بررسي تاثير نوع غذا بر ميزان تجمع مايكوسپرين‌ها در *Artemia urmiana* و parthenogenetic *Artemia*

ساناز خسروي[۱]، صابر خدابنده*[۱]، ناصر آق[۲] و مهديه بختياريان[۱]
[۱] گروه زيست شناسي دريا، دانشگاه تربيت مدرس، نور، ايران
[۲] پژوهشكده آرتميا و جانوران آبزي، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ايران
(تاريخ دريافت: ۱۳۹۰/۴/۴ ، تاريخ تصويب: ۱۳۹۱/۳/۳۰)

چكيده
مايكوسپرين‌ها، متابوليت‌هاي جذب كننده تابش فرابنفش هستند كه از طريق مسير سنتز اسيدهاي آمينه آروماتيک (Shikimate pathway) توليد مي‌شوند. در مطالعه حاضر به بررسي تاثير نوع غذا بر ميزان تجمع اين تركيبات در آرتميا اورميانا (*Artemia urmiana*) و آرتمياي بكرزا (parthenogenetic *Artemia*) پرداخته شد. سيست‌هاي هر دو جمعيت آرتميا تحت شرايط استاندارد تخم‌گشايي شدند. لاروها (ناپليوس اينستار I) بلافاصله بعد از تخم گشايي به آب رقيق شده درياچه اروميه با شوري ۱۵۰ گرم در ليتر انتقال يافت، سپس شوري آب محيط پرورش به طور تدريجي تا ۲۵۰ گرم در ليتر افزايش داده شد. آرتمياها در طول دوره پرورش با دو تيمار غذايي جلبک تک سلولي دونالیلا سالينا (*Dunaliella salina*) سبز و قرمز تغذيه شدند. در پايان آزمايش غلظت هفت نوع مايكوسپرين شامل Asterina-330، Shinorine، Mycosporine-2Glycine، Palythine، Porphyra-334، Mycosporine-Glycine:valine و Palythinol در آرتمياهاي بالغ توسط دستگاه HPLC اندازه‌گيري شد. نتايج بدست آمده افزايش معني‌دار ميزان مايكوسپرين‌ها را در هر دو جمعيت آرتمياي تغذيه شده با جلبک قرمز، به استثناي Shinorine در *A. urmiana*، در مقايسه با جلبک سبز نشان داد. در اكثر موارد آرتمياي بكرزا در مقايسه با *A. urmiana* قابليت بيشتري براي تجمع مايكوسپرين‌ها از خود نشان داد.

واژه هاي كليدي: مايكوسپرين، دونالیلا سالينا، آرتميا اورميانا، آرتمياي بكرزا.

* نويسنده مسئول: تلفن: ۰۱۲۲۶۲۵۶۱۱۴ فاكس: ۰۱۲۲۶۲۵۳۴۹۹ E-mail: skhoda@modares.ac.ir

مقدمه

امواج الكترومغناطيسي تشكيل دهنده طيف طبيعي نور خورشيد، طول موج‌هاي بسيار كوتاه گاما تا طول موج-هاي بلند راديويي را در بر مي‌گيرند. در اين ميان، تشعشعات خورشيدي با طول موج‌هاي بين ۱۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر در محدوده امواج فرابنفش قرار گرفته كه بر اساس طول موج به سه دسته A (۴۰۰-۳۲۰ نانومتر)، B (۳۲۰-۲۸۰ نانومتر) و C (۲۸۰-۱۰۰ نانومتر) تقسيم-بندي مي‌شوند (Halliday *et al*., 2008). نتايج حاصل از مطالعات چند دهه اخير حاكي از ارتباط مستقيم فعاليت-هاي انساني بالاخص رهاسازي تركيبات هالوژندار (از جمله كلروفلئوروكربن‌ها) با تحليل فزاينده لايه ازون و بدنبال آن افزايش چشم‌گير نفوذ اشعه فرابنفش[1] (UVR) به سطح زمين مي‌باشد (McCulloch, 2003; Platt and Honninger, 2003). تابش فرابنفش به طور مستقيم، از طريق جذب توسط ماكروملكول‌هاي حياتي مانند DNA، و يا غيرمستقيم از طريق توليد اشكال فعال اكسيژن و راديكال‌هاي آزاد، حيات آبزيان را به مخاطره مي‌اندازد (Kieber *et al*., 2003; Buma *et al*., 2003). گزارشات بسياري از كاهش بقا، تاخير در رشد، ناهنجاري‌هاي مورفولوژيک و فيزيولوژيک در جانوران آبزي به خصوص در مراحل اوليه رشد حكايت دارند (Jokinen et al., 2000; Lesser and Barry, 2003).

در اين ميان، آبزيان ساكن آب‌هاي كم عمق و شفاف در معرض خطر جدي قرار دارند و به روش‌هاي مختلف از خود در برابر تابش UV محافظت مي‌كنند (Hessen, 2003). يكي از اين روش‌هاي موثر، توانايي آن‌ها در سنتز و ذخيره تركيبات نيتروژن‌داري با وزن مولكولي كم مي-باشد كه داراي يک حلقه سيكلوهگزان متصل به يک اسيدآمينه يا گروه آمينوالكل بوده و با نام عمومي مايكوسپرين‌ها شناخته مي‌شوند (Shick and Dunlap, 2002). بعدها مشتقات ايميني مايكوسپرين‌ها به عنوان متابوليت‌هاي جذب كننده اشعه فرابنفش در ارگانيسم-هاي دريايي تحت عنوان اسيدهاي آمينه شبيه مايكوسپرين (Mycosporine-like amino acids) (MAAs) ناميده شدند كه حداكثر جذب آن‌ها در محدوده ۳۱۰ تا ۳۶۰ نانومتر مي‌باشد (Singh *et al*., 2008). تاكنون بيش از ۲۰ نوع MAAs شناسايي شده كه تفاوت طيف جذبي آن‌ها به دليل گروه‌هاي جانبي و نيتروژن استخلافي‌شان مي‌باشد (Sinha *et al*., 2007; Singh *et al*., 2008). بر اساس شواهد موجود سنتز MAAs از طريق مسير Shikimate (مسير سنتز اسيد-هاي آمينه آروماتيک) انجام مي‌پذيرد (Singh *et al*., 2008). از اين رو فيتوپلانكتون‌ها و جلبک‌ها در زمره مهمترين توليدكنندگان MAAs قرار مي گيرند (Sinha *et al*., 2007) كه ميزان سنتز اين تركيبات بسته به گونه اين موجودات بسيار متفاوت مي‌باشد (Jeffrey *et al*., 1999). از آنجايي كه جانوران فاقد چنين مسيري هستند، قادر به سنتز MAAs نبوده و اين مواد را از طريق تغذيه (Newman *et al*., 2000; Carefoot *et al*., 2000; Helbling *et al*., 2002) و يا همزيستي با جانداران توليدكننده آن‌ها (Shick *et al*., 2005) جذب و ذخيره مي‌كنند. بدين وسيله MAAs در اكوسيستم‌هاي آبي از يک سطح غذايي به سطح غذايي ديگر در زنجيره غذايي منتقل مي‌گردد (Shick and Dunlap, 2002). در ميان سخت‌پوستان، تركيبات MAAs در كريل قطب جنوب (*Euphausia superba*) (Newman *et al*., 2000)، گونه-هاي متنوعي از پاروپايان (Tartarotti *et al*., 2001; Pérez *et al*., 2006) و همچنين در آرتميا (Grant et al., 1984) گزارش شده است. در مطالعه حاضر اثر تغذيه با جلبک دونالیلا سالیناي سبز و قرمز بر ميزان تجمع MAAs در دو جمعيت آرتمياي دو جنسي (*Artemia urmiana*) و بكرزا (parthenogenetic *Artemia*) ساكن درياچه اروميه و بركه‌هاي اطراف آن مورد بررسي قرار گرفت. با توجه به ارزش اقتصادي بالا و كاربرد فراوان آرتميا در صنعت آبزي‌پروري با فراهم آمدن شرايط مناسب جهت تجمع هر چه بيشتر MAAs در بيومس آن، مي‌توان اميدوار بود كه موجودات تغذيه كننده از آن مانند لارو ماهي و ميگوي پرورشي از اين ماده جاذب

[1] Ultraviolet Radiation

UVبهره‌مند شده و مقاومت‌شان در برابر تابش این اشعه زیان آور افزایش یابد. همچنین با اثبات وجود چنین توانایي در آرتمیا مبني بر جذب MAAs از جیره غذایي مي توان امید داشت که غني‌سازي این سخت‌پوست از طریق جیره غذایي موجب پر رنگ‌تر شدن نقش کاربردي آن در صنایعي مانند صنایع داروسازي و آرایشي- بهداشتي شود.

مواد و روش‌کار

در تحقیق حاضر از سیست‌هاي *A. urmiana* و *Artemia* parthenogenetic (آرتمیاي بکرزا) که به ترتیب از دریاچه ارومیه و برکه‌هاي اطراف آن جمع‌آوري شده بود، استفاده گردید. سیست‌ها تحت شرایط استاندارد (دما: ۲۸°C، pH= ۸، نور: ۲۰۰۰ lux، شوري: ۳۳ g l^{-1}) و متعاقب ۲۴ ساعت هوادهي تخم گشایي شدند (Sorgeloos et al., 1986). لاروها (ناپلئوس اینستار I) به تعداد ۶۰۰۰ عدد بلافصله بعد از تخم گشایي به هر ظرف استوانه‌اي - مخروطي شیشه‌اي حاوي ۶ لیتر آب رقیق شده دریاچه ارومیه با شوري ۱۵۰ g l^{-1} منتقل گردید. سپس جهت افزایش شوري به ۲۵۰ g l^{-1}، شوري آب به صورت یک روز در میان به میزان ۱۰ g l^{-1} افزایش داده شد تا به حد مورد نظر برسد. دماي آب داخل ظروف با استفاده از روش حمام آب گرم در ۲۸ ±۰/۵°C ثابت نگه داشته شد. دوره نوري ۱۲ ساعت روشنایي و ۱۲ ساعت تاریکي براي هر دو تیمار تغذیه و ۳ تکرار هر یک از آن‌ها اعمال گردید. غذادهي آرتمیاها تا زمان رسیدن به بلوغ بر اساس نوع تیمار با استفاده از جلبک تک سلولي *Dunaliella salina* سبز و قرمز و بر اساس جدول غذادهي استاندارد انجام گرفت (Coutteau *et al.*, 1992). در پایان دوره پرورش نمونه آرتمیاهاي بالغ جمع‌آوري شده و با استفاده از دستگاه فریز دارير خشک گردید.

کشت جلبک

براي کشت جلبک از نمونه خالص جلبک سبز تک سلولي *Dunaliella salina* که توسط پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزي دانشگاه ارومیه فراهم گردید، استفاده شد. محیط کشت مایع با مخلوط کردن آب رقیق شده و استریل دریاچه ارومیه با شوري ۱۲۰ g l^{-1}، محلول مغذي Walne (۱ میلي‌لیتر در هر لیتر محیط کشت) و ترکیب ویتامین B_1 و B_{12} (۵۰ میکرولیتر در هر لیتر محیط کشت) تهیه گردید (Lavens and Sorgeloos, 1996).

براي تهیه سوسپانسیون جلبکي با تراکم یکنواخت، ابتدا از توده خالص جلبک سبز تک سلولي *Dunaliella salina* ذخیره شده روي محیط آگار دریایي، به لوله‌هاي آزمایش محتوي ۲۰ میلي‌لیتر محیط کشت مایع، تلقیح و پرورش روي میز کشت با شدت روشنایي ۲۰۰۰ لوکس و دوره نوري ۲۴ ساعته انجام پذیرفت. دماي اتاق پرورش بین ۲۴-۱۸ °C تنظیم شد. پس از شکوفایي جلبک، محتویات لوله‌ها به ظروف بزرگتر منتقل گردید و هوادهي دائمي بوسیله پیپت‌هاي فیلتردار استریل متصل به سیستم هوادهي مرکزي انجام گرفت. زماني که تراکم جلبک سبز رنگ در ظروف مذکور به حد معین ۱۸ میلیون سلول در میلي‌لیتر رسید، هوادهي قطع شده و محتویات ظروف پرورش به ظروف استریل ذخیره منتقل و تا زمان غذادهي در یخچال نگه‌داري شدند. شمارش سلول‌هاي جلبک براي تعیین تراکم آن‌ها در ظروف پرورش با استفاده از لام هماتوسایتومتر بورکر و بر اساس فرمول زیر انجام پذیرفت (Lavens and Sorgeloos, 1996).

$$A= X \times 10^4 \times d$$

A: تعداد سلول جلبک در یک میلي‌لیتر. X: تعداد جلبک شمارش شده در ۲۵ خانه – d: ضریب رقیق سازي. جهت کشت جلبک *D. salina* قرمز رنگ، جلبک *D. salina* سبز پرورش داده شده در شوري ۱۲۰ g l^{-1} که تراکم آن به حد مناسب رسیده است به ظروف بزرگتري حاوي محیط کشت مایع با شوري ۲۵۰ g l^{-1} منتقل گردید. در این حالت جلبک تکثیر نشده و تحت استرس ناگهاني شوري زیاد، بتدریج حجم زیادي بتاکاروتن سنتز کرده و در مدتي در حدود ۳ ماه به رنگ قرمز روشن در- مي‌آید (Fisher *et al.*, 1994).

اندازه‌گيري **MAAs**

تمامي مراحل مربوط به آناليز و اندازه‌گيري MAAs موجود در بيومس آرتميا در آزمايشگاه زيست شناسي دريايي پروفسور Martine Fouchereau-Peron (دانشگاه پيير و ماري كوري[2]، كشور فرانسه) انجام پذيرفت و از روش Mason *et al.*, 1998 با كمي تغيير به شرح زير استفاده گرديد:

آماده سازي نمونه‌ها در محلول متانول ۱۰۰ درصد انجام گرفت، بدين منظور ابتدا g ۰/۱ از نمونه آرتمياي خشک شده بوسيله خردكن شيشه‌اي مخصوص (Germany, DELAWARE, 15 ml, No 96006) در ml ۳ از محلول فوق هضم شده، به مدت ۱۰ دقيقه در دماي C° ۴ در ۲۰۰۰ دور در دقيقه سانتريفيوژ و محلول رويي جدا سازي گرديد. در مرحله بعد ml ۲ از محلول متانول ۱۰۰ درصد به باقي‌مانده نمونه اضافه شده و پس از سانتريفيوژ مجدد، محلول رويي جداسازي گرديد و در مرحله نهايي عصاره گيري با ml ۱ محلول متانول۱۰۰ درصد و مطابق با روش ياد شده انجام شد. نهايتا حلال عصاره تام بدست آمده بدنبال عبور از كارتريج C18 Sep Pak با استفاده از دستگاه فريز درايرر در خلا و دماي پايين تبخير شد و باقيمانده خشک عصاره تام جهت آناليز نهايي در دماي C° ۸۰- نگهداري گرديد.

براي اندازه‌گيري مايكوسپرين‌ها، نمونه باقيمانده خشک عصاره تام در µl ۱۰۰ متانول ۴۰% حاوي ۰/۱ % اسيد استيک حل شده و در سه تكرار، هر بار به ميزان ۱۰ ميكروليتر به دستگاه HPLC (SPECTRASYSTEM SN 4000, AS 3000,P 1000XR,SCM 1000) مجهز به ستون C8(4.6 mm × 500 mm) تزريق شد. شستشوي ستون بوسيله حلال متانول ۴۰% حاوي ۰/۱ % اسيد استيک و با سرعت جريان ۰/۸ ميلي‌ليتر در دقيقه انجام شد و ميزان جذب در طول موج‌هاي بين ۳۱۰ تا ۳۴۰ نانومتر خوانده شد. براي شناسايي مايكوسپرين‌ها از استاندارد خالص آن‌ها استفاده شد (Carreto *et al.*, 2001).

آزمايش در قالب فاكتوريل با طرح پايه كاملا تصادفي و براي دو فاكتور رژيم غذايي و جمعيت كه هر يک داراي ۲ سطح مي‌باشند، انجام پذيرفت. تجزيه و تحليل آماري داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (ver. 15.0) انجام گرديد و جهت تعيين معني‌دار بودن اختلاف ميانگين‌ها، در سطح معني داري ۵ درصد ($P = 0.05$)، از آزمون آناليز واريانس ۲ طرفه (Two way-ANOVA) استفاده شد. نمودار هاي مربوطه توسط برنامه Excel (ver. 2007) رسم گرديد. براي تعيين وجود اختلاف معني‌دار ميان ميزان مايكوسپرين‌هاي مختلف در دو جلبک *Dunaliella salina* سبز و قرمز از آزمون t با نمونه‌هاي جفتي جهت آناليز آماري استفاده شد.

نتايج

نتايج حاصل از اندازه‌گيري ميزان مايكوسپرين‌ها در جلبک *Dunaliella salina* سبز و قرمز در جدول شماره ۱ آمده است. نتايج بدست آمده از آناليز آماري نشان داد كه ميزان ۷ نوع MAAs موجود در جلبک *Dunaliella salina* قرمز به طور معني‌داري بيشتر از جلبک *Dunaliella salina* سبز است.

نتايج حاصل از تاثير نوع رژيم غذايي بر ميزان MAAs در دو جمعيت آرتمياي مورد مطالعه در نمودار ۱ ارائه شده است. بررسي‌هاي آماري حاكي از اثر معني‌دار هر دو فاكتور مورد مطالعه بر ميزان تجمع MAAs مي‌باشد (جدول ۲). نتايج بدست آمده نشان داد كه تغذيه با جلبک *Dunaliella salina* قرمز موجب افزايش معني‌دار ميزان ۷ نوع MAAs در هر دو جمعيت آرتميا (به استثناي Shinorine در *A. urmiana*) در مقايسه با شرايط تغذيه از جلبک *Dunaliella salina* سبز مي‌شود ($P <$ ۰/۰۵). نتايج آناليزهاي آماري (جدول ۲) در بيشتر موارد در تيمارهاي مشابه از لحاظ نوع غذا نشان مي‌دهد كه ميزان MAAs در آرتمياي بكرزا به طور معني‌داري بيشتر از مقدار آن‌ها در *A. urmiana* است (نمودار ۱). به

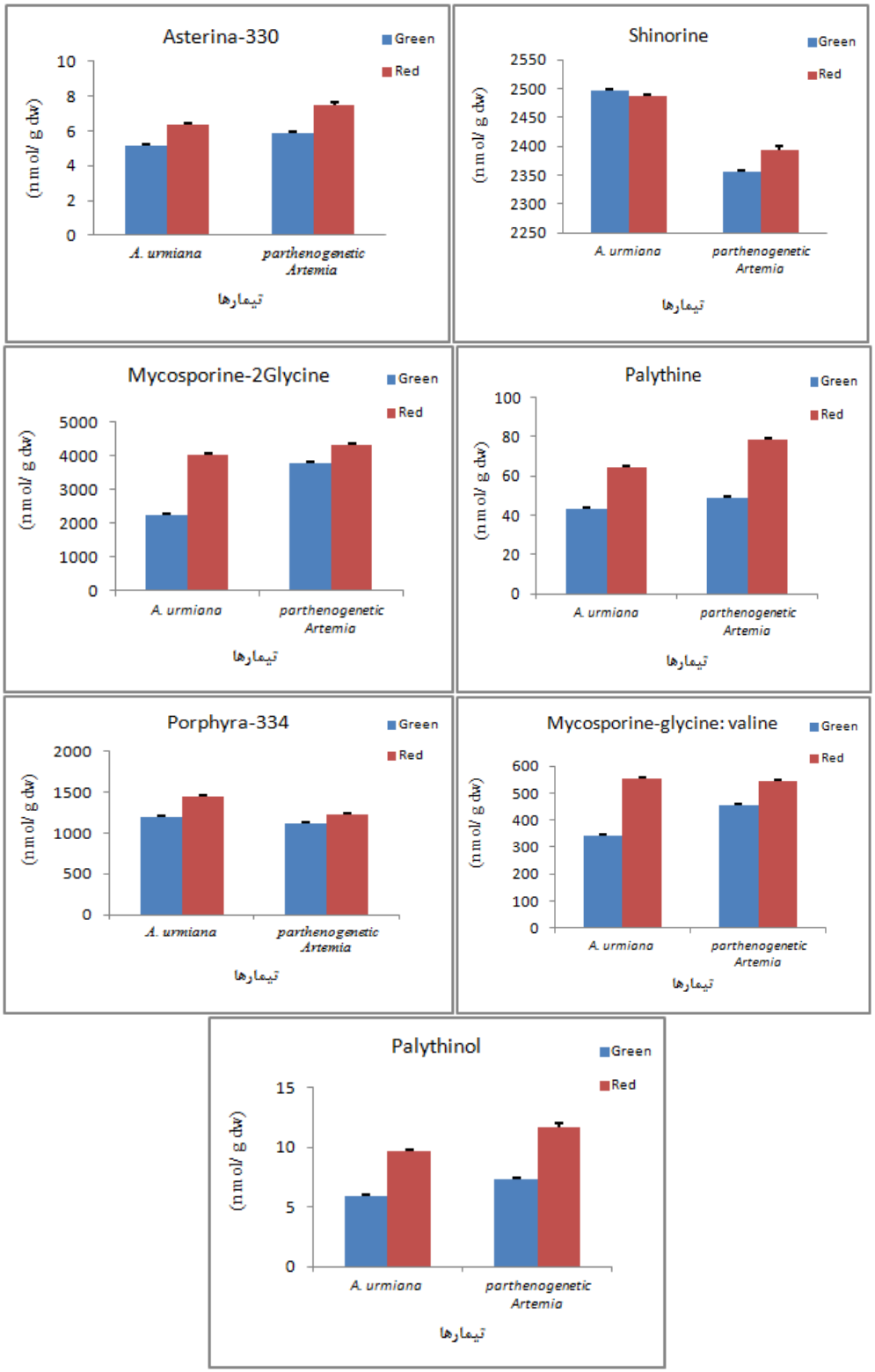
[2] Pierre and Marie Curie University or UPMC-Paris University or Paris 6

استثناي Shinorine و Porphyra-334 كه غلظت آن‌ها در جمعيت دوجنسي مورد مطالعه (*A. urmiana*) به طور معني‌داري بيشتر از مقدار اندازه‌گيري شده آن‌ها در جمعيت بكرزا مي‌باشد. بر اين اساس، اندازه‌گيري غلظت Mycosporine-glycine:valin نشان داد كه در تيمار تغذيه با جلبک *Dunaliella salina* قرمز، ميزان اين MAAs در *A. urmiana* به طور معني‌داري بيشتر از مقدار آن در آرتمياي بكرزا مي‌باشد.

همچنين بر اساس نتايج حاصل از اين مطالعه، كمترين و بيشترين مقدار اندازه‌گيري شده در ميان اين ۷ نوع MAAs به ترتيب مربوط به Asterina-330 و Mycosporine-2glycine مي‌باشد.

بحث

تاكنون هيچ متازوآيي يافت نشده كه قادر به سنتز MAAs باشد. نتايج مطالعات متعدد اين باور را كه مصرف كنندگان، MAAs را از غذاي خود جذب و ذخيره مي‌كنند، تصديق مي كنند. بر اين اساس، Carrol و Shick (۱۹۹۶) در مطالعه‌اي توتياي دريايي سبز (*Strongylocentrotus droebachiensis*) را به مدت نه ماه در دو تيمار جداگانه با جلبک قرمز *Mastocarpus stellatus* (غني از MAAs) و جلبک قهوه‌اي *Laminaria saccharina* (فاقد MAAs) تغذيه كردند. نتايج آن‌ها حاكي از افزايش معني‌دار ميزان كل MAAs موجود در تخمدان توتياهاي ماده تغذيه شده با جلبک قرمز بود. در تجربه‌اي مشابه، Mason و همكارانش (۱۹۹۸) با افزودن درصد مشخصي از جلبک قرمز *Mastocarpus stellatus* (غني از MAAs) به غذاي فرموله ماهي *Oryzias latipes* امكان انتقال MAAs در زنجيره غذايي را مورد بررسي قرار دادند. آن‌ها مشاهده كردند كه غلظت دو MAAs (Palythine و Asterina-330) در بافت چشم ماهي مذكور در طي دوره ۱۵۰ روزه تيمار تغذيه با جلبک قرمز از ميزان پايه ۰/۰۱۷ به ۰/۱۵ نانومول بر ميلي گرم وزن خشک مي‌رسد، در حالي كه در ماهيان كنترل به ميزان قابل توجهي كاهش داشته است. همچنين نسبت Palythine به Asterina-330 (۱ : ۵/۶۶) نيز مشابه نسبت آن‌ها در جلبک قرمز (۱ : ۶/۳۶) مورد نظر بود كه آن را دليل محكمي بر منشاء تغذيه‌اي MAAs در اين ماهي دانستند. Carefoot و همكاران (۲۰۰۰) در بررسي تاثير جيره غذايي بر تجمع MAAs در خرگوش دريايي (*Aplysia dactylomela*)، از سه نوع جلبك قرمز شامل *Acanthophora spicifera*, *Centroceras clavulatum* و *Laurencia sp.* و جلبك سبز *Ulva lactuca* در تغذيه آن استفاده كردند. نتايج آن‌ها نشان داد كه همبستگي بالايي ميان ميزان و نوع MAAs تجمع يافته در بافت‌هاي بدن خرگوش دريايي با نوع جيره غذايي وجود دارد. به طور كلي بالاترين سطوح MAAs در گروه تغذيه شده با جلبک قرمز *Acanthophora* و پايين‌ترين سطوح نيز در گروه تغذيه شده با جلبك سبز *Ulva lactuca* مشاهده شد كه به ترتيب حاوي بيشترين و كمترين مقادير MAAs در ميان جلبک‌هاي مورد مطالعه بودند. Newman و همكارانش (۲۰۰۰) نيز ارتباط مثبتي ميان غلظت MAAs گوناگون در بدن كريل قطب جنوب (*Euphausia superba*) و جلبک *Phaeocystis antarctica* مورد تغذيه آن‌ها يافتند. نتايج آن‌ها همچنين نشان داد كه ميزان MAAs طي ۳۵ روز گرسنگي بعد از پايان دوره تغذيه كاهش قابل ملاحظه‌اي يافته است. Helbling و همكاران (۲۰۰۲) با مطالعه دو گونه سخت پوست *Amphitoe valida* و *Idothea baltica* تغذيه شده با دو جيره غذايي متفاوت از لحاظ ميزان MAAs در نتايج مشابهي دريافتند كه ميزان MAAs در سخت پوستان تغذيه شده با جلبک قرمز *Polysiphonia sp.* (غني از MAAs) بيش از آن‌هايي است كه با جلبک‌هاي سبز *Codium sp.* و *Enteromorpha sp.* (فاقد MAAs) تغذيه شدند.



نمودار ۱- تاثیر تغذیه با دو جلبک ***Dunaliella salina*** سبز و قرمز بر میزان تجمع ۷ نوع **MAAs** مختلف (بر حسب نانومول بر گرم وزن خشک) در ***A. urmiana*** و ***Artemia*** **parthenogenetic** (میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار).

جدول ۱- نتایج تحلیل آزمون **t** با نمونه‌هاي جفتي روي میزان ۷ نوع **MAAs** مختلف (بر حسب نانومول بر گرم وزن خشک) در ۲ جلبک ***Dunaliella salina*** سبز و قرمز. سطح معني داري ۵ درصد (***P* = 0.05**).

مایکوسپرین	PL	Myc-G:V	PR	PI	Myc-2G	SH	AS
جلبک سبز	۰/۱۹±۰/۰۱^{a}	۵/۶±۰/۰۵^{a}	۱۹/۹۱±۰/۲۲^{a}	۰/۹۲±۰/۰۳^{a}	۵۳/۷۴±۲/۸۹^{a}	۴۲/۷۵±۱/۸۱^{a}	۰/۱۸±۰/۰۲^{a}
جلبک قرمز	۰/۲۵±۰/۰۲^{b}	۱۲/۶۴±۰/۰۴^{b}	۳۸/۲۴±۰/۱۳^{b}	۱/۸۶±۰/۳۷^{b}	۷۸/۶۴±۲/۰۹^{b}	۷۳/۵۵±۰/۰۷^{b}	۰/۶۵±۰/۰۶^{b}

AS: Asterina-330; SH: Shinorine; Myc-2G: Mycosporine-2glycine; PI: Palythine; PR: Porphyra-334; Myc-G:V: Mycosporine-glycine:valine; PL: Palythinol

جدول ۲- نتایج تحلیل واریانس چند متغیري روي میزان ۷ نوع **MAAs** در ۲ متغیر تغذیه و نوع جمعیت. سطح معني داري ۵ درصد (***P* = 0.05**).

MAA identity	Source	df	*F*	*p*
Asterina-330	Species	۱	۳۸۱/۴۵۴	۰/۰۰۰۱
	Diet	۱	۸۶۴/۳۹۱	۰/۰۰۰۱
	Species*Dite	۱	۲۵/۷۴۴	۰/۰۰۱
	Residual	۸		
Shinorine	Species	۱	۴۸۱۱/۹۱۹	۰/۰۰۰۱
	Diet	۱	۷۶/۹۷۳	۰/۰۰۰۱
	Species*Dite	۱	۲۰۰/۲۰۵	۰/۰۰۰۱
	Residual	۸		
Mycosporine-2glycine	Species	۱	۲۸۶۰۲/۳۷۲	۰/۰۰۰۱
	Diet	۱	۴۴۸۷۴/۹۲۱	۰/۰۰۰۱
	Species*Dite	۱	۱۲۳۵۴/۶۷۸	۰/۰۰۰۱
	Residual	۸		
Palythine	Species	۱	۶۳۶۹/۶۶۶	۰/۰۰۰۱
	Diet	۱	۴۳۹۴۵/۸۰۵	۰/۰۰۰۱
	Species*Dite	۱	۱۲۵۴/۳۰۱	۰/۰۰۰۱
	Residual	۸		
Porphyra-334	Species	۱	۸۱۵/۹۰۷	۰/۰۰۰۱
	Diet	۱	۱۳۴۴/۲۷۷	۰/۰۰۰۱
	Species*Dite	۱	۱۵۲/۸۰۷	۰/۰۰۰۱
	Residual	۸		
Mycosporine-glycine:valine	Species	۱	۷۴۶/۱۴۵	۰/۰۰۰۱
	Diet	۱	۶۲۶۴/۹۹۵	۰/۰۰۰۱
	Species*Dite	۱	۹۹۰/۶۷۸	۰/۰۰۰۱
	Residual	۸		
Palythinol	Species	۱	۲۹۷/۸۰۰	۰/۰۰۰۱
	Diet	۱	۱۶۰۷/۲۱۳	۰/۰۰۰۱
	Species*Dite	۱	۱۰/۰۳۴	۰/۰۰۰۱
	Residual	۸		

نتايج حاصل از اين تحقيق نيز بيانگر ارتباط نزديک ميان ميزان و نوع MAAs موجود در جيره غذايي (*Dunaliella salina*) با ميزان و نوع آن‌ها در بدن مصرف کنندگان (آرتميا) مي‌باشد. بر اين اساس، ميزان MAAs اندازه-گيري شده در هر دو جمعيت آرتمياي مورد مطالعه با تغيير رژيم غذايي از جلبک *Dunaliella salina* سبز به *Dunaliella salina* قرمز، به استثناي يک مورد، افزايش معني‌داري يافته است.

با در نظر گرفتن اين حقيقت که غلظت MAAs موجود در *Dunaliella salina* سبز رنگ در اثر استرس شوري و تبديل آن به *Dunaliella salina* قرمز رنگ به ميزان قابل توجهي افزايش يافته است، اين نتايج به وضوح نتايج مطالعات ديگران را تاييد مي‌کند. همچنين تشابه نوع و ميزان MAAs يافت شده در جيره غذايي (جلبک *Dunaliella salina*) و جانور مصرف کننده آن (آرتميا) خود دليل موجهي بر تاثير معني‌دار تغذيه بر نوع و ميزان MAAs موجود در مصرف کنندگاني مانند آرتميا مي-باشد. بر اين اساس کمترين و بيشترين مقادير MAAs يافت شده در جلبک توليد کننده (*Dunaliella salina*) و جانور مصرف کننده آن (*Artemia*) در اين مطالعه به ترتيب مربوط به Asterina-330 و Mycosporine-2glycine مي‌باشد.

علاوه بر آن، مقادير متفاوت MAAs در مصرف کنندگان را مي‌توان به جذب و انباشتگي انتخابي MAAs گوناگون در بافت‌هاي مختلف جانوران مصرف کننده ارتباط داد که به نوبه خود وجود مکانسيم‌ها و يا حاملين ويژه‌اي را در نقل و انتقال اين ترکيبات ضد UV تاييد مي‌کند (Mason *et al*., 1998). به عنوان مثال توتياي دريايي (*Strongylocentrotus droebachiensis*) اساسا Shinorine را از جلبک قرمز *Chondrus crispus* جداسازي، جذب و ذخيره مي‌کند با وجود اينکه اين جلبک حاوي مقادير زيادي از ديگر MAAs از جمله Palythine، Asterina-330 و Usujirene مي‌باشد (Adams *et al*., 2001). اين در حالي است که ماهي *Oryzias latipes*، MAAs نظير Palythine و Asterina-330 را از جيره غذايي خود (*Mastocarpus stellatus*) جدا و در بدن خود انباشته مي‌کند (Mason *et al*., 1998). از آنجايي که Shinorine داراي ماهيت اسيدي بوده و Palythine و Asterina-330 ماهيتي خنثي دارند؛ مي توان ناقلين ويژه‌اي را براي نقل و انتقال آن‌ها در بدن مصرف کنندگان متصور شد. به علاوه اثر بازدارنده غلظت مشابه Porphyra-334 بر ميزان جذب Shinorine از طريق لوله گوارش خيار دريايي را مي توان به تشابه ساختار شيميايي اين دو MAAs ربط داد که در آن صورت اين خود دليل ديگري بر اين مدعاست که جذب MAAs در جانوران مصرف کننده از طريق مکانيسم‌هايي با واسطه ناقلين ويژه صورت مي‌پذيرد تا فرايند انتشار (Shick and Dunlap, 2002). از طرف ديگر مشاهدات ما حاکي از آن بود که به جز دو MAAs ، Shinorine و Porphyra-334 در بقيه موارد ميزان MAAs در آرتمياي بکرزا به طور معني‌داري بيش از *A. urmiana* مي باشد. اين در حالي است که مي‌دانيم آرتمياي بکرزا در طبيعت در شرايط نامساعدتري نسبت به *A. urmiana* زندگي مي‌کند. عمق آب برکه‌هاي اطراف درياچه ارروميه که زيستگاه اين آرتمياي بکرزا است از چند سانتيمتر تجاوز نمي‌کند و به تبع خواص فيزيکوشيميايي آب اين برکه‌ها به شدت تحت تاثير عوامل محيطي (دما، تابش اشعه فرابنفش و غيره) قرار دارد (Agh *et al*., 2008). لذا نتايج تحقيق حاضر مبني بر توانايي بيشتر آرتمياي بکرزا در تجمع MAAs را مي توان يکي از دلايل سازش يافتگي بالاي اين آرتميا نسبت به شرايط سخت و استرس‌آور ياد شده، دانست.

بر اساس نتايج تحقيق حاضر استفاده از جلبک دونالیلا سالیناي قرمز در تغذيه آرتميا مي‌تواند به طور معني‌داري سبب تجمع مقادير بالاتري از MAAs در آرتميا، خصوصا آرتميا بکرزا شود. بنابراين، با در نظر گرفتن نقش بسيار مهم آرتميا در صنعت آبزي پروري به عنوان غذاي زنده و حامل مواد گوناگون و نيز قابليت انتقال MAAs از طريق زنجيره‌هاي غذايي، استفاده از آرتمياي ياد شده (به عنوان حامل اين مواد ارزشمند) در جيره غذايي آبزيان پرورشي

به خصوص در مراحل اولیه رشد و گونه‌هاي حساس به تابش فرابنفش، احتمالا مي‌تواند سبب کاهش اثرات مخرب اشعه UV و تلفات و خسارات ناشي از آن در این صنعت گردد.

References

- Adams, N.L., Shick, J.M., Dunlap, W.C., 2001. Selective accumulation of mycosporine-like amino acids in ovaries of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* is not affected by ultraviolet radiation. Marine Biology 138, 281–94.
- Agh, N., Van Stappen, G., Bossier, P., Sepehri, H., Lotfi, V., Razavi Rouhani, S.M., Sorgeloos, P., 2008. Effects of salinity on survival, growth, reproductive and life span characteristics of *Artemia* populations from Urmia Lake and neighboring lagoons. Pakistan Journal of Biological Sciences 11, 164-172.
- Buma, A.G.J., Boelen, P., Jeffrey, W.H., 2003. UVR-induced DNA damage in aquatic organisms. In: Helbling, E.W., Zagarese, H.E., (Eds.), UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 291–327.
- Carefoot, T.H., Karentz, D., Pennings, S.C., Young, C.L., 2000. Distribution of Mycosporine-like amino acids in the sea hare *Aplysia dactylomela*: effect of diet on amounts and types sequestered over time in tissues and spawn. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 126, 91–104.
- Carreto, J.I., Carignan, M.O., Montoya, N.G., 2001. Comparative studies on mycosporine-like amino acids, paralytic shellfish toxins and pigment profiles of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* and *A. minutum*. Marine Ecology Progress Series 223, 49–60.
- Carroll, A.K., Shick, J.M., 1996. Dietary accumulation of mycosporine-like amino acids (MAAs) by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). Marine Biology 124, 561–69.
- Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. Hydrobiologia 234, 25-32.
- Fisher, M., Pick, U., Zamir, A., 1994. A salt-induced 60-kilodalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella*. Journal of Plant Physiology 106, 1359-1365.
- Grant, P.T., Middleton, C., Plack, P.A., Thomson, R.A., 1985. The isolation of four aminocyclohexenimines (mycosporines) and a structurally related derivative of cyclohexane-1:3-dione (gadusol) from the brine shrimp, *Artemia*. Comparative Biochemistry and Physiology 80, 775-759.
- Halliday, G.M., Norval, M., Byrne, S.N., Huang, X.X., Wolf, P., 2008. The effects of sunlight on the skin. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms 5, 1-9.
- Helbling, E.W., Menchi, C.F., Villafañe, V.E., 2002. Bioaccumulation and role of UV-absorbing compounds in two marine crustacean species from Patagonia, Argentina. Photochemistry and Photobiology Science 1, 820–825.
- Hessen, D.O., 2003. UVR and pelagic metazoans. In: Helbling, E.W., Zagarese, H.E., (Eds.), UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 401–430.
- Jeffrey, S.W., MacTavish, H.S., Dunlap, W.C., Vesk, M., Groenewoud K., 1999. Occurrence of UVA- and UVB-absorbing compounds in 152 species (206 strains) of marine microalgae. Marine Ecology Progress Series 189, 35–51.
- Jokinen, E.I., Salo, H.M., Markkula, S.E., Aaltonen, T.M., Immonen, A.K., 2000. Effects of ultraviolet light on immune parameters of the roach. Toxicology Letters 112, 303-310.
- Kieber, D.J., Peake, B.M., Scully, N.M., 2003. Reactive oxygen species in aquatic ecosystems. In: Helbling, E.W., Zagarese, H.E., (Eds.), UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 251–288.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 1996. Manual of the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, 295 pp.
- Lesser, M.P., Barry, T.M., 2003. Survivorship, development, and DNA damage in echinoderm embryos and larvae exposed to ultraviolet radiation (290–400 nm). Experimental Marine Biology and Ecology 292, 75-91.

- Mason, D.S., Schafer, F., Shick, J.M., Dunlap, W.C., 1998. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) are acquired from their diet by medaka fish (*Oryzias latipes*) but not by SKH1 hairless mice. Comparative Biochemistry Physiology 120, 587–98.
- McCulloch, A., 2003. Fluorocarbons in the global environment: a review of the important interactions with atmospheric chemistry and physics. Journal of Fluorine Chemistry 123, 21-29.
- Newman, S.J., Dunlap, W.C., Nicol, S., Ritz, D., 2000. Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquire a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae. Experimental Marine Biology and Ecology 255, 93–110.
- Pérez, P., Libkind, D., Del Carmen Diéguez, M., Summerer, M., Sonntag, B., Sommaruga, R., Van Broock, M., Zagarese, H.E., 2006. Mycosporines from freshwater yeasts: a trophic cul-de-sac. Photochemical and Photobiological Sciences 5, 25–30.
- Platt, U., Honninger, G., 2003. The role of halogen species in the troposphere. Chemosphere 52, 325-338.
- Shick, J.M., Dunlap, W.C., 2002. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. Annual Review of Physiology 64, 223–262.
- Shick, J.M., Ferrier-Pages, C., Grover, R., Allemand, D., 2005. Effects of starvation, ammonium concentration, and photosynthesis on the UV-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the coral *Stylophora pistillata*. Marine Ecology Progress Series 295, 135–156.
- Singh, S.P., Kumari, S., Rastogi, R.P., Singh, K.L. Sinha, R.P., 2008. Mycosporine-like amino acids (MAAs): Chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. Indian Journal of Experimental Biology 46, 7-17.
- Sinha, R.P., Singh, S.P., Häder, D-P., 2007. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. Photochemistry and Photobiology Part B: Biology 89, 29-35.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, Ph., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. University Press, Ghent, 319 pp.
- Tartarotti, B., Laurion, I., Sommaruga, R., 2001. Large variability in the concentration of mycosporine-like amino acids among zooplankton from lakes located across an altitude gradient. Limnology and Oceanography 46, 1546–1552.

Effect of Diet on Mycosporines Accumulation in *Artemia urmiana* and Parthenogenetic *Artemia*

S. Khosravi [1], S. Khodabandeh [*1], N. Agh [2] and M. Bakhtiarian [1]
[1] Department of Marine Biology, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran
[2] *Artemia* & Aquatic Animals Research Institute**,** Urmia University, Urmia, I.R. Iran
(Received: 24/06/2011 , Accepted: 19/06/2012)

Abstract
Mycosporines are UV-absorbing metabolites which are produced via aromatic amino acids synthesis pathway (shikimate pathway). In the present study the effect of diet was examined on accumulation of these compounds in *Artemia urmiana* and parthenogenetic *Artemia*. The cysts of both strains were hatched under standard conditions. The larvae (instar-I nauplii) were directly transferred to the diluted Urmia Lake water (150 g l^{-1}), the salinity was then increased gradually up to 250 g l^{-1}. During the culture period, both *Artemia* strains were fed on two algal feeding regimes including green and red *Dunaliella salina*. Concentration of seven Mycosporines including Asterina-330, Shinorine, Mycosporine-2Glycine, Palythine, Porphyra-334, Mycosporine-Glycine:valine and Palythinol were measured in adult *Artemia* using HPLC at the end of experiment. Results showed significant increase in the concentration of mycosporines in both *Artemia* populations fed on red algae compared to those received green algae, except for Shinorine in *A.urmiana*. Parthenogenetic *Artemia* showed higher capability for accumulation of Mycosporines compared to *A. urmiana* in most cases.

Keyword: Mycosporine, *Dunaliella salina*, *Artemia urmiana*, Parthenogenetic *Artemia.*

*Corresponding author: Tel: +981226256114 Fax: +981226253499 E-mail:skhoda@modares.ac.ir