1057-AMIWR2019

تغییرات بیان ژن NKA در شوری های مختلف محیطی در سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*)

سهیلا ثقفیان خو[۱]، امیر پرویز سلاطی[۱]، وحید مرشدی[۲]، محمود نفیسی[۲]، احمد قاسمی[۲]

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

چکیده

ماهی سی‌باس آسیایی، *Lates calcarifer* از ماهیان باارزش دریایی بوده که در استرالیا با نام بارامونده‌ی شناخته می‌شود. این ماهی از گونه های مهم و تجاری آبزی پروری جنوب شرق آسیا، که به میزان زیادی در استرالیا، تایلند و اندونزی پرورش داده می‌شود. این گونه به شوری و تغییرات دمای آب مقاوم است، و می‌تواند در محیط های با اسمولالیته متفاوت مانند دریا، مصب، آب شیرین زندگی کند. این امر باعث می‌شود این گونه به نمونه مناسبی برای مطالعه اثرات شوری بر روی پاسخ های فیزیولوژیکی تبدیل گردد. این مطالعه برای ارزیابی تغییرات در بیان Na^+/K^+ ATPase (NKA) در بافت آبشش سی‌باس آسیایی طراحی شد که در محدوده ای از شوری ها شامل آب شیرین، ۱۵، ۳۵ و ۵۰ ppt نگه داری شدند. تعداد ۱۸۰ قطعه به طور تصادفی بین ۱۲ تانک هوادهی شده فایبرگلاس توزیع شد (حجم ۳۰۰ لیتر). آب خلیج فارس با شوری ۵۰ ppt در این مطالعه استفاده شد. شوری های دیگر از طریق رقیق سازی آب دریا ساخته شد. هر تیمار در ۳ تکرار انجام شد. ماهی ۷ روز در شوری های آزمایش نگه داری شد. در پایان دوره مطالعه، ماهی به روش آسان کشته شد و بافت آبشش آن برداشته شد. بیان mRNA NKA در آبشش اندازه گیری شد. الگوی U شکل برای بیان NKA در این مطالعه ثبت شد، بالاترین بیان NKA آبششی در ۵۰ ppt مشاهده شد، درحالی که کمترین بیان در ۳۵ ppt ثبت شد. یافته های ما نشان داد که بیان NKA به عنوان انتقال دهنده اصلی آبشش بالاترین بیان را در زیستگاه های غیرمعمول و کمترین بیان را در شوری های محیط طبیعی دارند.

واژه های کلیدی: سی‌باس آسیایی، شوری، آبشش، NKCC، NKA

مقدمه

ماهی سی باس آسیایی (***Lates calcarifer***)از ماهیان با ارزش دریایی بوده که در استرالیا با نام بارامونده‌ی شناخته می شود. این ماهی از گونه های مهم و تجاری آبزی پروری جنوب شرق آسیا، که به میزان زیادی در استرالیا، تایلند و اندونزی پرورش داده می شود (Larson, 1999). دامنه پراکنش این ماهی از اقیانوس هند شمالی تا اقیانوس آرام غربی می باشد و از ایران تا قسمت شمالی استرالیا گسترش یافته و در دمای بهینه ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتیگراد زیست می کنند (Tian and Qin, 2003). در ۱۵ سال گذشته تولید ماهی سی باس آسیایی در استرالیا به طور پیوسته افزایش یافته است و این روند قابل پیش بینی همچنان نیز ادامه دارد (Thirunavukkarasu et al., 2004). سازش پذیری با غذای دستی، تکثیر در شرایط اسارت، نرخ رشد سریع (نرخ رشد ماهی سی باس در مراحل اولیه زندگی کم بوده اما از وزن ۳۰ گرم رشد سریع این ماهی شروع شده و بعد از رسیدن به وزن ۴ کیلوگرم کاهش پیدا می کند) و قیمت بالای محصول در بازار به واسطه کیفیت بالای گوشت از عواملی است که این گونه را مناسب آبزی پروری کرده است (Singh, 2000; Mathew, 2009).

این گونه به شوری و تغییرات دمای آب مقاوم است که می تواند در محیط های با اسمولالیته متفاوت مثل دریا، مصب،مرداب های ساحلی و رودخانه ها زندگی کند. این امر باعث می شود این گونه به نمونه آزمایشی مناسبی برای مطالعه آثار شوری نیز تبدیل گردد.چنانچه بتوان از آب های شور و لب شور منابع داخلی برای پرورش ماهیانی با ارزش اقتصادی و سازگار با شرایط جدید استفاده کرد، می توان کمبود پروتئین های جانوری را تا حدود زیادی جبران کرد (Hafezamini and Orian, ۲۰۰۳).

شوری یکی از مهم ترین فاکتورهای موثر بر رشد و ماندگاری ماهیان می باشد که این عمل از طریق تنظیم فشار اسمزی صورت می گیرد. با توجه به اینکه فشار اسمزی مایعات بدن در شوری پایین تقریباً با فشار اسمزی محیط برابر است و موجود در این محیط ها انرژی کمتری را صرف تنظیم اسمزی می نماید و در نتیجه میزان انرژی بیشتری صرف رشد ماهی می شود. درصد بقا و بازماندگی گونه های زیادی از ماهیان ممکن است در شوری های پایین بهتر باشد (Likongwe et al., 1996). ماهی یوری هالین مکانیسم هایی دارد که اجازه می دهد آنها به نوسانات شوری گسترده ای تطابق یابند که به وسیله ی غدد درون ریز و سیستم اعصاب غدد درون ریز کنترل و هماهنگ شده است. ماهی سی باس آسیایی به عنوان یک گونه یوری هالین توانایی تطابق با شوری های مختلف را دارد. با توجه به اهمیت پرورشی، اقتصادی و بازارپسندی بالا و قابلیت تحمل دامنه وسیع می توان آن را در محیط هایی با شوری متنوع پرورش داد. با توجه به اینکه ظرفیت تنظیم اسمزی ماهیان در رابطه با تغییرات شوری به طور وسیعی در گونه های پرورشی و اقتصادی و هم چنین گونه های مهاجر و ماهیانی که در مصب زندگی می کنند به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است. اما با این حال مطالعات گسترده ای در رابطه با مکانیسم پاسخ های فیزیولوژیک ماهی سی باس آسیایی نسبت به سطوح مختلف شوری صورت نگرفته است.

مواد و روش ها

۲۵۰ قطعه ماهی به ¬مدت ۱۴ روز در تانک ¬های ذخیره با ¬شرایط آزمایش و غذای کنستانتره سازگاری پیدا کردند. با ¬شروع دوره ۳۰ روزه آزمایش، تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی با ¬میانگین وزن اولیه ۳۴/۳۶±/۴۱ گرم بین ۱۲ تانک ¬فایبرگلاس مدور ۳۰۰ لیتری (۱۵ قطعه به ¬ازای هر تانک) و به ¬صورت کاملا تصادفی بین تیمارها توزیع شدند. غذادهی به ماهیان تیمار شاهد و سایر تیمارها به¬ وسیله جیره تجاری ماهی سی¬باس آسیایی با اندازه ۳ میلی¬ متر (۵۰ درصد پروتئین، ۱۶ درصد چربی، ۲/۵درصد فیبر،۱۴ درصد خاکستر) دو ¬بار در روز و در ساعت¬ های ۸ و ۱۶ تا حد سیری انجام شد. تیمارها به ¬ترتیب شامل آب¬ شیرین، شوری ۱۵، ۳۵ و ۵۰ گرم در لیتر بودند. تنظیم شوری با ¬استفاده از شوری¬ سنج(WTW مدل U10)و تطابق به شوری به ¬تدریج و در طی مدت ۷ روز انجام شد. آب استفاده شده برای تانک ¬ها به¬ طور¬ مستقیم از خلیج ¬فارس پمپاژ می¬شد که شوری آن معادل ۵۰ گرم بر لیتر بود. برای تامین آب تیمارهای ۱۵ و ۳۵ گرم بر لیتر، عمل رقیق سازی با محاسبه نسبت میزان مورد ¬نیاز از آب¬ شور به ¬وسیله آب ¬شیرین لازم برای مخلوط ¬سازی انجام شد، سپس با دستگاه شوری ¬سنج صحت شوری¬ های تهیه شده بررسی گردید. . آب تانک ¬ها بسته ¬به وضعیت کیفی آب بین ۵۰ تا ۷۰ درصد در شبانه¬روز تعویض شد .

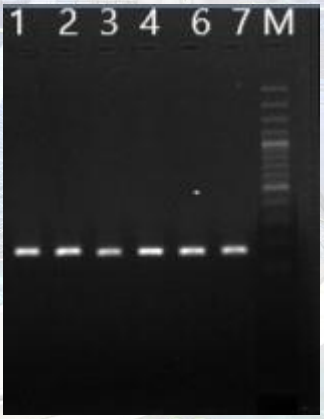
دوره ¬نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. شاخص ¬های فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما با استفاده از دماسنج¬ جیوه ای و اکسیژن ¬محلول با استفاده از اکسیژن¬متر (WTW مدل(oxi320/set ، pHمتر (WTW مدل B3223/set)در طول مدت آزمایش به ¬صورت هفتگی اندازه گیری شد. در پایان دوره آزمایش تعداد ۶ عدد ماهی از هر تیمار (۲ عدد ماهی از هر تکرار) برای انجام آزمایشات مولکولی ابتدا بیومتری شدند و پس از خون¬گیری از ماهی¬ها ، از آبشش آن¬ها نمونـه -بـرداری شد. سپس نمونه¬ ها¬ی بافت آبشـش آن¬هـا (کل آبشش) جهت جلوگیری از تجزیه RNA بسرعت در ازت¬ مایع فیکس شدند¬RNA .ی کل موجود در نمونه¬ هـا با استفاده از کیت High Pure RNA Tissue ¬استخراج شده

و پس از بررسی کمی و کیفی¬RNA ی استخراج شده با ¬استفاده گرفتند. جهت ساخت cDNA از کیت¬ فرمنتاز استفاده شد .

در این تحقیق، ژن بتا اکتین به¬ عنوان کنترل¬ داخلی انتخاب شدند . ژن های مورد ¬بررسی، زیر¬واحد α1b ژن آنزیم Na+/K+-ATPase می¬باشد که توالی RNA این ژن ¬ها در سایت NCBI ثبت گردیده است.

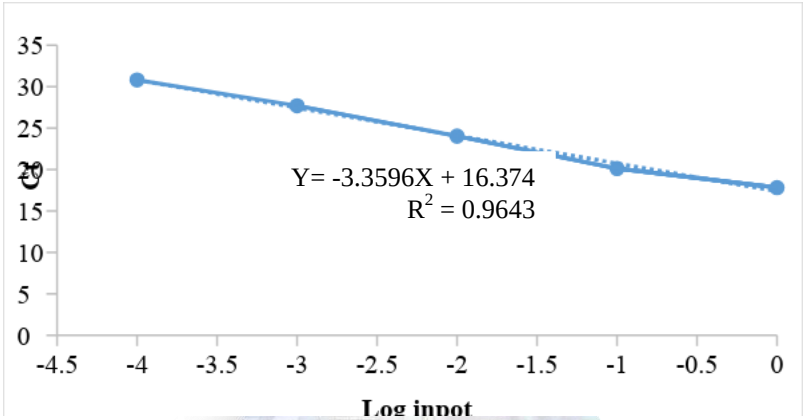
نتایج و بحث

به ¬منظور تایید بیان¬ ژن و مناسب بودن پرایمرهای طراحی شده برای اندازه¬گیری بیان ¬ژن ابتدا واکنش PCR بر¬روی cDNA ساخته ¬شده از آبشش ماهی سی باس انجام گردید. الکتروفورز (شکل ۱)، باندی به ¬طول ۲۰۰ جفت باز را به -ترتیب برای NKA بر روی ژل آگارز نشان داد. بر¬¬این اساس کیفیت تکثیر ژن¬ها مورد ¬نظر برای RT-PCR مناسب بود.



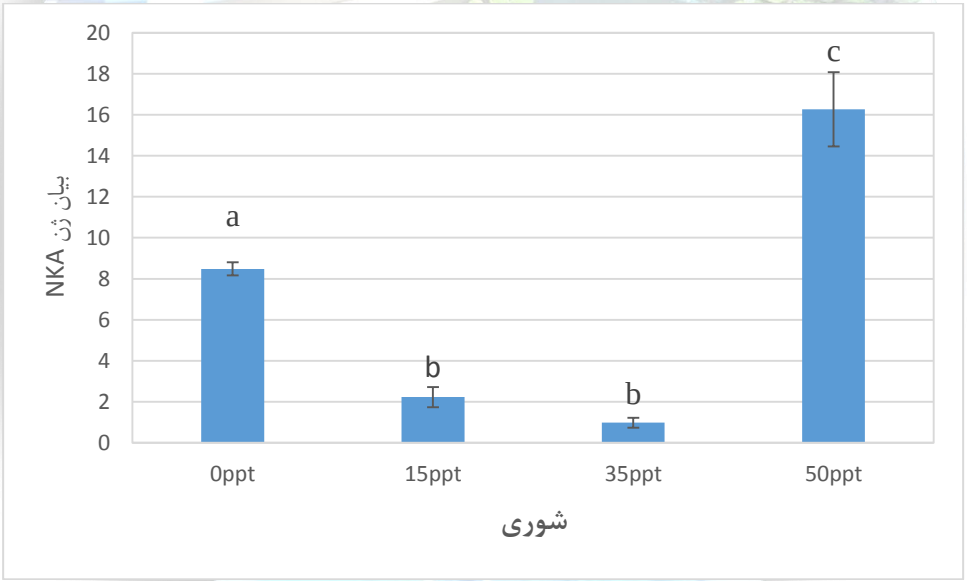
شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای ژن NKA

منحنی لگاریتم استاندارد مقادیر رقت¬سازی شده هر ژن (ژن Na/K-ATPase و NKCC و βactin به¬عنوان کالیبراتور) در برابر CT هر رقت (درمورد هر ژن مقادیر میانگین CT رقت¬های مختلف در ۳ بار تکرار محاسبه و مقادیر CT ژن کنترل داخلی و ژن¬های Na+/K+-ATPase و NKCC به ¬طور ¬مجزا محاسبه گردید) رسم و فرمول خط متناسب با فرمول y= ax+b استخراج گردید. نتایج نشان داد همبستگی بین تغییرات مقادیر CT ژن CYP1A در برابر رقت¬ های متفاوت cDNA معنی¬دار(۰/۰۱ > Pو براساس معادله خط کارآیی تکثیر¬ژن Na+/K+-ATPase برابر ۹۸/۵۸درصد می-باشد (نمودار۱)



نمودار ۱. منحنی استاندارد تکثیرژن Na+/K+-ATPase براساس غلظت لگاریتمی از cDNA آبشش (محور y میزان Ct و محور x لگاریتم غلظت در واکنش)

همانطور که در نمودار۲ نشان داده شده است نتایج میزان بیان¬ ژن NKA در تیمارهای مختلف گزارش شده است. میزان بیان ¬ژن NKA در تیمار ppt50 نسبت ¬به سایر تیمارها بیشتر است و اختلاف معنی¬داری با سایر تیمارها نشان داد (P). <۰/۰۵ بیان¬ ژن NKA در تیمار شاهد نسبت ¬به تیمار ppt15 و ppt35 بیشتر است و تفاوت معنی ¬داری بین تیمار ppt15 و ppt35 دیده نشد.



نمودار۲. مقایسه میانگین بیان ژن NKA در بافت آبشش ماهیان سی‌باس آسیایی در مواجهه با شوری های مختلف محیطی. حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.۷

ماهیان استخوانی دارای یک تنظیم U" شکل" از فعالیت NKA در گونه های یوری هالین دریایی یا گونه های یوری هالین آب شیرین هستند که تحت شرایط طبیعی با تغییرات شدید در شوری محدود زندگی می کنند. وابستگی شوری U شکل NKA آبشش در اکثر ماهیان استخوانی مطالعه شده متفاوت است که به نظر می¬رسد فعالیت NKA با شوری خارجی ارتباط مثبتی دارد. با این حال فعالیت NKA black porgy ارتباط منفی با شوری خارجی دارد. نتایج مشابه در خامه ماهی مشاهده شد که فعالیت NKA آبششی در آب شیرین نسبت به آب شور بالاتر بود (Lin et al., 2003). وابستگی شوری U شکل NKA ممکن است انرژی مثبت داشته باشد، به دلیل اینکه آنها مطمئن هستند که ماهی ممکن است فعالیت NKA نسبتا کمی را برای بیشتر زمان حفظ کند. در همان زمان پتانسیل بیشتری برای افزایش NKA دارند و بنابراین قادر به سازگاری به محیط های با هیپرسالین یا هیپوسالین هستند.(Jensen et al., 1998)

در محیط¬های هیپراسموتیک فعالیت NKA باعث خروج سدیم و کلر می¬شود، که برای کمک به تنظیم الکترولیت پلاسما در این محیط ضروری است (Evans et al., 2005).در محیط¬ های هیپواسموتیک، که جذب الکترولیت لازم می¬باشد، نیروی رانده شده برای جذب سدیم در غشای قاعده¬ای جانبی در MRC آبششی توسط سدیم پتاسیم ATP آز فراهم می¬شود، اگرچه فعالیت آن به ¬طور فعال به سطوح پایه¬ای پایین تنظیم می¬شود ولی کماکان نقش مهمی در جذب سدیم دارد (Marshall, 2002).

منابع

Colombe, L., Fostier, A., Bury, N., Pakdel, F., Guiguen, Y., 2000. A Mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: cloning and characterization of its steroid binding domain. Steroids 65, 319-328.

Cutler, C,P., Cramb, G., 2002. Two isoforms of the Na+/K+/2Cl- cotransporter are expressed in the European eel (Anguilla anguilla). Biochim. Biophys. Acta 1566, 92-103.

Cutler, C.P., Cramb, G., 2008. Differential expression of absorptive cationchloride cotransporters in the intestinal and renal tissues of the European eel (Anguilla anguilla). Comp. Biochem. Physiol. B 149, 63-73.

Dang, Z., Balm, P.H.M., Flik, G., Wendelaar Bonga, S. E., 2000. Cortisol
increases Na+/K+ -ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia Oreochromis mossambicus. J. Exp. Biol. 203, 2349-2355.

Evans, D.H., Piermarini, P. M., Potts, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. J. Exp. Zool. 283, 641-652.

Geering, K., 1990. Subunit assembly and functional maturation of Na+/K+ -ATPase. J. Membr. Biol. 115, 109-121.

Greenwood, A.K., Butler, P.C., White, R.B., DeMarco, U., Pearce, D., Fernald, R.D., 2003. Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. Endocrinology 144, 4226-4236.

Hafezamini, P. and Orian, Sh. 2002. Survey of effects of choloride sodium stress on blood hematocrit and hemoglobin in common carp (Cyprinus carpio). Iranian Scientific Fisheries Journal, 3: 13-22.

Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. Comp Biochem. Physiol. B 136, 593-620.

Hiroi, J., Yasumasu, S., McCormick, S.D., Hwang, P.P., Kaneko, T., 2008. Evidence for an apical Na-Clcotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. J. Exp. Biol.211,2584-2599.

Hwang, P.P., Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrionrich cells. Comp. Biochem. Physiol. A 148, 479-497.

Larson, H., 1999. Order Perciformes. Suborder Percoidei. Centropomidae. Sea perches. p. 2429-2432.

Lee, T.H., Hwang, P.P., Shieh, Y.E., Lin, C.H., 2000. The relationship between deep-hole ′ mitochondria-rich cells and salinity adaptation in the euryhaline teleost, Oreochromis mossambicus. Fish. Physiol. Biochem. 23, 133-140.

Likongwe, J.S., Stecko, T.D., Stauffer Jr., J.R., Carline, R.F. 1996. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Aquaculture, 146: 37- 46.

Marshall, W.S., 2002. Na+, Cl-, Ca2+ and Zn2+ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. J. Exp. Zool. 293, 264-283.
Marshall, W. S., Cozzi, R.R., Pelis, R.M., McCormick, S.D., 2005. Cortisol receptor blockade and seawater adaptation in the euryhaline teleost Fundulus heteroclitus. J. Exp. Zool. 303, 132-142.
Mathew, G., 2009. Taxonomy, identification and biology of Seabass (Lates calcarifer). National Training on 'Cage Culture of Seabass' held at CMFRI, Kochi,14 - 23 December.
McCormick, S. D., 1995. Hormonal control of gill Na+, K+ -ATPase and chloride cell function. In: Wood, C.M., Shuttle-Worth, T.J. (Eds), Cellular and Molecular Approaches to fish Ionic Regulation. Academic press, New York, pp. 285-315.
McCormick, S.D., 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. Am. Zoool. 41. 781-794.
Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fisher 9, 211- 268.
Perry. S.F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater to freshwater fishes. Annu. Rev. Physiol. 59, 325-334.
Sakamoto ،T., McCormick ،S.D., 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. Gen. comp. Endocrinol. 147, 24-30.
Sarvi, k., Niksirat, H., Mojazi Amiri, B., Mirtorabi, S. M., Rafiee, G. R. and Bakhtiyari, M., 2006. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (Salmo trutta caspius). Aquaculture 256: 564–569.
Seidelin, M., Madsen, S.S., 1999. Endocrine control of Na+/K+ -ATPase and chloride cell development in brown trout (Salmo trutta): interaction of insulin-like growth factor-I with prolactin and growth hormone. J. Endocrinol. 162, 127-135.
Singh, R.K., 2000. Growth, survival and production of Lates calcarifer in a seasonal rain-fed coastal pond of the Konkan region. Aquaculture 8: 55-60.
Thirunavukkarasu, A.R., Abraham M., Kailasam, M., 2004. Handbook of seed production and culture of Asian seabass, Lates calcarifer (Bloch), CIBA, Bulletin 18: 1–58.
Tian, X., Qin, J.G., 2003. A single phase of food deprivation provoked compensatory growth in barramundi, Lates calcarifer. Aquaculture 224: 169–179.
Wendelaar Bonga, S.F., 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77, 591-625.
Wood, C,M., Marshall, W.S., 1994. Ion balance, acid-base regulation, and chloride cell function in the commen Killifish, Fundulus heteroclitus- a euryhaline estuarine teleosts. Estuaries 17, 34-52.