

(OPEN ACCESS)

Investigation of zebrafish (*Danio rerio*) exposure to Butachlor herbicide on some physiological indices

Peyman Rostami^{*1}, Ali Shabani², Roghieh Safari³, Seyed Aliakbar Hedayati⁴

1. Corresponding Author, Ph.D. Student of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: p.rostamy1373@gmail.com
2. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: ashabani@gau.ac.ir
3. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fisheriessafari@yahoo.com
4. Dept. of Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: marinebiology1@gmail.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 10.11.2023

Revised: 10.28.2023

Accepted: 10.31.2023

Keywords:

Gene expression,
Herbicide,
Liver enzyme,
Toxin

ABSTRACT

Background and Objectives: The aim of this study was to evaluate the effect of sub-lethal concentrations of Butachlor on some antioxidant responses and stress genes expression and some biochemical indices of zebra fish.

Materials and Methods: After determining of LC₅₀, for 96 hours, zebra fish (0/3±0/01 g) in four experimental groups including (T₁: 10%, T₂: 25%, T₃: 50% of LC₅₀ and control) were exposed to different levels of the herbicide Butachlor for 14 days. At the end of the exposure to Butachlor, samples of whole body were collected to measure SOD, CAT and HSP70 genes expression and some biochemical indices including: ALP, ALT and AST. At the end of experimental period.

Results: results revealed that SOD, CAT and HSP70 genes expression were up-regulated at 25 and 50% treatments that had significant differences with 10% and control (P<0.05). ALP, ALT and AST activities in fish treated with 25% Butachlor had remarkable differences with others groups (P<0.05). Therefore, it can be concluded that, Butachlor had destructive effects on zebra fish.

Cite this article: Rostami, Peyman, Shabani, Ali, Safari, Roghieh, Hedayati, Seyed Aliakbar. 2025. Investigation of zebrafish (*Danio rerio*) exposure to Butachlor herbicide on some physiological indices. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (2), 57-67.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2023.21817.1827

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی ماهی زبرا گورخری (*Danio rerio*) در مواجهه با علف‌کش بوتاکلر

پیمان رستمی^{۱*}، علی شعبانی^۲، رقیه صفری^۳، سید علی اکبر هدایتی^۴

۱. نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

رایانامه: rostamy1373@gmail.com

۲. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

رایانامه: ashabani@gu.ac.ir

۳. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

رایانامه: fisheriessafari@yahoo.com

۴. گروه بوم‌شناسی آبزیان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

رایانامه: marinebiology1@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	سابقه و هدف: هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های تحت کشنده علف‌کش بوتاکلر
مقاله کامل علمی- پژوهشی	(Butachlor) بر برخی از پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی (بیان ژن‌های SOD و CAT)، استرس (HSP70) و آنزیم‌های کبدی ماهی زبرا گورخری (<i>Danio rerio</i>) می‌باشد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۹	مواد و روش‌ها: بدین‌منظور در ابتدا میزان LC ₅₀ بوتاکلر در مدت زمان ۹۶ ساعت مشخص شد
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۶	سپس بچه‌ماهیان زبرا با میانگین وزنی ۰/۳±۰/۰۱ گرم به‌مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۹	۰، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ درصد بوتاکلر (LC ₅₀) قرار گرفتند و در پایان دوره آزمایش به‌منظور ارزیابی
	بیان ژن‌های مذکور و بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی از ماهیان زبرا (کل بدن) نمونه‌برداری انجام شد.
واژه‌های کلیدی:	
آنزیم‌های کبدی،	یافته‌ها: نتایج نشان داد که سطح بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و
بیان ژن،	پروتئین شوک حرارتی (HSP70) در ماهیانی که در معرض غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ درصد قرار
سم،	گرفته بودند نسبت به تیمار ۱۰ درصد و گروه شاهد بالاتر بودند و اختلاف معنی‌داری با گروه
علف‌کش	شاهد و تیمار ۱۰ درصد داشتند (P<۰/۰۵). میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین
	آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) نیز با افزایش غلظت بوتاکلر تا
	سطح ۲۵ درصد روندی افزایشی را داشتند و بالاترین میزان در تیمار ۲۵ درصد بود که اختلاف

معنی‌داری با شاهد داشت ($P < 0/05$). با توجه به تأثیر سم بوتاکلر بر فاکتورهای فیزیولوژیک ماهی زبرا به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی و همچنین راه‌یابی این سم به آب‌ها و محیط‌زیست ماهیان، می‌توان چنین استنباط کرد که سمیت بوتاکلر حتی در غلظت‌های پایین نیز می‌تواند آثار مخربی را بر فیزیولوژی ماهی و حتی جمعیت ماهی اعمال کند.

استناد: رستمی، پیمان، شعبانی، علی، صفری، رقیه، هدایتی، سید علی‌اکبر (۱۴۰۴). بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی ماهی زبرا گورخری (*Danio rerio*) در مواجهه با علف‌کش بوتاکلر. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۴ (۲)، ۶۷-۵۷.

Doi: 10.22069/japu.2023.21817.1827



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

امروزه به دلیل گسترش صنعت کشاورزی، استفاده از علف کش‌ها برای کنترل علف‌های هرز بخشی از شیوه‌های کشاورزی مدرن برای افزایش بهره‌وری است (۱) با این حال، استفاده گسترده و بی رویه از این مواد شیمیایی از طریق رواناب کشاورزی، صنعتی و زهکشی شهری به محیط آبی راه پیدا می کند و اکوسیستم‌های آبی را در معرض تهدید شدید قرار می دهد (۱). موجودات غیرهدف از جمله ماهی‌های ساکن در محیط‌های آبی نزدیک مزارع کشاورزی، آسیب پذیرترین موجوداتی هستند که می توانند تحت تأثیر علف‌کش‌ها قرار گیرند. علف‌کش‌ها پس از رسیدن به محیط آبی، ممکن است در ماهی‌ها یا سایر آبزیان غیرهدف تجمع کنند و اثرات مخرب مختلفی را بر سلامتی این گونه‌ها برجای گذارند (۲). علف‌کش بوتاکلر متعلق به خانواده کلرواستانیلید است که به طور گسترده برای کنترل علف‌های هرز و علف‌های هرز پهن برگ در شالیزارها استفاده می شود (۳). به طور کلی، بوتاکلر در محیط پایدار است و نیمه عمر ۱۱ تا ۱۸ روزه در خاک دارد، بنابراین می تواند تهدیدی برای آبزیان و همچنین حیوانات خشکی باشد (۴). مطالعات گسترده‌ای در ارتباط با بقایای بوتاکلر در اکوسیستم‌های آبی و آثار مخرب آن‌ها بر موجودات آبی گزارش شده است (۵، ۶ و ۷). ابراهیم‌زاده و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که قرار گرفتن در معرض سمیت ناشی از بوتاکلر به مدت ۱۴ روز باعث افزایش سطح آنزیم‌های ALT، ALP و AST در ماهی قرمزی شود (۷). به منظور ارزیابی زیست محیطی، سم شناسی و ایمنی آفت‌کش‌ها، ماهی‌ها به عنوان یک مدل، عالی عمل می کنند زیرا آن‌ها دارای تحرک بالا، تنوع و تراکم زیادی هستند هم چنین به عنوان تجمع کننده‌های زیستی شناخته شده اند که قادرند آلودگی‌های چندساله یک منطقه

زیستی را نشان دهند (۸). ماهی زبرا گورخری با نام علمی (*Danio rerio*) به عنوان یک مدل مؤثر و و محوری جهت بررسی آزمایش‌های سم شناسی شناخته شده است (۹). ماهی زبرا دارای تخم‌های شفاف و رشد و تکامل سریع است و اندام‌های اصلی آن ۲۴ ساعت پس از لقاح قابل مشاهده هستند (۱۰). نشانگرهای زیستی مختلفی مانند آنزیم‌های آنتی اکسیدانی: سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)، پروتئین شوک حرارتی (HSP70) و آنزیم‌های کبدی: آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) جهت پایش وضعیت سلامت ماهی هنگام قرار گرفتن در معرض عوامل مخرب بیگانه از جمله علف‌کش‌ها مورد سنجش قرار می گیرند (۱۱ و ۱۲). SOD و CAT به عنوان اولین سد سیستم دفاعی بدن در مقابل بروز آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از قرارگرفتن در معرض علف‌کش‌ها هستند که از سلول و بافت در برابر بروز آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می کنند. هم چنین سطح آنزیم‌های ALT و AST نیز یک فاکتور مهم جهت ارزیابی آسیب‌های بافتی (کبد) در نظر گرفته می شود (۱۳). بنابراین با توجه به استفاده از حجم انبوهی از سم بوتاکلر در مزارع کشاورزی و ورود آن به منابع آبی، هدف از این پژوهش بررسی اثرات مخرب سم بوتاکلر بر تغییرات فیزیولوژیک ماهی جهت ارائه به سازمان‌های مدیریتی به منظور اعمال راهکارهای مدیریتی کنترل و محدودیت در کاربرد سم می باشد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی شرایط آزمایشی و تهیه ماهی و سم بوتاکلر: این پژوهش در پاییز ۱۴۰۰ در شرایط آزمایشگاهی جهت بررسی اثر سمیت بوتاکلر بر ماهی زبرا گورخری انجام شد. سم بوتاکلر با درجه خلوص ۶۰ درصد همراه با یک امولسیون به عنوان حلال از

یکسان بود، همه فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب روزانه اندازه‌گیری و ثبت می‌شد و میزان دما، pH و اکسیژن آب به ترتیب ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۷/۶ و ۷/۸ میلی‌گرم بر لیتر بود.

نمونه‌برداری ژنتیکی: جهت سنجش میزان بیان ژن‌های SOD، CAT و HSP70 از ماهیان زبرا نمونه‌برداری شد. ابتدا ماهیان با پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش شدند. پس از زدن سر و دم در شرایط استریل، در ویال‌های از قبل استریل شده قرار گرفتند و بلافاصله به ازت مایع منتقل شدند و تا زمان انجام تست‌ها ژنتیکی در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: جهت استخراج RNA ابتدا نمونه‌های مربوط به هر تیمار در هاون‌های چینی و در مجاورت با ازت مایع پودر شدند و به ویال‌های استریل منتقل شدند سپس با استفاده از کیت RNX-Plus و طبق مراحل ذکر شده در دستورالعمل شرکت سازنده مراحل بعدی استخراج انجام شد. سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت جینت بایو در ویال‌های مخصوص PCR انجام شد.

ریل تایم PCR: در این مطالعه از پرایمرهای قبلی طراحی شده برای این گونه در مطالعه صفری و همکاران (۲۰۱۶) استفاده شد. بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از دستگاه qPCR-(Bio-Rad) ساخت کشور آمریکا صورت گرفت. هر ویال محتوی ۱۸ میکرولیتر مستر و ۲ میکرولیتر cDNA بود. مستر مورد استفاده در این قسمت از ترکیب ۱۰ میکرولیتر سایبر گرین، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلی‌مراز، آغازگر پیش‌رونده و پس‌رونده هر کدام ۰/۲ میکرولیتر، ۶/۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۱ میکرولیتر DMSO به‌دست آمد.

یک فروشگاه سموم کشاورزی تهیه و جهت تست‌های مربوط به LC₅₀ و طرح آزمایش مذکور مورد استفاده قرار گرفت. ۴۰۰ قطعه بچه‌ماهی زبرا گورخری از کارگاه خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شصت‌کلای استان گلستان خریداری شد و توسط کیسه‌های پلاستیکی حاوی آب و اکسیژن با نسبت ۱ به ۳ به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان بخش آزمایشگاه شهید ناصر فضلی برآبادی (سالن ونیرو) انتقال داده شدند. ماهیان به‌مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاه سازگار شدند و در طول این مدت با غذای بیومار تغذیه شدند. همه فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب (دمای آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷/۸ و pH ۷/۶) روزانه اندازه‌گیری می‌شد.

آزمایش تعیین LC₅₀: به‌منظور تعیین میزان LC₅₀ تعداد ۱۵۰ قطعه بچه‌ماهی زبرا در ۱۵ آکواریوم تقسیم‌بندی شدند و در معرض غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر بوتاکلر به‌مدت ۹۶ ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت هر ۲۴ ساعت تعداد تلفات شمارش و ثبت می‌شد. میزان LC₅₀ به‌دست آمده ۱/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه شد.

طرح آزمایش بررسی سمیت حاد: جهت پرورش، پس از مشخص شدن میزان LC₅₀ تعداد ۲۴۰ قطعه بچه‌ماهی با میانگین وزنی ۰/۳±۰/۰۱ گرم در ۱۲ عدد آکواریوم ۲۰ لیتری (۲۰ قطعه در هر آکواریوم) توزیع شدند و به‌مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های تحت کشنده ۰ (شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲) و ۵۰ (تیمار ۳) درصد بوتاکلر (LC₅₀) قرار گرفتند. تیمارها دارای ۳ تکرار بودند و با جیره بیومار (کشور فرانسه) ۳ بار در روز و در حد سیری تغذیه می‌شدند. در طول مدت آزمایش شرایط پرورش برای همه تیمارها

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده (SOD, CAT, HSP70 و β -Actin).

Table 1. Characteristics of PCR primer set (SOD, CAT, HSP70, B-actin) used in this study.

نام پرایمر Primer name	توالی Sequence	طول قطعه (جفت باز) Sequence length	شماره دسترسی Accession number
SOD سوپر اکسید دیسموتاز	F:GGGTGGCAATGAGGAAAG R:GCCCACATAGAAATGCACAG	200	BC055516.1
CAT کاتالاز	F:GCATGTTGGAAAGACGACAC R:GTGGATGAAAGACGGAGACA	197	AJ007505.1
HSP70 پروتئین شوک حرارتی	F: CTGCTGCTGCTGGATGTG R: GCTGGTTGTCTCGAGTAAGTG	200	AB062281.1
Beta-Actine بتا اکتین	F:ATGGGCCAGAAAGACAGTACGTG R: CTTCTCCATGTCGTCCAGTTGGT	140	NM_001124235.1

غلظت بوتاکلر میزان بیان ژن SOD افزایش یافت به‌طوری‌که بالاترین سطح بیان در ماهیان قرار گرفته در معرض ۵۰ درصد بوتاکلر بود که اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت ($P < 0.05$). بین تیمارهای ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری در سطح بیان ژن SOD مشاهده نشد ($P > 0.05$).

سطح بیان ژن کاتالاز (CAT): غلظت‌های مختلف بوتاکلر بر بیان ژن CAT در ماهیان زبرا تأثیر معنی‌داری داشته است (شکل ۲). طبق نتایج به‌دست آمده تیمارهای ۲ و ۳ درصد اختلاف معنی‌داری را با شاهد و تیمار ۱۰ درصد داشتند ($P < 0.05$) و بالاترین میزان بیان ژن کاتالاز در ماهیانی مشاهده شد که در معرض ۵۰ درصد بوتاکلر قرار گرفته بودند. بین تیمار ۲ و ۳ درصد اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$).

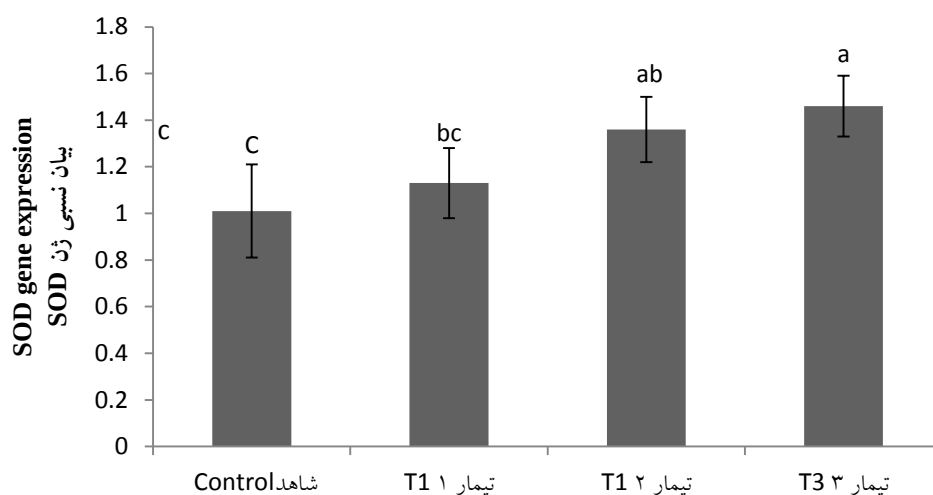
سطح بیان ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP70): نتایج حاصل از بیان ژن HSP70 نشان داد که بیش‌ترین سطح بیان در تیمار ۳ بود و اختلاف معنی‌داری با شاهد و تیمار ۱ داشت ($P < 0.05$) (شکل ۳). اختلاف آماری معنی‌داری در سطح بیان پروتئین شوک حرارتی (HSP70) در تیمار ۲ و ۳ مشاهده نشد ($P > 0.05$).

آنزیم‌های کبدی: ۳ عدد ماهی از هر تیمار با محلول پودر گل میخک (۰/۵ گرم بر لیتر) بیهوش شدند و در ویال به ازت مایع منتقل شدند و سپس ماهیان هر تیمار به‌صورت جداگانه در مجاورت با ازت مایع پودر شدند و درون ویال با محلول آماده فسفات بافر به‌میزان ۱ سی‌سی مخلوط شدند. ویال‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، فاز بالایی و شفاف توسط سمپلر به ویال‌های جدید منتقل شد و میزان آنزیم‌های ALP، ALT و AST با استفاده از کیت پارس آزمون و دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آزمون کولموگروف-اسمیرنوف Kolmogrov - Smirnov جهت توزیع نرمال و همگنی داده‌ها استفاده شد. بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و نرم‌افزار اکسل انجام گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و تست دانکن در فضای نرم‌افزار Spss ۲۰ استفاده شد.

نتایج

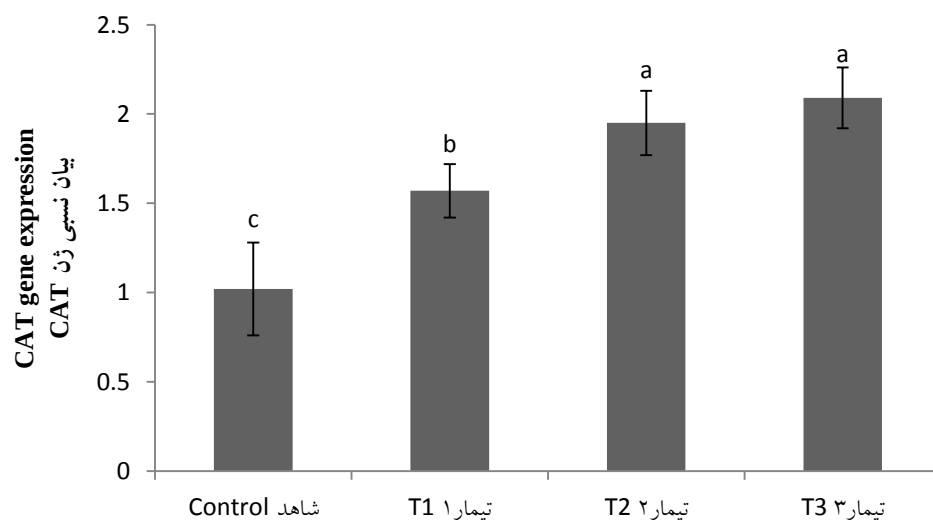
سطح بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD): نتایج به‌دست آمده از ارزیابی بیان ژن SOD در شکل ۱ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که با افزایش



شکل ۱- سطح بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ماهی زبرا در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده بوتاکلر (۰: شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲) و ۵۰ (تیمار ۳) درصد بوتاکلر (LC₅₀).

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

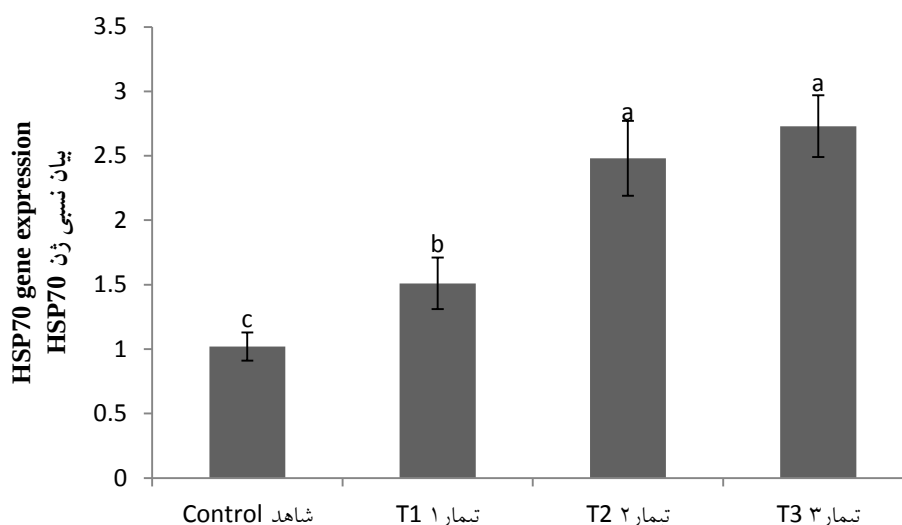
Figure 1. Levels of SOD gene expression in zebrafish exposed to sublethal concentrations of butachlor (0: Control), (10%: T1), (25%:T2), and (50%:T3) LC₅₀ butachlor. Different letters in each row indicate statistically significant differences ($P \leq 0.05$).



شکل ۲- سطح بیان ژن کاتالاز (CAT) ماهی زبرا در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده بوتاکلر (۰: شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲) و ۵۰ (تیمار ۳) درصد بوتاکلر (LC₅₀).

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

Figure 2. Levels of CAT gene expression in zebrafish exposed to sublethal concentrations of butachlor (0: Control), (10%: T1), (25%:T2), and (50%:T3) LC₅₀ butachlor. Different letters in each row indicate statistically significant differences ($P \leq 0.05$).



شکل ۳- سطح بیان ژن پروتئین شوک حرارتی (HSP70) ماهی زبرا در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده بوتاکلر (۰: شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲) و ۵۰ (تیمار ۳) درصد بوتاکلر (LC₅₀).

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ در بین تیمارها می‌باشد.

Figure 3. Levels of HSP70 gene expression in zebrafish exposed to sublethal concentrations of butachlor (0: Control), (10%: T1), (25%:T2), and (50%:T3) LC₅₀ butachlor. Different letters in each row indicate statistically significant differences ($P \leq 0.05$).

بوتاکلر قرار گرفتند و اختلاف معنی‌داری با شاهد و تیمار ۳ داشتند ($P < 0.05$). کم‌ترین سطح آنزیم‌ها ALP، ALT و AST در گروه شاهد مشاهده شد.

فاکتورهای بیوشیمیایی سرم: فاکتورهای ALP، ALT و AST تحت تأثیر غلظت‌های مختلف بوتاکلر قرار گرفت (جدول ۲). بیش‌ترین مقدار این آنزیم‌ها در ماهیانی بود که در مجاورت با غلظت ۲۵ درصد

جدول ۲- سطح آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارات آمینوترانسفراز (AST) ماهی زبرا در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده بوتاکلر (۰: شاهد)، ۱۰ (تیمار ۱)، ۲۵ (تیمار ۲) و ۵۰ (تیمار ۳) درصد بوتاکلر (LC₅₀).

Table 2. Levels of alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) enzymes in zebrafish exposed to sublethal concentrations of butachlor (0: Control), (10%: T1), (25%:T2), and (50%:T3) LC₅₀ butachlor.

تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	فاکتورهای بیوشیمیایی
122.53 ± 5.30 ^b	147.04 ± 15.91 ^a	129.57 ± 7.85 ^{ab}	104.153 ± 5.30 ^c	آلکالین فسفاتاز (ALP) (گرم بر دسی‌لیتر)
161.16 ± 7.07 ^b	239.96 ± 32.03 ^a	177.54 ± 16.97 ^b	148.43 ± 3.17 ^b	آلانین آمینوترانسفراز (AST) (گرم بر دسی‌لیتر)
272.82 ± 13.58 ^b	316.27 ± 30.05 ^a	283.41 ± 11.19 ^b	241.06 ± 15.78 ^c	آسپارات آمینوترانسفراز (AST) (گرم بر دسی‌لیتر)

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد

Different letters in each row indicate statistically significant differences ($P \leq 0.05$)

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش انجام شده، افزایش سطح بیان ژن‌های SOD، CAT و HSP70 در ماهیان زبرا تحت تأثیر قرار گرفتن در معرض سمیت بوتاکلر هم‌راستا با نتایج به‌دست آمده از گزارش‌های سایر پژوهش‌گران که با سموم دیگر انجام شده بودند می‌باشد. وانگ و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که میزان بیان ژن SOD تحت تأثیر قرار گرفتن ماهیان زبرا در معرض سم دیکوات افزایش یافت (۱۴) هم‌چنین افزایش سطح بیان ژن‌های SOD، HSP70 و HSP90 تحت تأثیر سم بوتاکلر در ماهیان رویتا توسط کومار و همکاران (۲۰۲۲) گزارش شد (۱۲). هنگامی که موجود در شرایط استرس اکسیداتیو ناشی از حضور سموم قرار می‌گیرد، به‌منظور کنترل گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) مسیرهای دفاعی مختلفی را به‌کار می‌گیرد. در این شرایط سیستم دفاعی سلولی با تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و CAT می‌تواند بر رادیکال‌های آزاد غلبه کند و از این طریق از سلول‌های بدن محافظت به‌عمل آورد (۱۵). در مطالعه حاضر افزایش سطح بیان ژن‌های SOD و CAT به‌دلیل حضور ROS ناشی از سمیت بوتاکلر می‌باشد که در چنین شرایطی SOD رادیکال‌های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند و CAT پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. بنابراین افزایش سطح ژن CAT به‌دلیل افزایش سطح H_2O_2 ناشی از افزایش فعالیت SOD می‌باشد و افزایش سطح آنزیم‌های SOD و CAT می‌تواند از ماهی در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از علف‌کش‌ها محافظت کند (۱۶). علاوه بر این HSP70 به‌عنوان محافظ ملکولی عمل می‌کند و در شرایط بروز استرس‌های مختلف و آسیب‌های اکسیداتیو سطح بیان آن در سلول افزایش پیدا می‌کند تا با جلوگیری از گردهم‌آیی پروتئین‌های ناخواسته و کنترل نشده در

این شرایط، به حفظ هومئوستازی سلول کمک کند (۱۷). در این مطالعه نیز افزایش سطح بیان HSP70 نیز ناشی از بروز شرایط استرس ناشی از قرار گرفتن در معرض سمیت بوتاکلر در ماهیان زبرا می‌باشد. ALT و AST آنزیم‌های اختصاصی کبد هستند که پاسخ‌های سریعی به سمیت موجود در کبد و تغییرات بافت‌شناسی آن نشان می‌دهند (۷). این آنزیم‌ها غیرپلاسمایی هستند که در سلول‌های کبدی، قلب، ماهیچه‌ها، آبش و دیگر ارگان‌های بدن یافت می‌شوند بنابراین حضور آن‌ها در پلاسما نشان‌دهنده وجود آسیب و یا نقص عملکرد در اندام می‌باشد (۷). تغییر در فعالیت آنزیم ALP نشان‌دهنده وجود اختلال در عملکرد کبد می‌باشد و به‌عنوان یک شاخص برای ارزیابی اثرات ناشی از آلودگی‌ها در نظر گرفته می‌شود. افزایش فعالیت ترانس‌آمینازها نشان‌دهنده کاتابولیز شدن پروتئین‌ها و یا آسیب‌های وارد شده به سلول‌های کبدی می‌باشد (۱۸). ترانس‌آمینازهای ماهی شامل آنزیم‌های میتوکندریایی و سیتوپلاسمی هستند که در کاتابولیسم آمینواسیدها و انتقال اسیدهای آلی نقش دارند (۷). در این مطالعه قرار گرفتن ماهیان زبرا در مجاورت با بوتاکلر به‌مدت ۱۴ روز منجر به افزایش سطح آنزیم‌های ALT و AST در پلاسما شد که نشان‌دهنده آسیب ناشی از علف‌کش بوتاکلر به سلول‌های کبدی می‌باشد. درواقع افزایش سطح آنزیم‌های ALT و AST در ماهیانی که در مجاورت با آب آلوده شده با بوتاکلر قرار گرفتند ناشی از نشت احتمالی این آنزیم‌ها از سیتوپلاسم میتوکندری سلول‌های کبدی به جریان خون و یا به‌دلیل ستر آن‌ها در اثر نقص عملکرد کبد می‌باشد (۱۹). هم‌راستا با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش سمیه و همکاران (۲۰۱۵) افزایش معنی‌دار آنزیم‌های ALT و AST را در ماهی رویتا (*Labeo rohita*) تحت تأثیر سمیت علف‌کش بوتاکلر گزارش کردند (۲۰). هم‌چنین

به‌عنوان یک شاخص زیستی جهش پایش و ارزیابی سلامت اکوسیستم‌های آبی بهره گرفت. در حقیقت وجود سموم در اکوسیستم‌ها آبی حتی در غلظت‌های پایین می‌تواند در درازمدت اثرات مخربی را بر آبزیان اعمال کند که این امر از دیدگاه آبی‌پروری بسیار دارای اهمیت می‌باشد.

افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های ALP، ALT و AST در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) که به مدت ۵ هفته در معرض سم بوتاکلر قرار گرفتند نیز توسط پژوهش‌گران گزارش شد (۷). از این مطالعه می‌توان چنین نتیجه گرفت که باتوجه به تأثیری که علف‌کش بوتاکلر بر ژن‌های آنتی‌اکسیدانی، استرس و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم داشت، می‌توان از این فاکتورها

منابع

1. Oluah, N. S., Aguzie, I. O., Ekechukwu, N. E., Madu, J. C., Ngene, C. I., & Oluah, C. (2020). Hematological and immunological responses in the African catfish *Clarias fariatus* exposed to sublethal concentrations of herbicide Ronstar®. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 201, 110824.
2. Elbadawi, A. A., & Ramadan, O. A. (2006). Some toxicological studies of the insecticide "pymetrozine" on *Oreochromis niloticus*. *Journal of Egyptian Academic Society for Environmental Development*. 7(3), 125-138.
3. Rao, A. N., Singh, R. G., Mahajan, G., & Wani, S. P. (2020). Weed research issues, challenges, and opportunities in India. *Crop Protection*. 134, 104451.
4. Akoto, O., Azuure, A. A., & Adotey, K. D. (2016). Pesticide residues in water, sediment and fish from Tono Reservoir and their health risk implications. *SpringerPlus*. 5(1), 1-11.
5. Eurie, F. M. A., Isabel, G. A., Arne, D., Lenin, R. F., Liesbeth, J., Pieter, S., & LM, G. P. (2021). From field to plate: Agricultural pesticide presence in the guayas estuary (Ecuador) and commercial mangrove crabs. *Environmental Pollution*. 289, 117955.
6. Xu, H. D., Wang, J. S., Li, M. H., Liu, Y., Chen, T., & Jia, A. Q. (2015). 1H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of herbicide butachlor on goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*. 159, 69-80.
7. Ebrahimzadeh, M., Heidari, B., Nazarhaghghi, F., & Alipour, A. (2021). Physiological responses of the goldfish (*Carassius auratus*) during subacute exposure to organic pollutants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 106, 773-778.
8. Van Geast, J. (2010). Bioaccumulation of sediment associated contaminants in freshwater organism: development and standardization of a laboratory method. PhD thesis, University of Guelph, Canada. 1-232.
9. OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development), 1992. OCED Test. Guideline 203 for Fish, Acute Toxicity Test. OECD, Paris, France.
10. D'costa, A., & Shepherd, I. T. (2009). Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. *Zebrafish*. 6(2), 169-177.
11. Bharti, S., & Rasool, F. (2021). Analysis of the biochemical and histopathological impact of a mild dose of commercial malathion on *Channa punctatus* (Bloch) fish. *Toxicology Reports*. 8, 443-455.
12. Kumar, V., Swain, H. S., Roy, S., Das, B. K., Upadhyay, A., Ramteke, M. H., & Banerjee, H. (2022). Integrated biomarker approach strongly explaining in vivo sub-lethal acute toxicity of butachlor on *Labeo rohita*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part*

- C: *Toxicology and Pharmacology*. 261, 109427.
13. Meng, D., Zhang, P., Zhang, L., Wang, H., Ho, C. T., Li, S., & Zhao, H. (2017). Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. *Journal of Functional Foods*. 37, 467-479.
 14. Wang, X. H., Souders II, C. L., Zhao, Y. H., & Martyniuk, C. J. (2018). Mitochondrial bioenergetics and locomotor activity are altered in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to the bipyridylum herbicide diquat. *Toxicology letters*. 283, 13-20.
 15. Song, S. B., Xu, Y., & Zhou, B. S. (2006). Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*. 65, 699-706.
 16. Gupta, P., & Verma, S. K. (2022). Evaluation of genotoxicity induced by herbicide pendimethalin in fresh water fish *Clarias batrachus* (linn.) and possible role of oxidative stress in induced DNA damage. *Drug and Chemical Toxicology*. 45(2), 750-759.
 17. Liu, X., Shi, H., Liu, Z., Wang, J., & Huang, J. (2019). Effect of heat stress on heat shock protein 30 (Hsp30) mRNA expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 19(8), 681-688.
 18. Patnaik, L. (2010). Biochemical alterations induced by sevin in *Clarias batrachus*. *Asian Journal Experimental Biology Science*, 1(1), 124-127.
 19. Gabriel, U. U., Akinrotimi, O. A., & Ariweriokuma, V. S. (2012). Changes in metabolic enzymes activities in selected organs and tissue of *Clarias gariepinus* exposed to cypermethrin. *Journal of Chemical Engineering*. 1(1), 25-30.
 20. Somaiah, K., & Sunita, K. (2015). Biochemical changes induced by Butachlor, pre-emergent herbicide to sub lethal concentrations in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton). *Journal de Afrikana*. 2(4), 99Y122.
 21. Safari, R., Hoseinifar, S. H., Van Doan, H., & Dadar, M. (2017). The effects of dietary Myrtle (*Myrtus communis*) on skin mucus immune parameters and mRNA levels of growth, antioxidant and immune related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*. 66, 264-269.

