نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی

Journal homepage: http://jair.gonbad.ac.ir

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه گنبد کاووس

شدت باندهای الکتروفورزی محتوی پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی تخم در رابطه با بقاء جنین و لارو در ماهی دنتکس معمولی (*Dentex dentex*) – یک ارزیابی اولیه

سید محمدرضا سمائی

استادیار، بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

نوع مقاله:
پژوهشی اصیل

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۰۰/۰۷/۳۰
پذیرش: ۰۰/۰۹/۰۱
DOI: 10.22034/jair.9.4.41

نویسنده مسئول مکاتبه:
سید محمدرضا سمائی، استادیار، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

ایمیل: seyedmohammadreza.samaee@gmail.com

چکیده

با وجود در دسترس بودن گزارشاتی از نقش پروتئین‌های ویتلوژنینی، و اسیدهای آمینه‌ی تخم بر بقاء جنین و لارو در ماهی دنتکس معمولی، تأثیرات پروتئین‌های "غیر ویتلوژنینی" تخم هنوز ناشناخته است. به‌منظور اجرای یک ارزیابی اولیه در این راستا تخم‌های لقاح یافته (۷۰ بچ [batch]) از طریق تخم‌ریزی طبیعی مولدین در اسارت فراهم شدند. شاخص‌های بقاء مانند نرخ شناوری و تفریخ تخم‌ها، و نرخ بقاء لاروها تعیین گردیدند. بچ‌ها براساس نرخ تفریخ در سه گروه با کیفیت پایین، متوسط، و بالا دسته‌بندی شدند. به‌واسطه SDS-PAGE عصاره تخم‌ها، ۶۳ باند پروتئینی (۱۶/۷ kDa تا ۱۳۱/۴) شناسایی شد. شدت باندها بر روی ژل (چگالی سنجی [<۲۰۰ تا ۸۷۷ $\mu g\ mL^{-1}$])، و ماهیت بیوشیمیایی آنها (رنگ‌آمیزی اختصاصی) تعیین گردید. در نتیجه ورود باندها به یک روند غربالگری، ۱۱ باند به‌عنوان باندهای محتوی پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی انتخاب شدند. بالاترین شدت این باندهای انتخابی در ژل‌های متعلق به تخم‌های باکیفیت بالا مشاهده شد. شدت ۹ باند از ۱۱ (به‌طور منفرد یا در ترکیب با باندهای پروتئینی دیگر) به‌طور معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) و مثبت از طریق یک سری مدل‌های رگرسیونی ساده و چند متغیره به شاخص‌های بقاء متصل شدند. به‌طور خلاصه، این نتایج اولیه اهمیت پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی تخم و تأثیرات منفرد و توأم آنها بر بقاء لاروهای ماهی دنتکس معمولی و پتانسیل آنها برای پیش بینی کیفیت تخم در ماهیان استخوانی را آشکار کرد، همچنین نشان داد که طراحی یک پژوهش عمیق‌تر در آینده جهت شناساسی دقیق‌تر محتوای پروتئینی باندهای انتخابی و بررسی مکانیسم تأثیرات آنها بر بقاء لاروها از ارزش پژوهشی بالایی برخوردار خواهد بود.

واژه‌های کلیدی:
کیفیت تخم، ماهیان دریایی، نشانگرهای زیستی

۱ | مقدمه

در بسیاری از گونه‌های ماهیان دریایی که از دیدگاه آبزی‌پروری حائز اهمیت هستند (برای مثال خانواده‌ی شانک ماهیان (Sparidae))، در فصل تولیدمثل تخم‌ها به یکباره رهاسازی نمی‌شوند. درطی یک فصل تولیدمثل (که اغلب چندماه به‌طول می‌انجامد) تخم‌ریزی در چند مرحله صورت می‌پذیرد. در هر مرحله از تخم‌ریزی یک بچ از تخم‌ها (egg batch) که به مرحله‌ی بلوغ رسیده است توسط والد رهاسازی می‌شود. به‌همین دلیل از این گونه ماهیان با عنوان تخم‌ریزان چند مرحله‌ای (multiple [batch] spawners) یاد می‌گردد (Loir *et al*., 2001). اگرچه اکثر این گونه‌ها قادر هستند تا در اسارت تعداد زیادی تخم‌های زنده تولید کنند، اما از یک طرف نرخ بقاء لاروهای حاصل شده از این تخم‌ها بسیار پایین می‌باشد و از طرف دیگر این نرخ بقاء در بین لاروهای حاصل از بچ‌های متفاوت به‌طور قابل ملاحظه و غیرقابل پیش‌بینی متغیر است (Matsuura *et al*., 1988; Lin *et al*., 1990; Giménez *et al*., 2006). حتی گزارش می‌شود که چنین تفاوت‌هایی در بقاء لارو مابین تخم‌های موجود در داخل یک بچ نیز قابل مشاهده است (McEvoy *et al*., 1993; Parrish *et al*., 1994). نکته ذکر شده از اهمیت بالایی در پرورش ماهیان دریایی برخوردار بوده و به عنوان یک تنگنا در صنعت تکثیر و پرورش این ماهیان محسوب می‌گردد. عواملی مانند کیفیت پایین غذا (Efthimiou *et al*., 1994)، کمبود غذا (Cardenete *et al*., 1997)، و استرس (Morales *et al*., 2005). می‌توانند بقاء لاروهای ماهیان دریایی را تحت‌تأثیر قرار دهند. کیفیت پایین تخمی که لارو از آن حاصل می‌شود نیز می‌تواند از جمله این عوامل باشد. انواعی از عوامل داخلی (intrinsic) و محیطی وجود دارند که می‌توانند کیفیت یک تخم را تحت‌تأثیر قرار دهند. محتوای بیوشیمیایی تخم می‌تواند یکی از این عوامل داخلی باشد. تفاوت در بین بچ‌های تخم رهاشده (در فواصل زمانی مختلف در طی یک فصل

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]

تولیدمثل) از دیدگاه محتوای بیوشیمیایی در بسیاری از ماهیان دریایی معرفی شده به سامانه‌های پرورشی مانند دنتکس معمولی (Giménez *et al*., 2006; Samaee, 2010; Samaee and Estévez, 2012; Samaee *et al*., 2009ab; 2010; 2013)، سیم دریایی قرمز (*Pagrus major* – Sakai *et al*., 1985; Matsuura *et al*., 1988)، شانک خط طلائی (*Sparus sarba* – Lin *et al*., 1990)، کفشک دم زرد (*Pleuronectes ferrugineus* – Manning and Crim, 1995)، کاد آتلانتیک (*Gadus morhua* – Kjesbu *et al*., 1996; Rani, 2005)، سیم سرطلائی (*Sparus aurata* – Lahnsteiner and Patarnello, 2003)، و زیره سنگالی (*Solea senegalensis* – Dinis *et al*., 1999) گزارش شده است. پروتئین‌ها به‌عنوان یک گروه از ترکیبات بیوشیمیایی تخم نقش‌های زیستی مهمی را در طی روند نمو جنین و لارو در ماهیان دریایی ایفا می‌کنند، برای مثال به‌عنوان جزء ساختاری پوسته تخم (Westerlund *et al*., 2001, Arukwe and Goksøyr, 2003; Oppen-Berntsen *et al*., 1992)، به‌عنوان ماده مغذی (در شکل پروتئین‌های زرده) (Bailey *et al*., 2002; Fyhn and Sergisted, 1987; Rønnestad *et al*., 1994, 1998)، و نقش آنزیمی برای یک دامنه وسیعی از مسیرهای متابولیکی (Terner, 1979). پروتئین‌های ویتلوژنینی به‌عنوان منبع اسیدهای آمینه آزاد معرفی شده‌اند (Hagedorn and Kunkel, 1979). این اسیدهای آمینه آزاد در روندهای زیستی مانند تولید انرژی (Finn *et al*., 1996)، ساخت پروتئین‌ها (Ohkubo and Matsubara, 2002)، تعادل اسمزی (Finn and Kristoffersen, 2007)، و ایجاد شناوری تخم (Iwasaki and Inoue, 1985, Craik and Harvey, 1987) مشارکت دارند. شناسایی ترکیب کمی و کیفی پروتئین‌های تخم در ارتباط با معیارهای بقاء جنین و لارو الف) به شناسایی مکانیسم نمو جنین و لارو و ب) معرفی یکسری از نشانگرها (bio-markers) برای پیش‌بینی کیفیت تخم در ماهیان دریایی منجر خواهد شد (Bobe and Labbé *et al*., 2010).

در پژوهش حاضر دنتکس معمولی (*Dentex dentex*) به عنوان گونه هدف مطالعه انتخاب شد، زیرا این پژوهش بخشی از یک مطالعه پیوسته روی محتوای بیوشیمیایی تخم این گونه در ارتباط با کیفیت تخم می‌باشد که توسط نویسنده مقاله حاضر از سال ۲۰۰۴ آغاز شده - است. از طرف دیگر این گونه عضوی از یک خانواده (شانک ماهیان) است که بسیاری از گونه‌های دارای ارزش تجاری به آن تعلق دارند. بنابراین امکان تعمیم دادن یافته‌های حاصل از مطالعه گونه دنتکس به سایر اعضاء این خانواده بیشتر است.

با وجود مطالعاتی (هرچند معدود) که در زمینه شناسایی ترکیب کمی و کیفی پروتئین‌های ویتلوژنینی (vitellogenin-derived proteins) ، اسیدهای آمینه آزاد (free amino acids) ، و اسیدهای آمینه متصل به پروتئین‌ها (protein bound amino acid) در تخم دنتکس در ارتباط با بقاء جنین و لارو صورت پذیرفته است (Samaee *et al*., 2009b; Samaee *et al*., 2010; Samaee *et al*., 2013) هنوز گزارشی در زمینه شناسایی ترکیب کمی و کیفی پروتئین‌های "غیر ویتلوژنینی" (non-vitellogenin derived proteins) تخم در گونه یاد شده در ارتباط با بقاء جنین و لارو وجود ندارد. پژوهش حاضر به‌عنوان اولین تلاش در این راستا تنها قصد دارد تا با اجرای یک بررسی اولیه، ارزشمند بودن طراحی یک مطالعه عمیق‌تر بر روی این گروه از پروتئین‌های تخم در ماهیان دریایی را ارزیابی نماید. این بررسی اولیه در ۱۰ مرحله انجام شد: ۱) جمع‌آوری تخم‌های لقاح یافته (تخم‌ریزی طبیعی مولدین در اسارت)، ۲) تعیین معیارهای بقاء جنین و لارو (نرخ شناوری تخم [floating rate – FR%]، نرخ تفریخ [hatching rate – HR%]، و نرخ بقاء [survival rate – SR%] در مراحل مختلف نمو)، ۳) دسته‌بندی بچ‌های تخم در سه گروه با کیفیت پایین، متوسط و بالا براساس نرخ تفریخ (HR%)، ۴) استخراج عصاره تخم، ۵) تعیین ترکیب کیفی پروتئین‌های موجود در عصاره تخم (جداسازی آنها به صورت باندهای پروتئینی با استفاده از SDS-PAGE)، ۶) شناسایی ماهیت بیوشیمیایی باندهای پروتئینی (رنگ‌آمیزی اختصاصی)، ۷) تعیین شدت باندهای پروتئینی برروی ژل (چگالی‌سنجی [densitometry])، ۸) انتخاب باندهای محتوی پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی (از طریق وارد نمودن باندها در یک روند غربالگری)، ۹) تعیین ماهیت ارتباط بین شدت باندهای پروتئینی انتخابی و معیارهای بقاء جنین و لارو (فرموله کردن معادلات رگرسیونی ساده)، و ۱۰) ارزیابی تأثیر توأم شدت باندهای پروتئینی بر معیارهای بقاء (فرموله کردن معادلات رگرسیونی چند متغیره).

۲ | مواد و روش‌ها

دو گله از مولدین برای مطالعه‌ی حاضر در انستیتو IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Spain) ایجاد شدند. گله‌ی اول شامل ۵ مولد ماده (۱/۵±/۵ kg) و ۷ مولد نر (۱/۲±۰/۳ kg). گله‌ی دوم شامل ۴ مولد ماده (۱/۶±۰/۳ kg) و ۷ مولد نر (۱/۵±۰/۵ kg).

مولدین در تانک‌های L ۴۰۰۰ مجهز به سامانه باز چرخ آب و در دمای آب ۲ ± ۱۸ نگهداری شدند. ماهیان مولد براساس ویژگی‌های ژنتیکی (میکروستلایت‌ها) شناسایی شده و نشانه‌گذاری شدند. اینکار جهت شناسایی مولدین مشارکت کرده در روند تخم‌ریزی صورت پذیرفت (برای جزئیات بیشتر به Piñera *et al*. 2004; Giménez *et al*. 2006) مراجعه گردد). تخم‌ریزی از طریق مدیریت چرخه تاریکی-روشنایی و دمای آب به‌ترتیبی که توسط سمائی (Samaee, 2010) شرح داده شد القاء گردید. چرخه تاریکی-روشنایی درطی فصل تولیدمثل به‌صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی درنظر گرفته شد. ماهی‌ها به‌طور روزانه با یک غذای تجاری (Vitalis Repro©, Skretting, Spain) (تشکیل شده از آرد ماهی (۶۵٪)، گلوتن (۱۱٪)، روغن ماهی (۱۱٪)، آرد لوبیا (۸٪)، و گندم (۴٪) که به‌طور خاص برای مولدین فرموله شده بود تغذیه شدند (Giménez *et al*. 2006, 2008).

مولدین در هنگام شب یا اوایل صبح (Abellan, 2000) اقدام به تخم‌ریزی می‌کردند. درطی فصل تخم‌ریزی تخم‌های رهاشده مربوط به دو گله مولدین هر روز صبح به‌طور جداگانه جمع‌آوری شدند (در کل

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]
[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]

۷۰ بچ مربوط به ۷۰ تخم‌ریزی). سپس تخم‌های شناور جداسازی شده (به‌عنوان تخم‌های زنده) و با درنظر گرفتن نسبت تخم‌های غیر شناور درصد تخم‌های شناور (نرخ شناوری تخم‌ها (FR%) محاسبه شد. تخم‌های شناور پس از شستشو در آب دریای فیلتر و استریل شده (با اشعه ماوراء بنفش (UV)) در دمای ۱۸ °C نگهداری شدند (Giménez, 2008).

یک بخشی از هر بچ در پلیت‌های کشت یاخته‌ای ۹۶ چاهکی کشت داده شد (Shields *et al.*, 1997). به این ترتیب که با استفاده از یک پیپت پاستور یک عدد تخم در هر چاهک قرار داده شد، هر چاهک با آب دریایی اتوکلاو شده پر گردید، و نهایتا پلیت‌های واجد تخم در داخل یک انکوباتور که دمای آن برروی ۱۹ °C تنظیم شده بود قرار داده شدند. تخم‌ها و لاروهای حاصل شده به‌طور روزانه مورد بررسی قرار گرفتند و شاخص‌هایی مانند نرخ تفریخ (HR%) و نرخ بقاء (SR%) در روزهای صفر (روزی که تفریخ اتفاق می‌افتد)، ۱، ۲، ۳، ۴، و ۵ پس از تفریخ ((post-hatch (dph)) محاسبه گردید. در طی این دوره لاروها تغذیه نشدند.

یک بخشی از هر بچ (حدود ۱۰۰ عدد) با استفاده از فرمالین ۴٪ فیکس شده و جهت تعیین مرحله نمو جنینی در زیر لوپ مورد بررسی قرارگرفت. سپس تخم‌های واجد جنین‌ها در یک مرحله نمو مشابه انتخاب شده و برای واکاوی پروتئین‌ها مورد استفاده قرارگرفتند.

۷۰ بچ جمع‌آوری شده در پژوهش حاضر براساس HR به سه گروه با کیفیت پایین (HR≤٪۳۳)، متوسط (٪۳۳<HR≤٪۷۲)، و بالا (HR>٪۷۲) تقسیم شدند. این محدوده‌های درنظر گرفته شده جهت گروه‌بندی بواسطه آنالیز واریانس ((ANOVA ($p < 0.05$)) و در پی آن آزمون دانکن انتخاب شد. البته این امکان وجود داشت تا از SR به عنوان معیار برای گروه‌بندی بچ‌های تخم از نظر کیفیت استفاده گردد، اما بررسی‌های اولیه نشان داد که همبستگی بالایی مابین HR و SR (y=۰/۸۶x+۱/۲۵; p<۰/۰۰۱; r^2=۰/۸۳; F=۳۲۲/۹۹) وجود دارد.

یک بخشی از هر بچ توسط آب شهر و سپس آب مقطر شسته شده و آب اضافی آنها توسط یک دستمال کاغذی حذف گردید. ۱۰۰۰ mg- ۵۰۰ تخم در یک ویال ۱/۵ mL ریخته شد و سپس این ویال با بافر تریس (pH=7.8 ;100 mM) پر گردید. در نهایت ویال حاوی نمونه با استفاده از نیتروژن مایع سریعاً منجمد و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- °C نگهداری شد.

تخم‌های منجمد از فریزر ۷۰- خارج و بر روی یخ قرار داده شدند تا شروع به ذوب شدن کنند. ۰/۲ g تخم در داخل یک ویال ۱/۵ mL وزن شده و ۱ mL لودینگ بافر (DTT (۱۰۰ mM)، SDS (۵٪)، گلیسرول (۱۰٪)، تریس (۶۰ mM)، بروموفنل بلو (۰/۰۰۵٪)، و pH (۸/۰) به آن اضافه گردید. سپس نسبت به هموژن نمودن تخم‌ها در داخل این بافر اقدام گردید. ویال حاوی هموژن به‌مدت ۱۰ min در یک ظرف حاوی آب ۹۰ °C انکوبه شده و سپس به‌مدت ۱۵ min در ۶۰۰۰ g در دمای محیط سانتریفیوژ شد. در نهایت بخش بالایی نمونه به آرامی برداشته شده، به یک ویال تازه انتقال یافت، و تا زمان استفاده در ۲۰ °C- نگهداری گردید.

به‌منظور جداسازی پروتئین‌ها از سیتم SDS-PAGE استفاده شد. مشخصات: ژل – اکریل آمید ۱۲٫۵٪ به ضخامت ۱ mm. بافر ژل جدا کننده (resolving) – SDS (۰/۸٪)، تریس (۱۵۰۰ mM)، و pH ۸/۸. بافر ژل متراکم‌کننده (stacking) – SDS (۰/۴٪)، تریس (۲۵۰ mM)، و pH ۶/۸. بافر الکترود – SDS (۰/۱٪)، تریس (۲۵۰ mM)، و گلایسین (۰/۱۹ mM). دقیقا ۱۵ Lµ عصاره تخم در داخل هر چاهک ژل ریخته شد. مقدار عصاره و غلظت ژل براساس یکسری از ارزیابی‌های اولیه انتخاب گردید. در طی الکتروفورز ابتدا نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ min در ولتاژ ۷۰ متراکم شدند و سپس جداسازی پروتئین‌ها به‌مدت ۱۰ h در ولتاژ ۱۲۰ صورت پذیرفت. رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو ((Coomassie brilliant blue R-250 (CBB R-250) جهت آشکار سازی باندها برروی ژل مورد استفاده قرارگرفت. با استفاده از یک اسکنر ساده نسبت به اسکن کردن ژل‌های رنگ شده و دیجیت کردن آن‌ها اقدام گردید. وزن مولکولی پروتئین‌های حاضر در باندها به کمک یک استاندارد پروتئینی وسیع طیف (۱۰-۲۵۰ kDa) (Bio-Rad, Inc, Hercules, California, USA) تعیین شد. وزن مولکولی باندهای ظاهر شده برروی ژل براساس kDa ارائه شد. تکرار پذیری نتایج SDS-PAGE از طریق تکرار سه باره کل روند تأیید شد.

از رنگ آمیزی اختصاصی ژل‌ها برای تشخیص ماهیت بیوشیمیایی محتوای باندهای پروتئینی موجود بر روی ژل استفاده شد: PAS (Periodic-Acid-Schiff) برای رنگ‌آمیزی گلایکوپروتئین‌ها (Carlsson, 1993) (آلبومین سرم گاوی (bovine serum albumin – BSA) و پروکسیداز (peroxidase – Pro) به‌ترتیب به‌عنوان کنترل منفی و مثبت مورد استفاده قرار گرفتند)؛ SBB (Sudan Black B) جهت رنگ‌آمیزی لیپوپروتئین‌ها (BSA به‌عنوان کنترل منفی)؛ PQD (Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Staining Kit from Invitrogen Detection Technologies, (Molecular Probes™) 2005) و متیل گرین ((methyl green (MG) Cutting and Roth, 1973) برای رنگ‌آمیزی فسفوپروتئین‌ها (BSA و کازئین (Casein) به‌ترتیب به‌عنوان کنترل منفی و مثبت)؛ و آلسین بلو (Alcian blue (AB)) برای رنگ‌آمیزی موکوپروتئین‌ها (Chayen *et al.*, 1973) (BSA و کلاژن (Collagen) به‌ترتیب به‌عنوان کنترل منفی و مثبت). رنگ‌آمیزی اختصاصی فقط برای ۱۲ بچ (۴ بچ از هر گروه از تخم‌های با کیفیت پایین، متوسط، و بالا) انجام شد.

تعیین غلظت پروتئین‌های تخم از طریق چگالی سنجی باندهای پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار (SCION IMAGE-4.0.2) انجام شد. جهت کالیبره کردن این نرم‌افزار BSA با غلظت‌های ۱۰ mg mL^{-1} تا ۲۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفت.

نرمال یا غیر نرمال بودن توزیع داده‌های مربوط به شدت باندهای پروتئینی و شاخص‌های بقاء جنین و لارو (FR، HR، و SR) با استفاده از آزمون اندرسون-درلینگ تعیین شد (Anderson-Darling test). تفاوت مابین بچ‌های با کیفیت متفاوت (HR پایین، متوسط، و بالا) از دیدگاه شدت باندهای پروتئینی با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و درپی آن آزمون دامنه چندگانه دانکن (Duncan´s multiple range

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]

test) مورد بررسی قرار گرفت. جهت ارزیابی روابط موجود مابین شدت باندهای پروتئینی، مدل‌های رگرسیونی ساده (simple regression models) فرموله شدند. سطح معنی‌دار ۰/۰۰۰۷ جهت انتخاب مدل‌های معنی‌دار درنظر گرفته شد. این مقدار از طریق اعمال تصحیح بنفرونی (Bonferroni's adjustment) برروی سطح معنی‌دار ۰/۰۵ به‌دست آمد. چنین اصلاحی احتمال وقوع خطای آماری نوع اول را به حداقل می‌رساند. جهت ارزیابی اثر توام شدت باندهای پروتئینی بر معیارهای بقاء، مدل‌های رگرسیونی چند متغیره فرموله شدند (multiple regression). آنالیزهای آماری با استفاده از نسخه‌های در دسترس SPSS، MINITAB، و Excel انجام شدند.

۳ | نتایج

متوسط نرخ شناوری تخم‌ها (FR) در پژوهش حاضر معادل ۱/۸±۷۴/۴٪ بود و در یک دامنه‌ای مابین ۲۸/۶٪ و ۹۷/۰٪ قرارداشت. نرخ تفریخ (HR) دامنه‌ی از ۰/۰٪ تا ۱۰۰٪ (با یک مقدار متوسط ۳/۳±۷۱/۰) را به‌خود اختصاص داد. تقریباً ۶۴/۳٪ از بچها یک HR بالای ۷۰٪ داشتند. نرخ بقاء (SR) لاروهای زبرا از روز صفر به طرف روز پنجم بعد از تفریخ به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت: SR در روز صفر ((۰/۰-۱۰۰٪) ۳/۱±۶۲/۴٪) و SR در روز ۵ ((۰/۰-۷۸/۱٪) ۲/۲±۱۷/۴٪).

در نتیجه SDS-PAGE عصاره‌های مستخرج از ۷۰ بچ تخم و رنگ آمیزی آنها با کوماسی بریلیانت بلو ۶۳ باند پروتئینی بر روی ژل ظاهر شدند (شکل ۱ و ۲). جهت جلوگیری از شلوغ شدن تصویر ژل‌ها از مشخص کردن مکان همه‌ی باندها بر روی ژل و نوشتن وزن مولکولی تمامی آنها پرهیز شد. فقط نسبت به مشخص نمودن مکان و وزن مولکولی باندهایی اقدام گردید که تحلیل نتایج به استناد آنها صورت پذیرفته است. سایر باندها تنها به‌صورت گذرا در متن اشاره شده‌اند. وزن مولکولی این ۶۳ باند از ۱۶/۷ kDa تا ۱۳۱/۴ متغیر بود. باندهای پروتئینی با وزن مولکولی ۱۶/۷ kDa، ۱۷/۷، ۲۰/۴، ۲۲/۲، ۲۲/۹، ۲۶/۷، و ۷۷/۹ در تمامی بچهای مورد مطالعه حضور داشتند. باندهای ۲۳/۵ kDa، ۲۴/۰، ۲۴/۹، ۳۳/۶، ۳۵/۰، ۳۷/۹، ۳۹/۶، ۵۳/۹، و ۵۷/۲ در ۸۰٪ از بچها حاضر بودند. مابقی باندهای پروتئینی فقط در ژل‌های مربوط به ۷۶٪-۳ از بچها مشاهده شدند.

ماهیت بیوشیمیایی باندهای پروتئینی: باند ۳۷/۹ kDa با PAS (شکل ۱: لین (lane) ۴)، باندهای ۱۷/۷ kDa، ۲۲/۲، ۳۵/۰، ۳۷/۹، ۵۳/۹، ۵۷/۲، ۷۷/۹، ۱۱۹/۴، و ۱۳۱/۴ با SBB (شکل ۱: لین ۳)، باندهای ۱۷/۷، ۲۲/۲، ۳۷/۹، ۵۳/۹، و ۷۷/۹ با MG (شکل ۲: لین)، باندهای ۳۷/۹، ۵۳/۹، ۷۷/۹، ۱۱۹/۴، و ۱۳۱/۴ با PQD (شکل ۱: لین ۷)، و باندهای ۳۶/۴، و ۳۷/۹ با AB (شکل ۱: لین ۶) رنگ شدند. مطالب فوق حاکی از این است که بعضی از باندها با بیش از یک روش رنگ‌آمیزی اختصاصی رنگ شده‌اند (به بخش "بحث و نتیجه‌گیری" مراجعه گردد).

شدت باندهای پروتئینی بر روی ژل: بالاترین غلظت مربوط به باند ۷۷/۹kDa (۸۷۷ $\mu g\ mL^{-1}$) بود، بعد از آن باندهای ۱۶/۸ kDa، ۱۶/۹، ۱۷/۰، ۱۷/۷، ۲۲/۲، و ۵۷/۲ با یک غلظت ۴۰۰ $\mu g\ mL^{-1}$ و بالاتر قرار داشتند. باندهای ۱۷/۶ kDa، ۲۲/۹، ۲۴/۵، ۲۵/۶، ۳۳/۶، ۳۵/۰، ۳۷/۹، و ۵۳/۹ غلظتی کمتر از ۴۰۰ $\mu g\ mL^{-1}$ و بیشتر از ۲۰۰ $\mu g\ mL^{-1}$ داشتند. غلظت پروتئین‌های باقیمانده نیز کمتر از ۲۰۰ $\mu g\ mL^{-1}$ بود.

غربالگری باندها جهت رسیدن به باندهای محتوی پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی: این کار در چند مرحله انجام شد. مرحله اول: حذف باندهایی که در کمتر از ۵۰٪ از بچهای تخم حاضر بودند (۳۲ باند). مرحله دوم: حذف ۸ باندی که بر پایه‌ی یک مطالعات قبلی (Samaee and Estévez, 2011; Samaee *et al*., 2009b) به‌عنوان باندهای حاوی پروتئین‌های ویتلوژنینی معرفی شده بودند (شکل ۱: لین ۲) (به بخش "بحث و نتیجه‌گیری" مراجعه گردد). مرحله سوم: حذف ۶ باندی که در مطالعه‌ی حاضر به‌طور اختصاصی رنگ‌آمیزی شدند (شکل ۱: لین‌های ۳ تا ۷) (به بخش "بحث و نتیجه‌گیری" مراجعه گردد). مرحله چهارم: حذف ۶ باندی که تفاوت معنی‌داری در بین بچهای تخم با کیفیت متفاوت (پایین، متوسط، و بالا (به بخش "مواد و روش‌ها"، قسمت "گروه‌بندی بچها براساس کیفیت" مراجعه گردد)) از دیدگاه شدت آنها مشاهده نشد. در نهایت ۱۱ باند (جدول ۱ و شکل ۲) به‌عنوان باندهایی درنظر گرفته شدند که واجد پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی هستند.

آنالیز واریانس تفاوت قابل ملاحظه‌ای را در بین بچهای تخم با کیفیت‌های متفاوت (پایین (HR≤۳۳٪)، متوسط (۳۳٪<HR≤۷۲٪)، و بالا (HR>۷۲٪)) از دیدگاه شدت این ۱۱ باند پروتئینی (جدول ۱: ستون‌های ۷ تا ۹) آشکار کرد. اگرچه براساس آزمون دانکن این تفاوت‌ها مابین تخم‌های با کیفیت پایین و متوسط معنی‌دار نبود، اما شدت باندهای یاد شده در تخم‌های با کیفیت بالا به شکل معنی‌داری بسیار بالاتر از دو گروه یاد شده بود.

جهت ارزیابی این موضوع ابتدا مدل‌های رگرسیونی ساده مابین شدت این ۱۱ باند پروتئینی بر روی ژل و معیارهای بقاء جنین و لارو (FR، HR، و SR در مراحل مختلف نمو) فرموله شدند. مقدار ۰/۰۰۰۷ به‌عنوان سطح معنی‌دار (به بخش مواد و روش‌ها مراجعه گردد) جهت پذیرش معنی‌دار بودن یا نبودن ارتباط رگرسیونی بین شدت باندهای یاد شده و معیارهای بقاء جنین و لارو مد نظر قرار گرفت. براساس معیار ذکر شده ۹ باند از ۱۱باند پروتئینی انتخابی (جدول ۱ و شکل ۲) در پژوهش حاضر از طریق ۱۴ مدل رگرسیونی ساده (شکل ۳) و ۱۵ مدل رگرسیونی چندمتغیره (جدول ۲) به‌طور معنی‌داری به معیارهای بقاء مرتبط شدند.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]

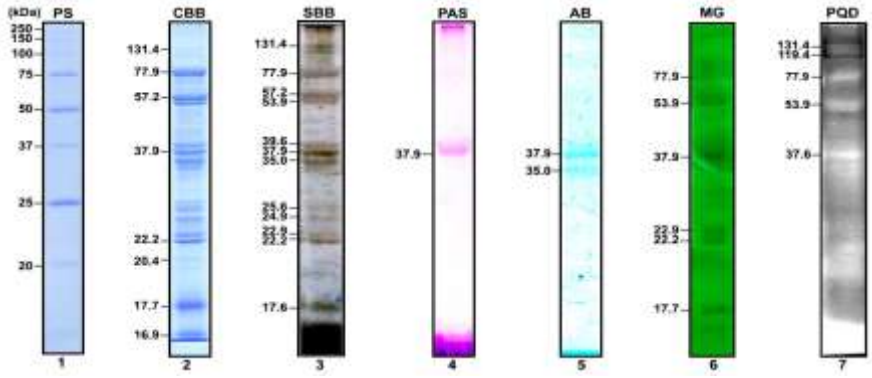
[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]

جدول ۱ – شدت (g/mlμ) و فراوانی ۱۱ باند پروتئینی (انتخاب شده به عنوان باندهای واجد پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی) در تخم‌های ماهی دنتکس - معمولی با کیفیت متفاوت (پایین، متوسط، و بالا)

ردیف	پروتئین‌ها (kDa)	فراوانی (٪)	شدت هر باند (g/mlμ) در کل ۷۰ بچ (بدون تفکیک بچ‌ها از دیدگاه کیفیت)			شدت هر باند (g/mlμ) در بچ‌های با کیفیت‌های متفاوت (میانگین±خطای استاندارد)		
			میانگین±خطای استاندارد	حداقل	حداکثر	پایین (n=۹)	متوسط (n=۱۹)	بالا (n=۴۲)
۱	۱۰۵/۴	۵۷	۳۷/۷±۷/۵	۰/۰	۳۱۴/۰	۰٫۰۰±۰٫۰۰$^{(a)}$	۹/۲±۲/۳$^{(a)}$	۵۸/۷±۱۱/۴$^{(b)}$
۲	۶۳/۸	۶۹	۳۸/۶±۵/۸	۰/۰	۱۹۱/۰	۱۱/۱±۴/۲$^{(a)}$	۱۳/۵±۲/۷$^{(a)}$	۵۵/۸±۸/۵$^{(b)}$
۳	۵۰/۵	۷۶	۹۲/۹±۲۰/۵	۰/۰	۷۷۵/۰	۶/۳±۱/۸$^{(a)}$	۱۵/۹±۳/۸$^{(a)}$	۱۴۷/۶±۳۱/۹$^{(b)}$
۴	۴۳/۵۰	۵۰	۱۵/۸±۲/۹	۰/۰	۹۵/۰	۷/۲±۲/۶$^{(a)}$	۱۲/۴±۲/۲$^{(a)}$	۱۹/۲±۴/۶$^{(b)}$
۵	۳۳/۶	۸۷	۱۹۱/۹±۲۹/۰	۰/۰	۹۴۹/۰	۴۰/۰±۱۰/۵$^{(a)}$	۵۶/۰±۹/۳$^{(a)}$	۲۸۵/۷±۴۲/۵$^{(b)}$
۶	۳۲/۴	۶۴	۹۵/۴±۱۸/۸	۰/۰	۶۹۱/۰	۱۲/۹±۵/۲$^{(a)}$	۲۸/۳±۶/۰$^{(a)}$	۱۴۳/۵±۲۹/۱$^{(b)}$
۷	۳۱/۴	۵۴	۴۶/۵±۸/۸	۰/۰	۳۴۳/۰	۱۲/۶±۴/۷$^{(a)}$	۱۱/۴±۴/۵$^{(a)}$	۶۹/۷±۱۳/۴$^{(b)}$
۸	۲۶/۷	۱۰۰	۱۴۲/۸±۱۹/۷	۲۰/۰	۸۷۵/۰	۳۱/۹±۵/۱$^{(a)}$	۴۶/۰±۹/۱$^{(a)}$	۲۱۰/۴±۲۸/۱$^{(b)}$
۹	۲۴/۰	۸۶	۱۲۵/۱±۱۸/۰	۰/۰	۶۰۷/۰	۲۶/۸±۴/۵$^{(a)}$	۳۳/۹±۴/۳$^{(a)}$	۱۸۷/۴±۲۵/۸$^{(b)}$
۱۰	۲۳/۵	۹۴	۹۳/۵±۱۰/۸	۰/۰	۴۵۰/۰	۲۳/۲±۰/۱$^{(a)}$	۳۰/۹±۲/۶$^{(a)}$	۱۳۶/۹±۱۴/۵$^{(b)}$
۱۱	۱۹/۶	۵۰	۱۷/۱±۲/۹	۰/۰	۱۲۱/۰	۱/۷±۱/۷$^{(a)}$	۱۰/۳±۲/۴$^{(ab)}$	۲۳/۵±۴/۵$^{(b)}$

جدول ۲- مشخصات ۱۵ مدل رگرسیونی چند متغیره‌ی که از طریق آنها ترکیب‌های متفاوتی از باندها (منتسب به پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی (مراجعه به شکل ۲) و ویتلوژنینی (مراجعه به شکل ۱: لین ۲)) به شکل معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) به معیارهای بقاء متصل شدند.

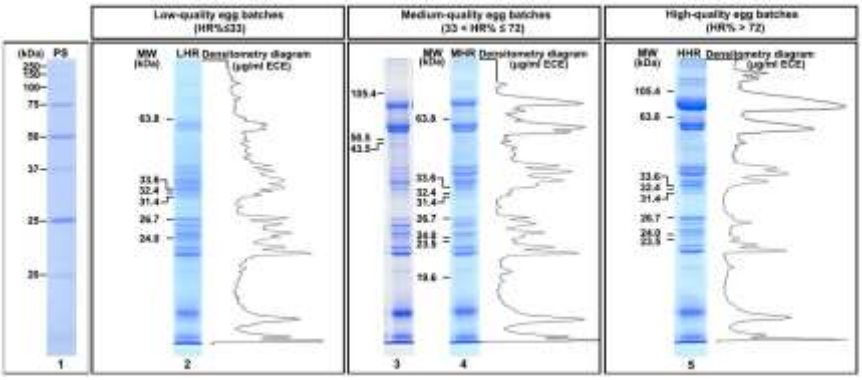
ردیف	باندهای پروتئینی (kDa) مورد استفاده برای فرموله کردن مدل‌های چند متغیره	معیارهای بقاء	اجزاء مدل‌های چند متغیره	
			r^2	F
۱	۲۲/۹، و ۱۰۵/۴	تفریخ (٪)	۰/۶۶	۳۲/۰
۲	۲۲/۹، و ۲۴/۰	تفریخ (٪)	۰/۶۶	۴۲/۱
۳	۲۲/۹، و ۲۳/۵	تفریخ (٪)	۰/۶۸	۳۴/۶
۴	۲۲/۹، و ۲۵/۶	تفریخ (٪)	۰/۶۷	۳۴/۹
۵	۲۲/۹، و ۳۵/۰	تفریخ (٪)	۰/۶۷	۴۳/۷
۶	۲۲/۲، و ۱۰۵/۴	تفریخ (٪)	۰/۶۶	۳۰/۹
۷	۲۲/۲، و ۲۳/۵	تفریخ (٪)	۰/۶۷	۳۲/۱
۸	۲۲/۲، ۲۵/۶، و ۲۶/۷	تفریخ (٪)	۰/۷۰	۲۹/۹
۹	۲۲/۲، ۲۵/۶، ۷۷/۹، و ۲۲/۹	تفریخ (٪)	۰/۷۳	۲۳/۲
۱۰	۲۲/۲، ۲۵/۶، ۳۹/۶، و ۲۳/۵	تفریخ (٪)	۰/۷۳	۱۵/۵
۱۱	۲۲/۲، و ۳۲/۴	بقاء (٪) در ۰ dph	۰/۵۸	۱۴/۳
۱۲	۲۲/۲، ۲۶/۷، و ۷۷/۹	بقاء (٪) در ۰ dph	۰/۶۱	۱۱/۷
۱۳	۲۲/۲، ۳۱/۴، و ۷۷/۹	بقاء (٪) در ۰ dph	۰/۶۱	۱۱/۶
۱۴	۲۲/۹، ۲۴/۹، ۱۰۵/۴، و ۱۷/۷	بقاء (٪) در ۰ dph	۰/۶۳	۸/۰
۱۵	۲۲/۲، ۷۷/۹، ۱۷/۷، و ۳۱/۴	بقاء (٪) در ۰ dph	۰/۶۳	۸/۶



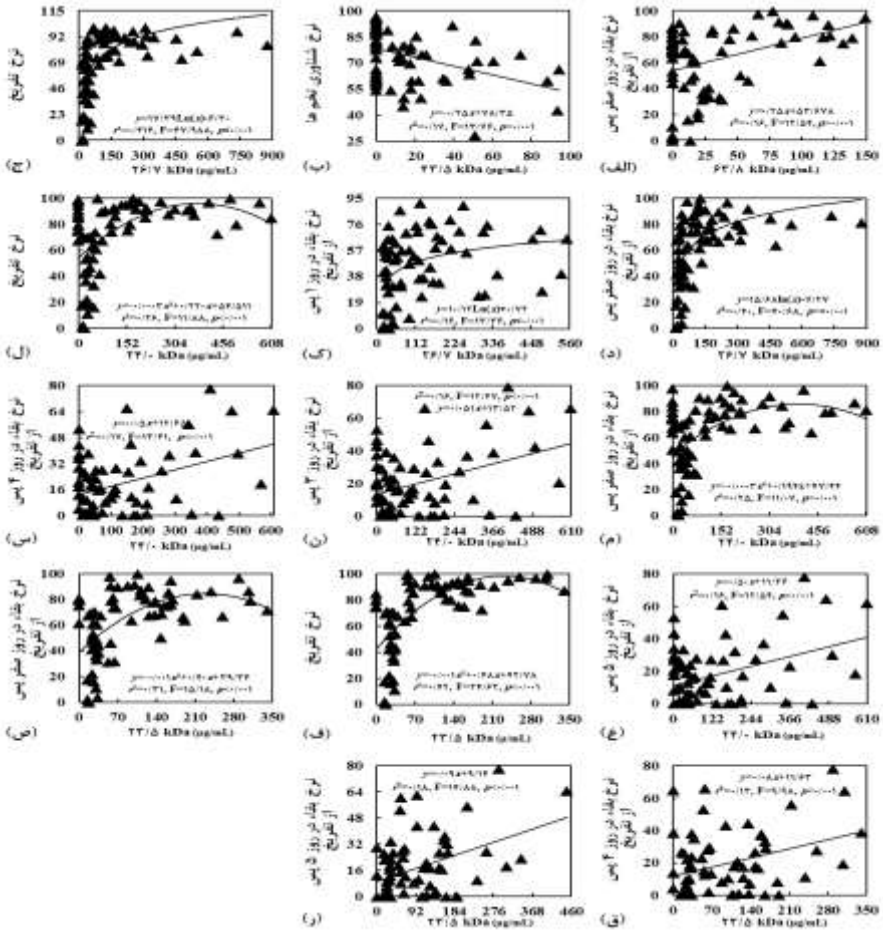
شکل ۱- شناسایی ترکیب بیوشیمیایی باندهای پروتئینی براساس رنگ‌آمیزی اختصاصی آنها. لین ۱: واجد باندهای پروتئینی و وزن مولکولی آنها در یک استاندارد پروتئینی (PS). لین ۲: واجد ۶۳ باندی که پس از SDS-PAGE عصاره‌ی تخم و در پی رنگ آمیزی ژل با کوماسی بریلیانت بلو برروی ژل ظاهر شدند. در این لین مکان و وزن مولکولی باندهایی که توسط (Samaee *et al.*, 2009b) و (Samaee and Estévez., 2011) به‌عنوان باندهای محتوی پروتئین‌های ویتلوژنینی شناسایی شده بودند مشخص شده‌است. لین ۳: ژل رنگ شده با سودان بلک B (SBB). لین ۴: ژل رنگ شده با پریودیک اسید شیفت (PAS). لین ۵: ژل رنگ شده با السین بلو (AB). لین ۶: ژل رنگ شده با متیل گرین (MG). و لین ۷: ژل رنگ شده با PQD.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]



شکل ۲- تصویر ژل‌های رنگ آمیزی شده با کوماسی بریلیانت بلو مربوط به تخم‌های دنتکس معمولی با کیفیت‌های متفاوت (پایین (لین ۲)، متوسط (لین ۳ و ۴)، و بالا (لین (۵)، واجد ۶۳ باند پروتئینی ظاهر شده پس از SDS-PAGE عصاره‌ی تخم‌ها. مکان و وزن مولکولی (باتوجه به استاندارد پروتئینی (PS) ارائه شده در لین ۱) یازده باند پروتئینی انتخاب شده (به‌عنوان باندهای واجد پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی) در پژوهش حاضر برروی این ژل‌ها مشخص شده‌اند. در این شکل تفاوت مابین این ژل‌ها از دیدگاه شدت یازده باند پروتئینی یاد شده (دیاگرام‌های چگالی سنجی) قابل مشاهده است. MW: وزن مولکولی، LHR: تخم‌های واجد نرخ تفریخ (HR%) پایین، MHR: تخم‌های با نرخ تفریخ متوسط، و HHR: تخم‌های با نرخ تفریخ بالا.



شکل ۳- معادلات رگرسیونی ساده‌ی فرموله شده مابین پنج باند (از یازده باند پروتئینی انتخاب شده به عنوان باندهای واجد پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی) و معیارهای بقاء. تعداد نمونه (n)=۷۰

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

باندهای kDa ۷۷/۹ و ۵۳/۹ با SBB، MGP، و PQD (شکل ۱: لین-های ۳، ۶، و ۷) رنگ شدند. نتایج رنگ‌آمیزی اختصاصی این دو باند و وزن مولکولی آنها می‌تواند نشانه‌ای از حضور ساختارهایی مانند لیپوویتلین-فسویتین (lipovitellin-phosvitin) در این باندها باشد (Sawaguchi *et al*., 2006; Amano *et al*., 2007). باند ۳۷/۹ با SBB، MGP، PQD، و AB رنگ شد (شکل ۱: لین‌های ۳، ۵، ۶، و ۷). این نشان می‌دهد که احتمالا این باند به ترتیب محتوی یک موکو، لیپو، و فسفوپروتئین با وزن مولکولی مشابه است. رنگ شدن باند ۳۵/۰

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]
[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]

با SBB و AB (شکل ۱: لاین‌های ۲ و ۳) نیز دلیلی بر حضور لیپو و گلایکوپروتئین‌ها در این باند است. باند ۱۶/۹ با SBB و PAS رنگ شد، احتمالاً محتوی یک لیپو و گلایکوپروتئین می‌باشد. باندهای kDa ۱۳۱/۴، ۱۱۹/۴ (البته این باند جزء آنهایی بود که یک فراوانی <۵۰٪ داشت و بنابراین در طی روند غربالگری حذف شد. به همین دلیل بر روی شکل ۱ مکان و وزن مولکولی آن مشخص نشده است)، ۵۷/۲، ۳۹/۶، ۳۵/۰، ۲۲/۲، و ۱۷/۷ فقط با SBB (شکل ۱: لین ۳) رنگ شدند که این نشان می‌دهد که باندهای یاد شده صرفا محتوی لیپوپروتئین می‌باشند. روش‌های رنگ آمیزی اختصاصی در مطالعات قبلی جهت تعیین ماهیت بیوشیمیایی پروتئین‌های تخم در یکسری از ماهیان استخوانی آب شیرین مانند قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Lahnsteiner, 2000, 2007).

هفت باند از باندهایی که به‌طور اختصاصی رنگ شدند (kDa ۱۳۱/۴، ۷۷/۹، ۵۷/۲، ۳۷/۹، ۲۲/۲، ۱۷/۷، و ۱۶/۹) (شکل ۱: لین ۲) به‌همراه باند ۲۰/۴ kDa از جمله باندهایی بودند که توسط سمائی (Samaee *et al*., 2009b) و سمائی و استیوز (Samaee and Estévez, 2011) براساس نتایج به‌دست آمده از یک کروماتوگرافی اختصاصی و در پی آن LC-ESI-MS/MS پروتئین‌های جداسازی توسط این کروماتوگرافی به عنوان پروتئین‌های ویتلوژنینی شناسایی شده بودند. شش باند دیگر (kDa ۵۳/۹، ۳۹/۶، ۳۵/۰، ۲۵/۶، ۲۴/۹، و ۲۲/۹) (شکل ۱: لین‌های ۳ تا ۷) که در مطالعه حاضر به‌طور اختصاصی رنگ شده بودند نیز به عنوان پروتئین‌های ویتلوژنینی درنظر گرفته شدند، زیرا مولکول ویتلوژنین یک "لیپو، گلایکو، فسفوپروتئین" است بنابراین پروتئین‌های تخم که از شکستن آن حاصل می‌گردند می‌توانند یک لیپوویتلین (lipovitellin)، فسویتین (phosvitin)، بتاکمپوننت (β'-component)، گلایکوپروتئین (glycoproteins)، و یا یک ساختار ترکیبی از آنها (برای مثال لیپوویتلین-فسویتین) باشند (Sawaguchi *et al*., 2006; Amano *et al*., 2007). بنابراین باتوجه به این نکته شش باندی که در پژوهش حاضر به‌طور اختصاصی به‌عنوان لیپوپروتئین، گلایکوپروتئین، و یا فسفوپروتئین رنگ شدند به‌عنوان پروتئین‌های ویتلوژنینی تخم در نظر گرفته شدند. پس از حذف الف) ۱۴ باند فوق، ب) ۳۲ باندی که فراوانی کمتر از ۵۰٪ داشتند، و ج) شش باندی که تفاوت معنی‌داری در بین بچ‌های تخم با کیفیت متفاوت (پایین، متوسط، و بالا) از دیدگاه شدت آنها برروی ژل مشاهده نشده بود، مابقی باندها (۱۱ باند (جدول ۱ و شکل ۲)) به‌عنوان باندهایی درنظر گرفته شدند که محتوی پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی هستند.

همان‌طور که در بخش نتایج ذکر شد ۹ باند از ۱۱ باند پروتئینی انتخابی از طریق ۱۴ مدل رگرسیونی ساده (شکل ۳) و ۱۵ مدل رگرسیونی چند متغیره (جدول ۲) به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) به معیارهای بقاء جنین و لارو مرتبط شدند.

در پژوهش حاضر فقط باند ۴۳/۵ kDa با نرخ شناوری تخم‌ها (FR) از طریق یک مدل رگرسیونی (شکل ۳ الف) به‌طور معنی‌دار مرتبط شد. که البته دور از انتظار نیست زیرا پدیده شناوری تخم‌ها در ماهیان دریایی به عواملی مانند ترکیب کیفی و کمی اسیدهای آمینه آزاد حاصل شده از شکستن پروتئین‌های ویتلوژنینی تخم، یون‌های معدنی (Waguchi *et al*., 2006; Fabra *et al*., 2006; Finn, 2007)، و چربی‌ها نسبت داده می‌شود. بنابراین در اینجا یافتن یک دلیل فیزیولوژیک برای توضیح ارتباط معنی‌دار یافت شده مابین شدت باند ۴۳/۵ kDa و FR دشوار می‌باشد.

میانگین قدرت آماری (r^2) مدل‌های فرموله شده رگرسیونی ساده مابین شدت باندهای انتخاب شده و معیارهای بقاء در مراحل اولیه (HR و SR در صفر و ۱ dph) و پیشرفته‌ی (SR در ۵-۲ dph) نمو به ترتیب معادل ۰/۲۸ و ۰/۱۶ بود (شکل ۳). این مقادیر مشابه آن چیزی است که در مدل‌های فرموله شده براساس پروتئین‌های ویتلوژنینی در مطالعات قبل گزارش شده است (به‌ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۱۵) (Samaee *et al*., 2009b). اگرچه قدرت این مدل‌ها کمتر از آنهایی بود که در مطالعات قبلی براساس عوامل بیوشیمیایی دیگر فرموله شده بودند، برای مثال متابولیت‌ها/آنزیم‌های مربوط به متابولیسم قندها (به‌ترتیب ۰/۳۰ و ۰/۲۹) (Giménez *et al*., 2006)، چربی‌ها (۰/۶۰) (Samaee, 2010)، اسیدهای چرب (۰/۷۰ و ۰/۷۳) (Samaee *et al*., 2009a)، اسیدهای آمینه‌ی آزاد (۰/۷۱ و ۰/۶۶) (Samaee *et al*., 2010)، و اسیدهای آمینه‌ی متصل به پروتئین‌ها (۰/۹۶ و ۰/۹۷) (Samaee *et al*., 2013). یک r^2 بزرگتر مشخص کننده یک تأثیر مستقیم بالاتر است (Samaee *et al*., 2010). این‌گونه به‌نظر می‌رسد که محتوای اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه‌ی آزاد، و اسیدهای آمینه متصل به پروتئین‌های تخم در مقایسه با پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی تخم معیار بهتری برای پیش‌بینی موفقیت جنین و لارو در ماهی دنتکس معمولی باشند.

در مطالعه حاضر شدت باندهای انتخابی به‌طور معنی‌داری به معیارهای بقاء هم در مراحل اولیه (۶۴/۳٪ از مدل‌ها) و هم در مراحل پیشرفته‌ی نمو (۳۵/۷٪ از مدل‌ها) مرتبط بودند. گزارشات مشابهی نیز در مورد پروتئین‌های ویتلوژنینی (Samaee *et al*., 2009b) و متابولیت/آنزیم‌های مربوط به متابولیسم قندها (Giménez *et al*., 2006) در این زمینه ارائه‌شده است. درحالی‌که سایر ترکیبات بیوشیمیایی تخم مانند چربی‌ها (Samaee, 2010) و اسیدهای آمینه آزاد (Samaee *et al*., 2010) اساساً به مراحل اولیه نمو و اسیدهای چرب (Samaee *et al*., 2009a) و اسیدهای آمینه متصل به پروتئین‌ها (Samaee *et al*., 2013) به مراحل پیشرفته نمو مرتبط بودند.

تمامی روابط معنی‌دار یافت شده مابین باندهای انتخابی در پژوهش حاضر و بقاء لاروها در روزهای ۲ تا ۵ پس از تفریخ به شکل توابع خطی بودند درحالی‌که این روابط با مراحل اولیه‌ی نمو (HR و SR در روزهای صفر و ۱ پس از تفریخ) ماهیت غیرخطی داشتند (شکل ۳). یک رابطه خطی نشان می‌دهد که بقاء لاروها در روزهای ۲ تا ۵ به‌طور مستقیم با افزایش غلظت این گروه از پروتئین‌ها افزایش می‌یابد.

ارزیابی پراکندگی داده‌های مربوط به شدت باندهای پروتئینی انتخابی در اطراف خط رگرسیونی در مدل‌های رگرسیونی ساده نشان می‌دهد که در مدل‌های مربوط به مراحل پیشرفته‌ی نمو (**SR** در روزهای ۲ تا ۵ پس از تفریخ) این پراکندگی بیشتر از مدل‌های مربوط

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]

به مراحل اولیه نمو می‌باشد (HR و SR در روزهای صفر و ۱ پس از تفریخ) (شکل ۳). این نشان می‌دهد که تأثیر عوامل دیگر در بقاء لارو در مراحل پیشرفته‌تر بیشتر است. این عوامل می توانند داخلی باشند (مانند محتوای سایر ترکیبات بیوشیمیایی تخم) و یا مربوط به عوامل محیطی باشند. این نکته جهت پیش‌بینی بقاء لارو در مراحل پیشرفته‌تر نمو در دنتکس باید مورد توجه قرارگیرد.

در مطالعه‌ی انجام شده توسط سمائی و همکاران (Samaee *et al.*, 2009b) شواهدی از تأثیر توأم پروتئین‌های ویتلوژنینی بر معیارهای بقاء جنین و لارو در ماهی دنتکس به‌دست نیامد. در پژوهش حاضر طراحی مدل‌های رگرسیونی چندمتغیره مابین ترکیبات دوتایی از پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی (جدول ۲: ردیف‌های ۱ تا ۳) و معیارهای بقاء جنین و لارو یک افزایش قابل ملاحظه در میانگین قدرت مدل‌های رگرسیونی (r^2) را سبب شد (یک افزایش از ۰/۲۲ (شکل ۳) به ۰/۶۷ (جدول ۲: ستون ۴، ردیف های ۱ تا ۳)). این مدل‌ها در نتیجه مشارکت چهار باند از ۱۱ باند انتخابی (۲۲/۹ kDa، ۲۳/۵، ۲۴/۰، و ۱۰۵/۴) حاصل شدند. در معدود مطالعات قبلی تلاش‌هایی در جهت یافتن چنین روابطی مابین ترکیب کمی پروتئین‌های تخم در سایر ماهیان استخوانی (مانند قزل‌آلای رنگین‌کمان) و بقاء جنین و لارو در آنها صورت پذیرفته است (Lahnsteiner, 2000, 2007)، اما در مطالعات یاد شده مشخص نگردیده است که پروتئین‌های مورد بررسی متعلق به کدام گروه از پروتئین‌های تخم هستند.

در پژوهش حاضر مدل‌هایی با مشارکت ترکیبات متفاوتی از باندهای منتسب به پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی (جدول ۱ و شکل ۲) و منتسب به پروتئین‌های ویتلوژنینی (شکل ۱: لین ۲) نیز فرموله شدند (جدول ۲: ردیف‌های ۴ تا ۱۵)، که در آنها میانگین قدرت مدل از ۰/۲۲ در مدل‌های رگرسیونی ساده (شکل ۳) به ۰/۶۶ در مدل‌های رگرسیونی چند متغیره افزایش یافت. نتایج طراحی مدل‌های رگرسیونی چند - متغیره در پژوهش حاضر می‌تواند به‌عنوان مدرکی آماری برای وجود تأثیرات توأم مابین پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی (جدول ۲: ستون ۴، ردیف‌های ۱ تا ۳) و از طرف دیگر وجود تأثیرات توأم مابین پروتئین-های ویتلوژنینی و غیر ویتلوژنینی (جدول ۲: ستون ۴، ردیف های ۴ تا ۱۵) بر بقاء جنین و لاروها باشد. چنین تأثیرات توأمی در مورد سایر عوامل بیوشیمیایی تخم نیز گزارش شده است برای مثال چربی‌ها (Czesny *et al.*, 1999; Samee *et al.*, 2009a) و اسیدهای چرب (Samaee *et al.*, 2009a)، متابولیت‌ها/آنزیم‌های مربوط به متابولیسم قندها (Giménez *et al.*, 2006)، و اسیدهای آمینه آزاد (Samaee *et al.*, 2010).

یافته‌های پژوهش حاضر را می‌توان در چند جمله خلاصه کرد: ۱) از دیدگاه علوم پایه وجود ارتباط آماری معنی‌دار و مثبت مابین داده-های مربوط به‌شدت باندهای پروتئینی غیر ویتلوژنینی و معیارهای بقاء جنین و لارو حاکی از تأثیر مقدار این گروه از پروتئین‌ها بر بقاء لاروها در سامانه‌های پرورشی ماهی دنتکس معمولی است. ۲) این ارتباطات همچنین نشان داد که مقدار این دسته از پروتئین‌های تخم از دیدگاه کاربردی می‌تواند به‌عنوان یک شاخص زیستی (bio-markers) برای پیش‌بینی کیفیت تخم در ماهیان دریایی در سامانه‌های پرورشی مورد استفاده قرار گیرد. ۳) قدرت پایین مدل (پراکندگی بالای نقاط در اطراف خط رگرسیونی) در روابط رگرسیونی ساده نشان دهنده این است که علاوه‌بر مقدار پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی عوامل داخلی دیگر (مانند تأثیر توأم پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی و سایر ترکیبات بیوشیمیایی تخم) یا محیطی برروی بقاء جنین و لارو مؤثر هستند. ۴) نتایج طراحی مدل‌های رگرسیونی چند متغیره در پژوهش حاضر می‌تواند به‌عنوان مدرکی آماری برای وجود تأثیرات توأم مابین پروتئین‌های غیر ویتلوژنی از یک طرف و وجود تأثیرات توأم مابین این پروتئین‌ها و پروتئین‌های ویتلوژنینی تخم بر بقاء جنین و لاروها تلقی گردد. پژوهش حاضر اهمیت طراحی یک پژوهش عمیق‌تر جهت شناسایی دقیق‌تر ماهیت پروتئین‌های موجود در باندهای منتسب به پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی ظاهر شده برروی ژل SDS-PAGE و مکانیسم تأثیر مستقیم و توأم آنها بر بقاء جنین و لارو در مراحل مختلف نمو در ماهیان دریایی را آشکار کرد.

پست الکترونیک نویسندگان

سید محمدرضا سمائی: seyedmohammadreza.samaee@gmail.com

REFERENCES

Abellan E. 2000. Culture of common dentex (*Dentex dentex* L.) present knowledge, problems and perspectives. Cahiers Options Méditerranéennes, 47: 157-168.

Amano H., Fujita T., Hiramatsu N., Shimizu M., Sawaguchi S., Matsubara T., Kagawa H., Nagae M, Sullivan C.V., Hara A. 2007. Egg yolk proteins in gray mullet (*Mugil cephalus*): Purification and classification of multiple lipovitellins and other vitellogenin-derived yolk proteins and molecular cloning of the parent vitellogenin genes. Journal of Experimental Zoology, 307A: 324-341.

Arukwe A., Goksøyr A. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. Comparative Hepatology, 2: 4.

Bailey K.M., Merati N., Helser M., Hiramatsu N., Hara A. 2002. Developmental changes in egg yolk proteins of Walleye Pollock, *Theragra chalcogramma*, and a comparative study of immunoreactivity of other North Pacific teleostes and invertebrate eggs. Bulletin of Fisheries Sciences Hokkaido University, 53(3): 95-105.

Bobe J., Labbé C. 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology 165(3): 535-548.

Cardenete G., Abellán E., Skalli A., Hidalgo M.C., Massuti S. 1997. Feeding *Dentex dentex* with dry diets: growth response and diet utilisation. Cahiers Options Méditerranéennes, 22: 141-151.

Carlsson S.V. 1993. Isolation and characterization of glycoproteins. In: Fukuda M, Kobata A (Eds.).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]

Glycobiology: A practical approach. New York: Oxford University Press Inc. UK.

Chayen J., Bitensky L., Butcher RG. 1973. Histochemie: Grundlagen und Methoden [übersetzt von Michael Gschwendt]. UK: John Wiley and Sons L td.

Craik J.C.A., Harvey S.M. 1987. The causes of buoyancy in eggs of marine teleosts. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 67: 169-182.

Cutting J.A., Roth T.F. 1973. Staining of phospho-proteins on acrylamide gel electropherograms. Analytical Biochemistry, 54: 386-394.

Czesny S, Kolkoviski S, Dabrowski K, Culver D. 1999. Growth, survival, and quality of juvenile walleye, *Stizostedion vitreum*, as influenced by n–3 HUFA enriched Artemia nauplii. Aquaculture, 178: 103-115.

Dinis M.T., Ribeiro L., Soares F., Sarasquete C. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. Aquaculture, 176: 27-38.

Efthimiou S., Divanach P., Rosenthal H. 1994. Growth, food conversion and agonistic behaviour in common dentex (*Dentex dentex*) juveniles fed on pelleted moist and dry diets. Aquatic Living Resources, 7: 267-275.

Fabra M., Raldúa D., Bozzo M.G., Deen P.M., Lubzens E., Cerdà J. 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-1o play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. Developmental Biology, 295: 250-262.

Finn R.N., Fyhn H.J., Henderson R.J., Evjen M.S. 1996. The sequence of catabolic substrate oxidation and enthalpy balance of developing embryos and yolk-sac larvae of turbot, *Scophthalmus maximus* L. Comparative biochemistry and physiology - part A: Molecular & Integrative Physiology, 115: 133-155.

Finn R.N., Kristoffersen B.A. 2007. Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R hypothesis": correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. PLoS ONE, 2(1).

Fyhn H.J., Serigstad B. 1987. Free amino-acids as energy substrate in developing eggs and larvae of the cod *Gadus morhua*. Marine Biology, 96: 335-341.

Giménez G., Estévez A., Lahnsteiner F., Zecevic B., Bell J.G., Henderson R.J., Piñera J.A., Sanchez-Prado J.A. 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). Aquaculture, 260: 232-243.

Giméneza G. 2008. Optimización de la cría larvaria del dentón en condiciones intensivas de cultivo. Ph.D thesis, Department of Ecology, University of Barcelona, Spain.

Giméneza G. 2008. Optimización de la cría larvaria del dentón en condiciones intensivas de cultivo. Ph.D thesis, Department of Ecology, University of Barcelona, Spain.

Hagedorn H.H., Kunkel J.G. 1979. Vitellogenin and vitellin in insects. Annual Review of Entomology, 24: 475-505.

Iwasaki M., Inoue S. 1985. Structure of the carbohydrate units of polysialoglycoproteins isolated from the eggs of four species of salmonid fishes. Glycoconjugate Journal, 2: 209-228.

Kjesbu O.S., Solemdal P., Bratland P., Fonn M. 1996. Variation in annual egg production in individual captive Atlantic cod (*Gadus morhua*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53: 610-620.

Lahnsteiner F. 2000. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. Fish Physiology and Biochemistry 23: 107-118.

Lahnsteiner F. 2007. First results on a relation between ovarian fluid and egg proteins of *Salmo trutta* and egg quality. Aquaculture Research, 38: 131-139.

Lahnsteiner F., Patarnello P. 2003. Investigations on the metabolism of viable and nonviable gilthead sea bream (*Sparus aurata*) eggs. Aquaculture 223: 159-174.

Lin K.J., Twu J.Y., Chen C.H. 1990. Studies of daily spawning and quality of eggs in one goldline sea bream, *Sparus sarba*. *Bulletin* of *Taiwan Fisheries Research Institute*, 48: 251-262.

Loir M, Le Gac F, Somarakis S, Pavlidis M. 2001. Sexuality and gonadal cycle of the common dentex (*Dentex dentex*) in intensive culture. Aquaculture 194: 363–381.

Manning AJ, Crim LW. 1995. Variability in egg quality and production in a batch spawning flounder, *Pleuronectes ferrugineus*. In Goetz FW, Thomas P (Eds.). Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Austin, Texas, USA: Fish Symposium '95, Austin, p. 238.

Matsuura S., Furuichi M., Maruyama K., Matsuyama M. 1988. Daily spawning and quality of eggs in one female red sea bream. Suisan Zoshoku 36: 33-39.

McEvoy L, Holland D, McEvoy J. 1993. Effect of spawning fast on lipid and fatty acid composition of eggs of captive turbot, *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture, 114: 131-139.

Morales A.E., Cardenete G., Abellán E., García-Rejón L. 2005. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). Aquaculture Research, 36: 33-40.

Ohkubo N., Matsubara T. 2002. Sequential utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of barfin flounder, *Verasper moseri*. Marine Biology, 140: 187-196.

Oppen-Berntsen D.O., Hyllner S.J., Haux C., Helvik J.V., Walther B.T. 1992. Eggshell zonaradiata- proteins from cod (*Gadus morhua*) - extraovarian origin and induction by estradiol-17-beta. International Journal of Developmental Biology, 36: 247-254.

Parrish C.C., Castell J.D., Borwn J.A., Boston L., Strickland J.S., Somerton D.C. 1994. Fatty acid composition of Atlantic halibut eggs in relation to fertilization. Bulletin of Aquaculture Association of Canada, 94: 1-3.

Piñera J.A., Bernardo D., Blanco G., Vázquez E., Sánchez J.A. 2004. Finding my parents: how many genetic markers are needed? European Aquaculture Society, 34: 661-662.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]

Rani M.S. 2005. Prediction of larval viability based on egg quality parameters and early cleavage patterns in the experiments of triploidy induction in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Master of Science Thesis, University of Tromsø, Norway.

Rønnestad I., Koven W., Tandler A., Harel M., Fyhn H.J. 1998. Utilisation of yolk fuels in developing eggs and larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 162: 157-170.

Rønnestad I., Koven W.M., Tandler A., Harel M., Fyhn H.J. 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*). Marine Biology, 120: 187-196.

Sakai K., Minoru N., Masaaki I., Yoshioki S., Masatoshi T. 1985. Quality variation of naturally spawned eggs red sea bream. Suisan Zoshoku, 33: 7-11.

Samaee S.-M., Estévez A. 2011. Evidence for the fragmentation of VtgAb LvH in common dentex (*Dentex dentex*), a marine pelagophil teleost. Theriogenology, 76(1):110-4.

Samaee S-.M., Estévez A., Giménez G., Lahnsteiner F. 2009a. Evaluation of quantitative importance of egg lipids and fatty acids during embryos and larvae development in marine pelagophil teleosts: with an emphasis on *Dentex dentex*. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 311: 735–751.

Samaee S.-M., Lahnsteiner F., Giménez G., Estévez A., Sarg B., Linder H. 2009b. Quantitative composition of vitellogenin-derived yolk proteins and their effects on viability of embryos and larvae of common dentex (*Dentex dentex*), a marine pelagophil teleost. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 311: 504-520.

Samaee S.-M., Mente E., Estévez A., Giménez G., Lahnsteiner F. 2010. Embryo and larva development in Common Dentex (*Dentex dentex*), a pelagophil teleost: the compositions of eggs free amino acids and their interrelations. Theriogenology, 73: 909-919.

Samaee S.-M., Estévez A. 2012. Embryo and larva development in *Dentex dentex*, a marine pelagophil teleost: an endeavor to find a series of new fatty acid interrelations. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 317(1):55-72.

Samaee S.-M., Mente E., Estévez A. 2013. Egg protein bound amino acid content and embryo/larva success in common dentex (*Dentex dentex*), a marine pelagophil teleost. Animal Biology, 63: 59-75.

Samaee S-M. 2010. Quantitative composition of egg protein, lipid, fatty acid, and free amino acid in common dentex (*Dentex dentex* L.) and their relations to viability and larval development. Cybium, 34(2): 194.

Sawaguchi S., Kagawa H., Ohkubo N., Hiramatsu N., Sullivan C.V., Matsubara T. 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. Molecular Reproduction and Development, 73: 719-736.

Shields R.J., Brown N.P., Bromage N.R. 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. Aquaculture, 155: 1-12.

Terner C. 1979. Metabolism and energy conversion during early development. In: Hoar WS, Randall DJ (Eds.). The Physiology of Developing Fish, Part A. Eggs and Larvae, Fish Physiology, volume 8. London: Academic Press, pp: 261-278.

Westerlund L., Hyllner S.J., Schopen A., Olsson P.E. 2001. Expression of three vitelline envelope protein genes in Arctic char. General and Comparative Endocrinology, 122: 78-87.

نحوه استناد به این مقاله:

سمائی س.م.ر. شدت باندهای الکتروفورزی محتوی پروتئین‌های غیر ویتلوژنینی تخم در رابطه با بقاء جنین و لارو در ماهی دنتکس معمولی (*Dentex dentex*)- یک ارزیابی اولیه. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۴۰۰، ۴۸-۳۸ :(۴)۹ .

Samaee S.M.R. The intensity of electrophoretic bands containing egg non-vitellogenin derived proteins in relationship with embryo-larvae viability in common dentex (*Dentex dentex*) – a preliminary evaluation. Journal of Applied Ichthyological Research, University of Gonbad Kavous. 2021, 9(4): 38-48.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]

The intensity of electrophoretic bands containing egg non-vitellogenin derived proteins in relationship with embryo-larvae viability in common dentex (*Dentex dentex*) – a preliminary evaluation

Samaee S.M.R
Assistant Prof., Dept. of Aquatic Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Type:

Original Research Paper

Paper History:

Received: 22-10-2021
Accepted: 22-11- 2021

Corresponding author:

Samaee S.M.R. Assistant Prof., Dept. of Aquatic Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Email: seyedmohammadreza.samaee@gmail.com

Abstract

Despite the reported effects of egg vitellogenin-derived proteins (VtgDP) and amino acids on embryo-larvae viability in common dentex the effects of non-vitellogenin-derived proteins (non-Vtg-DP) has yet to be determined. As an initial study, fertilized eggs (70 batches) were provided by natural spawning of broodfish in captivity. Viability parameters (VP) such as egg floating, hatching, and larval survival rate were calculated. Egg batches were categorized as low, medium, and high quality upon hatching rate. Based on the SDS-PAGE of egg crude extracts 63 protein bands (16.7 to 131.4 kDa) were identified. The intensity of bands on gel (densitometry; <200 to 877 $\mu g\ mL^{-1}$), and their biochemical nature (specific staining) was determined. After subjecting the bands to a screening process, 11 bands were considered as non-vtgDP-contained bands. The highest intensity of the bands was observed in the gels belonging to high quality eggs. The intensity of 9 bands of 11 (individually or in combination with other protein bands) was significantly ($p<0.001$) and positively correlated to VPs via a series of simple and multiple regression models. In brief, the preliminary results revealed the importance of the class of egg proteins and their effects (individual and combined) on the viability of common dentex larvae and indicated their probable potential use to predict egg quality in teleosts. It also showed that it is worth to conduct a deeper study for more detailed characterization of the protein content of the selected bands and to evaluate the mechanism of their effects on larval success.

Keywords: Egg quality, marine fish species, bio-markers

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.22034/jair.9.4.41]