فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی۵۵، جلد۱۴، شماره۴، پاییز ۱۴۰۰، صفحه ۱۰۱ تا ۱۱۳
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

مقایسه میزان بیان ژن رشد(IGF-I) در سایزهای مختلف ماهیان بومی و غیر بومی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*)

DOR:

مریم حقی[۱]، **محمدرضا قمی**[۲]، محمود محسنی[۳]، مسعود قانع[۴]
۱-دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ایران.
۲-دانشیار گروه شیلات، دانشگاه آزاداسلامی واحد تنکابن، ایران.
۳-مؤسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
٤-دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاداسلامی واحد تنکابن، ایران.

تاریخ دریافت:۹۹/۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۱٤

چکیده

زمینه و هدف: رشد ماهی ها از طریق بسیاری از عوامل محیطی و فیزیولوژیکی تنظیم می شود و با پیشینه ژنتیکی هر موجود شکل می گیرد. فاکتور رشد شبه انسولین-یک IGF-I، نقش مهمی در فرآیندهای مختلف زیستی ماهیان بر عهده دارد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی میزان بیان ژن رشد IGF-I mRNA در مراحل مختلف رشد ماهیان قزل آلای رنگین کمان بومی و غیر بومی(وارداتی) کشور است.

روش کار: به همین منظور ماهیان قزل آلای بومی و غیر بومی در سه سایز کوچک، متوسط و بزرگ با میانگین کل(cm 78/6±25/32- g 34/244±66/453) از مرکز پرورش ماهی در استان گیلان(رشت) تهیه شد. ابتدا در شرایط استریل و بعد از بیهوشی ماهیان حدود ۲۰ میلی گرم از بافت کبد، از هر دو نژاد بومی و غیر بومی نمونه تهیه شد. استخراج RNA و سنتز cDNA براساس روش استاندارد RT-PCR در آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک دانشگاه آزاد تنکابن انجام شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که میزان بیان ژن IGF-I در بین نژاد بومی و غیر بومی تفاوت معنی داری دارد به طوری که بیشترین و کمترین میزان ژن به ترتیب در سایز کوچک نژاد غیر بومی و سایز متوسط نژاد بومی بود($P<0.05$). اما در بررسی رابطه وزن و طول با مقدار بیان ژن رابطه معنی داری دیده نشد($P>0.05$). این در حالی است که با افزایش اندازه ماهی میزان بیان IGF-I روند کاهشی نشان داد.

نتیجه گیری: این یافته ها نشان می دهد که ژنIGF-I در مراحل رشد و تکامل ماهیان قزل آلای رنگین کمان می تواند نقش اساسی داشته باشد.

واژه های کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، ژن رشد(IGF-I)، سایز بدن، تنوع ژنتیکی.

مقدمه

پروتئین حیوانی از بین منابع مختلف پروتئینی به دلیل دارا بودن اسیدهای آمینه ضروری برتری دارد. از بین منابع پروتئین حیوانی، توصیه زیادی به مصرف منابع پروتئین آبزی می شود.ماهی قزل آلای رنگین کمان از ماهیان بومی ساحل اقیانوس آرام و آمریکای شمالی بوده اما به دلیل شرایط بوم شناختی، مقاومت در برابر بیماری ها، سازگاری با شرایط زیست محیطی و رشد سریع یکی از مهم ترین گونه های مهم پرورشی در آبزی پروری دنیا و کشور ایران محسوب می شود. در یک دهه ی اخیر چند جمعیت از قزل آلای رنگین کمان با سرعت رشد و بازماندگی بهتر در مقایسه با جمعیت-های بومی به صنعت آبزی پروری کشور وارد شدند(۲). ماهی قزل آلای رنگین کمان نسبت به سایر آزاد ماهیان به دلیل داشتن ویژگی های خاص بیولوژیکی و اقتصادی

ارزش زیادی دارد. این ماهی سازگاری بالایی با محیط اطراف خود دارد. ماهی قزل آلا از غذایی که در اختیارش قرار می گیرد، به خوبی استفاده می کند و در انتخاب غذا زیاد سخت گیر نیست. شرایط پرورش متراکم را می پذیرد و از سرعت رشد بسیار خوبی برخوردار است. گوشت آن لذیذ و خوش طعم و با ذائقه مردم مناطق مختلف سازگار است(۶). قزل آلا ی رنگین کمان می تواند حرارت بالاتر و اکسیژن کمتر را نسبت به سایر آزاد ماهیان تحمل نماید و در شرایط یکسان، رشد سریع تری نسبت به قزل آلای قهوه ای دارد. تاریخچه تولید قزل آلای رنگین کمان در ایران، به سال ۱۹۶۶ میلادی بر می گردد، براساس آمارهای منتشر شده میزان تولید سالانه ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی در کشور بیش از یکصد هزار تن می باشد(IFSA). عقیده بر این است که منشاء و خاستگاه اکثر نژادهای ماهی قزل آلای رنگین کمان از یک هچری در کالیفرنیا در سال ۱۸۷۹ بوده است. در سال های اخیر به دلیل عدم وجود مراکز اصلاح نژاد و نگرانی از کاهش سرعت رشد، بسیاری از پرورش دهندگان اقدام به خرید و واردات تخم های چشم زده از کشورهایی مثل دانمارک، انگلیس، ایتالیا، اسکاتلند و استرالیا و فرانسه نموده(۵) و به صورت غیر اصولی با یک دیگر اختلاط پیدا کرده و پرورش یافته اند که خود سبب ایجاد آسیب-های جدی به ذخیره ژنی قزل آلاهای پرورشی در ایران و هم خونی ماهیان شده است و نیز به علت تلاقی بیش از حد خانوادگی نژادهای مولدین موجود، باعث کاهش رشد، تلفات زیاد و نیز ناهنجاری های شده است(۲۶). در سال های گذشته، پرورش نژادهای وارداتی قزل آلای رنگین کمان از جمله گونه های فرانسوی، نروژی و آمریکایی به طور معمول با وارد کردن مرحله تخم چشم زده برای دستیابی به نرخ رشد بهتر از نژاد بومی انجام می‌دادند، که پرورش دهندگان را برای تولید بهتر و سود بیشتر ترغیب می نمود. مطالعه و شناسایی ژن های درگیر در رشد آبزیان نقش مهمی در آبزی پروری و پیشرفت علم ژنتیک به خصوص در طی دوران تکامل لاروی ماهیان بر عهده دارد. یکی از شاخص های بسیار مهم در جهت تکامل و رشد متعادل در موجودات، هورمون رشد است که این هورمون در رشد سلول های بدن، متابولیسم پایه و انجام فرآیند تنظیم اسمزی در این موجودات نقش مؤثری را بر عهده دارد(۲۷). طی گزارش(۱۷) میزان فاکتورهای رشد در لاروهای فرانسوی از لاروهای ایرانی(بومی) و دانمارکی بهتر بوده است، که برای بار دیگر تاکید بر اهمیت مطالعه بیان mRNA ژن IGF-I مربوط به میزان رشد هر نژاد به طور جداگانه و با هم دارد. با توجه به اهمیت ژن IGF در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی ماهیان، مطالعه و بررسی آن برای درک بهتر وضعیت فیزیولوژیکی و تولیدمثلی ماهی می تواند سودمند باشد. IGF ها میتوژن های بالقوه ای برای بسیاری از انواع مختلف سلول هستند و نقش مهمی در رشد و نمو بازی می کنند(۳۰). امروزه یکی از اهداف مهم در مدیریت کارگاه های تکثیر ماهیان باید به کارگیری اصول اساسی ژنتیک و اصلاح نژاد در کارگاه باشد زیرا تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است(۱۵). رشد ماهی توسط یک مجموعه پیچیده از عوامل بیرونی و درونی و برهم کنش آن‌ها کنترل می شود. یکی از اصلی ترین تنظیم کننده-های درونی رشد محور سوماتوتروفیک است که از هورمون رشد(GH)، فاکتورهای تنظیم کننده GH(فاکتور آزاد کننده GH و سوماتوستاتین) تشکیل شده است و محصولات GH با اتصال به گیرنده های GH از جمله انسولین از کبد آزاد می شوند(۲۴). در واقع، بسیاری از این ژن ها(GH،GHR2، GHR1، IGF2 و IGF1) در انواع مختلف بافت ها(عضله، مغز و کبد) بیان می شوند. درواقع سوماتومدین ها همان IGF هستند

که به وسیله کلیه، آبشش و کبد تولید می‌شوند و در سازگاری آزاد ماهیان با آب شور، تحریک تولید و ترشح هورمون های جنسی ماده، آغاز فرآیند استروئیدزایی، تحریک مرحله زرده سازی و رسیدگی تخمک وحتی در تولید خاویار ماهیان خاویاری نقش دارند و عامل اصلی تنظیم و اقزایش رشد بدن می باشند. با توجه به اهمیت ژن IGF در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی ماهیان، مطالعه و بررسی آن برای درک بهتر وضعیت فیزیولوژیکی و تولیدمثلی ماهی می تواند بسیار سودمند باشد. پیشرفت در علم ژنومیک، تکنولوژی مولکولی وبیوتکنولوژی امکان بررسی نحوه- ی بیان این ژن در ماهی را فراهم نموده است. متاسفانه اکثر تحقیقات بیان ژن بر روی گونه های تجاری مانند گربه ماهی، سالمون، سفره ماهی و ماهی کاد به همراه هزاران ESTکه برای برخی گونه ها موجود است، متمرکز بوده است(۱۵،۳۱). محل اصلی تولید این عامل کبد بوده که سنتز و رها سازی آن در گردش پلاسمایی IGF-I تحت تأثیر هورمون رشد می باشد، به عبارتی منشا کبدی داشته و تحت تأثیر هورمون رشد ساخته می شود. IGF-I به جز منشای کبدی ماهیان بر حسب نوع بافت و برای گیرنده های ویژه در بافت نیز به طور موضعی تحت اثر مکانیسم اتوکرین- پاراکرین، ساخته و رها سازی می گردد(۱۴، ۲۲، ۲۶).فاکتور رشد شبه انسولین یک(IGF-I)، پلی پپتید تک زنجیره ای با شباهت ساختاری قابل توجه به پیش انسولین(proinsulin) می باشد. نقش انواع مختلف IGF خصوصاً IGF-I در فرآیندهای گوناگون فیزیولوژیکی از جمله تنظیم کننده رشد و نمو، تحریک کننده تقسیم و تمایز سلولی در بافت های مختلف، تنظیم فشار اسمزی است(۱۲). این فاکتور به عنوان عامل اصلی جهت توسعه و تکامل فولیکول های تخمدان، آغاز و توسعه فرآیند استروئیدزایی، تحریک کننده مرحله زرده‌گیری داخلی و آغاز زرده سازی خارجی و حتی رسیدگی نهایی تخمک مطرح می باشد(۳۳). نتایج مطالعه محققین نشان داد که IGF-I می تواند به طور مستقیم در تنظیم کلی رشد دخیل باشد و می تواند به صورت بالقوه به عنوان یک نشان گر رشد در هر گونه مورد بررسی قرار گیرد(۴). باتوجه به اهمیت ژن IGF در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی ماهیان، مطالعه و بررسی آن برای درک بهتر وضعیت فیزیولوژیکی و تولیدمثلی ماهی می تواند بسیار سودمند باشد. پیشرفت در علم ژنومیک، تکنولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی امکان بررسی نحوه ی بیان این ژن در ماهی را فراهم نموده است. در سال های اخیر به دلیل کمبود و یا عدم وجود مراکز اصلاح نژاد و نگرانی از کاهش سرعت رشد ماهیان سردابی و گرمابی، و با توجه به ارزش اقتصادی بالای برخی از این گونه ها در صنعت آبزی پروری ایران و جمعیت های مختلف پرورشی و افزایش بهره اقتصادی در حوزه دریای خزر در خلال سال های اخیر و به منظور بازسازی ذخایر سالانه میلیون ها قطعه بچه ماهی به طور مصنوعی تکثیر می شوند(۲۳). تنها راه باقی مانده توسعه کیفی از طریق اصلاح مدیریت تکثیر و پرورش آبزیان و بالابردن توان تولید در واحد سطح از طریق به کارگیری علم ژنتیک و اصلاح نژاد و سایر علوم وابسته به عنوان یک عامل مهم در افزایش بهره وری تولید می باشد. امروزه صنعت آبزی پروری به استفاده از گونه های سریع الرشد با درصد بازماندگی و کیفیت بالا نیاز داشته و به همین دلیل جمعیت های سریع الرشد اهمیت اقتصادی و تجاری زیادی را به خود اختصاص دادند، بنابراین شناسایی جمعیت های سریع الرشد پیش از آغاز یک دورهی مولدگیری و پرورش آبزیان بسیار اقتصادی و مهم می- باشد. در یک دهه ی اخیر چند جمعیت از قزل آلای رنگین کمان با سرعت رشد و بازماندگی بهتر در مقایسه با جمعیت های بومی به صنعت آبزی پروری کشور وارد

شدند که امکان شناسایی مورفولوژیک این جمعیت ها حتی با استفاده از اختلاف جزئی در رنگ بندی آن ها تقریباً غیرممکن به نظر می رسد. زیرا، بسیاری از این اختلافات ظاهری کاملاً وابسته به نوع تغذیه و شرایط اقلیمی پرورش می باشند. از سویی، با توجه به مسأله تقلب یا اشتباه احتمالی(به صورت عمدی یا تصادفی) در جای گذاری و فروش یک گونه یا جمعیت ماهی با سرعت رشد بالا با گونه یا جمعیتی با سرعت رشد پایین، اهمیت شناسایی جمعیت های این ماهیان به منظور معرفی جمعیتی با شرایط رشدی بهتر به شدت احساس می گردد(۹). بیان ژن یکی از مهم ترین مسایل بنیادی است که کمک می کند تا ژنوتیپ به صورت فنوتیپ ظاهر شود در واقع کدهای ژنتیکی که در رشته های DNA ذخیره شده اند، به وسیله بیان ژن تفسیر می شوند و خصوصیات و نحوه بیان ژن باعث ایجاد فنوتیپ در ارگانیسم خواهد شد. بیان ژن در ماهیان، در موارد گوناگونی نظیر تولیدمثل، انتخاب مولدین، سازش های محیطی و غیره حایز اهمیت است. تاکنون مطالعات زیادی در زمینه توالی یابی و بررسی بیان ژن در گونه‌های مختلف نظیر قزل‌آلای رنگین کمان(۲۹)، فیل ماهی(۳)، استرالیا(۳۳)، تاس ماهی روس(۱۲)، تاس ماهی سیبری(۳)، کپور معمولی(۲۰)، کپور علفخوار(۳)، ماهی طلایی(۳) منتشر شده است. اما با توجه به ارزش اقتصادی بالای این گونه در صنعت آبزی پروری ایران و جمعیت-های مختلف پرورشی و مطالعات کم در مورد بیان ژن رشد آزاد ماهیان پرورشی هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن رشد در این گونه ی مهم پرورشی کشور، اختلافات میزان بیان ژن رشد در کبد ماهیان، مورد بررسی و تحلیل قرار می گیرد، تا اختلافات میزان آن را در بین سه سایز مختلف از یک گونه و دو نژاد ماهی قزل آلای رنگین کمان را بتوان مقایسه کرد.

مواد وروش ها

با توجه به اهداف تحقیق تعداد ۶ قطعه ماهی از دو نژاد قزل آلای رنگین کمان موجود در ایران و قزل آلای رنگین کمان وارداتی در سه سایز کوچک(بچه ماهی)، متوسط(پیش پرواری) و بزرگ(پرواری) از مرکز پرورش ماهی اللهیاری گیلان(رشت، ایران) با میانگین ۷۰۰-۱۰۰ گرم از یک حوضچه به طور زنده صید شد. ماهیان سپس تحت تأثیر ماده بیهوشی گل میخک(ppm300) بیهوش شده و وزن و طول کل ماهیان به وسیله ترازو دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم و متر با دقت سانتی متر سنجش شدند. بلافاصله تحت شرایط استریل حدود ۲۰ میلی گرم از بافت کبد تمام ماهیان قزل آلای بومی و غیر بومی نمونه برداری شد. نمونه های کبدی تا شروع آزمایش در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. تمام نمونه ها با حفظ شرایط به آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن منتقل شدند.

روش استخراج RNA، ساخت cDNA و سنتز پرایمر

تمامی نمونه های کبد ماهیان در بافر استخراج Tri Reagent قرار داده شدند و با استفاده از دستگاه هموژنایزر کیاژن به طورکامل هضم شدند. روش استخراج RNA با استفاده از پروتوکل کیت شرکت سازنده(Thermo Fisher Scientific, America) انجام گرفت. RNA استخراجی در داخل محلول RNase free water و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه به منظور حذف تمام DNA ها به عنوان ناخالصی انکوبه شده و در نهایت به منظور بررسی کیفیت RNA استخراجی و اطمینان از عدم تخریب آن، با استفاده از دستگاه الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد به همراه DNA SAFE STAIN ارزیابی شد. پس از انجام الکتروفورز، عکس برداری از ژل توسط دستگاه Doc Gel صورت گرفت. مشاهده باندها به صورت واضح بر روی دستگاه UV Transilluminator نشان دهنده

کیفیت مناسب RNAهای استخراجی می باشد. هم چنین با استفاده از دستگاه نانودراپ(شرکت thermos Scientific)، کمیت RNA استخراجی تعیین شد. ابتدا RNAها تحت تیمار DNase I (Thermo science) قرار داده شدند و پس از ارزیابی و تیمار DNase I، یک میکروگرم از RNA استخراجی با استفاده از کیت(Thermo Fisher Scientific, America) برای ساخت اولین رشته cDNA به کار برده شد. پرایمرهای مورد نیاز برای تکثیر ژن IGF-I از مقالات علمی مستخرج(۳۵)و با استفاده از برنامه Primer-Blast مورد بررسی و تایید قرار گرفت. در این تحقیق، تکثیر ژن β-2-microglubulin (β 2m)(ژن کنترل داخلی)، به عنوان ژن رفرنس مورد استفاده قرار گرفت(۳۵). از آن جا که سطح بیان ژن کنترل داخلی می بایست در بافت های مختلف و نیز تمامی مراحل رشد یک موجود زنده ثابت باشد(۱)، ژن β 2m به دلیل حضور در بدن تمامی موجودات یوکاریوت و تغییر پذیری بسیار ناچیز، عدم عملکرد فوق تخصصی، طراحی آسان و در دسترس بودن پرایمر انتخاب شد. هم چنین این ژن برای تداوم بقای سلول و انجام فرایندهای طبیعی لازم می باشد. در نهایت پرایمرها توسط شرکت متابیون آلمان سنتز شدند.

Real-time PCR

واکنش Real-time PCR با استفاده از دستگاه(Lightcycler (96W Fast Real-Time PCR , system Roche. Germany با استفاده از نشانگر سایبرگرین(Fermentase) و براساس دستورالعمل استاندارد، مطابق جدول ذیل انجام شد(جدول ۲)(جدول ۳). سطوح بیان ژن تحت عنوان Ct توسط دستگاه نشان داده شد، که نشان دهنده تعداد چرخه هایی است که سیگنال فلوئورسنت نسخه های ژنی را شناسایی می‌نماید. راندمان PCR با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد(Radonic, A).

E % = 〖 10 〗^(1/(SLOPE) - 1)×۱۰۰

تغییرات نسبی بیان ژن IGF-I با استفاده از روش ۲^(–ΔΔCt) طبق معادله ۱، ۲ و ۳ محاسبه گشت(۲۱) در بین زمان های مورد مطالعه مرحله ای که کمترین مقدار ژن Ct را دارد به عنوان کالیبراتور به منظور ارزیابی نسبی بیان ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت(De Santis, C,.).

معادله ۱ ΔΔCt = ΔCt (ژن هدف) _ ΔCt (کالیبراتور)

معادله ۲ ΔCt (ژن هدف) = Ct (ژن هدف) _Ct (ژن کالیبراتور)

معادله ۳ ΔCt (ژن کالیبراتور) = ΔCt (زن هدف هر نمونه) – ΔCt (ژن نمونه کنترل)

جهت تجزیه و تحلیل داده ها و نرمال سازی سطح بیان بین نمونه ها از آزمون آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه و برای تحلیل چند مقایسه ای میانگین از آزمون توکی با کمک نرم افزار SPSS در سطح اطمینان ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

میانگین وزن و طول کل ماهیان قزل آلای بومی و غیر بومی در(جدول ۴) نشان داده شد. در کل ماهیان سایز کوچک، متوسط، بزرگ به ترتیب دارای وزن ۸۹/۱۶، ۵۱۴، ۶۹۰ گرم بوده و طول کل به ترتیب ۱۸/۵۸، ۳۳/۷۵، ۳۸/۱۴ سانتی متر داشتند. نتایج میانگین بیان ژن ها(Ct) حاصل از Real-time PCR در تمام کبد ماهیان قزل آلای بومی و غیر بومی در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن IGF-I ماهیان قزل آلای رنگین کمان بومی و غیر بومی در سایزهای مختلف(کوچک، متوسط، بزرگ) تفاوت معنی داری وجود دارد($P<0.05$). با توجه به نتایج میزانCt نمونه ها بیشترین میانگین میزان بیان ژن IGF-I مربوط به سایز کوچک ماهیان قزل آلای رنگین کمان

غیر بومی(وارداتی) ۳۱/۶۰ بوده و کمترین میزان بیان ژن مربوط به سایز متوسط ماهی قزل آلای رنگین کمان بومی ۲۱/۶۸ بود. برای پی بردن به کیفیت Total RNA استخراج شده از نمونه ها، مقداری از هر نمونه بااستفاده از ژل ۱/۵٪ آگارز الکتروفورز شد. شدت وضوح و پهنای باندهای حاصل، معیار مناسبی جهت پی بردن به کیفیت RNA استخراج شده می باشد. به این معنی که آلودگی به پروتئین و DNA نداشته و RNA هایی با این کیفیت برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند(شکل ۱).

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر ژن های IGF-I و 2m در ماهی قزل آلای بومی و غیر بومی پرورشی

نام پرایمر	ژن	توالی پرایمر ۵'→ ۳'	طول محصول PCR(bp)
IGF-I- F	IGF-I	GGC ATT CCG TCT TC ATC AG	466(۳۵)
IGF-I- R		CGG TAG TTC CTG TTG CCT GT	
β 2m- QPCR- F	2m	AGC TGG GCA AGC CCA ACA CC	127(۳۵)
β 2m- QPCR- R		TGG TGG AAG GCC AGG TCG CT	

جدول ۲- مواد مورد نیاز جهت Real-time PCR ژن های IGF-I و 2m

مواد مصرفی	حجم	غلظت
مستر میکس سابرگرین	۱۰ µl	1X
آغازگر روبه جلو	۱ µl	IGF-1→5pmol/ µl 2m→10pmol/ µl
آغازگر روبه عقب	۱ µl	IGF-1→5pmol/ µl 2m→10pmol/ µl
cDNA	۱ µl	2µg
آب مقطر دیونیزه	۴ µl	-
جمع کل	۱۷ µl	-

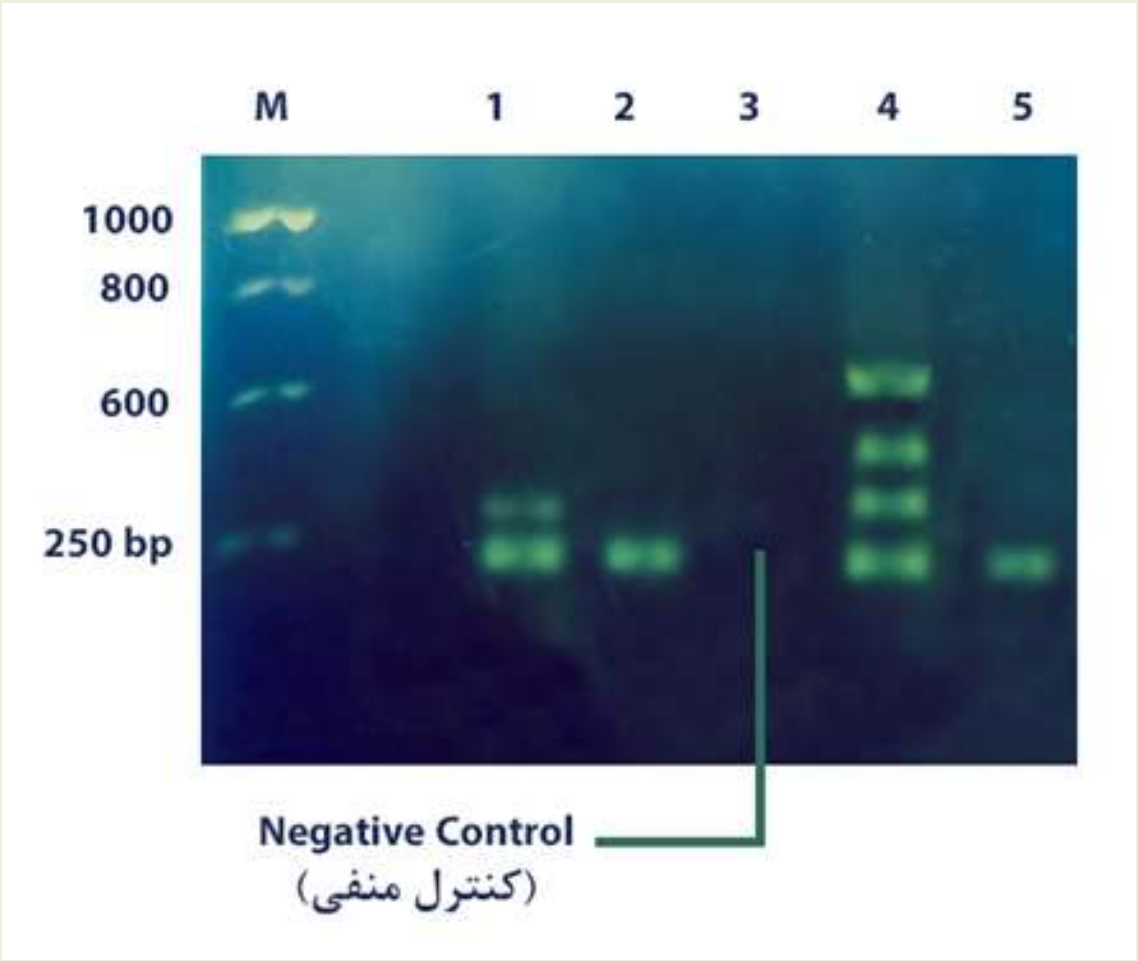
جدول ۳- برنامه زمانی و دمایی Real-time PCR برای تکثیر ژن های IGF-I و 2m

مراحل	(ژن 2m)		(ژن IGF-I)		تعداد سیکل
	زمان	دما	زمان	دما	
واسرشت سازی اولیه	۵ دقیقه	۹۴	۵ دقیقه	۹۴	۱
واسرشت سازی ثانویه	۳۰ ثانیه	۹۴	۳۰ ثانیه	۹۴	
اتصال آغازگر ها به رشته الگو	۳۰ ثانیه	۵۸	۳۰ ثانیه	۵۸	
بسط پلیمراز	۳۰ ثانیه	۷۲	۳۰ ثانیه	۷۲	۳۵
بسط نهایی	۵ دقیقه	۷۲	۵ دقیقه	۷۲	۱

جدول ٤- میانگین وزن(گرم) و طول کل(سانتی متر) ماهیان قزل آلای پرورشی

سایز بدن	نژاد	وزن	طول کل
بومی	کوچک	۹۳/۳۳ ± ۵/۷۷^{c}	۱۹/۱۶ ± ۰/۷۶^{c}
	متوسط	۵۳۰/۰۰ ± ۱۰/۰۰^{b}	۳۴/۱۶ ± ۱/۲۵^{b}
	بزرگ	۷۳۰/۰۰ ± ۱۰/۰۰^{a}	۳۹/۳۳ ± ۰/۵۷^{a}
غیربومی	کوچک	۸۵/۰۰ ± ۵/۰۰^{c}	۱۸/۰۰ ± ۱/۰۰^{c}
	متوسط	۴۹۸/۳۳ ± ۱۰/۴۰^{b}	۳۳/۳۳ ± ۰/۵۷^{b}
	بزرگ	۶۵۰/۰۰ ± ۱۰/۰۰^{a}	۳۷/۵۰ ± ۰/۵۰^{a}

*حروف غیر همنام در هر ستون برای هر نژاد (بومی و غیر بومی) نشانه وجود اختلاف معنی‌دار (توسط آزمون توکی) می‌باشد.

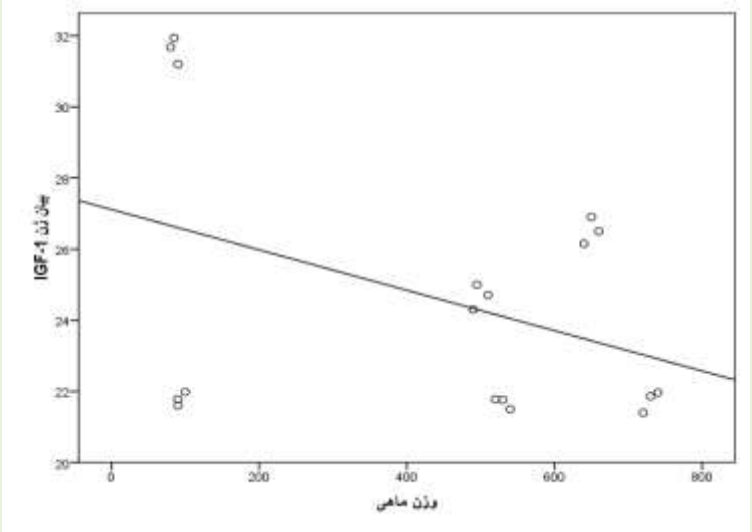


شکل ۱- باندهای RNA های استخراج شده بر روی ژل آگارز1.5 ٪(M=مارکر مولکولی100 bp)

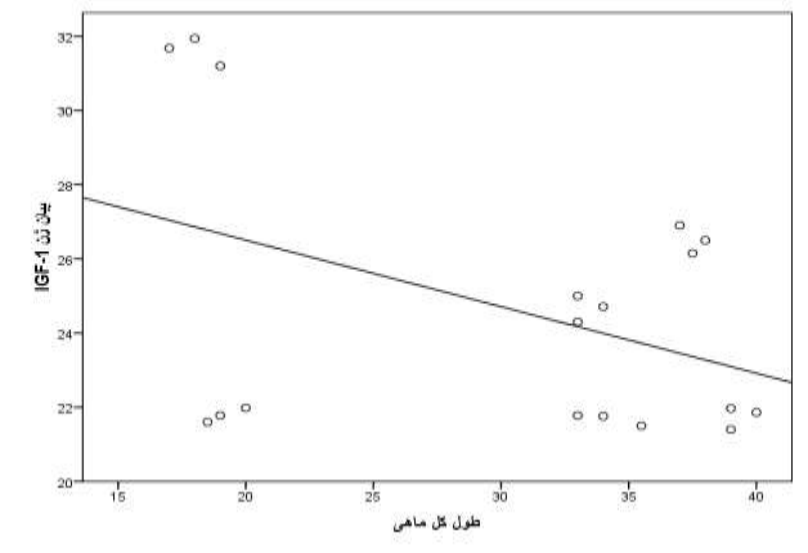
(M) نشان دهنده ی ۱۰۰ جفت باز است و نمونه های ۱ و ۲، ۴ و ۵ بیانگر کیفیت RNA استخراج شده است. شماره ۳ کنترل منفی است.

نتایج بررسی تعیین رابطه بین وزن و طول کل ماهیان قزل آلای رنگین کمان بومی و وارداتی با سطح بیان نسبی ژن IGF-Iنشان داد که وزن بدن با سطح بیان نسبی IGF تفاوت معنی داری ندارد($P>0.05$). ولی رابطه غیر مستقیمی(منفی) بین میزان بیان نسبی ژن IGF-I و وزن بدن مشهود است(P=۰/۱۰، r=-۰/۴۰). به طوری که با افزایش یا کاهش وزن میزان بیان نسبی ژن IGF-I کاهش و افزایش می یابد. نمودار خطی رگرسیون وزن

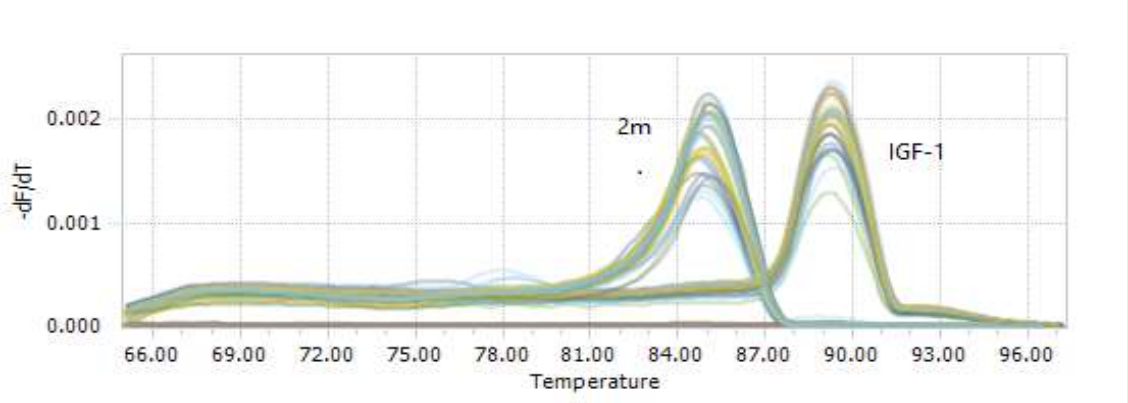
و ژن IGF-I در(نمودار ۱) نشان داده شده است. هم چنین در بررسی رابطه بین طول کل با سطح بیان نسبی IGF تفاوت معنی¬داری بین آن ها وجود ندارد($P>0.05$). ولی رابطه غیر مستقیمی(منفی) بین میزان بیان نسبی ژن IGF-I و طول کل بدن دیده شد($P>۰/۰۷$، $r=-۰/۴۲$). بدین گونه که کاهش سطح بیان ژن mRNA IGF-I در ماهی سایز متوسط(پیش پرواری) و بزرگ (پرواری) نسبت به سایز کوچک (بچه ماهی) را نشان داد، که می توان نتیجه گیری نمود با افزایش اندازه ماهی(وزن و طول کل) بیان IGF-I کاهش می یابد. نمودار خطی رگرسیون طول کل و بیان ژن IGF-I در(نمودار ۲) نشان داده شده است. جهت اطمینان از تکثیر قطعه اختصاصی و بررسی وجود قطعات غیر اختصاصی در محصول PCR، نمودار منحنی ذوب برای ژن-های m۲ و IGF-1 رسم گردید. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود تصویر منحنی ذوب این دو ژن را در سیستم Real-time PCR نشان می دهد که وجود تنها یک قله برای هر یک از ژن های IGF-1 و m۲ بیان گر تکثیر اختصاصی قطعه موردنظر و عدم حضور محصولات غیراختصاصی است.



نمودار ۱- نمودار رگرسیون وزن ماهی و میزان بیان ژن IGF-I در بافت کبد قزل آلای بومی و وارداتی



نمودار ۲- نمودار رگرسیون طول کل ماهی و میزان بیان ژن IGF-I در بافت کبد قزل آلای بومی و وارداتی



شکل ۲- منحنی ذوب ژن‌های *IGF-1* و *2m*

بحث و نتیجه گیری

ژن IGF-I نقش مهمی را در رشد و تکامل عضلات سوماتیک مهره داران(۳۴)از جمله ماهیان(۱۰) بازی می کند. باتوجه به اهمیت ژن IGF در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی ماهیان، مطالعه و بررسی آن برای درک بهتر وضعیت فیزیولوژیکی و تولیدمثلی ماهی می تواند سودمند باشد. در تحقیق حاضر سطوح مختلف بیان ژن IGF-I در کبد سه گروه اندازه ای مختلف در دو گروه از ماهیان قزل آلای پرورشی بومی و غیر بومی اندازه گیری شد. در هر سه سایز دو گروه از ماهیان، سطوح مختلف بیان ژن IGF-I مشاهده شد و ارتباط معنی داری نشان نداد که این نتایج مطابق با کارهای قبلی در سایر گونه های ماهی بود(۳۲،۱۳)، و این موضوع نشان می‌دهد که IGF-I می تواند به طور مستقیم در تنظیم کلی رشد دخیل باشد و می تواند به صورت بالقوه به عنوان یک نشان گر رشد در هر گونه مورد بررسی قرار گیرد. علاوه بر این ثابت شده است که سطح IGF-I با رشد در انواع مختلفی از ماهیان ارتباط مثبت داشته است(۸). در تحقیق حاضر سطوح مختلف بیان ژن IGF-I در کبد گروهی از ماهیان قزل آلای رنگین کمان پرورشی بومی و غیر بومی اندازه گیری شد که طی مطالعه محققین بیشترین میزان بیان IGF-I در کبد یافت شده است که بیان گر نقش محوری کبد در تولید و رهاسازی IGF-I می باشد. به نظر می رسد در ماهیان غضروفی و سایر ماهیان استخوانی کبد به عنوان محل اصلی بیان ژن IGF-I باشد. در گونه-هایی از ماهیان مانند ماهی قزل آلا(۲۶)، GH در برانگیختن بیان ژن IGF-I در سطح کبدی مؤثر است. در تحقیق حاضر، میزان بیان ژن IGF-I قزل آلای رنگین کمان بومی و غیر بومی در سایزهای مختلف تفاوت معناداری نشان داد، میزان بیان ژن IGF-I در ماهیان سایز کوچک قزل آلای غیربومی بیشتر از ماهیان سایز کوچک قزل آلای بومی است و این اختلاف معنی دار بود($P<0.05$)، که مشابه با برخی مطالعات قبلی بوده است. برای مثال می توان به گزارشاتی مثل(۱۷) اشاره نمود که مقدار نرخ رشد ویژه و سایر پارامترهای رشد در لاروهای فرانسوی از لاروهای ایرانی(بومی) و دانمارکی را که بهتر دانستند. در بررسی رابطه بین میزان بیان ژن IGF-I با طول کل و وزن بدن مشخص شد که یک رابطه منفی بین آن هاست، بدین معنی که با افزایش طول و وزن بدن میزان بیان ژن IGF-I کاهش می یابد. مطالعه حاضر، کاهش سطح بیان ژن IGF-I mRNA در ماهی سایز بزرگ نسبت به سایز کوچک را نشان داد، که می-

توان نتیجه گیری نمود با افزایش اندازه ماهی(وزن و طول کل) بیان mRNA IGF-I کاهش می یابد و هم چنین افزایش بیان ژن IGF-I در نمونه کوچک نسبت به نمونه-های متوسط و بزرگ، نقش کلیدی آن در رشد می باشد. که این نتایج مطابق با کارهای قبلی در سایر گونه های ماهی بوده است(۳۲). همانند تحقیقی دیگر که بیان تنظیم ژن IGFBP1 در کبد قزل آلای رنگین کمان سایز کوچک، نسبت به سایزهای های بزرگتر نشان داده شد(۱۹). باید این نکته را اذعان نمود که در پرورش ماهیان عوامل بسیاری در رشد ماهیان نقش دارند. عموماً سیستم تولید در کشور ایران بصورت سیستم باز و سیستم‌های بازگردشی می باشد با توجه به محدویت منابع آبی و مشکلات تولید دغدغه ی بسیاری از تولیدکنندگان حرکت به سمت سیستم هایی با تولید و فن آوری بالاتر و استفاده از آب برگشتی می باشد. به همین منظور تحقیقی با هدف مقایسه یک سیستم باز گردشی نسبی با کاهش ۶۶ درصدی آب تازه ورودی و جایگزینی آب برگشتی به جای آن(دو بار بازگردش آب) با یک سیستم باز با تراکم پرورشی یکسان در محیط کارگاهی بر برخی از پارامترهای رشد، هورمون کورتیزول(به عنوان شاخص استرس) و بیان ژن های ماهیچه ای مرتبط با رشد(IGF-I) در ماهی قزل آلای رنگین کمان انجام دادند. نتایج آنان نشان داد که ماهیان در سیستم برگشتی آب دارای وزن و طول کمتر و ضریب تبدیل بیشتری نسبت به ماهیان پرورش داده در سیستم باز هستند. هم چنین استفاده از آب برگشتی کاهش اندکی بر برخی از عملکردهای رشد و افزایش میزان استرس ماهی را موجب می شود. تراکم، گرسنگی، تغییرات محیطی و فیزیکی باعث ایجاد استرس شده و در نهایت برعملکردهای رشدی محور هورمون رشد IGF-I اثر مستقیم دارد(۴).

تشکر و قدر دانی

از مدیریت و کارکنان مرکز پرورش خصوصی ماهیان سردابی دکتر الله یاری واقع در شهرستان رشت جهت فراهم نمودن نمونه ها و هم چنین از زحمات مهندس بشیری و دکتر اسمعیل نیا سپاسگزاری می گردد. تمامی مراحل آزمایشگاهی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انجام پذیرفت.

منابع

۱-اکبرزاده، آ.، حق بین، ک.، نعمت اللهی، م.، محجوبی، ف.، فرحمند، ح.، کلنگی میاندره، ح. ۱۳۹۱. انتخاب مناسب ترین ژن های رفرنس جهت مطالعات PCR time-Real در مراحل ابتدایی زیست تاسماهی ایرانی، *Acipense persicus*. مجله بوم شناسی آبزیان، دوره ۲، شماره ۳، ص ۱۳-۱.

۲-ایرجی، س.، مناف فر، ر.، اسماعیلی فریدونی، ا.، زارع، ص. ۱۳۹۴. تفکیک دو سویه ی تجاری ماهی قزل آلای ایرانی و فرانسوی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP. مجله دامپزشکی ایران، دوره یازدهم، شماره ۴، ص ۶-۹.

۳-پیکان حیرتی، ف.، مجازی امیری، ب.، فرحمند، ح. ۱۳۸۸. توالی یابی فاکتور رشد شبه انسولین-یک IGF-I در فیل ماهی Huso huso و بررسی بیان آن در بافت های مختلف. مجله زنتیک نوین، شماره ۳، ص ۱۷-۲۵.

٤-زاهدی، س.، اکبرزاده، آ.، مهرزاد، ج.، نوری؛ ا.، هرسیج، م. ۱۳۹۸. مقایسه پارامترهای رشد، هرمون کورتیزول و بیان ژن های مرتبط با استرس و رشد ماهی قزل آلای رنگان کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در دو سیستم باز و بازگردشی. مجله پژوهش های ماهی شناسی کاربردی، شماره ۳، ص ۱۲۴-۱۰۹.

۵-عبدالله نژاد، ز. ۱۳۹۱. بررسی بیان ژن هورمون رشد طی مراحل تکاملی در تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*). دانشکده منابع طبیعی. دانشگاه گیلان، کلونینگ ژن هورمون رشد(GH) ماهی (*Huso huso*) در سازه های لنتی ویروسی

و غیر ویروسی و بررسی بیان ژن در سلول های بنیادی جنینی انسانی، دوره ۱۳، شماره۱، صفحات ۱۰-۱.

۶-یوسفیان، م.، بینایی، م.، قره ویسی ش.، بحرکاظمی م.،۱۳۹۱. مقایسه فاکتورهای بیوشیمیایی پیش مولد ماهی قزل آلای رنگین کمان، *Oncorhynchus mykiss* قزل آلای رنگین کمان ایرانی و فرانسوی. مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، سال ششم، شماره ۴، صفحات ۱۴-۹.

7.Akbarzadeh, A., Farahmand, H., Mahjoubi, F., Nematollahi, M. A., Leskinen, P., Rytkonen, K. (2011). The transcription of L-gulono-gamma-lactone oxidase, a key enzyme for biosynthesis of ascorbic acid, during development of Persian sturgeon Acipenser persicus. Comparative. Biochemistry and Physiology, 158; 282-288.

8.Beckman, B. R., Larsen, D. A., Moriyama, S., Lee-Pawlak, B., DickhoV, W. W. (1998). Insulin-like growth factor-I and environmental modulation of growth during smoltification of spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawystscha*). Gen. Comp. Endocrinol. 109;325–335.

9.Carrera, E.; Garcia, T.; Cespedes, A.; Gonzalez, I.; Sanz, B.; Hernandez, P.E., Martin, R. (1999). Identification of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR amplification and restriction analysis of the mitochondrial cytochrome b gene. Journal of Food Protection, 61; 482-486.

10. Castillo, J., Codina, M., Martinez, M.L., Navarro, I., Gutierrez, J. (2004). Meatbolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, (286); 935-941.

11. De Santis, C., Smith Keune, C., Jerry, D.R. (2010). Normalizing RT-qPCR Data: Are we getting the right answers? An appraisal of normalization approaches and internal reference genes from a case study in the finfish lates calcarifer. Marine Biotechnology, 13(2); 170-180.

12. Din, S.Y., Hurvitz, A., Goldberg, D., Jackson, K., Levavi- Sivan, B., and Degani, G. (2008). Cloning of Russian sturgeon, (*Acipenser gueldenstaedtii*) growth hormone and insulin like growth factor I and their expression in male and female fish during the first period of growth. Journal of endocrinology investment, (31); 201-210.

13. Duan, C. (1998). Nutritional and developmental regulation of insulin- like growth factors in fish. Journal of Nutrition, 128(2); 306–314.

14. Duan, C. (1997). The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. American Zoologist., 37(6); 491-503.

15. Dunham, R. A. (2004). Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches, department of fisheries and allied aquacultures auburn, university alabama USA, CABI Publishing, P 7-13, 160-192, 207-211.

16. Gjedrem, T. (2000). Genetic improvement of coldwater fish species. Aquaculture Research, (3); 25–33.

17. Gorjipoor, E., Kamaei, K., Bashti, T., Zargham, D., Razmi, K., Gandomkar, H.A. (2009). Comparison of growth and survival rate between import andnative rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Fisheries Science Research Institute, 40;. 88.1252.

18.IFSA. Iran fisheries organization, Deputy of planning and development manager, Office of Budget and Planning, 2015. P 33.

19. Kocmarek, A.L., Ferguson, M., Danzmann, R.G. (2104). Differential gene expression in small and large rainbow trout derived from two seasonal spawning groups. BMC Genomics, (15); P 9.

20. Liang, Y.H., Cheng, C.H., Chan, K.M. (1996). Insulin-like growth factor-I Ea2 is the predominantly expressed form of IGF in common carp, (*Cyprinus carpio*). Molecular Marine Biology and Biotechnology, 5; 145-152

21. Livak, K.J. Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔC T method. Methods, (25);402–408.

22. Mommsen, T.P. (1998). Growth and metabolism. In: The physiology of fishes, Edited by D. H. Evans, 2nd ed., CRC press; 65-97.

23. Nazari, R.M., Modanloo, M., Ghomi, M.R., Ovissipor, M.R. (2010). Application of synthetic hormone LHRH-A2 on the artificial propagation of Persian sturgeon *Acipenser persicus*. Aquaculture International, 18; 837–841.

24. Nordgarden, U., Fjelldal, P.G., Hansen, T., Björnsson, B.T., Wargelius, A. (2006). Growth hormone and insulin-like growth factor-I act together and independently when regulating growth in vertebral and muscle tissue of Atlantic salmon postsmolts. Genearal and Comparative Endocrinology, (149); 253–260.

25. Radonic, A., Thuike, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W. Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gen selection for quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications, (313);856- 862.

26. Reinecke, M., Schmid, A., Ermatinger, R., Loffing-Cueni, D. (1997). Insulin-like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: Gene sequence, tissues expression, and cellular localization. Endocrinology, (138); 3613-3619.

27. Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G. (2002). Rat ghrelin stimulates growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. – Zool. Sci. (19); 797-800.

28. Sajedi, R.H., Aminzadeh, S., Naderi, H., Abdolahi, H. (2003). Genetic variation within and among rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, hatchery populations from Iran assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. Food Science, (68); 870-873.

29. Shamblott, M.J., Chen, T.T. (1992). Identification second insulin-like growth factor in a fish species. Proceeding of Natural Academic Science. USA, (89);8913-8917.

30. Vong, Q. P., Chan, K. M., Cheng, C. H. K. (2003). Quantification of common carp (Cyprinus carpio) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. Journal of Endocrinology, (178): 513–521.

31. Wenne, R., Boudry, P., Hemmer-Hansen, J., Kause.A. (2007). What role for genomics in fisheries management and aquaculture, Aquat. Living Resour, 20(3); 241–255.

32. Wood W. A., Duan, C., Bern, H. A. (2005). Insulin-like growth factor signaling in fish. International review of cytology, 243; 215-285.

33. Wuertz, S., Gessner, J., Kirschbaum, F., Kloas, W. (2007). Expression of IGF-I and IGF-I receptor in male and female sterlet, *Acipenser ruthenus*; Evidence for an important role in gonad maturation. Comparative biochemistry and physiology, (147); 223-230.

34. Yakar, S., Pennisi, P., Kim, C.H., Zhao, H., Toyoshima, Y., Gavrilova, O. (2005). Studies involving the GH-IGF axis: lessons from IGF-I and IGF-I receptor gene targeting mouse models. Journal of Endocrinological Investigation, 28 (5); 19-22.

35. Yarmohammadi, M., Shabani, A., Pourkazemi, M., Soltanloo, H., Imanpour, M,R., Ramezanpour, S. (2012). Effects of starvation and re-feeding on compensatory growth performance, plasma metabolites and IGF-I gene expression of Persian sturgeon (Acipenser persicus, Borodin 1897). Iranian journal of fisheries Sciences, 12(2); 465-483..

Expression and Comparison of Growth Gene (IGF-1) in Native and Non-Native Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in three Different Sizes

M. Haghi[1], **M. R. Ghomi[2]**, M. Mohseni[3], M.Ghane[4]
1. Department of Fisheries, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
2.Department of Fisheries, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
mghomi@tonekabon.iau.ac.ir
3.Caspian Sea International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Rasht, Iran.
4.Department of Microbiology, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran**Received:2020.2.10** **Accepted: 2020.4.11**

Abstract

Inroduction & Objective: Fish growth is regulated by many environmental and physiological factors and is shaped by the genetic background of each organism. Insulin-like growth factor I (IGF-I) plays an important role in various biological processes of fish. This study aimed to examine the rate of expression of IGF-I mRNA growth gene at different stages of growth in local and imported rainbow trout in Iran.

Materials and Methods: Hence, local and imported trout fish in three sizes of small, medium and large, with a total mean weight and size of 453.66±244.34 gr and 32.25±6.78 cm, respectively, were obtained from the fish breeding center in Guilan province (Rasht). First, 20 mg samples of the liver tissue of the fish were obtained under sterile conditions after anesthesia from both local and imported breeds. RNA extraction and cDNA synthesis were performed according to the RT-PCR standard method in the Genetics Research Laboratory of Tonekabon Azad University.

Results: The results showed that the expression of IGF-I gene was significantly different between local and imported breeds so that the highest and lowest gene levels were in the small size of imported breed and medium size of local breed, respectively ($P<0.05$). However, there was no significant relationship between the amount of gene expression and weight and length of fish ($P>0.05$), while IGF-I expression showed a decreasing trend with an increase in the fish size.

Conclusion: These findings suggest that the IGF-I gene may play a key role in the growth and development of rainbow trout.

Keywords: Rainbow trout, Growth Gene (IGF-I), Body Size, Genetic Diversity.