اثر جیره غذایی حاوی پروپیونیک اسید بر بیان ژن های درگیر در سیستم ایمنی میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vanammei*)

سجاد پورمظفر*[1]، حسین رامشی[1]، سعید تمدنی جهرمی[2]، محمد رضا زاهدی[2]، شهرام صیدمرادی[1]
Email: Sajjad5550@gmail.com
1- ایستگاه تحقیقاتی نرمتنان، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرلنگه، ایران.
2- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

چکیده:
شیوع و گسترش بیماری ها در صنعت آبزی پروری منجر به کاهش تولید گردید، از این رو پرورش‌دهندگان به استفاده از آنتی بیوتیک ها روی آوردند. آنتی بیوتیک اثرات منفی زیادی بر جانوار میزبان، محیط زیست و انسان ها داشت، بنابراین علاقه مندی شدیدی در جایگزین کردن آنتی بیوتیک ها به وجود آمد. امروزه از اسیدهای آلی در صنعت آبزی پروری به صورت گسترده استفاده می شود. این مطالعه به منظور بررسی اثر جیره غذایی حاوی پروپیونیک اسید بر بیان ژن های درگیر در سیستم ایمنی میگو پاسفید غربی (*Litopenaeus vanammei*) انجام گرفت. به همین منظور 150 عدد میگو با میانگین وزن 10/2±0/04 در شش تانک توزیع گردید. رژیم غذایی میگو ها شامل تیمار شاهد و تیمار 0/5٪ پروپیونیک اسید بود. میزان غذادهی 2/5 ٪ درصد وزن بدن و 4 مرتبه در طول شبانه روز انجام گرفت. بعد از 60 روز، از هپاتوپانکراس میگوها به منظور بررسی بیان ژن های لیزوزیم، کراستین و پنائیدین به روش Realtime-PCR نمونه برداری شد. نتایج حاصل نشان داد که افزایش معنی داری در بیان ژن های لیزوزیم و کراستین نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$)، در حالی که میزان بیان پنائیدین تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نداشت ($P > 0.05$). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پروپیونیک اسید می تواند به عنوان یک تحریک کننده سیستم ایمنی مطرح شود، هر چند که مطالعات تکمیلی در این خصوص بایستی انجام گیرد.

کلمات کلیدی: میگوی وانامی، پروپیونیک اسید، لیزوزیم، کراستین، پنائیدین.

1-مقدمه:

در سال‌های اخیر، صنعت پرورش میگو با چالش‌های بزرگی به دلیل شیوع بیماری‌های باکتریایی و ویروسی مواجه شده است. این امر سبب شده اغلب اوقات پرورش‌دهندگان به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها تمایل پیدا کنند. در سال‌های اخیر، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با مخالفت‌های شدیدی روبه رو شده است. به طوری که امروزه در صنعت آبزی‌پروری، استفاده از مواد ضد میکروب به ازای هر تن محصول حدود 700-2 گرم می‌باشد (Ng *et al.*, 2009). به هر حال استفاده بلندمدت از این مواد می‌تواند باعث به وجود آمدن مقاومت باکتریایی در میگو شود و همچنین در دوزهای بالاتر نیز می‌تواند تأثیر منفی بر روی رشد و سایر فاکتورهای ایمنی داشته باشد (Da Silva et al., 2013). اخیراً یکی از موادی که به دلیل اثر ضد میکروبی قوی و خصوصیات پیشگیری کننده از بیماری‌ها توجهات زیادی رو به خود جلب کرد، اسیدهای آلی بود (Romano, Koh and Ng, 2015). اسیدهای آلی، ساختمانی کوتاه زنجیره دارند که شامل پروپیونیک اسید، اسید استیک، فرمیک اسید، سیتریک و لاکتیک اسید می‌شود. این مواد به همراه نمک‌هایشان حاوی یک یا چند گروه کربوکسیل (-COOH) هستند که به عنوان ترکیب ضد میکروبی در صنعت تولید غذای موجودات زنده استفاده می‌شود (Romano, Koh and Ng, 2015). همچنین، مطالعات پیشین نشان داده است که اسیدهای آلی اثرات ضد باکتری در میگوی وانامی (Da Silva *et al.*, 2013)، هیبرید قرمز تیلاپیا (*Oreochromis* sp) (Ng *et al.*, 2009) خوک (Kluge, Broz and Eder, 2006) و میگوی مونودون (Romano, Koh and Ng, 2015) دارد. تاکنون مطالعه ای در

خصوص اثرات اسیدهای آلی بر بیان ژن در آبزیان صورت نگرفته است، از این رو، این مطالعه به بررسی رژیم غذایی حاوی پروپیونیک اسید و پتانسیل این ماده بر بیان ژن های درگیر در سیستم ایمنی میگوی وانامی پرداخته است.

2-مواد و روش:

125 عدد میگو وانامی با میانگین وزنی 10/2±0/04 گرم از مزارع پرورش تهیه و به محل اجرای پروژه منتقل شدند. به مدت 15 روز در مخازن حاوی آب شور جهت سازگاری به محیط قرار داده شدند. پس از این، تعداد 125 قطعه میگو به صورت تصادفی در 6 مخزن فایبرگلاس با ظرفیت 400 لیتر پراکنده شدند. میزان شوری 1/21 ± 20/27 گرم در لیتر و دما 1/64 ± 25/84 درجه سانتی‌گراد بود. میگوها روزانه 4 بار در ساعت‌های 7 و 11/30، 15/30 و 22 به میزان 2/5 درصد وزن بدن به مدت 60 روز تغذیه شدند. پس از مرحله سازگاری، میگوها با جیره غذایی تجاری (فاقد اسید آلی) و حاوی 0/5 درصد پروپیونیک اسید (Sigma Aldrich St. Louis, Mo, USA) به عنوان مکمل غذایی تغذیه شدند. هر دو جیره غذایی با روغن پوشش‌دار شدند و در دمای 20- تا زمان استفاده نگهداری شدند (Romano, Koh and Ng, 2015).

در انتهای دوره پرورش،از هپاتوپانکراس میگوها به منظور سنجش بیان ژن های لیزوزیم، کراستین و پنائیدین نمونه برداری شد. RNA کل با استفاده از RNAx plus (سیناژن، ایران) استخراج شد. کیفیت RNA با استفاده از الکتروفورز حاوی ژل آگارز 1/5 درصد و با استفاده اتیدیموم بروماید تعیین شد. cDNA با استفاده از کیت سنتز SuPrime Script RT Premix 2X (شرکت GeNet BIO Inc، کره جنوبی) براساس دستور العمل شرکت سنتز گردید.

آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از مطالعات قبلی گرفته شده و با نرم‌افزار Bio edit تست شدند و با آزمایش کردن در دستگاه PCR بهترین دما برای تکثیر بدست آمد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول 1 نشان داده شده است. به منظور انجام Real time PCR محتویات هر تیوپ به مقدار 20 میکرولیتر در نظر گرفته شد:

10میکرولیتر بافر سایبرگرین، 0/2 میکرولیتر آغازگر پیش‌رونده و پس رونده ژن هدف، 6/40 میکرولیتر آب، 0/2 میکرولیتر آنزیم تگ پلی مراز، 2 میکرولیتر cDNA رقیق شده، 1 میکرولیتر دی متیل سولفواکساید. در نهایت کارایی PCR و تغییرات نسبی بیان ژن‌ها براساس منحنی استاندارد ذوب و براساس معادله زیر انجام شد:

کارایی PCR $= 10^{(1/\text{منحنی})} - 1 \times 100$

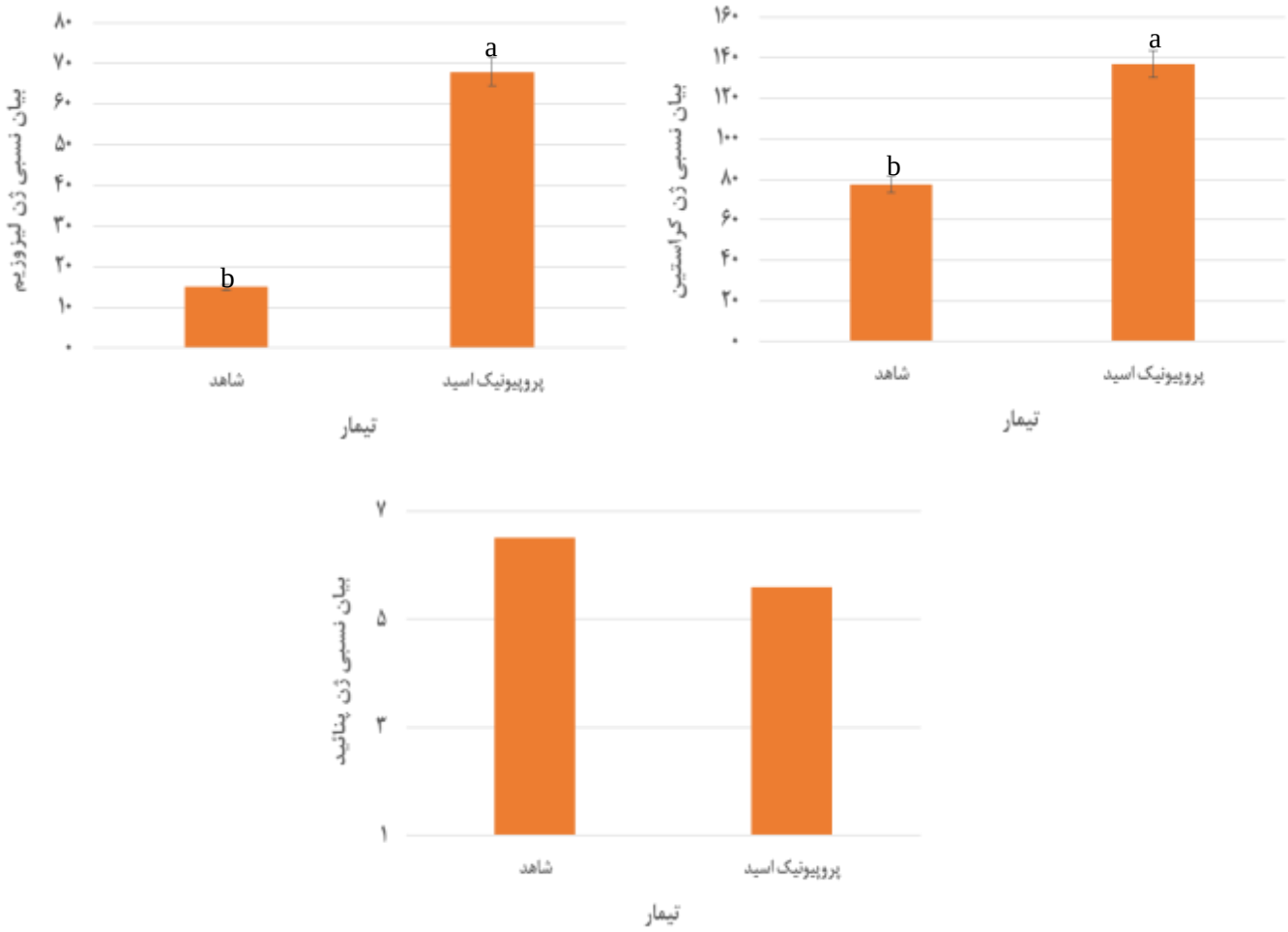
جدول1. توالی آغازگرهای استفاده‌شده

ژن	شماره دستیابی توالی mRNA (Accession Number)	آغازگرها:پیش‌رونده (forward) و پس‌رونده (reverse)	طول قطعه تکثیر شونده bp (Amplicon)
لیزوزیم	AY170126.2	TGT TCC GAT CTG ATG TCC GCT GTT GTA AGC CAC CC	123
کراستین	AF430076	ACGAGGCAACCATGAAGG AACCACCACCAACACCTAC	141
پنائیدین	Y14926	CACCCTTCGTGAGACCTTTG AATATCCCTTTCCCACGTGAC	121
β-actin	AF300705	CCACGAGACCACCTACAAC AGCGAGGGCAGTGATTTC	150

3-نتایج و بحث:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مکمل غذایی حاوی پروپیونیک اسید موجب افزایش معنی دار بیان ژن های لیزوزیم و کراستین نسبت به تیمار شاهد شد ($P < 0.05$)، در حالی که تفاوتی در میزان بیان پنائیدین مشاهده نشد ($P > 0.05$). لیزوزیم یکی از شناخته شده‌ترین پپتیدهای ضد میکروبی است که به صورت مستقیم به عوامل بیماری‌زا همچون باکتری‌ها حمله کرده و دیواره سلولی آن‌ها را تخریب می‌کند. ، لیزوزیم میگوی وانامی فعالیت ضد باکتری قوی در برابر باکتری های ویبریو و میکروکوکاسه لیزودیکتیکوس دارد (Lin *et al.*, 2012). همچنین نتایج مطالعات پیشین نشان داده است، لیزوزیم قادر است در مقابل رنج وسیعی از عوامل بیماری زا همچون ادواردوزیلا، ویبریو، میکروکوکوس، وایت اسپات از آبزی مراقبت کند (De-La-Re-Vega *et al.*, 2006; Mai and Hu, 2009; Sun *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2015).

کراستین یکی از عوامل مهم تأثیرگذار در سیستم ایمنی میگو می‌باشد. به علاوه، این پپتید به طور مشخص در شناسایی و دفع باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی به سیستم ایمنی کمک می کند. با توجه به خواص ضد میکروبی، کراستین میگوی موروتوج (*Pandalopsis japonica*) پاسخ ضد باکتریایی قوی در مواجهه با باکتری استافیلوکوکوس آرئوس (*Staphylococcus aureus*) نسبت به باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس (*Vibrio parahaemolyticus*) دارد (Kim *et al.*, 2012). علاوه بر این، نتایج حاصل از دیگر مطالعات نشان داده است که کراستین اثر ممانعت کنندگی قوی علیه باکتری‌های گرم مثبت در میگوی چینی (*Vibrio parahaemolyticus*) (Zhang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2010) و میگو مونودون (Supungul *et al.*, 2008) داشته است. به نظر می رسد پروپیونیک اسید به عنوان یک ماده حاوی اسید آلی، می‌تواند به عنوان جایگزینی مناسب برای سایر مواد تحریک کننده ایمنی در نظر گرفته شود، هر چند مطالعات گسترده‌تر جهت درک بهتر نقش این ماده در پاسخ‌های ایمنی و فاکتورهای رشد مورد نیاز می‌باشد.



نمودار 1: میانگین (± انحراف معیار) بیان نسبی ژن های لیزوزیم، کراستین و پنائید میگوی وانامی تغذیه شده با پرورپیونیک اسید در پایان دوره آزمایش. حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

4-منابع:

De-La-Re-Vega, E. *et al.* (2006) 'White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahemolyticus* and *Vibrio cholerae*', *Fish and Shellfish Immunology*, 20(3), pp. 405–408.

Kim, M. S. *et al.* (2012) 'Molecular characterization of three crustin genes in the morotoge shrimp, *Pandalopsis japonica*', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Inc., 163(2), pp. 161–171..

Kluge, H., Broz, J. and Eder, K. (2006) 'Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets', *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90, pp. 316–324.

Lin, Y. C. *et al.* (2012) 'Modulation of innate immunity and gene expressions in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term starvation and re-feeding', *Results in Immunology*. Elsevier, 2, pp. 148–156..

Mai, W. and Hu, C. (2009) 'cDNA cloning, expression and antibacterial activity of lysozyme C in the blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*)', *Progress in Natural Science*. National Natural Science Foundation of China and Chinese Academy of Sciences, 19(7), pp. 837–844..

Ng, W. K. *et al.* (2009) 'Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp*., and subsequent survival during a challenge test with Streptococcus agalactiae', *Aquaculture Research*, 40(13), pp. 1490–1500..

Romano, N., Koh, C. B. and Ng, W. K. (2015) 'Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 435, pp. 228–236..

da Silva, B. C. *et al.* (2013a) 'Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 384–387, pp. 104–110.

Sun, C. *et al.* (2010) 'Molecular cloning and characterization of three crustins from the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*', *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd, 28(4), pp. 517–524..

Supungul, P. *et al.* (2008) 'Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*', *Developmental and Comparative Immunology*, 32(1), pp. 61–70..

Tian, Y. *et al.* (2015) 'Expression of c-type lysozyme gene in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) is highly regulated and time dependent after salt stress', *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Inc., 180, pp. 68–78..

Zhang, J. *et al.* (2007) 'Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*', *Journal of Biotechnology*, 127(4), pp. 605–614. doi:.