تغییرات فصلی مقادیر گلیسرول در دوجورپایان

شهناز محسنی عسگرانی[۱]، امیدوار فرهادیان[۱] و جواد کرامت[۲]

[۱] **ایران، اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات**

[۲] **ایران، اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی**

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۵

چکیده

در این مطالعه، مقادیر گلیسرول دو گونه از دوجورپایان *Gammarus pseudosyriacus* و *Gammarus bakhteyaricus* از منطقه خرسونک و کلیچه در طی فصول مختلف یک دوره یک‌ساله موردبررسی قرارگرفت. نمونه‌ها پس از خشک شدن عصاره‌گیری و به دستگاه HPLC تزریق شد تا مقدار گلیسرول تعیین گردد. میزان گلیسرول *G. pseudosyriacus* در فصل بهار، تابستان، پاییز و زمستان بترتیب برابر با ۹۱/۶۹، ۳/۷۲، ۲۹، ۲۴/۲۸ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن مرطوب و برای *G. bakhteyaricus* بترتیب برابر با ۲۸/۸۶، ۹/۵۷، ۴۰/۸۱، ۲/۸۱ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن مرطوب بود. افزایش قندهای الکلی با وزن مولکولی کم ارتباط تنگاتنگی با دیاپوز و آنهیدروبیوزیز دارد. در اوایل پاییز با شروع فرایند آنهیدروبیوزیز موجود شروع به افزایش این ترکیبات محافظت‌کننده می‌کند و در اواخر پاییز این ترکیبات به حداکثر میزان خود می‌رسد. مصرف این ترکیبات در زمستان به‌عنوان ضد یخ سبب به حداقل رسیدن میزان آن‌ها در زمستان می‌شود. چنین به نظر می‌رسد که گونه *G. pseudosyriacus* در اواسط بهار میزان این ترکیبات را افزایش داده تا در تابستان در مواجهه با شوک دمایی و خشکی احتمالی قادر به بقا باشد که در تابستان با مصرف این ترکیبات مقدار آن‌ها به حداقل می‌رسد. علت وقوع این پیک‌ها را می‌توان به عوامل مختلف محیطی از قبیل نوسانات تدریجی دمای آب/هوا نسبت داد. دلیل دیگر نرخ مصرف گلیسرول این دو گونه دوجورپای بررسی شده در فصول مختلف است. این مطالعه نشان داد اندازه‌گیری ترکیبات بیوشیمیایی بخصوص گلیسرول دوجورپایان ابزار مناسبی برای سنجش استرس‌های زیست‌محیطی محیط‌های آبی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *G. pseudosyriacus*، *G. bakhteyaricus*، دوجورپایان، گلیسرول، تغییرات فصلی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۳۹۱۳۵۶۴ ، پست الکترونیکی: omfarhad@cc.iut.ac.ir

مقدمه

دوجورپایان از راسته‌های سخت‌پوستان هستند و به‌طور عمده در دو دسته گاماریده (Gammaridae) و هایپریده (Hyperidae) قراردارند. فراوانی و تنوع زیاد دو جورپایان در اکوسیستم‌های آبی سبب پراکنش جهانی آنها شده است. دو جورپایان بعنوان غذای زنده و طعمه در تغذیه لارو ماهیان اهمیت دارد. بسیاری ازدوجورپایان شاخص‌های زیست‌شناختی مهم برای ارزیابی کیفیت آب و اطلاع از درجه آلودگی آبها هستند (۳). مطالعات در خصوص آرایه‌شناسی گونه‌های جنس گاماروس در ایران در برخی از استانهای ایران از قبیل قم، مرکزی، تهران، لرستان، کرمان، چهارمحال و بختیاری، اصفهان و حوزه دریای خزر صورت گرفته است (۱ و ۲).

باتوجه به نقش مطالعات بیولوژیک و اکولوژیک زیستمندان در حفاظت و مدیریت منابع آب، محیط‌زیست فیزیکی آب های جاری دارای خصوصیات ویژه‌ای است که چالش‌هایی را برای جانداران ساکن آن ایجاد می‌کند. موجودات آبزی به نوبه خود نسبت به تغییر خصوصیات فیزیکی زیستگاه و

کیفیت آب عکس‌العمل نشان می‌دهند. درشت بی‌مهرگان کف‌زی ازجمله موجودات آبزی هستند که با تغییرات ایجادشده در زیستگاه تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۲ و ۳). تغییرات آب‌وهوای جهانی و خشکسالی از بزرگ‌ترین استرس‌های محیط زیستی برای حیات زیست‌مندان گیاهی و جانوری بوده است که سطوح دما و رطوبت قابل‌تحمل آن‌ها را تغییر می‌دهد. در تابستان خشک شدن و در زمستان شوک سرمایی از فاکتورهای تعیین‌کننده نوع استراتژی بقای موجود در بی‌مهرگان تلقی می‌شود (۲۰).

تغییر زیستگاه، تغییر آب و هوا، تعارضات بیولوژیکی و برداشت بی‌رویه تأثیرات قابل‌توجهی روی جمعیت حشرات و پاسخ‌های فیزیولوژیکی تنظیم‌کننده آن‌ها دارد. خشک شدن یکی از بیش‌ترین استرس‌های وابسته به محیط‌زیست است که در ارتباط مستقیم با افزایش گرمای جهانی قراردارد. حشرات خشکی عمدتاً به دلیل وجود نسبت بالای سطح به حجم یکی از حساس‌ترین موجودات در مقابل خشک شدن هستند. موجودات استراتژی‌های مختلفی را برای جلوگیری از خشک شدن و یا تحمل خشک شدن اتخاذ کرده‌اند. جلوگیری از خشک شدن با حفظ آب و یا کاهش از دست رفتن آب بدن از طریق روش‌های اکولوژیکی، فیزیولوژیکی، ساختاری و بیوشیمیایی امکان‌پذیر است (۱۲).

دمای بدن و فعالیت‌های متابولیکی موجودات خونسرد مثل سخت‌پوستان عمدتاً وابسته به دمای آب اطراف است. سازگاری با دما در موجودات در سه بازه زمانی سازگاری با تغییرات فصلی، سازگاری با تغییرات سریع ناشی از تغییر میزان آب و سازگاری طولانی‌مدت درزمانی که موجود وارد محیط جدید می‌شود (سازگاری ژنتیکی) قابل‌توجه است (۳و ۱۲).

معمولاً چهار متابولیسم سلولی برای سازگاری با تغییر دمای محیط پیرامون شامل تغییر در میزان آنزیم‌های جبران‌کننده تأثیرات دما، تغییر در میزان مواد و فاکتورهای مؤثر در پاسخ به تغییر دما، تغییر در فرم و یا تلفیق فعالیت آنزیم‌ها، و القاء یا فعال‌سازی آنزیم‌ها با کاتالیزگرهای مؤثر در دماهای مختلف وجود دارد (۸).

استراتژی دیگری که می‌تواند سبب بقا در مدت زمان طولانی، حتی پس از کاهش محتوای آب بدن به زیر آستانه‌ی تحمل (کمتر از ۲۳درصد آب در وزن مرطوب و یا کمتر از ۰/۳ گرم به ازاء هر گرم وزن خشک) شود، آنهیدرو بیوزیز است. دراین مرحله از زندگی، ارگانیسم می‌تواند کاملاً بی‌آبی را تحمل کند و فعالیت‌های متابولیکی خود را کاهش دهد. به عبارت دیگر یک ارگانیسم در مرحله‌ی آنهیدروبیوزیز هیچ نشانه آشکاری از حیات را نشان نمی‌دهد و با دوباره آبدار شدن محیط فعالیت‌های حیاتی خود را از سر می‌گیرد. لاروهای بدون آب‌شده حشرات می‌توانند محدوده دمایی ۲۷- درجه تا ۱۰۶+ درجه را تحمل کنند (۱۳).

شرایط نامساعد محیطی همچون نبود آب (۹)، یخ زدن (۱۷)، نبود اکسیژن (۶) و قرارگرفتن در معرض شوری بالا (۱۱)، باعث وارد شدن موجود به مرحله آنهیدروبیوزیز می‌شود. این سازگاری فیزیولوژیکی از طریق تجمع برخی از ترکیبات همچون گلیسرول، سوربیتول، ساکارز، ترهالوز و آمبلی فروز امکان‌پذیر است. علاوه بر ترکیبات ذکر شده، مواد دیگری نیز همچون اینوزیتول (۱۶) و رایبیتول (۵) از ارگانیسم‌ها در برابر بی‌آبی، شوک اسمزی و حرارتی حفاظت می‌کنند.

علاوه بر گرما عوامل دیگری نیز باعث افزایش ترهالوز می‌شوند این عوامل شامل: آرسنات، یون فلزات سنگین نظیر کادمیوم، جیوه و عوامل اکسیدکننده است (۹). ترکیبات مختلفی مانند پلی‌ال به‌عنوان ترکیبات حفاظت کننده در پاسخ به دمای پایین و یخ زدن در همولنف حشرات ساخته می‌شود. تفاوت در مقادیر پلی‌ال‌های درون یک‌گونه مربوط به تغییرات فصلی است که به‌وسیله دما و دوره‌های نوری تنظیم می‌شود (۶). پلی‌ال‌ها، به‌عنوان

ترکیبات حفاظت کننده در برابر تغییرات دما نه‌تنها در حشرات، بلکه در همه‌ی ارگانیسم‌های پوست‌انداز یافت می‌شود. شرایط شوک گرمایی و سرما روی تجمع پلی‌ال‌ها و فعالیت آنزیم‌های مربوط به متابولیسم آن در نماتودها تأثیر می‌گذارد (۱۸). در بسیاری از حشرات هر دو عامل خشک شدن و دمای پایین، تولید گلیسرول را القاء می‌کند و باعث حفاظت در برابر تأثیرات زیان‌آور سلولی خشک شدن، روی مغز و پروتئین‌ها می‌شود (۱۰).

اگرچه تحقیقات در خصوص قندهاو پلی‌ال‌ها و نقش آن‌ها در بی‌مهرگان خشکی و آبزی به طور موردی انجام‌شده است لیکن در خصوص تأثیرات عوامل اکولوژیک در طی فصول مختلف و همچنین در زیستگاه‌های مختلف کمتر انجام‌شده است. دراین مطالعه هدف آن است تا اثر مقادیر ترهالوز و گلیسرول روی دوجورپایان جنس *Gammarus* موردبررسی قرارگیرد.

مواد و روشها

معرفی منطقه موردمطالعه: دراین تحقیق رودخانه زاینده‌رود بزرگترین رودخانه فلات مرکزی ایران، به‌عنوان منطقه موردمطالعه انتخاب شد. نمونه‌برداری‌ها از دو ایستگاه خرسونک و کلیچه انجام شد. ایستگاه خرسونک با بستر سنگی – قلوه‌سنگی، جریان آب نسبتاً تند، طول جغرافیایی ۳۲ درجه و ۳۴ دقیقه و ۱۱ ثانیه شمالی و عرض۵۰ درجه و ۲۲ دقیقه و ۱۷ ثانیه شرقی است. ایستگاه کلیچه در فاصله ۱۱ کیلومتری از ایستگاه خرسونک قراردارد و در طول جغرافیایی۳۲ درجه و ۳۸ دقیقه و ۰۲ ثانیه شمالی و عرض ۵۰ درجه و ۲۷ دقیقه و ۱۴ ثانیه شرقی قراردارد. این منطقه دارای آب‌وهوای سرد و کوهستانی، زمستان‌های سرد و برفی بوده است، به‌طوریکه سطح رودخانه در نیمی از فصل زمستان پوشیده از یخ است.

نمونه‌برداری: در این تحقیق نمونه‌برداری از منطقه مورد نظر، به‌صورت فصلی از اوایل پاییز ۱۳۹۴ تا اواسط تابستان ۱۳۹۵ از دو ایستگاه مورد نظر انجام گرفت. نمونه‌برداری فصل پاییز در تاریخ ۱۸ آبان ماه، فصل زمستان در ۱۴ دی‌ماه، فصل بهار در ۲۸ اردیبهشت و فصل تابستان در تاریخ ۱۸ تیرماه انجام گرفت. نمونه‌برداری در هر فصل به مدت یک روز از ساعت ۹ صبح تا ۲ بعدازظهر، به ترتیب از ایستگاه خرسونک در فاصله ۴۰ کیلومتری چادگان و ایستگاه کلیچه در فاصله ۳۰کیلومتری چادگان انجام گرفت. در هر نمونه‌برداری ۲۰۰ فرد جمع‌آوری گردید. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در مکان هر ایستگاه اندازه‌گیری شد و سپس نمونه‌ها برای آنالیز سایر پارامترها به آزمایشگاه هیدروبیولوژی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل گردید.

فرآیند خشک‌کردن: گروه‌های ۵-۳ تایی از نمونه‌های گاماروس روی کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرومتر، با ۰/۴۴ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیرشده درون پتری دیش‌های شیشه‌ای (۱۰ پتری دیش) قرار داده شدند. پتری دیش‌ها در دمای اتاق ۲۶-۲۲ درجه سانتی‌گراد در مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک گردید.

استخراج قند از نمونه‌های خشک‌شده: برای استخراج و اندازه‌گیری قندهای الکلی موجود در بدن، حدود ۱۵ میلی‌گرم از نمونه‌های خشک‌شده در یک پتری دیش حاوی آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت خیسانده شد پس‌ازآن به یک لوله آزمایش استریل حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۰ درصد منتقل و همگن‌سازی به مدت ۲۰ دقیقه بااستفاده از ورتکس انجام شد و محلول پس از یک فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد، پس‌ازآن مایع عبور داده‌شده تحت گاز ازت خشک شد. پس از تبخیر کامل حلال الکلی، رسوب باقی‌مانده در ۰/۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیرشده، حل شد. محلول حاصل از فیلترسرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. قندهای الکلی به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) Chimadzu

مدل Waters مجهز به ستون تجزیه کربوهیدرات‌ها (SC1011Shodex) جداسازی شد. فاز متحرک شامل آب، سرعت فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و آشکارساز مورد استفاده RI بود. جداسازی قندها در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ستون و آشکارساز استفاده شد. پس از تنظیمات دستگاه و پایدار شدن آن، نمونه‌ی قند تهیه‌شده از نمونه‌ها به حجم ۵ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد. جهت اندازه‌گیری یا تجزیه کمی قندهای الکلی جداشده از روش رسم منحنی درجه‌بندی شده استفاده شد. برای این منظور استاندارد گلیسرول با غلظت‌های ۱۰ تا ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به دستگاه تزریق و منحنی استاندارد (سطح زیر پیک برابر غلظت) برای هر غلظت رسم شد.

تجزیه آماری: اطلاعات بدست آمده به‌صورت میانگین گزارش می‌شوند. برای اطمینان از نرمال بودن داده‌های حاصل از تیمارهای آزمایشی با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنف مورد بررسی قرارگرفت. داده‌های درصد ابتدا به ریشه دوم آنها تبدیل‌شده و سپس مورد تجزیه واریانس قرارگرفت. داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه آماری قرارگرفت. مقایسه میانگین داده‌های مختلف با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزارSPSS 16.0 صورت گرفت.

نتایج

در این مطالعه برخی خصوصیات کیفی آب از قبیل دما، هدایت الکتریکی، سختی، اکسیژن محلول و شوری آب اندازه‌گیری شد. نتایج در جدول ۱ نشان می‌دهد که در فصل بهار، تابستان، پاییز و زمستان میانگین دما بترتیب برابر با ۱۰، ۱۴، ۱۳و ۱- درجه سانتی‌گراد، میانگین هدایت الکتریکی بترتیب برابر با ۲۵۲، ۲۳۶، ۲۲۰ و ۲۸۴ میکروموس بر سانتی‌متر، میانگین سختی بترتیب برابر با ۱۸۵، ۱۴۰، ۱۹۰، ۲۳۰ میلی‌گرم برلیتر، میانگین اکسیژن محلول به ترتیب برابر با ۱۱/۲۵، ۱۰/۲۶، ۱۰/۴۹، ۱۵/۲۹میلی‌گرم برلیتر و میانگین شوری بترتیب برابر با۱۴۷/۸، ۱۳۸/۴، ۱۲۹/۰۳، ۱۶۹/۴۱میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد.

جدول ۱- پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب منطقه نمونه‌برداری

پارامترها	بهار	تابستان	پاییز	زمستان
دمای آب (°C)	۱۰	۱۴	۱۳	-۱
هدایت الکتریکی ($mhos\ cm^{-1}\mu$)	۲۵۲	۲۳۶	۲۲۰	۲۸۴
سختی آب ($mg/l\ CaCO_3$)	۱۸۵	۱۴۰	۱۹۰	۲۳۰
اکسیژن (mg/l)	۱۱/۲۵	۱۰/۲۶	۱۰/۴۹	۱۵/۲۹
شوری (mg/l)	۱۴۷/۸	۱۳۸/۴	۱۲۹/۰۳	۱۶۹/۴۱

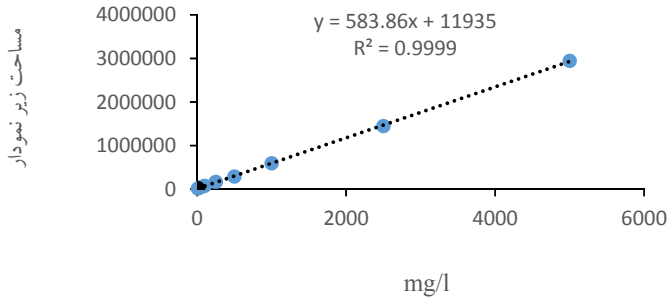
نظر به این‌که دراین مطالعه تغییرات فصلی گلیسرول در فصول مختلف در دوجورپایان مورد بررسی قرارگرفت، از بین گونه‌های شناسایی‌شده فقط دو گونه *Gammarus pseudosyriacus* و *Gammarus bakhteyaricus* که در تمام فصول حضور داشتند مورد ارزیابی واقع شد. شناسایی گونه‌ها براساس کلید و راهنمای‌شناسی ارائه‌شده توسط ابراهیم نژاد و همکاران ۱۳۸۴ انجام شد (۱). در فصول مختلف وزن نمونه‌ها قبل از فرآیند خشک‌کردن اندازه‌گیری می‌شد، پس از فرآیند خشک‌کردن نیز نمونه‌ها توزین

شدند. مقادیر وزن مرطوب و خشک به تفکیک گونه‌های مختلف و فصول در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول۲- تغییرات وزن خشک و مرطوب دو گونه *G. pseudosyriacus* و *G. bakhteyaricus*

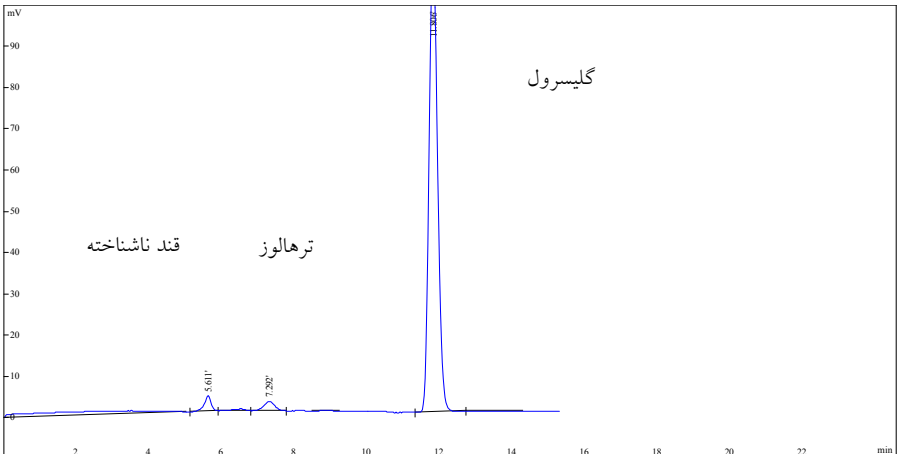
	وزن مرطوب (mg)		وزن خشک (mg)	
	G. pseudosyriacus	***G. bakhteyaricus***	***G. pseudosyriacus***	***G. bakhteyaricus***
بهار	۰/۲۱	۰/۲۴	۰/ ۰۱۵	۰/۰۲۱
تابستان	۰/۰۶۵	۰/۰۲۸	۰/۰۰۷	۰/۰۰۴
پاییز	۰/۰۵۴	۰/۰۵۷	۰/۰۱۵	۰/۰۰۷
زمستان	۰/۰۵۱	۰/۰۴۲	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹

به‌منظور بدست آوردن منحنی استاندارد گلیسرول برایHPLC، غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از گلیسرول به طور جداگانه به دستگاه تزریق شد. نتایج در شکل ۱ ارائه‌شده است. نتایج رسم نمودار خطی برای گلیسرول همبستگی بالای r^2=۰/۹۹ را نشان داد.



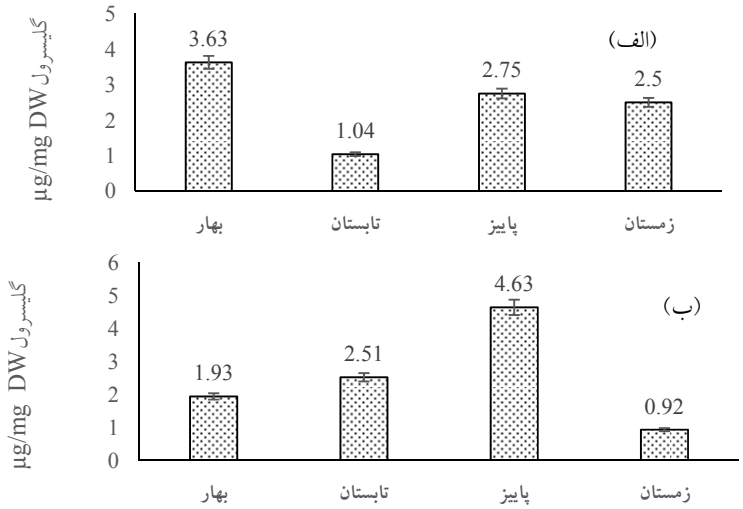
شکل ۱- منحنی استاندارد HPLC گلیسرول

تغییرات غلظت گلیسرول طی ماه‌های مختلف توسط دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. علاوه بر گلیسرول قند ترهالوز و یک ترکیب قند ناشناخته نیز در کروماتوگرام‌ها مشاهده شد. زمان بازداری برای قندهای ناشناخته، ترهالوز و گلیسرول بترتیب برابر با ۵، ۷ و ۱۱ دقیقه بود (شکل ۲).



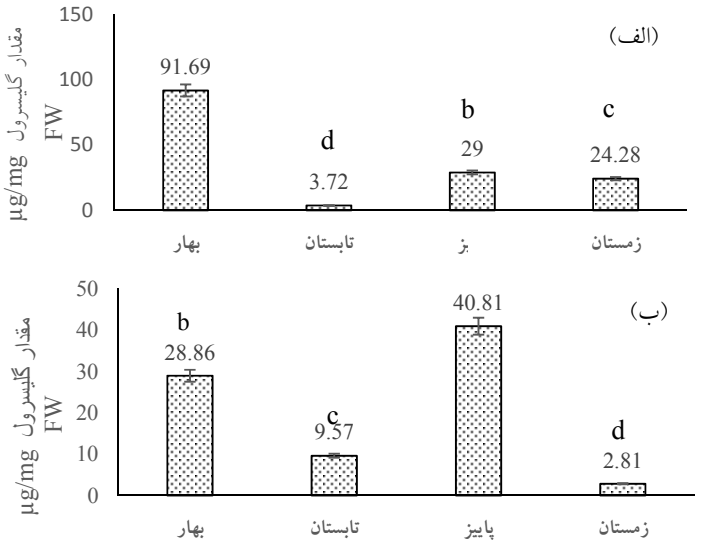
شکل۲- نمونه‌ای از کروماتوگرام HPLC مربوط به استانداردهای ترهالوز و گلیسرول

تغییرات فصلی گلیسرول برحسب میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک در دو گونه *G. pseudosyriacus* و *G. bakhteyaricus* در شکل ۳ (الف وب) نشان داده‌شده است. این نتایج مبین آن است که میزان گلیسرول گونه *G. pseudosyriacus* در فصل بهار، تابستان، پاییز و زمستان بترتیب برابر با ۳/۶۳، ۱/۰۴، ۲/۷۵و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک و برای *G. bakhteyaricus* بترتیب برابر با ۱/۹۳، ۲/۵۱، ۴/۶۳ و ۰/۹۲ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک بوده است. در گونه *G. pseudosyriacus* بیش‌ترین میزان گلیسرول برابر با ۳/۶۳ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک در فصل بهار و کمترین میزان آن ۱/۰۴ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک در فصل تابستان اندازه‌گیری شد (شکل۳ –الف). در گونه *G. bakhteyaricus* بیش‌ترین میزان گلیسرول ۴/۶۳ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک در فصل پاییز و کمترین میزان آن برابر با ۰/۹۲ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک در فصل زمستان دیده شد (شکل۳–ب).



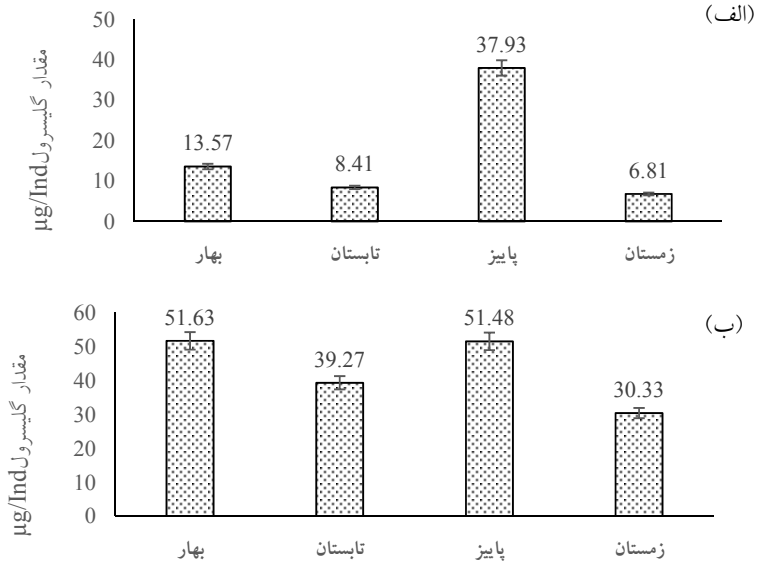
شکل۳- تغییرات فصلی گلیسرول برحسب میکروگرم بر میلی‌گرم وزن خشک در گونه *G. pseudosyriacus* (الف) و *G. bakhteyaricus* (ب)

تغییرات فصلی گلیسرول برحسب میکروگرم بر میلی‌گرم وزن مرطوب در دو گونه *G. pseudosyriacus* و *G. bakhteyaricus* در شکل ۴ (الف وب) نشان داده‌شده است. این نتایج بیان می‌کند که میزان گلیسرول *G. pseudosyriacus* در فصل بهار، تابستان، پاییز و زمستان بترتیب برابر با ۹۱/۶۹، ۳/۷۲، ۲۹و ۲۴/۲۸ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن مرطوب و برای *G. bakhteyaricus* بترتیب برابر با ۲۸/۸۶، ۹/۵۷، ۴۰/۸۱ و ۲/۸۱ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن مرطوب بوده است. در گونه *G. pseudosyriacus* بیش‌ترین میزان گلیسرول برابر با ۹۱/۶۹ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن مرطوب در فصل بهار و کمترین میزان آن ۳/۷۲ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن مرطوب در فصل تابستان اندازه‌گیری شد (شکل۴ –الف). در گونه *G. bakhteyaricus* بیش‌ترین میزان گلیسرول ۴۰/۸۱ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن مرطوب در فصل پاییز و کمترین میزان آن برابر با ۲/۸۱ میکروگرم بر میلی‌گرم وزن مرطوب در فصل زمستان دیده شد. بین سطوح گلیسرول در تمام فصول در دو گونه تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ مشاهده شد (شکل۴ –ب).



شکل۴ – تغییرات فصلی گلیسرول برحسب میکروگرم بر میلی‌گرم وزن مرطوب در گونه *G. pseudosyriacus* (الف) و *G. bakhteyaricus* (ب)

در شکل–۵ (الف وب) تغییرات فصلی گلیسرول برحسب میکروگرم به ازاء هر فرد در گونه *G. pseudosyriacus* و*G. bakhteyaricus* نشان داده‌شده است. این نتایج بیان می‌کند که میزان قند گلیسرول گونه *G. pseudosyriacus* در فصل بهار، تابستان، پاییز و زمستان بترتیب برابر با ۱۳/۵۷، ۸/۴۱، ۳۷/۹۳ و ۶/۸۱ میکروگرم به ازاء هر فرد و برای گونه *G. bakhteyaricus* بترتیب برابر با ۵۱/۶۳، ۳۹/۲۷، ۵۱/۴۸و ۳۰/۳۳ میکروگرم به ازاء هر فرد بوده است. در گونه *G. pseudosyriacus* بیش‌ترین میزان گلیسرول برابر با ۳۷/۹۳ میکروگرم به ازاء هر فرد در فصل پاییز و کمترین میزان آن ۶/۸۱ میکروگرم به ازاء هر فرد در فصل زمستان اندازه‌گیری شد (شکل ۵ –الف). در گونه *G. bakhteyaricus* بیشترین میزان گلیسرول ۵۱/۶۳ میکروگرم به ازاء هر فرد در فصل بهار و کمترین میزان آن برابر با ۳۰/۳۳ میکروگرم به ازاء هر فرد در فصل زمستان دیده شد (شکل۵ –ب).



شکل۵– تغییرات فصلی گلیسرول برحسب میکروگرم به ازاء هر فرد در گونه *G. pseudosyriacus* (الف) و *G. bakhteyaricus* (ب)

بحث و نتیجه‌گیری

در طی دوره‌های زمستان گذرانی و شرایط شوک دمایی تابستان در بدن بی‌مهرگان یک سری تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اتفاق می‌افتد که به مصون ماندن بی‌مهرگان از اثرات سوء ناشی از دماهای پایین و بالا کمک می‌کند. ازجمله این تغییرات، افزایش غلظت یکسری ترکیبات با وزن مولکولی پایین شامل قندها و پلی‌ال‌ها می‌شود. رایج‌ترین پلی‌ال شناخته‌شده در بی‌مهرگان گلیسرول است (۴). این ترکیبات به حفظ ساختار طبیعی غشاهای سلولی و پروتئین‌ها در شوک‌های دمایی کمک می‌کنند و به‌این‌ترتیب باعث افزایش تحمل بی‌مهرگان در دماهای پایین در زمستان و دماهای بالا در تابستان می‌شود (۱۴).

وجود مقادیر بالای گلیسرول دراین گونه‌ها به‌خصوص در فصل پاییز می‌تواند دلایل ناشناخته و کم شناخته‌ای داشته باشد. به نظر می‌رسد که افزایش قندهای الکلی با وزن مولکولی کم ارتباط تنگاتنگی با دیاپوز و آنهیدروبیوزیز دارد و در اوایل پاییز با شروع فرایند آنهیدروبیوزیز موجود شروع به افزایش این ترکیبات محافظت‌کننده می‌کند و در اواخر پاییز این ترکیبات به حداکثر میزان خود می‌رسد. مصرف این ترکیبات در زمستان به‌عنوان ضد یخ سبب به حداقل رسیدن میزان آن‌ها در زمستان می‌شود. میزان این ترکیبات در فصل بهار در هردو گونه بالابود. باتوجه به اینکه در این فصل نمونه‌برداری در اواخر اردیبهشت‌ماه انجام شد چنین به نظر می‌رسد که موجود با شروع فرآیند آنهیدروبیوزیز در اواسط بهار به دلیل بالا رفتن تدریجی دما میزان این ترکیبات را افزایش داده تا در تابستان در مواجهه با شوک دمایی و خشکی احتمالی قادر به بقا باشد. در تابستان با مصرف این ترکیبات مقدار آن‌ها به حداقل می‌رسد. براساس نتایج بدست آمده از مطالعات گذشته، گلیسرول باعث محافظت در برابر تنش‌های دمایی اعم از سرما و گرما می‌شود (۱۹).

علت وقوع پیک‌های افزایش گلیسرول را می‌توان به عوامل مختلفی نسبت داد. برای نمونه می‌توان به نوسانات تدریجی دمای آب اشاره نمود. عامل مهم دیگر قابل‌بحث تفاوت مصرف این ترکیبات در فصول مختلف است. برای نمونه در زمستان برای جلوگیری از یخ زدن میزان گلیسرول ذخیره‌شده در فصل قبل (پاییز) به مصرف می‌رسد و میزان آن در فصل سرما و یخبندان تا سر حد امکان کاهش می‌یابد. مطالعه در برخی بندپایان ریز از قبیل *Alaskozetes arcticus* به جلوگیری از یخ زدن تجمع گلیسرول و حذف هسته‌های یخ را نشان می‌دهد (۱۹).

دراین مطالعه استدلال ما این است قند گلیسرول برای مقابله با سرما (کریپتوبیوزیز) می‌باشد اما مطالعات آزمایشگاهی برای اثبات این موضوع نیاز است. به طور مشابهی لینا و همکاران (۲۰۱۲) نیز پلی‌ال‌ها را به‌عنوان شاخص استرس در لاروهای *Drosophila melanogaster* و یک نشانگر در آنهیدروبیوزیز معرفی نمودند (۱۵). علاوه بر این، چوان و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که تغییر زیستگاه و آب و هوا تأثیرات قابل‌توجهی روی جمعیت‌های بندپایان دارند. آن‌ها بیان کردند که در بسیاری از حشرات هردو عامل خشک شدن و دمای پایین تولید گلیسرول را القاء می‌کند.

نتایج نشان داد که این دو گونه در برابر تغییرات فصلی تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای در مقادیر گلیسرول بدن خود اعمال می‌کنند. این تغییرات برگرفته از تغییرات دما و سختی آب طی فصول مختلف است. بی‌مهرگان تغییرات ناگهانی محیط زندگی خود را به‌عنوان یک تنش قلمداد کرده و در برابر این استرس از خود واکنش نشان می‌دهند ازآنجایی‌که ممکن است این نوع تنش‌ها زودگذر و یا دائمی باشد مکانیسم عمل موجود نیز در پاسخ به آن تفاوت می‌کند.

منطقه موردمطالعه جزء مناطق سردسیری دسته‌بندی می‌شود که در زمستان دوره‌های یخبندان کوتاه و یا طولانی

مدتی را تجربه می‌نماید، این دو گونه گاماروس مورد بررسی نیز برای سازگاری در چنین منطقه‌ای مکانیسمی را اتخاذ کرده که با افزایش قند گلیسرول و ترهالوز در پاییز قبل از شروع چنین تنش‌هایی آمادگی لازم را برای زمستان گذرانی داشته باشد. در تابستان نیز ممکن است به علت تغییراتی که در دمای آب از پایان زمستان تا اواخر بهار رخ می‌دهد، برای آمادگی در برابر شرایط خشکی احتمالی مقادیر این دو قند را در فصل بهار در خون خود بالا می‌برد.

نتایج نشان داد که گلیسرول در شرایط زمستان گذرانی در مواجهه با شوک‌های دمایی ایفای نقش می‌کنند. در مورد تفاوت مقادیر گلیسرول در بین دو گونه نیز می‌توان چنین بیان کرد که تفاوت بین‌گونه‌ای معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد ولی گونه *G. pseudosyriacus* همواره مقادیر بالاتری از گلیسرول را داشت. این سازگاری می‌تواند در تغییرات شدید اقلیمی و یخبندان و خشکی‌های احتمالی طولانی‌مدت به این‌گونه برای بقا کمک کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تحصیلات تکمیلی و معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان به دلیل فراهم آوردن امکانات انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

۱. ابراهیم نژاد، م.، حسینی، ل.، و ساری، ع. ۱۳۸۴. جمع‌آوری و شناسایی گونه‌های جنس *Gammarus* در رودخانه زاینده‌رود، مجله زیست‌شناسی ایران، شماره ۱۸، صفحات ۲۱۸-۲۲۷.

۲. آلن، د.، ۱۹۴۵. اکولوژی رودخانه، ساختار عمل آبهای جاری، ویرایش دوم، مترجم ابراهیم نژاد، م.، ۱۳۸۵. انتشارات دانشگاه اصفهان، اصفهان،۵۷۴صفحه.

3. Adams, S. M., 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress, Bethesda, 644pp.
4. Burke, M. J., 1986. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In membranec, metabolism, and dry organisms. Comstock Publishing Associate, Cornell University Press, Ithaca, PP: 358-363.
5. Cannon, R. J. C., and Block, W., 1988. Cold tolerance of micro arthropods. Biological Reviews, 63, PP: 23-77.
6. Chen, Q., and Haddad, G., 2004. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia. The Journal of Experimental Biology, 207, PP: 3125-3129.
7. Chown, S. L., Sorensen, J. G., and Terblanche, J. S., 2011. Water loss in insects: an environmental change perspective. Journal of Insect Physiology, 57(8), PP: 1070-1084.
8. Clegg, J. S., 1965. The origin of trehalose and its significance during the formation of encysted dormant embryos of *Artemia salina*. Comparative Biochemistry and Physiology, 14, PP: 15-143.
9. Crowe, J. H., Hekstara, F. A., and Crowe, L. M., 1992. Anhydrobiosis annual review of physiology, 54, PP: 579-599.
10. Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., and Aurell Wistrom, C., 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. Biochemistry Journal 242, PP: 1-10.
11. Evans, D. R., and Dethier, V. G., 1957. The regulation of the taste thresholds for sugar in the biowfly, The Journal of Physiology, 1, PP: 3-17.
12. Faibairn, D., 1958. Trehalose and glucose in helminths and other invertebrates. Canadian journal of Zoology, 36, PP: 787-795.
13. Hinton, H. E., 1960. A fly larva that tolerates dehydration and temperatures of -270° to +102°C. Nature, 188, PP: 336-337.
14. Lee, R. E., 1991. Principles of insect low temperature tolerance. In Lee, R. E. and Denlinger, D. L. *Insects at Low Temperature*. Chapman & Hall, New York, PP: 17–46.
15. Leena, J., Sushama, M., and Bimalendu, B., 2012. Trehalose as an indicator of desiccation stress in *Drosophila melanogaster* larva: A potential marker of anhydrobiosis. Biochemical and Biophysical Research Communication, 419, PP: 638-642.
16. Madin, K. A. C., and Crowe, J. H., 1957. Anhydrobiosis in nematodes: biosynthesis of trehalose. The Journal of Experimental Zoology, 211, PP: 311-320.

17. Morrissey, R. E., and Baust, J. G., 1976. The ontogeny of cold tolerance in the gall fly, Eurosta solidagensis. Journal of Insect Physiology, 22(3), PP: 431-437.

18. Sussman, A. S., and Lingappa, B. T., 1959. Role of trehalose in ascospores of *Neurospora tetrasperma*. Science, 130, 1343 p.

19. Teets, N. M., and Denlinger, D. L., 2014. Surviving in a frozen desert: environmental stress physiology of terrestrial Antarctic arthropods. Journal of Experimental Biology 217(1), PP: 84-93.

20. Vanin, S., Bubacco, L., and Betramini, M., 2008. Seasonal variation of trehalose and glycerol concentration in winters snow-active insect, Cryo Letters 29, PP: 485-491.

Seasonal Changes of Glycerol Contents in Amphipoda

Mohseni Asgarani S.[1], Farhadian O.[1] and Keramat J.[2]

[1] Dept. of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran

[2] Dept. of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

In this research, the content of glycerol were investigated in two amphipod species of *Gammarus pseudosyriacus* and *Gammarus bakhteyaricus* from Khersonak and Kalicheh during different seasons for one-year. The samples were dried, extracted and then injected into high performance liquid chromatography (HPLC) for determination glycerol content. The glycerol contents were 91.69, 3.72, 29 and 24.28 µg/mg wet weight for *G. pseudosyriacus* and 28.86, 9.57, 40.81 and 2.81 µg/mg wet weight for *G. bakhteyaricus* at spring, summer, autumn and winter, respectively. The high amount of alcoholic sugar with low molecular weight has distinct relation with diapause and anhydrobiosis. In the beginning of autumn, the organisms produce these protective components and receive to maximum in the late autumn. The glycerol was consumed as ant- freezing agent in winter and reach to lowest amounts. It seems that *G. pseudosyriacus* increased the glycerol in the middle of spring to survive probably against to thermal shocks and desiccation that decrease in summer. The reason of these peaks could be attributed to various environment parameters, such as gradual fluctuations in water/air temperature. Another reason may be associated with rate of glycerol consumption in these two examined amphipods. This study showed that the amphipods are suitable organisms for monitoring of aquatic environments by measuring of biochemical components, especially glycerol.

Key words: *G. pseudosyriacus, G. bakhteyaricus,* Amphipoda, Glycerol, Seasonal Changes