

ارزیابی تأثیر دوز، زمان و نوع پرتوهای ماورا بنشش B و C بر آسیب DNA در تخم چشم زده و لارو در حال جذب کیسه زرده ماهی قزل آلای رنگین کمان از روش آزمون کامت قلیایی (*Oncorhynchus mykiss*)

Assessment of dose and time dependant DNA damage induced by ultraviolet -B and C radiation on egg and larvae of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by alkaline Comet assay

پروانه سامانی^۱، محمد رضا کلباسی مسجد شاهی^{۱*}

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، دانشگاه تربیت مدرس

Samani P¹, Kalbassi Masjedshahi MR^{*1}

1. MSc Students, Professor, Tarbiat Modares University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: kalbassi_m@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

پرتوها به واسطه اثرات مخربی که بر DNA موجودات دارند، به عنوان عوامل محیطی تنفس زا موجب بسیاری از تغییرات فیزیولوژیک از جمله تأثیر بر اسپرم، کاهش لقاح و بدشکلی جینین ماهیان می‌شوند. هدف از این مطالعه، ارزیابی تأثیر دوز و مدت زمان پرتو ماورا بنشش بر آسیب‌های DNA در ماهی قزل آلای رنگین کمان (Oncorhynchus mykiss) بود. در این خصوص تأثیر دوزهای مختلف پرتوهای ماورا بنشش نوع B (۱۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۵۳ $\mu\text{w}/\text{cm}^2$) و C ($\mu\text{w}/\text{cm}^2$) در زمان‌های مختلف پرتو دهدی (۳۰ و ۶۰ دقیقه) بر آسیب‌های ایجاد شده در DNA جینین و لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان به روش الکتروفورز سلول‌های منفرد یا کامت قلیایی (Comet assay) ارزیابی شد. نتایج نشان دهنده رابطه خطی میزان میزان دوز پرتو با آسیب DNA می‌باشد، به طوری که با افزایش میزان دوز پرتو، میزان آسیب DNA در لارو و تخم چشم زده به صورت معنی‌داری افزایش یافت. همچنین حساسیت لارو در مقایسه با تخم چشم زده بیشتر بوده که احتمالاً به دلیل لایه کوریونی تخم یا فضای پروتیلین تخمک می‌باشد که جینین را از تأثیرات این پرتو حفظ می‌کند. با افزایش مدت زمان پرتو ماورا بنشش از ۳۰ به ۶۰ دقیقه، افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان آسیب DNA در تخم و لارو قزل آلای رنگین کمان مشاهده نشد. نتایج این مطالعه ضمن تایید کارآیی روش کامت قلیایی در ارزیابی آسیب DNA جینین و لارو نشان داد که دوز پرتوهای مورد مطالعه اثرات مخرب بیشتری نسبت به زمان پرتو دهدی داشته و شدت این آسیب‌ها در مرحله لاروی بیش از مرحله جنبینی است. یافته‌های مذکور در به کارگیری این پرتوها در فرایند اصلاح نژاد ماهیان لازم است مدنظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

آسیب DNA
قزل آلای رنگین کمان
الکتروفورز سلول‌های منفرد
پرتو ماورا بنشش

مقدمه

در رشد و بروز ناهنجاری در لارو و در نهایت باعث افزایش مرگ و میر در تخم، جنین و لارو ماهی می‌شود (Kouwenberg et al. 1999).

Polymerase Chain Reaction (PCR)، Fluorescence in situ hybridization (FISH)، Immunological assay و Flowcytometry (FCM)، Electrochemical methods Comet در ارزیابی آسیب DNA گزارش شده است (Kumari et al. 2008).

کتروفورز سلول‌های منفرد به عنوان تکنیکی ساده و سریع برای اندازه‌گیری آسیب DNA مطرح شد. Singh et al. (1988) این روش را در شرایط قلیایی بالا ($\text{pH} > 13$) که حساسیت بالاتری به تشخیص سطوح‌های کم آسیب DNA دارد، گزارش کردند Olive et al. (2002). میزان آسیب اندازه‌گیری شده نمایانگر شکستگی دو رشته یا یک رشته DNA، کراس لینک درون سلولی و آسیب در بازه‌های DNA می‌باشد (Lemay and Wood 1999). در سنجش کتروفورز سلول‌های منفرد آسیب DNA به صورت مهاجرت مواد ژنتیکی از هسته مشاهده می‌شود و میزان مهاجرت نشان دهنده میزان تخریب DNA است (Erkekoglu 2012). بعد از اجرای کتروفورز باید مقدار DNA که از هسته مهاجرت کرده را مشخص کرد. از رنگ‌های مشخصی برای شناسایی DNA استفاده می‌شود. در نهایت تصاویر حاصل با اطلاعاتی از قبیل طول DNA حرکت کرده، درصد DNA در دنباله کامت و یا سایر شاخص‌ها تجزیه می‌شوند (Kumari et al. 2008).

مزایای این روش نسبت به سایر روش‌ها در این است که: ۱- تخریب ژنتوکسی در سطح هر سلول نمایان می‌شود؛ ۲- به جزیی‌ترین مقادیر تخریب حساس است؛ ۳- بیشتر سلول‌های یوکاریوتی برای این روش مناسب هستند؛ ۴- تنها مقدار کمی سلول از نمونه (یک لارو، یک قطره خون، میزان کم از بافت) کافی است؛ ۵- کم هزینه است؛ ۶- نسبتاً زمان مورد نیاز برای کامل شدن آزمایش کم است و ۷- معمولاً این روش سریع‌تر و حساس‌تر از سایر روش‌ها بوده و روشی است که اغلب برای ماهی استفاده می‌شود (Tice et al. 2000). از کاربردهای مهم این روش در علوم آبزیان می‌توان به بررسی اثرات ژنتوکسیک عوامل

پرتو ماوراء بنسش به واسطه اثرات مزموني که بر موجودات زنده دارد، به عنوان عامل تنش‌زای قوی زیست محیطی شناخته شده است. انواع مختلف پرتوهای ماوراء بنسش (ماوراء بنسش خلاء با طول موج کمتر از ۲۰۰ نانومتر، ماوراء بنسش C با طول موج بین ۲۰۰ و ۲۸۰ نانومتر، ماوراء بنسش B با طول موج بین ۳۱۵ و ۴۰۰ نانومتر) بر موجودات زنده اثرات متفاوت دارند. با وجود موانع و محافظه‌های محیطی مانند اکسیژن و ازن استراتوسفری، ماوراء بنسش A و ماوراء بنسش B به بیوسفر می‌رسند، در حالی که ماوراء بنسش C به شدت توسط اکسیژن و ازن استراتوسفری جذب شده و به سطح زمین نمی‌رسد. پرتو ماوراء بنسش B در محیط آبی می‌تواند تا عمق ۳۰-۴۰ متری نفوذ کرده و به عنوان یکی از عوامل خطر ساز در محیط‌های آبی معرفی شده است (Dahms and Hellio 2010).

روش عملکرد انواع پرتوهای ماوراء بنسش متفاوت بوده و قرار گرفتن موجودات در معرض پرتوهایی با طول موج کوتاه‌تر، باعث سطوح بالاتر تنش اکسیداتیو و آسیب بیشتر DNA می‌شود (Lesser and Barry 2006). به همین دلیل تمرکز بیشتر مطالعات بر اثرات مخرب پرتو ماوراء بنسش B و ماوراء بنسش C می‌باشد. با توجه به این که پرتو ماوراء بنسش C کاملاً جذب شده و به سطح زمین نمی‌رسد، بیشتر مطالعات بر روی تاثیر پرتو ماوراء بنسش B می‌باشد (Adams and Shick 2001).

تعامل فیزیکی و شیمیایی پرتو با DNA سلولی باعث تولید انواع ضایعات اولیه از قبیل ایجاد شکستگی در تک رشته (SSB) یا دو-رشته (DSB)، شکست پیوندهای پروتئینی DNA و آسیب به پایگاه پورین و پریمیدین و ایجاد دائمی می‌شود (Brownman et al. 2003). همچنین شکستگی دو رشته DNA منجر به از دست دادن اطلاعات ژنتیکی شده و ممکن است کشنده باشد (Kumari et al. 2008).

حساسیت به پرتو ماوراء بنسش معمولاً در مراحل اولیه رشد بیشتر از سایر مراحل تکاملی است. پرتو ماوراء بنسش موجب کاهش ضربان قلب و اختلال در تنفس لارو ماهی (Freitag et al. 1999)، کاهش موقتی تغیریخ (Bass and Sistrun 1997)، تأخیر

داری شدند. در مطالعات برای محاسبه دوز پرتو مناسب از UV- متر برای منبع ماوراء بنسش مورد نظر استفاده می شود (Bhise and Khan 2002). دوزهای حاصل از منابع ماوراء بنسش B و C در فاصله های معین ۲۰، ۳۵، ۶۰ سانتی متری توسط UV متر محاسبه شد و دوزهای حاصل از پرتو ماوراء بنسش B به ترتیب ۱۵۳، ۸۴، ۴۰ و پرتو ماوراء بنسش C به صورت ۹۰، ۵۵، ۱۵ $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ محاسبه شد.

تیمارهای مورد مطالعه تحت پرتو ماوراء بنسش بر تخم چشم زده و لارو در حال جذب کیسه زرده ماهی قزل آلای رنگین کمان به صورت جدول ۱ تعریف شد.

سنجرس الکتروفورز سلول های منفرد (Comet assay) آماده کردن نمونه ها برای آنالیز کامت از کل ارگانیسم لارو و جنین بر اساس روش Kosmehl et al. (2008) و سنجرس الکتروفورز سلول های منفرد بر اساس پروتکل Dhawan et al. (2003) انجام شد.

تهیه سوسپانسیون سلولی به منظور انجام آزمون کامت ابتدا از لاروها به صورت منفرد سوسپانسیون سلولی تهیه شد. در این خصوص ابتدا هر لارو در ۲۰۰ میکرولیتر محلول یکنواخت کننده (هموژنایزر) (PBS) محتوى ۲۰ mM EDTA و ۱۰% DMSO قرار گرفت و با قیچی به قطعات ریز خرد شد. سپس قطعات خرد شده ساکن گذاشته تا قطعات بزرگ تهشیش شده و مایع رویی توسط پیپت ۴ جدا شد. محلول مذکور در $g \times 200$ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و پس از تخلیه مایع بالایی (سوپرناتانت) محلول هموژنایزر به رسوبات حاصله اضافه شد و مجدد در $g \times 130$ به مدت ۷ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ انجام پذیرفت. پس از تخلیه مجدد سوپرناتانت رسوب حاصله به منظور بارگذاری بر روی لام مورد استفاده قرار گرفت.

آماده سازی لام

ابتدا لامها در متانول یا اتانول قرار داده شده تا از هر گونه چربی پاک شوند. سپس لامها در محلول آگارز نرمال ۱/۲ درصد (که

جهش زا، ماده زایی، تشخیص ماده غذایی پرتو دیده و تشخیص یکپارچگی DNA در اسپرم طی نگهداری کوتاه و طولانی مدت اشاره کرد (Moodi et al. 2012).

مواد و روش ها

تهیه ماهی و طراحی آزمایش

در این مطالعه اثرات دوزهای متفاوت پرتو ماوراء بنسش در روند تکاملی تخم چشم زده و لارو در حال جذب کیسه زرده ماهی قزل آلای رنگین کمان بررسی شد. نمونه های مورد نظر از مولد های تکثیر یافته مزرعه تکثیر و پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان الماس دیمه (واقع در استان چهارمحال و بختیاری از توابع شهرستان کوهرنگ) تهیه شد. متوسط طول و وزن لاروها به ترتیب ۳-۳۵ میلی متر و ۱۰-۱۵ میلی گرم و تخم ها دارای متوسط قطر ۱/۵ میلی متر و متوسط وزن ۱/۱۴ گرم و سن آنها به ترتیب ۳۱ و ۲۶ روزه بود. خصوصیت کیفی آب لارو و تخم به صورت دمای ۹-۱۱ درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول ۱۰ ppm و سختی کم تا متوسط گزارش شده بود. به واسطه کاهش خطای جلوگیری از جابجایی لاروها و آسیب های احتمالی ناشی از حمل آنها به آزمایشگاه، پرتو دهی با انتقال و نصب لامپ ماوراء بنسش به محل تکثیر لاروها در کارگاه الماس دیمه انجام شد. لامپ ماوراء بنسش B (مدل Philips-japan-۵T۸F) و ماوراء بنسش C (Philips-japan) با طول موج های به ترتیب (۳۱۰ و ۲۵۴ نانومتر) بر روی محفظه ای نصب و اطراف محفظه با نایلون سیاه کاملا پوشانده شد. جهت رسیدن پرتوها به دوز مورد نظر لامپ های مذکور قبل از شروع پرتو دهی به مدت ۲۰ دقیقه روشن نگه داشته و سپس به منظور پرتوگیری تخم و لاروها در پلیت حاوی آب قرار گرفته و به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه در ۴ فاصله ۲۰، ۳۵، ۴۰ و ۶۰ سانتی Browman et.al. 2003; (Ghanizade and khodabande 2007) متری تحت تابش پرتو قرار گرفت. پس از اتمام پرتو دهی از هر پلیت ۱۰ نمونه تخم و لارو جمع آوری و در محلول حاوی بافر فسفات و ۱۰ DMSO درصد ثبیت شد. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی پر دیس نور دانشگاه تربیت مدرس تا زمان انجام آزمایشات در -۸۰ درجه سانتی گراد نگه

تیمار	کنترل	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
فاصله (cm)	-	۱۰	۱۰	۲۰	۲۰	۳۵	۶۰	۶۰	۶۰	۱۰	۱۰	۲۰	۲۰	۳۵	۳۵	۳۵	۶۰
دوز ($\mu\text{w}/\text{cm}^2$)	-	۱۵۳	۱۵۳	۸۴	۸۴	۴۰	۱۹۶	۱۹۶	۱۹	۱۹	۱۹	۹۰	۹۰	۵۵	۵۵	۱۵	۱۵
زمان (min)	-	۳۰	۳۰	۶۰	۶۰	۳۰	۳۰	۳۰	۶۰	۳۰	۳۰	۶۰	۶۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
نوع پرتو مأورا بنفس	-	B	B	B	B	C	C	C	C	C	C	۳۰	۶۰	۳۰	۶۰	۱۵	۱۶

آنالیز تصاویر

جهت انجام آزمایش و تجزیه تصاویر برای هر ماهی یک لام و بر روی هر لام دو لام استفاده شد که در هر کدام حدود ۵۰ سلول در نقاط مختلف به صورت تصادفی انتخاب شدند و از نرمافزار COMET SCORE™ برای تجزیه و بررسی تصاویر حاصل استفاده شد. از شاخص‌های مهم که این نرم افزار محاسبه کرد %DNA می‌توان به طول کامت، ارتفاع کامت، طول دنباله کامت، در دنباله کامت و moment Tail اشاره کرد که به صورت زیر تعریف می‌شوند:

طول کامت: تعداد پیکسل‌هایی که در جهت افقی کامت می‌باشد $L_C=Nx$

ارتفاع کامت: تعداد پیکسل‌هایی که در جهت عمودی کامت می‌باشد $H_C=Ny$

طول دنباله کامت: به صورت پیکسل‌های حاصل از تفریق طول کامت از طول سر کامت (پیکسل‌های افقی سر کامت) تعریف می‌شود. $T_L=L_C-L_H$

درصد DNA در دنباله کامت: مجموع پیکسل‌های در جهت افقی و عمودی دم کامت بر مجموع پیکسل‌های در جهت افقی و عمودی کامت ضرب در 100 تعریف شده است.

$$\%DNA_T = (\sum i_{t(x,y)}) / (\sum i_{c(x,y)}) \times 100$$

به صورت درصد DNA دنباله کامت ضرب در طول دنباله محاسبه می‌شود. $M_T = \%DNA \times T_L$

پردازش داده‌ها

طرح کلی این تحقیق بر اساس طرح بلوک کاملاً تصادفی تعریف شد. برای این کار قبل از تجزیه و تحلیل، از نظر نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگرف- اسمیرنوف اطمینان حاصل شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، برای مقایسه تاثیر زمان و میزان

در ماکروویو ذوب شده است) فرو برده شده و پشت لام با دستمال کاغذی پاک شد. سپس لام‌ها در حرارت $40-70$ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کاملاً خشک شده و تبدیل به لایه‌ای نازک شوند. بهتر است قبل از این مرحله لام‌ها علامت‌گذاری شده تا سطحی که حاوی ژل است قابل تشخیص باشد.

سنجرش الکتروفورز سلول‌های منفرد $10-20$ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی با 100 میکرولیتر آگارز نقطه ذوب پایین $0/75$ درصد مخلوط و بر روی لام‌های آماده شده بارگذاری شد و سپس یک لام روی آن گذاشته شد و به مدت 30 دقیقه در یخچال (دما 4 درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت تا کاملاً سفت شود و پس از آن لام برداشته شد. لام‌ها در محلول لایزیز ($2/5$ M سدیم کلرید، mM EDTA 100 mM تریس، 10 درصد تریتون- 100 ، 10 درصد دی متیل سولفید اکساید، $pH=10$) در 4 درجه سانتی‌گراد در تاریکی به مدت یک ساعت قرار داده شدند. برای بازشدن پیچش‌های 20 دقیقه در بافرخنک قلیایی (یک mM DNA 300 هیدروکسید سدیم $pH>13$) قرار داده شدند. سپس لام‌ها به تانک الکتروفورز حاوی بافر الکتروفورز (مشابه بافر قلیایی) منتقل و به مدت 20 دقیقه در 4 درجه سانتی‌گراد و 300 میلی آمپر و 25 ولت الکتروفورز اجرا شد. پس از اتمام الکتروفورز لام‌ها در بافر خنثی ($0/4$ M Tris) شستشو داده شده و سپس با اتیدیوم برومايد رنگ آمیزی شدند. لام‌ها با میکروسوب اپی فلئورسنس با فیلتر مناسب مجهز به دوربین (Invert-المپیوس-ساخت ژاپن- مجهز به سیستم فازکتراست و نومارسکی) بررسی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

جدول ۲- مقایسه شاخص‌های کامت در تیمارهای مختلف پرتو ماورا بنفس B در تخم چشم زده و لارو در حال جذب کیسه زرد

تیمارها										مراحل تکاملی	شاخص
۶۰ دقیقه در $\mu\text{w}/\text{cm}^2$	در ۱۹ دقیقه	در ۴۰ دقیقه	در ۴۰ دقیقه	در ۸۴ دقیقه	در ۸۴ دقیقه	در ۱۵۳ دقیقه	در ۱۵۳ دقیقه	کنترل			
۸۳/۶۸±۳/۴۷ ^{bcd}	۹۷/۴۵±۳/۲۷ ^{abc}	۸۹/۶۸±۴/۲۵ ^{bc}	۹۷/۰۸±۳/۱۵ ^{abc}	۱۱۹/۲۸±۵/۷۸ ^a	۱۱۴/۰۷±۴/۹۱ ^a	۱۰۴/۳۲±۱۱/۵۳ ^{ab}	۱۰۱±۲۴/۷۸ ^{ab}	۷۵/۴۲±۴/۹۵ ^c	تخم چشم زده	طول کامت	
۲۶۷/۰۹±۱۸/۶۹ ^{bcde}	۲۲۱/۲۹±۲۶/۵۱ ^e	۳۶۸/۳۸±۴۰/۱۵ ^a	۱۹۶/۷۸±۷/۶۹ ^e	۲۴۳/۱۱±۱۴/۹۹ ^{de}	۳۱۴/۰۴±۲۳/۷۵ ^{abcd}	۳۳۶/۶۰±۱۶/۵۵ ^{abc}	۳۴۴/۳۳±۱۳/۲۸ ^{ab}	۲۵۸±۲۱/۳۴ ^{cde}	لارو در حال جذب کیسه زرد		
۵۵/۱۳±۲/۷۴ ^a	۶۶/۷۲±۲/۱۰ ^{ab}	۶۱/۵۷±۳/۱۲ ^{ab}	۶۱/۱۹±۱/۹۱ ^{ab}	۶۷/۸۰±۳/۴۶ ^{ab}	۷۵/۶۷±۳/۵۷ ^a	۶۱/۴۷±۴/۸ ^{ab}	۷۵/۶۰±۱۷/۹۳ ^a	۵۸/۳۷±۴/۰ ^b	تخم چشم زده		
۱۲۱/۹۸±۷/۸۴ ^{cd}	۱۲۹/۲۹±۱۱/۷۱ ^{cd}	۱۹۱/۹۴±۲۲/۲۱ ^{ab}	۸۸/۴۰±۲/۹۸ ^d	۱۱۹±۶/۶۵ ^{cd}	۱۵۴/۴۴±۱۰/۶۷ ^{bc}	۱۴۶/۸۱±۱۰/۸۸ ^c	۲۱۱/۶۷±۲۶/۲۴ ^a	۱۹۹/۵۱±۱۷/۳۱ ^a	لارو در حال جذب کیسه زرد		
۲۰/۰۸±۲/۹۹ ^c	۱۸/۹۱±۲/۵۰ ^c	۲۶/۷۳±۳/۱۷ ^b	۲۴/۰۲±۳/۲۰ ^c	۳۲/۲۹±۳/۵۹ ^{abc}	۴۱/۵۰±۵/۳۸ ^{ab}	۴۷/۱۶±۶/۷۹ ^a	۴۶/۶۰±۷/۰ ^a	۱۷/۶۸±۳/۱۲ ^c	تخم چشم زده	طول دنباله کامت	
۹۶/۷۵±۲۳/۱ ^{bc}	۶۳/۵۷±۳۴/۱۴ ^{cd}	۱۳۰/۱۹±۲۸/۳۹ ^{abc}	۱۰۳/۲۸±۷/۰۹ ^{bc}	۱۵۵/۳۳±۱۶/۹۳ ^{ab}	۱۵۱/۱۶±۲۷/۹۴ ^{ab}	۱۹۱/۴۷±۱۱/۷۸ ^a	۱۷۳/۳۳±۱۸/۶۸ ^{ab}	۱۳/۲۹±۷/۷۶ ^d	لارو در حال جذب کیسه زرد		
۱۲۰/۲۴±۲/۱۱ ^c	۷/۷۸±۱/۶۴ ^c	۲۶/۵۴±۳/۳۴ ^b	۲۵/۲۴±۳/۲۰ ^b	۳۳/۸۱±۲/۵۴ ^{ab}	۲۹/۸۰±۳/۵۴ ^b	۴۴/۰۷±۴/۱۰ ^a	۳۵/۰۹±۵/۲۶ ^{ab}	۰/۴۰±۰/۲۲ ^c	تخم چشم زده		
۲۵/۰۷±۴/۰۹ ^{cd}	۲۰/۷۹±۱۲/۵۱ ^{de}	۲۶/۸۶±۶/۸۰ ^{cd}	۳۴/۰۴±۲/۳۷ ^{bed}	۵۳/۹۴±۵/۵۶ ^{ab}	۳۵/۵۷±۵/۸۲ ^{bed}	۵۷/۰۳±۲/۶۳ ^a	۴۲/۷۴±۷/۳۳ ^{abc}	۵/۴۰±۳/۰۶ ^c	لارو در حال جذب کیسه زرد	DNA دنباله کامت	
۴/۲۸±۱/۲۷ ^{cd}	۲/۳۲±۰/۶۴ ^{cd}	۱۰/۴۹±۱/۹۳ ^{bc}	۹/۹۶±۱/۹۷ ^{bc}	۱۸/۴۹±۲/۰۲ ^{ab}	۱۶/۶۷±۲/۳۲ ^{ab}	۲۱/۴۲±۴/۰۴ ^a	۲۰/۸۷±۶/۰۲ ^a	۰/۲۲±۰/۰۸ ^d	تخم چشم زده	Tail Moment	

رنگین کمان با روش الکتروفورز سلول‌های منفرد مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که نوع و دوزهای مختلف هر پرتو اثرات متفاوتی بر روی DNA تخم و لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان دارد.

بررسی شاخص‌های به دست آمده از سنجش الکتروفورز سلول‌های منفرد تخم چشم زده و لارو، تحت تاثیر تیمارهای مختلف پرتو ماورا بنفس B نشان داد که طول دنباله، درصد DNA در دنباله و Tail moment با افزایش دوز ارتباط مستقیمی داشته است. بیشترین و کمترین میزان پارامترهای ذکر شده تحت دوز پرتوهای ماورا بنفس B در تخم و لارو به ترتیب در دوزهای $15^3 \mu\text{w}/\text{cm}^2$ و $19 \mu\text{w}/\text{cm}^2$ مشاهده شد (جدول ۲).

دوز پرتو ماورا بنفس B و C بر آسیب DNA در تخم چشم زده و لارو از آزمون t جفتی و به منظور بررسی ماورا بنفس C و B بر DNA تخم چشم زده و لارو آزمون t مستقل استفاده شد و برای مقایسه شاخص‌های مختلف کامت در تیمارهای مختلف پرتو ماورا بنفس B و در لارو و تخم چشم زده آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح معنی دار $P \leq 0.05$ استفاده شد. تجزیه داده‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 17 در سطح احتمال 0.05 انجام شد.

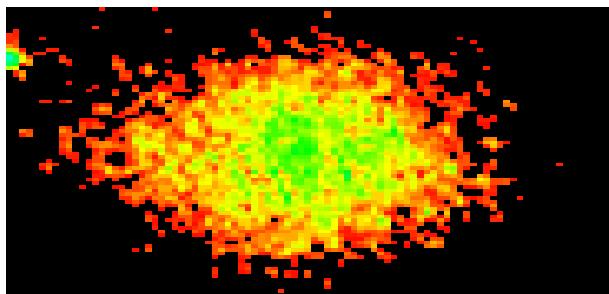
نتایج و بحث

در این بررسی تاثیر پرتوهای ماورا بنفس B و C بر روی DNA تخم چشم زده و لارو در حال جذب کیسه زرد ماهی قزل آلای

جدول ۳- مقایسه شاخص های کامت در تیمارهای پرتو ماوراء بنفس C در تخم چشم زده و لارو در حال جذب کیسه زرده

تیمارها											مرحله تکاملی	شاخص
۱۵ μw/cm ² در ۶۰ دقیقه	۱۵ μw/cm ² در ۳۰ دقیقه	۵۵ μw/cm ² در ۶۰ دقیقه	۵۵ μw/cm ² در ۳۰ دقیقه	۹۰ μw/cm ² در ۶۰ دقیقه	۹۰ μw/cm ² در ۳۰ دقیقه	۱۹۶ μw/cm ² در ۳۰ دقیقه	۱۹۶ μw/cm ² در ۳۰ دقیقه	کترل				
۸۷/۹۴±۲/۲۵ ^{de}	۷۷/۲۹±۲/۲۹ ^c	۱۰۳/۳۴±۴/۱۵ ^{bed}	۹۵/۱۱±۷/۹۰ ^a	۱۱۳/۰۹±۹/۵۹ ^a	۱۱۶/۱۵±۶/۴۱ ^a	۱۰۶/۴۶±۳/۶۳ ^{ab}	۹۹/۸۹±۳/۲۷ ^{abcd}	۸۸/۳۲±۴/۵۱ ^{cd}	تخم چشم زده	لارو در حال جذب کیسه زرده	طول کامت	
۲۵۱/۷۷±۲/۰ ^b	۲۷۷/۹±۱۸/۹ ^{abc}	۲۲۶/۵۳±۲۲/۹۵ ^{cd}	۱۷۴/۱۴±۱۰/۴۰ ^d	۳۰۳/۰۸±۲۹/۲۸ ^{ab}	۲۸۷/۲۳±۲۰/۷۴ ^{abc}	۳۴۳/۶۷±۱۰/۱۳ ^a	۲۸۸/۲±۱۳/۱۹ ^{abc}	۲۶۰±۱۷/۹۵ ^{bc}	لارو در حال جذب کیسه زرده	لارو در حال جذب کیسه زرده		
۵۹/۷۶±۲/۷۳ ^b	۶۷/۰۹±۲/۸۵ ^{ab}	۶۳/۱۹±۲/۷۷ ^{ab}	۶۶/۱۸±۶/۶۱ ^{ab}	۶۲/۰۵±۳/۷۰ ^{ab}	۶۹/۹۲±۳/۴۹ ^{ab}	۷۰/۶۳±۲/۳۱ ^a	۶۷/۵۷±۲/۳۰ ^{ab}	۶۰/۰۶±۲/۶۷ ^{ab}	تخم چشم زده	لارو در حال جذب کیسه زرده	ارتفاع کامت	
۱۳۳/۱۴±۹/۷۳ ^{cd}	۱۳۳/۱۴±۹/۷۳ ^{cd}	۱۲۸/۱۶±۱۷/۷۶ ^{cd}	۹۳/۱۹±۵/۳۰ ^d	۱۵۶/۰۸±۱۶/۷۳ ^{abc}	۱۹۵±۲۰/۳۲ ^a	۱۶۴/۸۹±۱۳/۱۱ ^{abc}	۱۳۷/۸۷±۷/۴۸ ^{bed}	۱۸۲/۸۲±۱۴/۸۴ ^{ab}	لارو در حال جذب کیسه زرده	لارو در حال جذب کیسه زرده		
۲۴/۰۹±۳/۳۱ ^d	۲۱/۱۱±۲/۷۳ ^d	۴۱/۶۲±۲/۵۰ ^b	۴۰/۲۱±۶/۰۷ ^{bc}	۵۱/۵۰±۵/۶۸ ^{ab}	۴۷/۱۷±۴/۶۳ ^{ab}	۵۸/۹۳±۳/۸۶ ^a	۵۶/۶۶±۳/۲۰ ^a	۲۸/۶۵±۳/۴۲ ^d	تخم چشم زده	لارو در حال جذب کیسه زرده	طول دنباله کامت	
۹۴/۹۲±۲۴/۹۶ ^d	۸۴/۱۷±۱۶/۴۵ ^d	۱۲۴/۱۶±۲۳/۵۵ ^{cd}	۱۰۳/۵۷±۸/۱۴ ^{cd}	۱۸۶/۶۲±۲۲/۰۶ ^{ab}	۱۵۳/۵۶±۸/۶۵ ^{bc}	۲۲۰/۵۶±۱۴/۰۷ ^a	۲۰۲/۲۰±۱۲/۸۲ ^{ab}	۱۲/۲۹±۷/۴۹ ^c	لارو در حال جذب کیسه زرده	لارو در حال جذب کیسه زرده	طول دنباله کامت	
۲۹/۵۹±۳/۸۱ ^{cd}	۱۴/۵۸±۳/۵۲ ^c	۳۶/۸۲±۳/۸۳ ^{abc}	۲۴/۶۷±۴/۵۱ ^d	۳۸/۷۰±۳/۷۶ ^{ab}	۳۵/۱۱±۳/۶۹ ^{bc}	۴۶/۰۹±۳/۴۱ ^a	۴۳/۰۴±۲/۳۶ ^{ab}	۰/۹۴±۰/۱۷ ^f	تخم چشم زده	لارو در حال جذب کیسه زرده	درصد DNA دنباله کامت	
۳۳/۸۱±۸/۹۹ ^b	۳۱/۶۳±۵/۵۴ ^b	۶۰/۵۸±۴/۲۸ ^a	۵۱/۴۲±۴/۰۷ ^a	۵۶/۰۹±۵/۶۱ ^a	۵۳/۵۳±۶/۲۲ ^a	۶۱/۸۳±۳/۱۴ ^a	۵۶/۳۷±۴/۸۳ ^a	۵/۴۰±۲/۹۶ ^c	لارو در حال جذب کیسه زرده	لارو در حال جذب کیسه زرده	درصد DNA دنباله کامت	
۸/۹۲±۱/۹۸ ^{ed}	۵/۲۶±۱/۶۲ ^e	۲۰/۵۱±۳/۲۲ ^{bc}	۱۵/۵۸±۴/۷۶ ^{cd}	۲۴/۶۷±۴/۰۸ ^{abc}	۲۱/۸۹±۳/۲۱ ^{abc}	۳۰/۸۱±۳/۳۸ ^a	۲۶/۵۲±۲/۳۱ ^{ab}	۰/۳۱±۰/۰۷ ^c	تخم چشم زده	لارو در حال جذب کیسه زرده	Tail Moment	
۵۵/۳۷±۱۶/۲۶ ^d	۴۹/۵۴±۱۰/۱۰ ^d	۷۶/۹۴±۲۰/۷۷ ^{bc}	۵۷/۱۰±۷/۳۸ ^d	۱۰۹/۷۹±۱۲/۰۶ ^{ab}	۸۳/۲۵±۱۲/۱۰ ^{bc}	۱۳۹/۳۱±۱۵/۱۳ ^a	۱۱۷/۰۵±۱۴/۱۳ ^{ab}	۷/۱۰±۴/۵۲ ^d	لارو در حال جذب کیسه زرده	لارو در حال جذب کیسه زرده	لارو در حال جذب کیسه زرده	

حساسیت بیشتر لارو (بیشترین میزان آسیب $110/1\pm 11/18$) نسبت به تخم چشم زده (بیشترین میزان آسیب $21/42\pm 4/04$) است. این نتایج برای تیمارهای تخم چشم زده و لارو در حال جذب کیسه زرده تحت پرتو ماوراء بنفس C نیز صادق بوده است ($<0/05$) و حساسیت بالاتر لارو (بیشترین میزان آسیب $139/31\pm 15/13$) نسبت به تخم چشم زده (بیشترین میزان آسیب $30/81\pm 3/38$) مشاهده شد (شکل های ۱ تا ۶).



شکل ۱- سلول های جنینی ماهی قزل آلای رنگین کمان تیمار یافته با آزمون کامت قلیایی (گروه شاهد)

مشاهده روند عددی شاخص های به دست آمده حاصل از تصاویر به دست آمده از سنجش الکتروفوروز سلول های منفرد تخم چشم زده و لارو در حال جذب کیسه زرده تحت پرتو ماوراء بنفس C نشان دهنده ارتباط افزایشی بین پارامترهای طول دنباله، درصد DNA در دنباله و Tail moment با دوز پرتو می باشد. بیشترین و کمترین میزان پارامترهای مذکور در دوزهای $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ ۱۹۶ و ۱۵ مشاهده شد (جدول ۳).

Tail moment تلفیقی از هر دو پارامتر طول دنباله کامت و درصد DNA در دنباله کامت می باشد بنابراین در مقایسه تیمارها از این پارامتر استفاده شد. بررسی این پارامتر نشان دهنده میزان آسیب DNA می باشد.

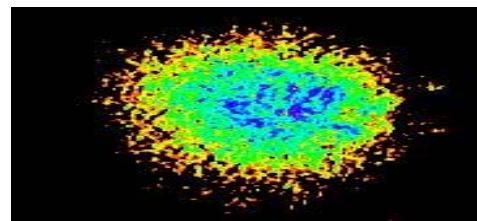
برای بررسی تاثیر پرتوهای ماوراء بنفس C بر DNA لارو و تخم چشم زده از آزمون t مستقل استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون با توجه به ناهمگنی واریانس ها ($<0/05$) نشان دهنده اختلاف معنی دار بین دو گروه لارو و تخم چشم زده تحت تیمار پرتوهای ماوراء بنفس C می باشد ($<0/05$). میانگین گروه ها نشان دهنده

نتایج حاصل از آزمون t جفتی برای مقایسه زمان پرتو دهنی و دوزهای پرتو ماوراء بنسن B و C بر تخم چشم زده اختلاف معنی داری بین پرتو دهنی در ۳۰ و ۶۰ دقیقه نشان نداد ($p > 0.05$) و بیشترین و کمترین آسیب DNA به ترتیب در تیمارهای ماوراء بنسن B و C به ترتیب در دوزهای ۱۵۳ (۲۱/۴۲ \pm ۰/۰۴)، ۱۹۳ (۲۱/۴۲ \pm ۰/۰۴) و ۱۹ (۲/۳۲ \pm ۰/۶۴)، ۱۵ (۵/۲۶ \pm ۱/۶۲) $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (۳۰/۸۱ \pm ۳/۲۸) و ۱۹ (۴/۳۲ \pm ۰/۶۴) $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (۳۰/۸۱ \pm ۳/۲۸) ایجاد شده بود. همچنین نتایج مقایسه زمان و دوز پرتو ماوراء بنسن B و C بر لارو در حال جذب کیسه زرد نیز اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). بیشترین و کمترین آسیب DNA ایجاد شده به ترتیب در پرتو ماوراء بنسن B و C به صورت ۱۳۹/۳۱ \pm ۱۵/۱۳، ۱۱۰/۱ \pm ۱۱/۱۸ و ۴۲/۰۷ \pm ۲۷/۷۶ $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ مشاهده شد.

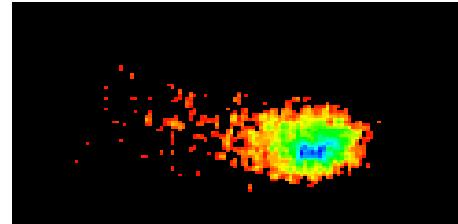
آزمون t جفتی مورد استفاده برای بررسی تاثیر پرتو ماوراء بنسن C و B بر DNA تخم چشم زده و همچنین لارو در حال جذب کیسه زرد نشان داد که بین دو پرتو ماوراء بنسن B و C اختلاف معنی داری وجود ندارد ($p > 0.05$).

نتایج به دست آمده از پردازش تصاویر نشان داد که پارامترهای طول و ارتفاع کامت روند مشخصی نداشتند و فقط گویای اندازه ای از کل کامت (سر و دنباله کامت) هستند. بنابراین بر اساس این دو پارامتر دقیقاً نمی توان درباره آسیب DNA ناشی از هر دو نوع پرتو ماوراء بنسن B و C اظهار نظر کرد. این در حالی است که ۳ پارامتر دیگر یعنی طول دنباله کامت، درصد DNA در دنباله کامت و Tail moment بر اساس افزایش دوز پرتو (عامل تاثیر گذار بر افزایش معنی دار یافته اند). DNA

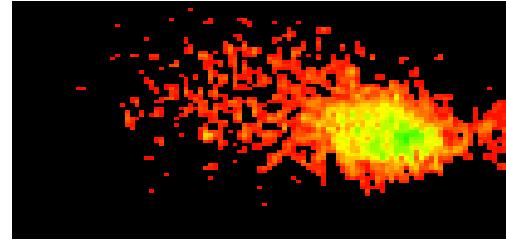
بنابراین می توان با تکیه بر این پارامترها با قاطعیت بیشتری درباره آسیب DNA بحث کرد. طول دنباله کامت در واقع تعداد پیکسل های دنباله کامت سلول می باشد و درصد DNA در دنباله کامت مجموع پیکسل های دنباله نسبت به پیکسل های کل کامت است و خطاهای حاصل از پشت زمینه کامت را کاهش می دهد، در مطالعات مختلف این پارامتر را به عنوان پارامتر موثر معرفی کردند. اما Tail moment اولین بار توسط Olive (2002) مطرح شد و حاصل ضرب دو پارامتر مهم ذکر شده یعنی درصد DNA در دنباله کامت و طول دنباله کامت می باشد و از آنجا که هر دو پارامتر را شامل می شود می تواند اهمیت بیشتری نسبت به دو



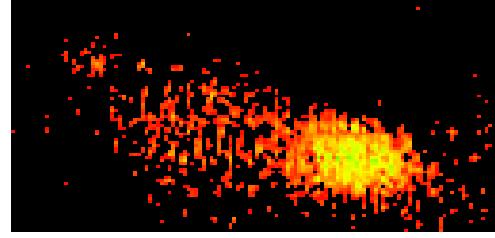
شکل ۲- سلول های لاروی ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تیمار یافته با آزمون کامت قلیابی (گروه شاهد)



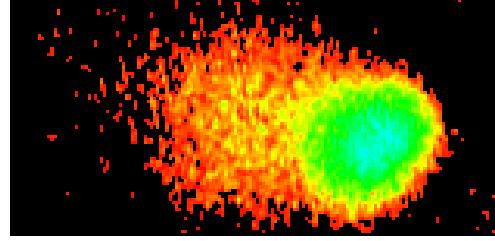
شکل ۳- سلول های جنینی ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تیمار پرتو ماوراء بنسن B در دوز $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ ۱۹ به مدت ۶۰ دقیقه تیمار یافته با آزمون کامت قلیابی



شکل ۴- سلول های لاروی ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تیمار پرتو ماوراء بنسن B در دوز $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ ۱۹ به مدت ۳۰ دقیقه تیمار یافته با آزمون کامت قلیابی



شکل ۵- سلول های جنینی ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تیمار پرتو ماوراء بنسن C در دوز $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ ۱۹۶ به مدت ۶۰ دقیقه تیمار یافته با آزمون کامت قلیابی



شکل ۶- سلول های لاروی ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تیمار پرتو ماوراء بنسن C در $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ ۱۹۶ به مدت ۶۰ دقیقه تیمار یافته با آزمون کامت قلیابی

از این مطالعه مطابقت داشت. در این مطالعه مشاهده شد که این موجود در طی تکامل لاروی به صورت شناور، به صورتی که سمت حاوی زرده به سمت نور باشد، قرار می‌گیرد، در نتیجه تسمیمات سلولی در حال انجام، توسط گلوبول‌های چربی و پروتئین‌های زرده محافظت می‌شود.

همچنین مطالعه Lesser et al. (2003) بر روی خارپوست دریایی تحت تاثیر پرتو ماوراء بنسن نیز نشان داد که میزان آسیب در مرحله اولیه جینی کمتر از مرحله انتهایی است که می‌تواند به دلیل سرعت بالای ترمیم DNA در مراحل اولیه باشد. موجود در مرحله پایانی نسبت به مرحله اولیه به آسیب DNA مقاوم‌تر است ولی میزان و سرعت ترمیم کاهش می‌یابد. اما باید در نظر داشت که این نتیجه برای تمامی ماهیان صادق نیست، به عنوان مثال نتایج حاصل از این بررسی با مطالعه Vetter (1999) مغایرت داشت و نتایج نشان داد که DNA تخمه ماهی آنچه‌وی (Engraulis mordax) تحت تاثیر پرتو ماوراء بنسن مشابه با مرحله لاروی آسیب دیده است. حضور یا عدم حضور ترکیبات محافظ در ماهی آنچه‌وی در حال بررسی است، بنابراین می‌توان گفت که این ترکیبات یا وجود ندارند یا اینکه برای حفاظت از پرتو موثر نیستند.

عوامل مختلفی برای ایجاد آسیب DNA در اثر پرتو وجود دارد. از جمله این عوامل می‌توان به نسبت سطح به حجم موجود، خصوصیات بافت و حضور ترکیبات محافظ، محل قرارگیری موجود نسبت به پرتو (در ستون آب و یا فاصله از منبع نور خروجی)، مدت زمان در معرض پرتو، قدرت ترمیم موجود و پایداری DNA در هر لایه سلولی اشاره کرد (Malloy et al. 1997). در این مطالعه بعد از پرتودهی نمونه‌ها ثبت شدند و به موجود اجزاء ترمیم سلولی داده نشد. همچنین برای آزمایشات به صورت یکسان از کل لارو و تخمه استفاده شد. با توجه به شرایط مشابه در عوامل ذکر شده میتوان دو فاکتور زمان و فاصله قرار گیری از منبع (دوز حاصل) را مقایسه و بحث کرد.

نتایج حاصل نشان داد که بین دو بازه زمانی ۳۰ و ۶۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، این در حالی است که روند خطی بین میزان آسیب DNA و فاصله از منبع نوری (میزان دوز پرتو) وجود دارد. در نتیجه میزان دوز پرتو بر میزان آسیب DNA

پارامتر دیگر در ارزیابی آسیب DNA داشته باشد (Olive 1990). تاثیر پرتو ماوراء بنسن B و C بر DNA لارو و تخمه چشم زده یکی از اثرات مزمن پرتو ماوراء بنسن تاثیر بر DNA است، که باعث آسیب‌های جدی به سلول به خصوص در مراحل اولیه رشد (Lesser et al., Häder and Sinha 2005) می‌شود (جنینی و لاروی) می‌شود. (al. 2001) با مطالعه تاثیر پرتو ماوراء بنسن B بر لارو روغن ماهی اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*) به عنوان ماهی که تخمه و لارو پلاژیک دارد، نشان داده شد که از مهمترین عوامل مرگ و میر دوران لاروی این ماهی استرس اکسیداسیون و آسیب DNA ایجاد شده در اثر پرتو مورد مطالعه می‌باشد.

در مطالعه حاضر، از نتایج استنباط می‌شود که DNA لارو و تخمه تحت تاثیر پرتو ماوراء بنسن B و C قرار گرفته است و ارتباط خطی بین آسیب DNA و دوز پرتو وجود دارد. مطالعات مختلفی تاثیر پرتو ماوراء بنسن بر DNA تخمه و لارو گونه‌های مختلف را گزارش کردند. از جمله این مطالعات می‌توان به (Vetter 1999) Mekkawy بر روی ماهی آنچوی (*Engraulis mordax*), (Clarias gariepinus) et al. (2010) بر روی گربه ماهی آفریقایی (Clarias gariepinus) اشاره کرد، که نتایج به دست آمده در این مطالعه را تایید می‌کنند.

مقایسه تاثیر پرتو ماوراء بنسن B و C بر میزان آسیب DNA ایجاد شده در لارو و تخمه چشم زده ماهی قزل آلا رنگین کمان نشان داد که این موجود در مرحله لاروی بسیار حساس‌تر از مرحله تخمه می‌باشد. حساسیت کمتر تخمه می‌تواند به دلیل لایه کوریونی تخمه یا فضای پروتیلین پر از مایع (یا تاثیر هر دو) باشد و همچنین تکامل و پیشرفت موادی از جمله گادوسول^۱ که در واقع نوعی آنتی اکسیدان طبیعی است که در تخدمان و مراحل جنینی و لاروی مهره داران دریایی گزارش شده است و از نفوذ پرتو ماوراء بنسن جلوگیری کرده و ماهی را در مرحله جنینی در برابر این پرتو محافظت می‌کنند.

در مطالعه Browman et al. (2003) پرتو ماوراء بنسن (Gadus morhua) اثر مستقیم بر DNA تخمه و لارو روغن ماهی (Gadus morhua) داشته است و دوزهای بالاتر این پرتو بر DNA لارو ماهی تاثیر بیشتری نسبت به مرحله تخمه دارد، که با نتایج حاصل

^۱ Gadusol

نسبت به لارو داشته است که احتمالاً به دلیل وجود محافظه‌هایی از قبیل لایه کوریونی، چربی و پروتئین‌های زرد و ترکیبات محافظه می‌باشد. همچنین میزان دوز پرتو در مقایسه با زمان پرتوهایی، بر میزان آسیب DNA اثر گذارتر می‌باشد و این نکته در هنگام به کارگیری تکنیک‌های مرتبط با استفاده از پرتوها بر آبزیان مثل ایجاد ماهیان ماده زاد، لازم است مدنظر قرار گیرد. در مجموع این مطالعه نشان داد که، روش سنجش الکتروفورز سلول‌های منفرد می‌تواند به خوبی برای شناسایی آسیب‌های DNA در سلول‌هایی که از طریق خرد شدن کل ارگانیسم لارو و تخم چشم زده به دست آمده، استفاده شود و می‌توان در مطالعات ژنتوکسیکولوژیک در اهداف مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- Adams N, Shick J (2001) Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Marine Biology 138:267-280.
- Bass EL, Sistrun SN (1997) Effect of UVA radiation on development and hatching success in *Oryzias latipes*, the Japanese medaka. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 59:537-542.
- Bhise MP, Khan T (2002) Androgénésis: the best tool for manipulation of fish genomes. Turkish Journal of Zoology 26:317-326.
- Browman H, Vetter RD, Rodrigues CA, Cullen JJ, Davis RF, Lynn E, Pirre J (2003) Ultraviolet (280–400 nm)-induced DNA Damage in the Eggs and Larvae of *Calanus finmarchicus* G. (*Copepoda*) and Atlantic Cod (*Gadus morhua*). Photochemistry and Photobiology 77: 397-404.
- Dahms HU, Leej S (2010) UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. Aquatic Toxicology 97: 3-14.
- Dhawana, Bajpayee MM, Pandey AK, Parmar D (2003) Protocol for the single cell gel electrophoresis/comet assay for rapid genotoxicity assessment., Infrastructure Transitions Research Consortium 1077,1.
- Dietrich G, Szpryka A, Wojtczak M, Dobosz S, Goryczko K, Akowski, Ciereszko A (2005) Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Theriogenology 64:1809-1822.
- Erkekoglu P (2012) Gel Electrophoresis - Advanced Techniques. 500 pp.
- Freitag J, Steeger O, Storzu, Paul R (1998) Sublethal impairment of respiratory control in plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae induced by UV-B radiation, determined using a novel biocybernetical approach. Marine Biology 132: 1-8.

اثر گذارتر از میزان زمان پرتو است، که نتیجه حاصل با مطالعه Javris and Knowles (2003) مغایرت داشت. در این مطالعه لارو ماهی زبرا فیش (*Danio rerio*) تحت ۴ دوز گاما در دو بازه زمانی یک و ۲۴ ساعت قرار گرفته شد، که با توجه به نتایج بدست آمده، مشخص شد که زمان اثرگذارتر از میزان دوز پرتو بوده است. این مغایرت ممکن است به دلیل نوع پرتو، فاصله زمانی زیاد در مطالعه انجام شده، تفاوت در ساختار و اندازه ماهی زبرا فیش با ماهی قزل آلای و همچنین شرایط مختلف آزمایشگاهی باشد.

پرتو ماوراء بخش B و C دارای ترکیبات فعالی هستند که باعث تغییر در شیمی، ساختار DNA و ایجاد دایمر می‌شود. Lesser et al. (2003) و روش الکتروفورز سلول‌های منفرد قلیایی به تنها بی توانایی تشخیص دایمرهای حاصل از پرتو را ندارد، اما با اصلاحاتی مانند اضافه کردن مرحله آنزیمی (مانند T4 اندونوکلتاز) این روش کارآمدتر خواهد شد. استفاده از این آنزیم باعث شکست دایمرهای حاصل از پرتو ماوراء بخش می‌شود (Sastre et al. 2001). با این وجود محدودیت این روش مانع استفاده از آن نمی‌شود، زیرا این روش قادر است شکستگی‌های تک و دو رشته DNA و آسیب‌های دیگر که از تاثیر مستقیم و یا غیر مستقیم پرتو حاصل شده است را شناسایی کند Hudson and Ferrier 1996; Lemay and Wood 1999; Dietrich et al. 2005). طبق نتایج حاصل دو گروه پرتو ماوراء بخش B و C اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. این عدم اختلاف امکان دارد به دلیل حضور دایمرهای تشکیل شده در DNA باشد که توسط روش الکتروفورز سلول‌های منفرد شناسایی نشده است و هر دو پرتو تاثیر تقریباً یکسانی از لحاظ شکستگی رشته‌های DNA و سایر فاکتورهای قابل تشخیص با روش مورد مطالعه دارند. لذا ادامه مطالعات با استفاده از آنزیم فوق الذکر بر روی این ماهی می‌تواند در تفسیر بهتر نتایج موثر باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه تاثیر پرتو ماوراء بخش بر میزان آسیب DNA در جنین و لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان مشخص شد. طبق نتایج حاصل میزان آسیب DNA حاصل از پرتو تابعی از میزان دوز پرتو بوده است. همچنین مشخص شد که تخم آسیب کمتری

- Ghanizade kazeroni a, khodabande s (2007) Mortality and histology of skin on larvae and Embryo Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*) were exposed to UV -B radiation. Olom va Fonon Daryayi 99-102.(In Farsi)
- Hader DP, Sinha RP (2005) Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 571: 221-233.
- Hudson C, Ferrier M (2008) Assessing ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair in field-collected *Aiptasia pallida* using the comet assay. Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium, Ft. Lauderdale, Florida 7-11
- Jarvis R, Knowles J (2003) DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate γ -radiation: detection by the alkaline comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 541:63-69.
- Kosmehl T, Hallare AV, Braunbeck T, Hollerth (2008) DNA damage induced by genotoxins in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 650:1-14.
- Kouwenbergj, Browman H, Cullen J, Davis R, St Pierre, JF, Runge JA (1999) Biological weighting of ultraviolet (280–400 nm) induced mortality in marine zooplankton and fish. I. Atlantic cod (*Gadus morhua*) eggs. Marine Biology 134:269-284.
- Kumar S, Rastogi RP , Singh KL, Singh SP , Sinha RP (2008) DNA damage: detection strategies. Experimental and Clinical Sciences International online Journal for Advances in Science 7:44-62.
- Lemay M, Wood KA (1999) Detection of DNA damage and identification of UV-induced photoproducts using the CometAssay™ kit. BioTechniques 27: 846-851.
- Lesser MP, Barry TM (2003) Survivorship, development, and DNA damage in echinoderm embryos and larvae exposed to ultraviolet radiation (290-400 nm). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 292:75-91.
- Lesser MP, Barry TM (2006) Biological weighting functions for DNA damage in sea urchin embryos exposed to ultraviolet radiation. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 328:10-21.
- Lesserm P, Farrell JH, Walker CW (2001) Oxidative stress, DNA damage and p53 expression in the larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290-400 nm) radiation. Journal of Experimental Biology 204: 157-164.
- Malloyk D, Holman MA, Mitchell D, Detrich HW (1997) Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in Antarctic zooplankton. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94:1258-1263.
- Moodi S1, Farahmand H, Mirvaghefi A, Eshaghzade H, Kazemi R (2012) The Protective effect of Vitamin E on DNA integrity of frozen-thawed Beluga (*Huso huso*) sperm Using Alkaline Comet assay. Genetic Novin 7: 272-266 (In Farsi).
- Mekkawy IA, Mahmoud UM, Osmana G, Sayeda H (2010) Effects of ultraviolet A on the activity of two metabolic enzymes, DNA damage and lipid peroxidation during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Fish Physiology and biochemistry 36:605-626.
- Olive PL (2002) The comet assay. In Situ Detection of DNA Damage Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 4:103-105.
- Sastrem P, Vernet M, Steinert (2001) Single-cell Gel/Comet Assay Applied to the Analysis of UV Radiation-induced DNA Damage in *Rhodomonas sp.*(*Cryptophyta*). Photochemistry and Photobiology 74: 55-60.
- Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and molecular Mutagenesis 35:206-221.
- Vetter RD, Kurtzma N, Mori T (1999) Diel cycles of DNA damage and repair in eggs and larvae of northern anchovy, *Engraulis mordax*, exposed to solar ultraviolet radiation. Photochemistry and Photobiology 69:27-33.