

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر مکمل غذایی پر بیوتیک پودر قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*)
بر بیان ژن های P450 و Hsp70 بافت کبد ماهی تیلاپیا نیل
(*Oreochromis niloticus*) در مواجهه با سم کلر پیریفوس

عاطفه ابری^۱، سید علی اکبر هدایتی^{۲*}، حامد پاکنژاد^۳، طاهره باقری^۴، سید رضا خالقی^۱

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۰

چکیده

افزایش ورود آفت کش هایی مانند سم کلر پیریفوس در اکوسیستم های آبی می تواند سبب ایجاد آسیب های زیان باری بر آبزیان شود. این پژوهش با هدف بررسی تاثیر مکمل غذایی پر بیوتیک پودر قارچ خوراکی *Pleurotus ostreatus* بر بیان نسبی ژن های مرتبط با ایمنی (P450 و Hsp70) در بافت کبد بچه ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) در مواجهه با سم کلر پیریفوس صورت گرفت. در این بررسی ۱۲۰ قطعه بچه ماهی تیلاپیا نیل با میانگین وزن 20 ± 0.4 گرم در چهار تیمار و سه تکرار تقسیم شدند و با جیره های حاوی ۰ (شاهد)، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد قارچ به مدت ۴۲ روز تغذیه شدند. پس از پایان دوره تغذیه، تمام تیمارها به مدت ۱۴ روز در مواجهه با غلظت تحت کشنده سم کلر پیریفوس قرار گرفتند. نمونه برداری از بافت کبد برای ارزیابی بیان نسبی ژن های یاد شده در آخرین روز دوره تغذیه با قارچ و در چهاردهمین روز مواجهه با سم کلر پیریفوس صورت گرفت. میزان بیان نسبی P450 در تیمارهای ۰/۲ و ۰/۱ افزایش قابل توجهی داشت ولی تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۱ بعد از مواجهه با سم تفاوت معنی داری نسبت به گروه شاهد نداشتند ($P > 0.05$). بیان ژن Hsp70 در تیمارهای تغذیه شده با مکمل غذایی قبل و بعد از مواجهه با سم تفاوت معنی داری داشت ($P < 0.05$)، به طوری که در تیمار ۰/۲ افزایش یافت. ولی در تیمار ۰/۰۵ تفاوت معنی داری نسبت به تیمار شاهد نداشت ($P > 0.05$). نتایج این مطالعه نشان دهنده اثرات مثبت مکمل غذایی پر بیوتیک *Pleurotus ostreatus* بر بیان نسبی ژن های Hsp70 و P450 در بچه ماهی تیلاپیا نیل و تقویت دستگاه ایمنی آن در مواجهه با آلاینده ها و مواد تنش زا چون کلر پیریفوس است.

واژگان کلیدی: آفت کش، بیان ژن، ماهی تیلاپیا نیل، کلر پیریفوس، پر بیوتیک.

۱- دانشجوی دکتری بوم شناسی آبزیان، گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- استاد گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۴- استادیار مرکز تحقیقات شیلاتی آب های دور، موسسه تحقیقات شیلات ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.

* نویسنده مسئول: Hedayati@gau.ac.ir

مقدمه

پربیوتیک (Prebiotic) ماده غذایی غیرقابل هضمی است که از طریق تحریک رشد و فعالیت یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های موجود در روده، اثرات سودمندی برای میزبان دارد (Schrezenmeir and De Vrese, 2001)، مصرف مکمل‌های غذایی پربیوتیک سبب کاهش تنوع میکروبی و افزایش باکتری‌های مفید مانند *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* و کاهش باکتری‌های بیماری‌زا مانند گونه‌های *Aeromonas* و *Vibrio* می‌شود (Ringo et al., 2010). به نظر می‌رسد که قارچ‌ها مورد مناسبی برای پربیوتیک‌های طبیعی باشند زیرا شامل کربوهیدرات‌هایی مانند کیتین، همی سلولز، بتا و آلفا گلوکان‌ها و گالاکتان‌ها هستند و ترکیبات پلی ساکاریدی قارچ به عنوان پربیوتیک عمل می‌کنند (Gibson et al., 2004). قارچ‌ها به علت داشتن شمار زیادی از ترکیبات فعال زیستی به عنوان یک مکمل غذایی طبیعی مورد تایید قرار گرفته‌اند (Wasser, 2002). بتاگلوکان موجود در قارچ می‌تواند با اتصال به گیرنده‌های پروتئینی موجود در سطح ماکروفاژها منجر به فعال شدن آنها و در نتیجه

امروزه استفاده بیش از حد آفت‌کش‌ها به علت افزایش رونق کشاورزی سبب ورود این آلاینده‌ها به اکوسیستم‌های آبی شده است و آسیب‌های جبران ناپذیری را به محیط زیست گونه‌های آبی وارد کرده است. کلرپیریفوس (Chlorpyrifos: CPF) از حشره‌کش‌های ارگانوفسفره پرمصرف است که در کشاورزی برای محدود کردن حشرات به کار برده می‌شوند. استفاده از این سموم به علت توزیع گسترده در محیط آبی، اثرگذاری وسیعی در جانداران غیرهدف مانند بی‌مهرگان، پرندگان، پستانداران، ماهی‌ها و محیط زیست دارد (Castano et al., 1986). این سم ممکن است از طریق آبشش، پوست و سیستم گوارشی ماهی‌ها جذب و از طریق خون در بافت‌های دیگر توزیع شود. تجمع زیستی این آفت‌کش و رادیکال‌های آزاد شده در طی فرآیند سم‌زدایی آن در بافت کبد ممکن است بر عملکرد فیزیولوژی سلول‌ها تاثیر بگذارد (Xing et al., 2012). سموم ارگانوفسفره به طور عمومی سمیت بالایی دارند و مهم‌ترین عامل بیماری و مرگ‌ومیر ناشی از مسمومیت‌ها در کشورهای جهان سوم هستند (Hoffman and Papendorf, 2006).

برابر استرس گرما (Hsp) را در تیلاپای نیل تغذیه شده با جیره‌های غذایی قارچ دکمه سفید به مدت ۶۰ روز انجام دادند و مشاهده کردند که بیان نسبی ژن Hsp70 در مکمل قارچ دکمه‌ای در مقادیر ۰/۵ تا ۴ درصد کاهش یافت ($P < 0/05$). با توجه به این نتایج می‌توان استفاده از قارچ دکمه‌ای را برای مقابله با اثر تنش گرما بر آبی‌پروری تیلاپای نیل و بهبود رشد توصیه کرد. همچنین Dawood و همکاران (۲۰۲۰a) نقش ماننانولیگوساکارید (MOS) را در کاهش اثرات جانبی کلرپیریفوس در بیان ژن‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی ماهی تیلاپیا بررسی کردند و دریافتند که بیان ژن Hsp70 با سمیت CPF تنظیم شده است و به این نتیجه رسیده‌اند که پرپیوتیک مننانولیگوساکارید می‌تواند از اثرات جانبی سم کلرپیریفوس در ماهی تیلاپای نیل جلوگیری کند. Mokhbatly و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی نقش حفاظتی *Spirulina* و بتاگلوکان در گربه‌ماهیان آفریقایی (*Clarias gariepinus*) در برابر سمیت مزمن کلرپیریفوس مشاهده کردند که منجر به افزایش بیان ژن سیتوکروم (CYP1A-P450) P450 نسبت به گروه شاهد شد و استفاده از جیره غذایی *Spirulina* به تنهایی یا همراه با

حفظ و تقویت سیستم ایمنی شود (Van Loo and Gibson, 2006).

ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) از خانواده سیکلیده (Cichlidae)، بعد از کپورماهیان دومین گروه مهم ماهیان پرورشی به حساب می‌آیند. این ماهیان به علت توانایی بالا در سازگاری با شرایط نامساعد محیطی، تکثیر در محیط‌های پرورشی، مقاوم در برابر استرس و بیماری‌ها، تغذیه از سطوح پایین غذایی و نرخ رشد بالا از اهمیت پرورشی بالایی برخوردار هستند (Welker et al., 2011).

Yousefi و Hoseinifar (۲۰۱۸) اثرات کاهش دهنده احتمالی گالاتولگوساکارید (GOS) را بر سم کلرپیریفوس در ماهی گورخری (*Danio rerio*) تخمین زده‌اند. نتایج آنها نشان داد که تغذیه با ۱ درصد پرپیوتیک GOS باعث افزایش کل سطح پروتئین و سطح ایمونوگلوبولین شد ($P < 0/05$). این یافته‌ها نشان داد جیره غذایی با مکمل GOS می‌تواند در پاسخ به تعدیل ایمنی مفید باشد و بر کاهش اثرات جانبی سم کلرپیریفوس با اضافه کردن پرپیوتیک در جیره غذایی این ماهی تاثیرگذار است (Yousefi and Hoseinifar, 2018). در مطالعه‌ای دیگر، Dawood و همکاران (۲۰۲۰b) ارزیابی ژن‌های مرتبط با مقاومت در

منظور انگل‌زدایی در آب نمک (NaCl) با غلظت ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه حمام داده شدند و سپس به مدت ۴۸ ساعت برای کاهش تلفات احتمالی و استرس، غذادهی نشدند.

طراحی آزمایش و تیمار بندی ماهیان

در این آزمایش از قارچ صدفی *Pleurotus ostreatus* به عنوان پریبیوتیک استفاده شد و آزمایش در دو مرحله شامل مرحله اول تیمار با پروبیوتیک و مرحله دوم مواجهه با سم کلرپیریفوس انجام شد. در مرحله اول تیمار بندی بچه ماهیان در قالب چهار تیمار با سه تکرار انجام شد که شامل تیمار ۱ (شاهد) تغذیه با جیره پایه بدون پریبیوتیک، تیمار ۲ تغذیه با جیره پایه حاوی ۰/۰۵ درصد مکمل پریبیوتیک (۰/۱ گرم قارچ در کیلوگرم جیره)، تیمار ۳ تغذیه با جیره پایه حاوی ۰/۱ درصد مکمل پریبیوتیک (۰/۲ گرم قارچ در کیلوگرم جیره) و تیمار ۴ تغذیه با جیره پایه حاوی ۰/۲ درصد مکمل پریبیوتیک (۰/۴ گرم قارچ در کیلوگرم جیره) بود (Van Doan et al., 2017). در این آزمایش از غذای تجاری ماهی کپور معمولی (فراوانه، ایران) به عنوان جیره پایه استفاده شد (جدول ۱).

بتاگلوکان به طور قابل توجهی تغییراتی که توسط سم ایجاد شده بود را کاهش داد.

افزایش کشاورزی و صنعتی شدن آن و استفاده زیاد از سموم باعث افزایش آلاینده‌هایی همچون سم کلرپیریفوس در آب شده است که این آلاینده‌ها سبب ایجاد پاسخ تنش در ماهیان می‌شوند و عملکرد ایمنی ماهیان را کاهش می‌دهند. مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر استفاده از پودر قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) بر روی بیان ژن و در نهایت امکان کاهش سمیت کلرپیریفوس در بچه ماهیان تیلاپپای نیل صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری بچه ماهی‌ها

این پژوهش به مدت ۵۶ روز در مرکز تحقیقات آبی‌پروری شهید فضلی برآبادی و آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی آبزیان گروه تکثیر و پرورش آبزیان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ۱۲۰ قطعه بچه ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) از کارگاه بخش خصوصی تهیه و به محل آزمایش منتقل شدند. ابتدا ماهی‌ها به

جدول ۱: ترکیبات تشکیل دهنده جیره پایه

ترکیب جیره	پروتئین خام	چربی خام	فیبر خام	خاکستر	رطوبت	فسفر کل
مقدار (%)	۳۵-۳۸	۴-۸	۴-۷	۷-۱۱	۵-۱۱	۱-۱/۵

تراکم ۱۰ قطعه در هر وان، توزیع شدند (چهار تیمار با سه تکرار). ماهیان به مدت ۶ هفته بر اساس تیمار بندی با جیره های غذایی دارای مکمل پر بیوتیک (پودر قارچ صدفی) تغذیه شدند، بجز تیمار شاهد که جیره غذایی آن فاقد مکمل بود. غذاهای بچه ماهی ها به صورت دستی، روزانه در ۲ وعده به میزان ۳ درصد وزن بدن انجام شد (جافرنوده، ۱۳۹۵). در طی دوره آزمایش شاخص های فیزیکی و شیمیایی آب شامل اکسیژن محلول (۹-۷ میلی گرم در لیتر) و دما (۲۸-۲۵ درجه سانتی گراد) نیز اندازه گیری شدند.

مواجهه بچه ماهی ها با غلظت تحت کشنده سم کلرپیریفوس

پس از پایان ۶ هفته دوره تغذیه با جیره حاوی مکمل پودر قارچ صدفی (*P. ostreatus*) به عنوان پر بیوتیک، بچه ماهیان به مدت ۱۴ روز در مواجهه با سم کلرپیریفوس با غلظت ۰/۰۵ppm قرار گرفتند (حسن نتاج نیازی و همکاران، ۱۳۹۳). در طی مواجهه با سم روزانه ۵۰ درصد حجم آب تعویض شد و با اضافه کردن

برای آماده سازی جیره های آزمایشی ابتدا قارچ های صدفی (*P. ostreatus*) پر بیوتیک (قارچ پارس، ایران) خریداری شد و پس از خرد شدن به مدت ۴۸ ساعت در آون ۴۵ درجه سانتی گراد خشک و سپس به وسیله آسیاب برقی پودر شدند (Sevik et al., 2013). پودر قارچ با توجه به تیمار بندی طرح آزمایش ابتدا تقسیم شده، سپس با محلول ژلاتین ۴ درصد حل و با جیره پایه که قبلا با آسیاب پودر شده بود مخلوط شد. ترکیب به دست آمده با دستگاه میکسر (همزن) به صورت خمیر و بعد با چرخ گوشت به صورت رشته ای در آورده شد. رشته ها پس از خشک شدن در مجاورت هوا به پلت های کوچک تبدیل و در زیپ کیپ پلاستیکی در یخچال نگهداری شدند تا در دوره آزمایش مورد استفاده بچه ماهیان قرار گیرند (جافرنوده، ۱۳۹۵).

برای شروع آزمایش، بچه ماهیان، پس از دو هفته دوره سازگاری، در ۱۲ عدد وان ونیرو ۳۰۰ لیتری به عمق ۵۰ سانتی متر و حجم آب حدود ۱۰۰ لیتر، با میانگین وزنی $20 \pm 0/4$ گرم و

چینی استریل در مجاورت نیتروژن مایع، کوبیده و پودر شدند. سپس برای از بین بردن غشای سلولی و دسترسی به محتویات درون سلول، از کیت Geneall, TRIzol) RiboEx™ LS (Biotechnology، کره جنوبی) استفاده شد. در مرحله بعد برای ایجاد دو فاز آبی و آلی ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf، آلمان) شدند. پس از جدا کردن فاز روئی (فاز آبی)، برای رسوب RNA به آن ایزوپروپیل الکل اضافه شد و در آخر پس از شست‌وشو با اتانول ۷۵ درصد، پلت RNA رسوب داده شده در انتهای میکروتیوب قابل مشاهده بود. ارزیابی کمی RNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از نانودرآپ (Eppendorf، آلمان) سنجیده شد. در بررسی‌های کیفی RNA با استفاده از ژل الکتروفورز شدت باند SrRNA ۲۸ نسبت به باند SrRNA ۱۸، مورد ارزیابی قرار گرفت و فاقد DNA ژنومی بود. سپس ارزیابی کیفی RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی انجام و قابل مشاهده شد. برای سنتز cDNA از کیت SuPrimeScript RTase (GeNet Bio، کره جنوبی) استفاده شد و

میزان غلظت آلاینده از دست رفته میزان سم ثابت نگه داشته شد. در این مرحله، غذایی برای تمام تیمارها با جیره پایه، روزانه طی ۲ مرحله به میزان ۱/۵ درصد وزن انجام شد.

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از بافت کبد برای تعیین بیان ژن در دو مرحله شامل مرحله اول قبل از مواجهه با سم کلرپیریفوس (پایان ۶ هفته تغذیه با مکمل غذایی) و مرحله دوم پس از پایان ۱۴ روز مواجهه با سم کلرپیریفوس صورت گرفت. به دلیل حساسیت بالای آزمایش، نمونه‌برداری در شرایط کاملا استریل انجام شد. ابتدا برای نمونه‌برداری از هر تیمار ۳ ماهی به صورت تصادفی انتخاب شد و با استفاده از تیغ اسکالپل و پنس استریل نمونه‌های بافت کبد جدا و بلافاصله بعد از گذاشتن در میکروتیوب‌های علامت‌گذاری شده به تانک نیتروژن مایع منتقل شدند. و در نهایت نمونه‌های کبد برای نگهداری تا روز آزمایش به فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج RNA

ابتدا نمونه‌های کبد مربوط به هر تکرار از تیمارها با هم مخلوط شدند و در هاون‌های

مرجع β -actin صورت گرفت (Larionov et al., 2005).
 برای اطمینان از بهینه بودن شرایط Real Time PCR، با استفاده از منحنی استاندارد سری غلظت‌های مختلف (۱:۱۰، ۱:۲۵، ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰) از نمونه‌های cDNA از تیمارهای متفاوت هر پلیت بافت کبد تهیه و با هر دو آغازگر هدف و مرجع در سه تکرار تکثیر شدند و منحنی استاندارد برای تخمین کارایی و تکرارپذیری آزمایش برای هر آغازگر ترسیم شد (Ramakers et al., 2003). همچنین بررسی تغییر در بیان نسبی mRNA با روش منحنی استاندارد ارزیابی شد (Larionov et al., 2005).
 RNA تک‌رشته‌ای به دو رشته‌ای تبدیل شد. آغازگرهای مورد آزمایش (جدول ۲) بر اساس مطالعات قبلی تعیین و با استفاده از نرم‌افزار باوادیت (Bio Edit) با توالی موجود در بانک ژن NCBI (National Center for Biotechnology Information) آزموده شدند. کارایی آغازگرها با تکنیک PCR (Polymerase Chain Reaction) بررسی شد و بهترین دما برای تکثیر و انجام Real Time PCR به دست آمد. آزمون Real Time PCR با استفاده از نشانگر فلورسنسی YTA SYBR Green qPCR MasterMix 2X برای سنجش میزان محصول به دست آمده بر اساس یک دستور العمل استاندارد انجام شد. همچنین نرمال‌سازی بیان ژن هدف با استفاده از ژن

جدول ۲: توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن

نام ژن	توالی آغازگرها	دما اتصال (C) ^o	طول قطعه (bp)
Hsp70	رفت	۶۰	۱۸۹
	برگشت	۶۰	
P450	رفت	۶۰	۱۷۹
	برگشت	۶۰	
*β-actin	رفت	۶۰	۱۷۴
	برگشت	۶۰	

*: ژن β -actin به منزله ژن مرجع انتخاب شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

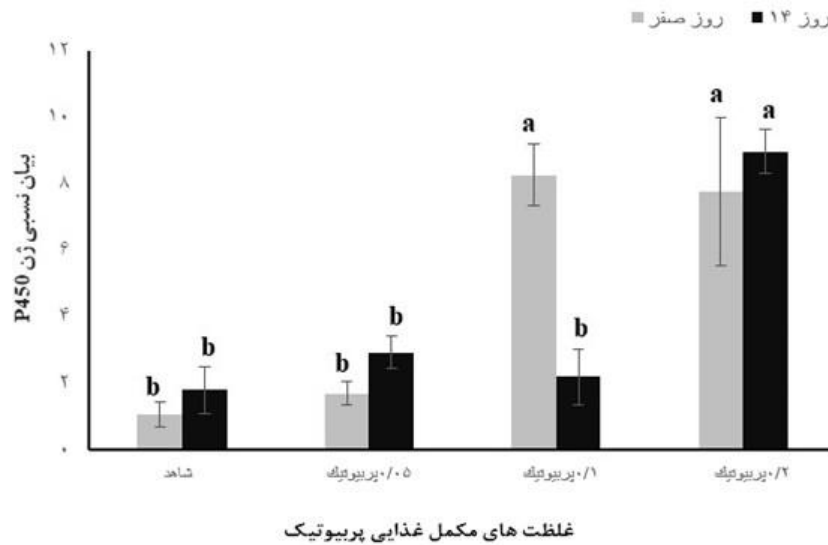
این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تیمار (شاهد و سه تیمار تغذیه شده با غلظت‌های مختلف پربیوتیک پودر قارچ) با سه تکرار اجرا شد. CT به دست آمده برای ژن‌های Hsp70، P450 و β -actin به عنوان ژن مرجع با استفاده از رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ برابر است با ΔCT ژن هدف منهای ΔCT کالیبراتور) تبدیل به بیان نسبی ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن مرجع β -actin شد (Livak and Schmittgen, 2001). سپس مقادیر به دست آمده برای بیان نسبی هر ژن نسبت به ژن مرجع با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) در نرم‌افزار SPSS 22 بررسی شدند. نمودارها نیز به وسیله نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 رسم شدند.

نتایج

بیان نسبی ژن P450

نتایج تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در بیان ژن سیتوکروم P450 در تمامی بچه ماهیان تیلاپیای نیل تیمارهای تغذیه شده

با جیره دارای پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) و شاهد و در مواجهه با غلظت تحت‌کشنده سم کلرپیریفوس تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$; شکل ۱). در تیمارهای تغذیه شده با پربیوتیک در انتهای دوره، قبل از قرارگیری در معرض سم (روز صفر)، در تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲ درصد پربیوتیک نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$). میزان بیان ژن در تیمارهای تغذیه شده با پربیوتیک با افزایش غلظت پربیوتیک افزایش قابل مشاهده‌ای نسبت به گروه شاهد داشت. بعد از ۱۴ روز مواجهه با سم کلرپیریفوس، تیمارهای ۰/۱ و ۰/۵ درصد پربیوتیک تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشتند ولی نسبت به گروه شاهد افزایش یافتند. در تیمار ۰/۱ درصد پربیوتیک بعد از مواجهه با سم نسبت به قبل از مواجهه، بیان ژن روند کاهشی داشت. اما در تیمار ۰/۲ درصد پربیوتیک یک روند افزایشی بعد از مواجهه با سم نسبت به قبل از مواجهه مشاهده شد. کمترین میزان بیان ژن در تیمار شاهد قبل از مواجهه با سم و بیشترین میزان در تیمار ۰/۲ درصد پربیوتیک بعد از مواجهه با سم بود.



شکل ۱: بیان ژن سیتوکروم P450 در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف مکمل پربیوتیک قارچ صدفی *Pleurotus ostreatus* قبل (روز صفر) و بعد (روز ۱۴) از مواجهه با سم کلریپریفوس (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری است ($P < 0.05$).

۰/۲ درصد پربیوتیک بود. بین تیمارهای ۰/۰۵ درصد پربیوتیک و شاهد روز ۱۴ (پس از مواجهه با سم کلریپریفوس) نسبت به گروه شاهد روز صفر (قبل از مواجهه با سم) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین در تیمارهای ۰/۲ درصد پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با سم میزان بیان ژن نسبت به گروه شاهد روند افزایشی داشت، ولی در تیمار ۰/۲ درصد پربیوتیک روز ۱۴ نسبت به روز صفر روند کاهشی داشت. تیمارهای ۰/۰۵ درصد پربیوتیک و شاهد روز ۱۴ تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد صفر نداشتند.

بیان نسبی ژن Hsp70

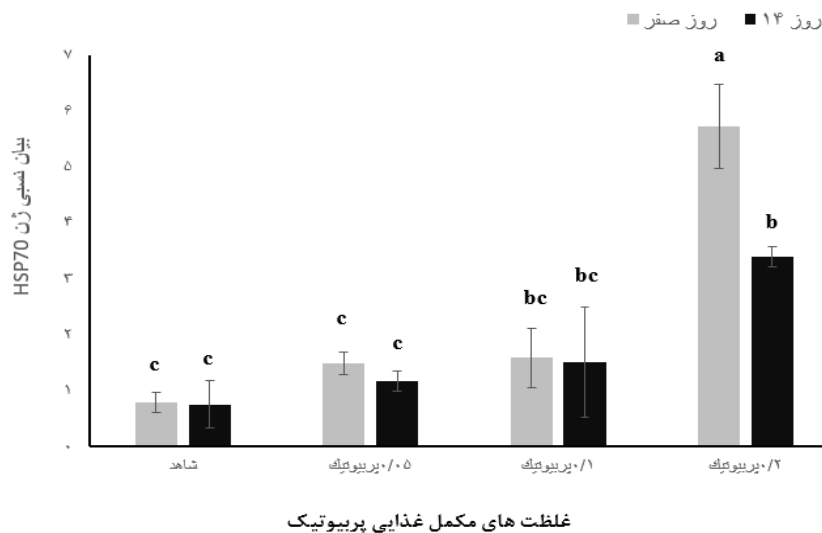
نتایج سنجش سطح بیان ژن Hsp70 طی روزهای صفر و ۱۴ مواجهه با سم کلریپریفوس بیان ژن Hsp70 در تمام تیمارهای آزمایشی تفاوت معناداری داشت ($P < 0.05$; شکل ۲). در کلیه تیمارهای آزمایشی پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با سم کلریپریفوس بیان ژن نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). کمترین مقدار بیان ژن Hsp70 مربوط به تیمار شاهد بعد از مواجهه با سم کلریپریفوس و بیشترین میزان مربوط به تیمار

سمیت شود. با توجه به مسمومیت حاد و اثرات مضر آلاینده در ماهی، برای جانداران آبرزی و همچنین برای سلامتی انسان یک تهدید جدی محسوب می‌شود. سموم ارگانوفسفره همانند کلرپیریفوس به هنگام ورود به بدن موجود زنده، تحت تاثیر فرآیندهای متابولیسمی مختلف تولید رادیکال‌های آزاد می‌کنند که این رادیکال‌ها اغلب توانایی آسیب رساندن به ساختمان مولکول‌های زیستی مثل ماده ژنتیکی و پروتئین‌ها را دارند.

همچنین در تیمار ۰/۱ درصد پریبوتیک بعد از مواجهه با سم کلرپیریفوس نسبت به قبل آن تفاوت معنی‌داری نداشت. ولی در تیمار ۰/۲ درصد پریبوتیک روز ۱۴ نسبت به روز صفر و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ایجاد شد.

بحث

ورود آلاینده به اکوسیستم آبی و نفوذ در بافت‌های گیاهی و جانوری آبرزیان منجر به تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی می‌شود که این تغییرات می‌تواند سازگار باشد یا منجر به



شکل ۲: بیان ژن Hsp70 در تیمارهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف مکمل پریبوتیک فارچ صدفی *Pleurotus ostreatus* قبل (روز صفر) و بعد (روز ۱۴) از مواجهه با سم کلرپیریفوس (میانگین \pm خطای استاندارد). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری است ($P < 0.05$).

اکوسیستم‌های طبیعی به وجود آورده است. در مطالعه Hyne و Maher (۲۰۰۱) بر میزان تجمع سموم ارگانوفسفره در بافت‌های مختلف ماهی‌ها (ماهیچه، چربی و آبشش)، بیشترین تجمع بافتی این سموم در بافت کبد مشاهده شد. استفاده از مکمل‌های غذایی برای کنترل زیستی بیماری‌ها و بهبود سیستم ایمنی در ماهیان گسترش یافته است (Hoseinifar et al., 2011).

پروتئین شوک حرارتی Hsp70 از میان ایزوفرم‌های مختلف، نوعی پروتئین است که در هنگام ورود انواع آلودگی‌ها، بیان آنها افزایش می‌یابد. تغییرات مختلفی از میزان بیان پروتئین Hsp70 در بافت ماهی‌ها در پاسخ به آلودگی‌های زیست محیطی مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفته است (Iwama et al., 1999). در مطالعه حاضر، نتایج بررسی سطوح بیان Hsp70 بین تیمارهای مختلف آزمایشی نشان داد که مقدار بیان این ژن در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با سم کلرپیریفوس روند افزایشی داشت ($P < 0.05$). مشاهدات بسیاری درباره تاثیر سموم کشاورزی بر بیان ژن Hsp70 در ماهیان مختلف صورت گرفته است از جمله تاثیر سم کلرپیریفوس در بیان ژن ماهی قزل‌آلای

ترکیبات ارگانوفسفره به علت چربی‌دوست بودن به راحتی از طریق پوست، آبشش و سیستم گوارش جذب می‌شوند و از سد خونی-مغزی عبور می‌کنند (Vale, 1998).

در طی سال‌های گذشته پژوهش‌های مختلفی با استفاده از پربیوتیک‌ها به عنوان مکمل غذایی در جیره غذایی ماهی‌ها و آبزیان دیگر به حالت‌های مختلف انجام شده است که می‌تواند سبب مقاومت ایمنی ذاتی ماهی را در برابر عوامل بیماری‌زا در فرآیندهای پرتنش بهبود بخشد (Bricknell and Dalmo, 2005). قارچ به عنوان یک پربیوتیک طبیعی شناخته شده است که حاوی پلی‌ساکاریدهایی است که مواد مغذی لازم را برای کلونی‌سازی باکتری‌های مفید همانند باکتری‌های لاکتیک اسید فراهم می‌کند. بتاگلوکان موجود در قارچ می‌تواند باعث تحریک ماکروفاژها شود. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که دیگر ترکیبات موجود در قارچ مانند لنتینان و شیزوفیلان باعث تحریک تکثیر لنفوسیت‌های T و شاخص‌های ایمنی همورال می‌شوند. قارچ می‌تواند جایگزین خوبی برای مواد دارویی باشد (Aida et al., 2009). نبود دانش کافی از اثرات جانبی و زیانبار سم کلرپیریفوس برای منابع طبیعی و موجودات، نگرانی‌هایی را درباره ورود آنها به

اتفاق بیفتد و وابسته به درجه عامل استرس‌زا است. بیان بیش از حد ژن Hsp70 ممکن است به استرس اکسیداتیو یا تغییر در سیتوکین‌های التهابی ناشی از قرار گرفتن در معرض این آفتکش مربوط باشد (Liu et al., 2013).

آنزیم سیتوکروم P450 مسئول متابولیسم اکسیداتیو ترکیباتی چون پروستاگلاندین‌ها، اسیدهای چرب، استروئیدها و همچنین مواد شیمیایی سرطان‌زا و آلاینده‌های زیست محیطی است (Norman and Henry, 2015). تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مطالعه حاضر نشان داد که بیان P450 در تمامی تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های غذایی پربیوتیک قبل و بعد از مواجهه با غلظت تحت کشنده سم کلرپیریفوس تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). گزارش‌های متعددی از تاثیر سم بر بیان ژن سیتوکروم P450 در ماهیان مختلف ارائه شده است. در گزارش Xing و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با بررسی تاثیر سم آترازین (ATR) و کلرپیریفوس (CPF) بر ایمنی و سیتوکروم P450 در بافت کبد ماهی کپور معمولی مشخص شد که سطح mRNA ژن‌های CYP و CYP1A در کبد کپور معمولی در معرض ATR و CPF افزایش معنی‌داری داشت و در تیمارهای در معرض سم، این

رنگین‌کمان که افزایش معنی‌داری در بیان ژن Hsp70 داشت ($P < 0.05$) (Benedetto et al., 2016). همچنین در مطالعه Xing و همکاران (۲۰۱۳) که اثر آترازین و کلرپیریفوس را بر سطح بیان ژن‌های Hsp70، HSC70 و HSP60 در بافت‌های بدن از جمله قلب، عضله، کبد، مغز، کلیه و آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بررسی کردند، نتایج نشان داد که بیان این ژن‌های به طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت ($P < 0.05$). این گزارش‌ها با یافته‌های مطالعه حاضر در مورد بیان ژن Hsp70 مغایرت دارد. با این حال، در مطالعه Dawood و همکاران (۲۰۲۰b) بر تاثیر جیره‌های غذایی دارای مکمل قارچ دکمه‌ای سفید بر ژن‌های مرتبط با ایمنی ماهی تیلاپای نیل، بیان نسبی ژن Hsp70 در ماهیان تغذیه شده با مکمل قارچ دکمه‌ای در مقادیر ۰/۵ تا ۴ درصد روند کاهشی داشت ($P < 0.05$) که با نتایج به دست آمده در این مطالعه موید این موضوع نیست. عواملی مانند قرار گرفتن در معرض گرما، سرما و شوک‌های اسمزی و شیمیایی سبب افزایش بیان ژن Hsp70 می‌شود تا از موجودات آبی در برابر استرس‌های غیرزنده محافظت کند. افزایش بیان ژن Hsp70 ممکن است به صورت آستانه‌ای

سموم تجمع بالایی را در کبد نشان دادند. همچنین Mokhbatly و همکارانش (۲۰۲۰) در بررسی نقش حفاظتی *Spirulina* و بتاگلوکان در گربه‌ماهی‌های آفریقایی (*Clarias gariepinus*) در برابر سمیت مزمن کلرپیریفوس مشاهده کردند که قرار گرفتن در معرض کلرپیریفوس منجر به افزایش رونویسی بیان ژن سیتوکروم (CYP1A-P450) نسبت به گروه شاهد شد. این گزارش‌ها با مطالعه حاضر مطابقت دارند. ولی در مطالعه Fu و همکاران (۲۰۱۳) بر تأثیر سموم آترازین و کلرپیریفوس بر روی سیتوکروم P450 در آبشش کپور معمولی، محتوای P450 در ماهیانی که در معرض ATR و همچنین ترکیب دو سم قرار داشتند بالاتر از گروه شاهد بود. پس از اتمام دوره ۴۰ روزه آزمایش، محتوای P450 در ماهی کاهش معنی‌داری یافت و در تیمار مواجهه با سم کلرپیریفوس تفاوت معنی‌داری در سیتوکروم نسبت به گروه شاهد نشان نداد (Fu et al., 2013). در مطالعه حاضر، کاهش میزان بیان نسبی ژن P450 در تیمار ۰/۱ در روز ۱۴ ممکن است در اثر سازگاری با شرایط ناشی از برقراری تعادل یونی جدید باشد (Huang et al., 2014) و یا ممکن است عامل این میزان کاهش، آسیب‌های سلولی مقاطع زمانی مختلف باشد (Softeland et al., 2010). بسیاری از مواد آلاینده مانند سموم کلرپیریفوس با تولید گونه‌های فعال اکسیژن، اثرات سمی بر سلول‌ها دارند و موجب نابودی مولکول‌های زیستی مانند پروتئین، لیپید و DNA می‌شوند. در نتیجه به مطالعات و پژوهش‌های بیشتری درباره تأثیر مکمل‌های غذایی مختلف برای کاهش اثر سمیت کلرپیریفوس نیاز است.

یافته‌های به دست آمده از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که افزایش غلظت پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) به عنوان مکمل غذایی اثرات مطلوبی بر بیان ژن‌های مورد مطالعه در بچه ماهی تیلاپیا نیل داشت و سبب بهبود وضعیت ایمنی بچه ماهی‌ها در رویارویی با سم کلرپیریفوس شد. نتایج نهایی به دست آمده از تجزیه و تحلیل‌های آماری این پژوهش نشان می‌دهد در بیان ژن Hsp70 در تیمارهای پربیوتیک ۰/۲ درصد و به نسبت کم تیمار ۰/۱ درصد در مواجهه با سم کلرپیریفوس افزایش معنی‌داری مشاهده شد و در بیان نسبی ژن p450 در تمام تیمارها بجز تیمار ۰/۱ درصد روز ۱۴ روند افزایشی داشت ($P < 0.05$).

در مجموع، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که افزودن پربیوتیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) با غلظت ۰/۲ درصد

به جیره غذایی تاثیر معناداری دارد و سبب تقویت سیستم ایمنی در مواجهه با آلاینده‌هایی همچون سم کشاورزی کلرپیریفوس می‌شود. به عبارتی می‌توان این گونه بیان کرد که اثرات تخریبی ناشی از این گونه آلاینده‌ها را کاهش دهد. هر چند نیاز به مطالعات بیشتری بر شاخص‌های دیگر فیزیولوژیکی ماهی است.

منابع

- جافرنوده ع. ۱۳۹۵. بررسی خواص سینترژیستی برخی اسیده‌های آلی با باکتری لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) در پرورش بچه ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). رساله دکتری، دانشگاه ارومیه. ۱۵۰ص.
- حسن‌نتاج نیازی ا. ایمانیور م.ر. هدایتی س.ع.ا. ۱۳۹۳. تعیین سمیت کشنده آفت‌کش کلرپیریفوس در ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) و مقایسه میزان سمیت آن با سایر سموم ارگانوفسفره. مجله بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۳(۴): ۱۲-۱.
- Aida F.M.N.A., Shuhaimi M., Yazid M. and Maaruf A.G. 2009.** Mushroom as a potential source of prebiotics: A review. Trends in Food Science and Technology, 20(11-12): 567-575.
- Benedetto A., Brizio P., Squadrone S., Scanzio T., Righetti M., Gasco L., Prearo M.C. and Abete M.C. 2016.** Oxidative stress related to chlorpyrifos exposure in rainbow trout: Acute and medium term effects on genetic biomarkers. Pesticide Biochemistry and Physiology, 129: 63-69.
- Bricknell I. and Dalmo R.A. 2005.** The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish and Shellfish Immunology, 19(5): 457-472.
- Castano A., Bols N.C., Braunbeck T., Dierick P., Halder M., Isomaa B., Kawahara K., Lee L.E.J., Mthersill C., Part P., Repetto G., Sintes J.R., Rufli H., Smith R. and Eisler R. 1986.** Diazinon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service, 85: 1-38.
- Dawood M.A., El-Shamaa I.S., Abdel-Razik N.I., Elkomy A.H., Gewaily M.S., Abdo S.E., Soliman A.A., Paray B.A. and Abdelkhalek N. 2020a.** The effect of mannanoligosaccharide on the growth performance, histopathology, and the expression of immune and antioxidative related genes in Nile tilapia reared under chlorpyrifos ambient toxicity. Fish and Shellfish Immunology, 103: 421-429.
- Dawood M.A., Eweedah N.M., El-Sharawy M.E., Awad S.S., Van Doan H. and Paray B.A. 2020b.** Dietary white button mushroom improved the growth, immunity, antioxidative status and resistance against heat stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 523: 1-9 (735229).
- Fu Y., Li M., Liu C., Qu J.P., Zhu W.J., Xing H.J. and Li S. 2013.** Effect of atrazine and chlorpyrifos exposure on cytochrome P450

- contents and enzyme activities in common carp gills. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94: 28–36.
- Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J., Rastall R.A. and Roberfroid M.B. 2004.** Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2): 259–275.
- Hoffman U. and Papendorf T. 2006.** Organophosphate poisonings with parathion and dimethoate. *Intensive Care Medicine*, 32: 464–468.
- Hoseinifar S.H., Mirvaghefi A., Merrifield D.L., Amiri B.M., Yelghi S. and Bastami K.D. 2011.** The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(1): 91–96.
- Huang G.Y., Ying G.G., Liang Y.Q., Liu S.S. and Liu U.S. 2014.** Expression patterns of metallothionein, cytochrome P4501A and vitellogenin in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 105: 97–102.
- Hyne R.V. and Maher W.A. 2003.** Macroinvertebrate biomarkers: Links to toxicosis and changes in populations or communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 366–374.
- Ihsan T., Edwin T. and Anggraeni W. 2018.** Behavioral responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by sublethal exposure to chlorpyrifos: A case study in Twin Lakes of West Sumatra. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 5(4): 205–210.
- Iwama G.K., Vijayan M.M., Forsyth R.B. and Ackerman P.A. 1999.** Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*, 39(6): 901–909.
- Larionov A., Krause A. and Miller W. 2005.** A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*, 6(1): 1–16.
- Liu T., Zhang Z., Chen D., Wang L., Yao H., Zhao F., Xing H. and Xu S. 2013.** Effect of atrazine and chlorpyrifos exposure on heat shock protein response in the brain of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(2): 277–283.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Mokhbatly A.A.A., Assar D.H., Ghazy E.W., Elbially Z., Rizk S.A., Omar A.A. and Dawood**

- M.A. 2020.** The protective role of spirulina and β -glucan in African catfish (*Clarias gariepinus*) against chronic toxicity of chlorpyrifos: Hemato-biochemistry, histopathology, and oxidative stress traits. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(25): 31636–31651.
- Norman A. and Henry H. 2015.** Hormones. *Steroid Hormones: Chemistry, Biosynthesis and Metabolism*. Elsevier, USA. 411P.
- Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H. and Moorman A.F. 2003.** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339, 62–66
- Ringo E., Olsen R.E., Gifstad T.O., Dalmo R.A., Amlund H., Hemre G.I. and Bakke A.M. 2010.** Probiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2): 117–136.
- Schrezenmeir J. and De Vres, M. 2001.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 361–364.
- Sevik S., Aktas M., Dogan H. and Kocak S. 2013.** Mushroom drying with solar assisted heat pump system. *Energy Conversion and Management*, 72: 171–178.
- Shayeghi M., Khobdel M., Bagheri F. and Abtai M. 2008.** Azynphosmethyl and diazinon residues in Qarasu River and Gorganrood in Golestan Province. *Journal of Public Health and Health Research Institute*, 6: 75–82.
- Softeland L., Holen E. and Olsvik P.A. 2010.** Toxicological application of primary hepatocyte cellcultures of Atlantic cod (*Gadus morhua*), effects of BNF, PCDD and Cd. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151: 401–411.
- Vale J.A. 1998.** Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102: 649–652.
- Van Doan H., Hoseinifar S.H., Dawood M.A., Chitmanat C. and Tayyamat K. 2017.** Effects of *Cordyceps militaris* spent mushroom substrate and *Lactobacillus plantarum* on mucosal, serum immunology and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 70: 87–94.
- Van Loo J. and Gibson G. 2006.** Inulin-type fructans as prebiotics. P: 57–100. In: Rastall B. and Gibson G. (Eds.). *Prebiotics: Development and Application*, Wiley, UK.
- Wasser S.P. 2002.** Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology, 60(3): 258–274.
- Welker T.L., Lim C., Yildirim-Aksoy M. and Klesius P.H. 2011.** Effects of dietary supplementation of a purified nucleotide mixture on immune function and disease and stress resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture Research, 42: 1878–1889.
- Xing H., Li S., Wang X., Gao X., Xu S. and Wang X. 2013.** Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain, kidney and gill of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Chemosphere, 90(3): 910–916.
- Xing H., Li S., Wang Z., Gao X., Xu S. and Wang X. 2012.** Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. Chemosphere, 88(4): 377–383.
- Xing H., Zhang Z., Yao H., Liu T., Wang L., Xu S. and Li S. 2014.** Effects of atrazine and chlorpyrifos on cytochrome P450 in common carp liver. Chemosphere, 104: 244–250.
- Yousefi S. and Hoseinifar S.H. 2018.** Protective effects of prebiotic in zebrafish, *Danio rerio*, under experimental exposure to Chlorpyrifos. International Journal of Aquatic Biology, 6(2): 49–54.



Research Paper

Effect of dietary prebiotic supplement of oyster mushroom powder (*Pleurotus ostreatus*) on the P450 and Hsp70 genes expression in liver tissue of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in exposure to chlorpyrifos

Atefeh Iri¹, Seyed Ali Akbar Hedayati^{2*}, Hamed Paknejad³, Tahere Bagheri⁴,
Seyed Reza Khaleghi¹

Received: May 2021

Accepted: June 2021

Abstract

Increased entry of pesticides such as chlorpyrifos into aquatic ecosystems can cause harmful damage to aquatic animals. The aim of this study was to investigate the effect of dietary supplement of *Pleurotus ostreatus* mushroom powder on the relative expression of immune-related genes (P450 and Hsp70) in the liver tissue of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to chlorpyrifos toxin. In this study, 120 juveniles of Nile tilapia with an average weight of 20 ± 0.4 g were divided into four treatments in three replications and fed with diet containing 0 (control), 0.05, 0.1 and 0.2% fungus for 42 days. At the end of the feeding trial, all treatments were exposed to the sub-lethal concentration of chlorpyrifos for 14 days. Liver tissue samples were taken to evaluate the relative expression on the last day of the mushroom feeding period and on the 14th day of exposure to chlorpyrifos. The relative expression of P450 in treatments of 0.2 and 0.1 were significantly increased, but the treatments of 0.05 and 0.1 after exposing to poison was not significantly different from the control group ($P > 0.05$). Expression of Hsp70 gene in treatments fed with dietary supplement before and after exposure to toxin was significantly different ($P < 0.05$). It increased in 0.2 treatment, but it was not significantly different in 0.05 treatment from control ($P > 0.05$). The results of this study indicate the positive effects of *Pleurotus ostreatus* prebiotic dietary supplements on the relative expression of Hsp70 and P450 genes in Nile tilapia juveniles and its immune system strengthen in the face of contaminants and stressful substances such as chlorpyrifos.

Key words: Pesticide, Gene Expression, Nile Tilapia, Chlorpyrifos, Prebiotic.

1- Ph.D. Student in Aquatic Ecology, Department of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Professor in Department of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3- Associate Professor in Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4- Assistant Professor in Offshore Water Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Chabahar, Iran.

*Corresponding Author: Hedayati@gau.ac.ir

