ۲- ۱- نقشه موقعیت مکان های نمونه برداری اردک ماهی از تالاب انزلی و تالاب امیرکلایه ۱۸

چکیده

شاخص ویتلوژنین و نسبت جنسی در اردک ماهی (*Esox lucius*) در تالاب انزلی

مرضیه عباسی

آلاینده‌های زیست محیطی که به درون اکوسیستم‌های آبی وارد می‌شوند توانایی مختل کردن فرایندهای متابولیسم، رشد و نمو و تولیدمثل یک موجود آبزی را داشته و می‌توانند موجب ناهنجاری‌های گنادی، انحراف نسبت‌های جنسی و تغییر فیزیولوژی تولیدمثل ماهی شوند؛ لذا هدف این تحقیق بررسی تغییرات برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسمای خون و مطالعه بافت شناسی گناد اردک ماهی (*Esox lucius*) نر و ماده در یک محیط آلوده (تالاب انزلی) و مقایسه آن با یک محیط غیر آلوده (تالاب امیرکلایه) می‌باشد. نمونه‌ها در طول فصل رسیدگی جنسی (آبان تا اسفند ۱۳۹۱) جمع آوری شدند و شاخص ویتلوژنین پلاسما با استفاده از روش غیرمستقیم Alkali-Labile Phosphoprotein (ALP) تعیین شد. همچنین پروتئین کل، کلسیم کل و هورمون ۱۷بتا- استرادیول در پلاسما اندازه‌گیری شدند. آنالیزهای بافت شناسی گناد به منظور بررسی اختلال در توسعه گنادی انجام گرفت و نسبت جنسی تعیین شد. نتایج به دست آمده تفاوت معنی داری در میانگین غلظت ALP، پروتئین کل، کلسیم کل و ۱۷بتا- استرادیول بین جنس نر و ماده در محیط آلوده نشان داد. با این حال میانگین مقدار شاخص ویتلوژنین در نرهای تالاب انزلی (۲/۲۷ ± ۴۲/۹۳) ۴۰٪ میانگین مقدار این شاخص در ماده‌ها (۱۱/۴۶ ± ۱۰۷/۲۷) و بیش از دو برابر مقدار اندازه‌گیری شده در نرهای تالاب امیرکلایه (۰/۳۸ ± ۱۸/۶۲) بود. نسبت جنسی مشاهده شده در تالاب انزلی متفاوت از ۱:۱ بود (۳۶/۲۳٪ نر و ۶۳/۷۶٪ ماده) اما شواهد و علایم حضور سلول‌های جنسی نر در گناد ماده و یا سلول‌های جنسی ماده در گناد نر مشاهده نشد. نتایج نشان می‌دهد که فیزیولوژی تولیدمثلی اردک ماهی تا حدی تحت تاثیر محیط آلوده تالاب انزلی که انواع آلاینده‌ها در آن یافت می‌شود، می‌باشد.

کلید واژه: *Esox lucius*،EDCs, ALP، هورمون استروئیدی، تالاب انزلی

Abstract

Vitellogenin index and sex ratio in pike (*Esox lucius*) in the Anzali wetland

Marzieh Abbasi

Environmental pollutants compounds which discharge into the aquatic ecosystems can potentially disturb biological processes such as metabolism, growth and reproduction of aquatic organisms. These compounds are able to cause gonadal abnormalities, biased sex ratios and altration in reproductive physiology of fish. The aim of this study was to investigate the induced changes of some biochemical parameters in the blood plasma of male and female pike (*Esox lucius*) in a polluted (the Anzali wetland) and a non-polluted environment (the Amirkolaye wetland). Histological exmainations of ovaries and testes was also carried out to assess the possible abnormality of gonads in both genders. Samples were collected from October 2012 to March 2013 during the maturation period. Alkali-Labile Phosphoprotein (ALP) was measured as an indirect measure to vitellogenin. Additionally, total protein, total calcium and17β-estradiol were measured in plasma and sex ratio of pike in the Anzali wetland was determined. The results revealed significant difference in mean ALP, total protein, total calcium and 17β-estradiol between genders in the Anzali wetland. However, the mean vitellogenin index in male pike of Anzali wetland (42.93 ± 2.27) was 40% of the average of this index in female (107.27 ± 11.46) which was more than double of mean value for male pike in the Amirkolaye wetland (18.62 ± 0.38). The sex ratio was significantly different from 1:1 (36.23% Male and 63.76% Female) sex ratio in the Anzali wetland but there was no evidence indicating the presence of female sexual cells in male gonads and vise versa. The results indicate that the reproductive physiology of pike are some what affected by contaminants found in the Anzali wetland, a highly polluted area.

Keywords: ALP, EDCs, *Esox lucius*, Steroid hormone, Anzali wetland

فصل اول

مقدمه، کلیات و

مروری بر منابع

۱-۱ مقدمه

فیزیولوژی تولیدمثلی ماهی تحت کنترل سیستم غدد درون ریز می‌باشد که خود تحت تاثیر عوامل محیطی همچون نور، دما و ... قرار دارد. این سیستم شامل غده‌های گوناگونی است که ساخت و ترشح هورمون‌های تنظیم کننده رشد و نمو، متابولیسم و تولیدمثل را بر عهده داشته (Pait and Nelson, 2003) و توسط اندام‌های مختلف کنترل می‌شود. با آنکه این سیستم عمدتا از طریق فعال سازی محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد فرایندهای گامتوژنز[1] و استروئیدوژنز[2] را آغاز و کنترل می‌نماید (Kah *et al*., 1993) اما در سیستم‌های آبی، شماری از آلاینده‌های محیطی وجود دارند که می‌توانند با شبیه سازی یا ممانعت از عملکرد هورمون‌های استروئیدی (Mills and Chichester, 2005)، اتصال به گیرنده‌های استروژنی یا آندروژنی (Tapiero *et al*., 2002) و مداخله کردن با ژن‌های پاسخگو به استروژن‌ها (Jobling *et al*.,1996) باعث اختلال در عملکرد این سیستم شوند (Harrison *et al*., 1997). این آلاینده‌های محیطی که تحت عنوان ترکیبات بر هم زننده غدد درون ریز (EDCs)[3] نامیده می‌شوند، شامل گروهی از مواد طبیعی و مصنوعی مانند فیتواستروژن‌ها (Burki *et al*., 2006)، 4-nonylphenol (White *et al*., 1994)، bisphenol-A (Celius *et al*., 1999)، PCBs (Knudsen and Pottinger, 1998)، PAHs (Santodonato, 1997) و ... می‌باشند که به علت رها سازی حجم عظیمی از فاضلاب های شهری، کشاورزی و صنعتی، به درون اکوسیستم‌های آبی وارد شده و به علت تاثیر بر فیزیولوژی موجودات آبزی، نگرانی های جدی به وجود آورده‌اند. در ایران بیش از ۲۰ تالاب بین المللی وجود دارد (یگانه موسوی، ۱۳۸۱) که از جمله آنها می‌توان به تالاب انزلی (Sakizadeh *et al*., 2012) و تالاب امیرکلایه (نظامی و همکاران، ۱۳۸۴) اشاره نمود. تالاب امیرکلایه به علت فقدان رودخانه ورودی و تامین آب تالاب از چشمه‌های آب زیرزمینی (نظامی، ۱۳۷۸) فاقد آلودگی ترکیبات شیمیایی بوده و به عنوان یک محیط سالم در نظر گرفته می‌شود در حالی که مطالعات قبلی نشان دادند که تالاب انزلی علی رغم آنکه یک ذخیره‌گاه مهم حیات وحش (Tavakkoli and Sabet Raftar, 2003) می‌باشد اما به علت رهاسازی مقدار زیادی از فاضلاب‌های تصفیه نشده شهری و صنعتی به درون این تالاب (پیغمبری، ۱۳۷۳)، غلظت برخی از ترکیبات EDCs مانند Octylphenol, 4-nonylphenol، و bisphenol-A در این تالاب بالا بوده (Mortazavi *et al*., 2012,2013) و از این رو ماهیان در این منطقه می‌توانند به صورت مستقیم و غیرمستقیم در معرض این ترکیبات قرارداشته باشند. تحقیقات اخیر نشان داده که قرارگیری ماهیان وحشی در معرض EDCs و ترکیبات آنها باعث بروز غیرعادی شرایط دوجنسیتی و ناهنجاری های گنادی (Scholz and Klüver, 2009)، تغییر نسبت جنسی (Larsson and Forlin, 2002) و القای ویتلوژنین (VTG) در جنس نر(Tyler *et al*., 2002) می‌شود.

[1]Gametogenesis
[2]Steroidogenesis
[3]Endocrine Disrupting Chemicals