پرورش لارو ماهی

بیان ژن پپسینوژن در مرحله لاروی ماهی صبیتی و رابطه آن با رشد

سمیرا ناظم‌رعایا*[۱]، محمدعلی نعمت اللهی[۱]، راضیه یزدان پرست[۲]، حمید فرحمند[۱]، قدرت اله میرزاده[۳]

[۱]گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

[۲]گروه بیوشیمی مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران

[۳]شیلات استان هرمزگان، بندرعباس

* s_nazemroaya@alumni.ut.ac.ir

واژه‌های کلیدی: صبیتی، لارو، پپسینوژن، رشد، Real time –PCR.

مقدمه

بسیاری از ماهیان دریایی استخوانی در زمان تخم‌گشایی معده ندارند و عملکرد معده را در پایان دوره لاروی به‌دست می‌آورند (Feng *et al.*, 2008). اینطور به نظر می‌رسد که هماهنگی بین فعالیت تمام آنزیم‌های گوارشی (به ویژه پروتئازها) در خلال تکامل لاروی، شکل هضم را به‌طور پیشرونده‌ای از شکل درون سلولی به برون سلولی تغییر می‌دهد (Zambonino-Infante *et al.*, 2008). موفقیت این تغییر با حضور فعالیت پپسین در معده(Salze *et al.*, 2012) و بیان ژن پپسینوژن به عنوان شاخص تمایز و کارایی معده مشخص می‌گردد که در ماهیان استخوانی به‌طور چشمگیری پس از زمان تغذیه با غذای ساختگی آغاز می‌گردد (Darias *et al.*, 2007). معده کاملاً تکامل یافته به عنوان اندامی کمک کننده و مهم برای سازگاری به جیره‌های خشک در لارو و بچه ماهی پس از دگردیسی در نظر گرفته می‌شود (Wu *et al.*, 2011). از سویی توانایی دنبال کردن بیان ژن‌های آنزیم‌های گوارشی در سطح رونویسی، تخمینی دقیقی از کارایی دستگاه گوارش را فارغ از نشانه‌های مداخله‌گر آنزیم‌های موجود در غذای زنده ارائه می‌دهد که ممکن است در سنجش بیوشیمیایی تشخیص داده شوند (Murray *et al.*, 2006). این مطالعه اولین مورد درباره فیزیولوژی گوارشی لارو ماهی صبیتی با اندازه‌گیری رونویسی ژن پپسینوژن و تأثیر آن بر رشد می‌باشد.

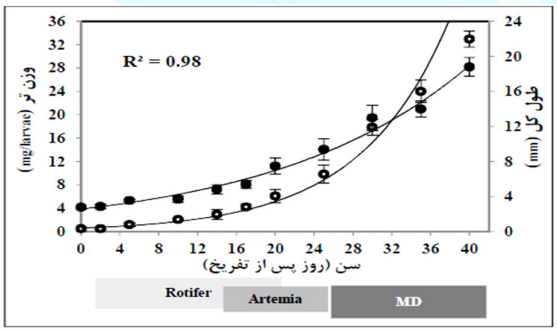
مواد و روش‌ها

پس از تکثیر و پرورش لارو ماهی صبیتی در کارگاه تکثیر ماهیان دریایی، نمونه‌برداری تصادفی از لاروها در سه تکرار زیستی از زمان تخمه‌گشایی تا روز ۲۰ پس از تفریخ یک روز در میان و پس از آن تا روز ۴۰ پس از تفریخ هر پنج روز یکبار صورت گرفت. نمونه‌های غوطه‌ور در نیتروژن مایع به فریزر ۷۰°C- منتقل شدند. پس از استخراج RNA توسط محلول «بایوزول» و انجام تیمار DNAse،

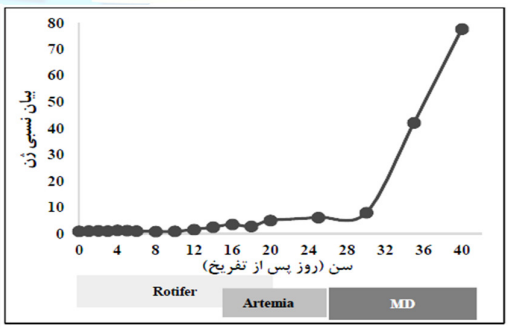
cDNA توسط کیت iScript ساخته شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس نواحی حفاظت شده ژن پپسینوژن (ژن هدف) و بتا- اکتین (ژن مرجع) در دیگر شانک‌ماهیان در بانک ژن «NCBI»، میزان بیان نسبی ژن پپسینوژن پس از نرمال‌سازی داده‌ها با بیان ژن بتا-اکتین با روش Real time-PCR و کاربرد کیت EvaGreen از طریق Efficiency adjusted $\Delta\Delta C_T$ به صورت $^{-}$ $2^{\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. برای ارزیابی رشد وزنی و طولی، تعداد ۳۰ قطعه لارو به صورت تصادفی نمونه‌برداری شد و روی توری با قطر ۱۵۰ µ قرار داده شدند و توسط کاغذ خشک‌کن از زیر رطوبت اضافی آنها گرفته شد و با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن آنها محاسبه گردید و پس از آن با دوربین عکاسی دیجیتال متصل به لوپ از آنها عکس برداری شد و با استفاده از نرم افزار آنالیز عکس ImageJ طول کل آنها بر حسب میلی‌متر محاسبه گردید.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که سه دوره رشدی مشخص در خلال تکامل لاروی صبیتی ابتدا با افزایش نسبتاً تدریجی تا روز ۱۶ پس از تفریخ، بعد با شیب بیشتر از این روز (همزمان با ارائه آرتمیا) تا آغاز جایگزینی غذای زنده با خشک و سپس با شیب بسیار تندتر از آغاز جایگزینی غذای زنده با خشک تا انتهای آزمایش وجود داشت. از سویی بیان نسبی ژن پپسینوژن به شکل نمایی در طول مرحله لاروی افزایش یافت، بطوریکه تا پیش از روز ۱۲ پس از تفریخ قابل تشخیص نبود و به شکل معنی‌داری از روز ۱۴ پس از تفریخ منطبق بر افزایش رشد (شکل.۱) مشخص و تا پیش از آغاز جایگزینی غذای زنده با غذای خشک با افزایش تدریجی همراه بود. افزایش ناگهانی در بیان آن، پس از تغییر در نوع جیره از غذای زنده به غذای خشک و منطبق بر دوره سوم رشد بود (شکل.۲). این نتایج بیانگر آن است که بیان زودهنگام ژن پپسینوژن و افزایش مقدار بیان آن با تأثیر بر افزایش فعالیت آنزیم پپسین و هضم پروتئین‌های جیره اثر مستقیم بر افزایش رشد دارد و امکان جایگزینی زودتر غذای زنده با غذای خشک را در این گونه فراهم می‌سازد چون معده کارا از روز ۱۶ پس از تفریخ در حال شکل گیری است.



شکل ۱. رشد وزنی و طولی در لارو صبیتی تا ۴۰ روزگی



شکل ۲. بیان نسبی ژن پپسینوژن در لارو صبیتی تا ۴۰ روزگی

فهرست منابع

1. Darias, M.J., Murray, H.M., Gallant, J.W., Douglas, S.E., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., 2007. Ontogeny of pepsinogen and gastric proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): Determination of stomach functionality. Aquaculture 270, 369-378.

2. Feng, S., Li, W., Lin, H., 2008. Identification and expression characterization of pepsinogen A in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Journal of Fish Biology 73, 1960-1978.

3. Murray, H., Gallant, J., Johnson, S., Douglas, S., 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. Aquaculture 252, 394-408.

4. Salze, G., McLean, E., Craig, S.R., 2012. Pepsin ontogeny and stomach development in larval cobia. Aquaculture 324, 315-318.

5. Wu, X., Washio, Y., Aritaki, M., Fujinami, Y., Shimizu, D., Hashimoto, H., Iwasaki, T., Uji, S., Suzuki, T., 2011. Staging of initial pepsinogen and chitinase expression and complete gastric gland development within the larval stomach of Japanese flounder, spotted halibut, seven-band grouper and greater amberjack. Aquaculture 314, 165-172.

6. Zambonino-Infante, J., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C.L., 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae, in: J.E.P. Cyrino (Ed.), Feeding and Digestive Functions of Fish. Science Publishers, Enfield, USA, 277–344.