فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال چهارم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۵

بررسی بیان ژن CYP19(a) و عملکرد تولیدمثلی ماهی گورخری (*Danio rerio*) تغذیه شده با جیره غنی شده با عصاره گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus castus*)

طیبه عنایت غلامپور[۱]، ولی‌اله جعفری[۲]*، محمد رضا ایمانپور[۳]، حامد کلنگی میاندره[۴]

تاریخ دریافت: مرداد ۹۵ تاریخ پذیرش: مهر ۹۵

چکیده

آروماتاز P450 (CYP19(a)) یک آنزیم استروئیدوژنیک کلیدی در تبدیل آندروژن به استروژن است که نقش مهمی را در تمایز جنسی و تکامل گناد ایفا می‌کند. از این رو، در مطالعه حاضر به بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه پنج انگشت بر عملکرد تولیدمثلی، نسبت جنسی و بیان یکی از مهمترین ژن‌های مرتبط با جنسیت (CYP19(a))، با استفاده از روش RT-PCR در ماهی گورخری پرداخته شد. لاروها پس از تفریخ با جیره غذایی آزمایشی در چهار سطح ۰ (گروه شاهد T_0)، ۵ (T_1)، ۱۰ (T_2) و ۱۵ (T_3) گرم عصاره در هر کیلوگرم غذا به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند. به منظور انجام بیان ژن، نمونه‌برداری از ماهیان در روزهای ۴، ۷، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ پس از تفریخ، صورت گرفت. نرمال‌سازی بیان ژن هدف با استفاده از ژن مرجع *β-actin* و آنالیز نتایج بیان ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ صورت گرفت. عملکرد تولیدمثلی در تیمارهای T_2 و T_3 به طور معنی‌داری بهتر از سایر تیمارها بود؛ به طوری که هماوری مطلق، شاخص گنادی و طول و وزن لاروها در این تیمارها بالاتر بود ($P<0/05$). با افزایش غلظت عصاره در جیره، نسبت جنس ماده به نر افزایش یافت ($P<0/05$). به طوری که در تیمار T_3، منجر به تولید ۸۷/۲۳ درصد جنس ماده شد. تحت تاثیر عصاره بیان ژن CYP19(a) نیز افزایش یافت، به طوری که در زمان تمایز گنادها (۴۵ روز پس از تفریخ) بالاترین بیان این ژن‌ها صورت گرفت. در مجموع، می‌توان استفاده از تیمار T_3 را برای دستیابی به بهترین عملکرد تولیدمثلی و درصد بالاتری از جنس ماده در ماهی گورخری به عنوان گونه مدل در آبزی‌پروری، پیشنهاد کرد.

واژگان کلیدی: *تولیدمثل، CYP19(a)، گیاه پنج انگشت، ماهی گورخری.*

۱- دانشجوی دکتری شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳- استاد گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۴- استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
* نویسنده مسئول: v.jafari110@yahoo.com

مقدمه

بر طبق مطالعات انجام شده، استروئیدهای جنسی نقش مهمی را در تمایز جنسی ماهیان در مراحل بسیار ابتدایی زندگی ایفا می‌کنند. ژن CYP19(a) یکی از کلیدی‌ترین ژن‌های مرتبط با جنسیت است که mRNA آن در ماهیان و خزندگان قبل از تمایز جنسی بیان می‌شود. مطالعات زیادی درباره بیان ژن در ماهیان صورت گرفته است (Fernandino et al., 2008; Cao et al., 2012). در واقع CYP19(a) آنزیم پایانی در مسیر ساخت استروئیدها است که آندروژن‌ها را به استروژن‌ها تبدیل می‌کند. بیان مناسب این آنزیم برای تولید مثل و تمایز جنسی در اکثر مهره‌داران حیاتی است (Trant et al., 2001). سطح mRNA ژن CYP19(a) در ابتدا پس از خروج از تخم (تفریخ) پایین است اما ۲۵ روز پس از تفریخ مقدار آن افزایش می‌یابد (Chen et al., 2014). به طور معمول استروئیدهای مصنوعی زیادی برای القای تغییر جنسیت در ماهیان استفاده می‌شوند اما به دلیل خطرات بالقوه چنین استروئیدهایی، بررسی امکان استفاده از مواد دارویی و گیاهی جدید امری مهم است. مطالعات نشان داده‌اند که گیاه پنج انگشت دارای استروئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین‌ها، تانین‌ها، رزین‌ها، نیترات پتاسیم، اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک است. پژوهشگران بیان کردند که فلاونوئیدهای (Flavonoids) موجود در گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus castus*)، از طریق افزایش سطح پروژسترون توانایی جنسی را در جنس ماده افزایش داده، سبب تولید هورمون جسم زرده می‌شود (Ghosal and Chakraborty, 2014). همچنین یکی از مهمترین ترکیباتی که در گیاه پنج انگشت وجود دارد و نقش اصلی را در تولید هورمون‌های جنس ماده ایفا می‌کند، ایزوفلاون‌ها هستند. ایزوفلاون‌ها از طریق جلوگیری از نوسانات هورمون‌های FSH و LH سبب طولانی شدن مرحله فولیکولار می‌شوند (Messina et al., 2006). در مطالعه ثمری (۱۳۸۹) تاثیر ایزوفلاون‌های روغن سویا بر بلوغ نهایی اووسیت‌ها در ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster tricogaster*) مورد بررسی قرار گرفت و تسریع بلوغ نهایی در این ماهی مشاهده شد. در مطالعه‌ای دیگر با بررسی اثر عصاره گیاه ختمی (*Althaea officinalis*) و هورمون ۱۷ بتا- استرادیول بر القا رشد و رسیدگی اووسیت‌ها در ماهی ماده نابالغ

گورامی سه خال، مشاهده شد که عصاره گیاه ختمی تاثیر بسیار مطلوبی در شاخص‌های مذکور داشته است (امانی شمس‌آباد، ۱۳۹۲). ناجی و همکاران (۱۳۹۳) به بررسی اثرات فیتواستروژنی عصاره بابونه (*Matricaria recutita*) بر درصد شاخص گنادی و قطر اووسیت‌های ماهی گورامی سه خال پرداختند و مشاهده کردند که با افزایش غلظت عصاره، شاخص گنادی افزایش یافت. بررسی سطح بیان ژن CYP19(a) در ماهیان گورخری جوان[1] که در معرض استرادیول (۱۰۰nM) قرار گرفته بودند، در مطالعه Kazeto و همکاران (۲۰۰۴) مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که بیان این ژن افزایش یافت. Fenske و Segner (۲۰۰۴) به بررسی نسبت جنسی و بیان ژن CYP19(a) در ماهیان گورخری تحت تاثیر فادروزول (Fadrozole) پرداختند و افزایش بیان این ژن و نیز افزایش درصد جنس نر را مشاهده کردند. Chen و همکاران (۲۰۱۴) نیز بیان ژن CYP19(a) را در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) که تحت تاثیر هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون قرار گرفته بودند، بررسی کردند و دریافتند که این هورمون باعث کاهش بیان ژن CYP19(a) می‌شود.

تکوین سریع، لقاح خارجی و تخم‌های شفاف ماهی گورخری موجب محبوبیت این مدل در زیست‌شناسی تکوینی و جنین‌شناسی شده است. این ماهی دارای تشابه سیستم غدد درون‌ریز و محور HPG[2] با پستانداران بوده، به عنوان یک گونه مدل در آبزی‌پروری استفاده می‌شود. علاوه بر موارد ذکر شده، بسیاری از ویژگی‌های دیگر مانند شباهت ژنومی با انسان، صرفه اقتصادی و پرورش آسان، موجب افزایش استفاده از این جانور مدل در رشته‌های گوناگون شده است (Hill et al., 2005; Spence et al., 2008).

گیاه پنج انگشت به عنوان یک گیاه فیتواستروژن (Naji et al., 2014) دارای خواص دارویی است و ترکیبات موجود در آن به عنوان جایگزین استروژن‌های مصنوعی در کنترل محور HPG در موش به کار رفته است (Nasri et al., 2004). تاکنون گزارشی از تاثیر عصاره گیاه پنج انگشت بر آبزیان گزارش نشده است. ناشناخته بودن اثرات آن بر فرآیندهای تغییر جنسیت و نحوه اثر آن بر روند تکامل گناد در آبزیان موجب شد تا در

1- Juvenile

2- Hypophysis-Pituary-Gonad Axis

این مطالعه تاثیر آن بر عملکرد تولیدمثلی، نسبت جنسی و بیان ژن CYP19(a) در ماهی گورخری به صورت کمی و با استفاده از RT-PCR مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نحوه نگهداری و تیماربندی ماهیان

مولدین نر و ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*) با میانگین وزن ۲/۶۶±۰/۲ گرم و میانگین طول ۵/۲±۰/۳ سانتی‌متر پس از انتقال به مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، به صورت جداگانه در آکواریوم‌هایی با ابعاد ۷۰×۴۰×۳۰ سانتی‌متر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷±۰/۲ قرار داده شدند. سپس مولدین بعد از دو هفته سازگاری با شرایط فیزیکوشیمیایی محیط جدید، به آکواریوم‌های ویژه تخم‌ریزی منتقل شدند.

برای انجام آزمایش، لاروها به طور تصادفی، در چهار تیمار ۰ (شاهد، T_0)، ۵ (T_1)، ۱۰ (T_2) و ۱۵ (T_3) گرم عصاره گیاه پنج انگشت *Vitex agnus castus* (شرکت داروسازی پورسینا، ایران) در هر کیلوگرم غذا قرار داده شدند و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد (در هر آکواریوم ۳۰ لارو). غذادهی لاروها پس از جذب ۷۵ درصد کیسه زرده، ابتدا با زرده تخم مرغ و سپس با ناپلی زئوپلانکتون‌های ریز غنی‌سازی شده با عصاره گیاه پنج انگشت و در نهایت با جیره پایه ساخت شرکت بیومار که با عصاره گیاه پنج انگشت با غلظت‌های ذکر شده غنی شده بود، به مدت ۴۵ روز انجام شد. ترکیب جیره پایه مورد استفاده برای تغذیه ماهیان در جدول ۱ آورده شده است. طی دوره آزمایش، غذادهی به ماهیان سه بار در روز و به میزان ۷ تا ۱۰ درصد وزن بدن انجام شد.

جدول ۱: ترکیب جیره پایه ماهی گورخری (*Daniorerio*) بر اساس وزن تر

ترکیبات	مقدار
پروتئین (٪)	۵۲/۴۵
چربی (٪)	۱۸/۴۴
خاکستر (٪)	۱۱/۳۵
فیبر (٪)	۲/۱
رطوبت (٪)	۸/۱۲
انرژی (cal/g)	۴۵۹۸/۵۶

در طول دوره آزمایش، برای کنترل دمای آب در هر کدام از آکواریوم‌ها یک بخاری ۲۰۰ وات (Abziparvar، ایران) نصب شد. برای حفظ کیفیت آب نیز هر ۲ روز یک بار ۴۰

درصد حجم آب آکواریوم تعویض و به صورت روزانه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب شامل pH، اکسیژن محلول، نیتریت، سختی کل و دمای آب اندازه‌گیری شد.

محاسبه شاخص‌های تولیدمثلی

وزن لاروها با استفاده از ترازو (با دقت ۱ میلی‌گرم) و طول آن‌ها با استفاده از خط‌کش (با دقت ۱ میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. برای تعیین درصد بقا، تعداد اولیه لاروها بر تعداد نهایی آنها تقسیم شد (مورگی و همکاران، ۱۳۹۳). برای اندازه‌گیری قطر تخم‌ها از لام‌های تهیه شده از تخمدان ماهیان عکس‌برداری شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار Axiovision قطر آن‌ها اندازه‌گیری شد (ناجی و همکاران، ۱۳۹۳). نسبت جنس نر به ماده با تقسیم تعداد کل ماهیان نر متولد شده بر تعداد کل ماهیان ماده متولد شده در کل دوره آزمایش، به دست آمد (حاجی بگلو و همکاران ۱۳۹۳). برای تعیین تعداد تخمک در تخمدان از روش وزنی استفاده شد. به این صورت که تخمدان از محوطه شکمی خارج و توزین شد. سپس بخشی از تخمدان برداشته شد و تعداد تخمک در آن شمارش و سپس به وزن کل تخمدان تعمیم داده شد (عنایت غلامپور و ایمانپور، ۱۳۹۱). برای تعیین شاخص گنادی[1] (GSI) از رابطه ۱ استفاده شد (Yiwang et al., 2001).

رابطه ۱:

۱۰۰ × (وزن بدن / وزن گناد) = شاخص گنادی (٪)

بررسی بیان ژن

برای بررسی بیان ژن، نمونه‌برداری از ماهیان در روزهای ۴، ۷، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ پس از تفریخ انجام شد و در هر مرحله ۵ قطعه ماهی از هر تیمار مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های ماهی بلافاصله پس از نمونه‌برداری با در ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) فریز شدند و سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

استخراج RNA

پس از همگن کردن ماهی‌های منجمد شده در ازت مایع، فرآیند استخراج با استفاده از کیت RNX-Plus و مطابق دستور العمل شرکت سازنده (Sina Colon، ایران) انجام شد. به این صورت که در هر مرحله نمونه‌برداری، RNA کل از سه نمونه استخراج شد و برای هر مرحله سه تکرار در نظر گرفته شد (Kolangi Miandare et al., 2013).

1- Gonadosomatic Index

ارزیابی کمی و کیفی RNA

ارزیابی کیفی RNA کل توسط دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ انجام شد و کمیت (غلظت) RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (ND-1000، Thermo Scientific، آمریکا) تعیین شد. مقدار جذب نوری نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100، BioRAD، آمریکا) در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر خوانده شد (Kolangi Miandare et al., 2013).

تولید cDNA

برای از بین بردن DNA ژنومی احتمالی در RNA استخراج شده از تیمار DNase I (Invitrogen، آمریکا) استفاده شد. ساخت رشته اول cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت سازنده (GeNet Bio، کره) برای نمونه‌ها انجام شد (Kolangi Miandare et al., 2013).

طراحی آغازگر

طراحی آغازگر مناسب برای تکثیر اختصاصی محصولات PCR از روی الگوهای متفاوت، یکی از ملزومات مهم در انجام اکثر آزمایش‌های RT-PCR محسوب می‌شود. آغازگرهای مورد نیاز برای ژن‌های CYP19(a) و *β-actin* برای انجام RT-PCR، طبق توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI (AY780257.1AF226620.1NM_131031) طراحی شد (جدول ۲). اندازه محصول PCR با توجه به آغازگرها و اختصاصی بودن عمل آن‌ها با کمک ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این که از یک‌سو، تقریبا در تمامی منابع برای بررسی بیان ژن از ژن *β-actin* به عنوان ژن مرجع استفاده شد و از سوی دیگر، بررسی بیان نسبی این ژن با استفاده از روش منحنی استاندارد مشخص شد که در تمامی مراحل تقریبا بیان ثابتی دارد، از این رو در این پژوهش، نرمال‌سازی بیان ژن هدف با استفاده از ژن مرجع *β-actin* صورت گرفت.

فرآیند RT-PCR

واکنش RT-PCR با استفاده از دستگاه Real Time PCR (BioRAD، آمریکا) و با استفاده از کیت سایبرگرین (سایبر بیوپارس، ایران) و بر اساس دستور العمل استاندارد، در مرحله اول، واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و با ۴۰ چرخه در این دما در ۳۰ ثانیه انجام شد. در مرحله بعد دما به ۶۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۲۰ ثانیه

جدول ۲: آغازگرهای به کاربرده شده در فرآیند RT-PCR

آغازگر	توالی	کارایی آغازگر (٪)	دمای ذوب (°C)	اندازه قطعه (bp)
ZCYP19(a)	F: TCTGCTTCAGAAGATTCATAAATACTTT R: CCTGCAACTCCTGAGCATCTC	۹۹	۵۵	۱۲۱
β-actin	F: AGGTCATCACCATCGGCAAT R: GATGTCCACGTCGCACTTCAT	۹۸	۵۸	۱۴۰

کاهش یافت و پس از آن ۴۰ ثانیه در دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد و در مرحله آخر به مدت ۷ دقیقه در این دما نگه داشته شد. تمامی واکنش‌ها در سه تکرار انجام شد. از آنجا که در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد محصول غیراختصاصی و دیمر مشاهده نشد، این دما به عنوان دمای واکنش در نظر گرفته شد.

برای انجام RT-PCR تمامی مراحل زمانی ذکر شده ارزیابی شد. خروجی دستگاه به صورت Ct (Threshold Cycle) یا چرخه آستانه ثبت شد. منحنی‌استاندارد با استفاده از نسبت‌های مختلف رقیق‌سازی cDNA (۱ به ۵، ۱ به ۱۰، ۱ به ۵۰، ۱ به ۱۰۰، ۱ به ۲۰۰ میکرولیتر) رسم شد. بازدهی PCR با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد (Radonic et al., 2004).

رابطه ۲:

$$E\ (\%) = [10^{(1/Slope)-1}] \times 100$$

E: بازده (Efficiency)

تغییرات نسبی بیان ژن CYP19(a) با دو بار مشتق‌گیری از Ct ($۲^{-\Delta\Delta Ct}$) محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001).

در بین زمان‌های مورد مطالعه مرحله‌ای که کمترین Ct را داشت به عنوان کالیبراتور به منظور ارزیابی بیان نسبی ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت (Larionov et al., 2005). نرمال‌سازی سطح بیان ژن CYP19(a) در مراحل مختلف تکوین ماهی گورخری با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون Tukey در سطح خطای ۱ درصد (P<۰/۰۱) بررسی شد.

در نرم‌افزار SPSS 19 ابتدا پراکنش نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. سپس میانگین داده‌ها محاسبه و برای تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار از نقطه نظر شاخص‌های محاسبه شده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون دانکن (Duncan) در سطح خطای

۰/۰۵ استفاده شد. همچنین از رگرسیون خطی و برای ارزیابی ضریب همبستگی از آزمون اسپیرمن استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های فیزیکوشیمیایی

مقادیر اندازه‌گیری شده شاخص‌های فیزیکوشیمیایی در طول دوره آزمایش برای pH ۷/۲±۰/۲، اکسیژن محلول ۴/۴±۰/۱mg/L، نیتریت ۱/۵۳±۰/۲mg/L، سختی کل ۲۰۲±۸/۱mg/L و دما ۲۴/۵±۱°C بود.

شاخص‌های تولیدمثلی

در جدول ۳ نتایج مربوط به عملکرد تولیدمثلی ماهیان گورخری (*Danio rerio*) درگروه‌های آزمایشی مختلف نشان داده شده است. بر طبق نتایج مشاهده شد که بالاترین قطر تخم، بقای لاروها، شاخص گنادی، طول و وزن لاروها در تیمار حاوی ۱۵ گرم عصاره گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus castus*) به دست آمد که حاکی از این است که با افزایش غلظت عصاره در جیره، عملکرد تولیدمثلی ماهیان نیز افزایش یافت.

جدول ۳: عملکرد تولیدمثلی ماهیان گورخری (*Danio rerio*) در گروه‌های آزمایشی مختلف

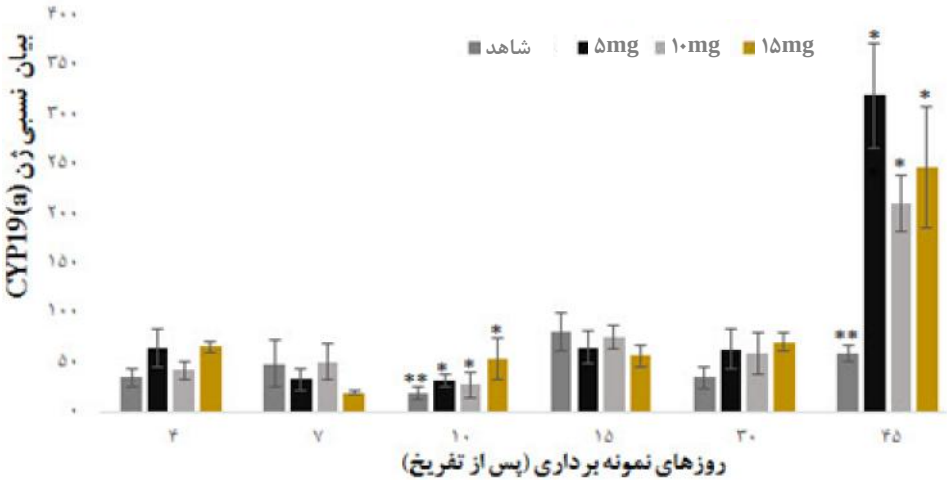
شاخص‌های تولیدمثلی	تیمار T_0 (شاهد)	تیمار T_1	تیمار T_2	تیمار T_3
بقای لارو تا جذب کیسه زرده (درصد)	۸۵/۰±۲/۳ c	۹۰/۲±۳/۲ b	۹۶/۱±۲/۷ b	۹۷/۲±۲/۳ a
طول لارو (میلی‌متر)	۵/۱±۰/۰۵ c	۵/۵±۰/۰۳ b	۵/۹±۰/۰۲ b	۶/۶±۰/۰۲ a
وزن لارو (میلی‌گرم)	۱/۲±۰/۰۲۰ c	۱/۵±۰/۰۲۵ b	۱/۹۵±۰/۰۵۶ b	۲/۱±۰/۰۶۵ a
وزن ماهیان بالغ ماده (گرم)	۱/۵۸±۰/۲ c	۲/۷۶±۰/۳ b	۲/۸۲±۰/۲ b	۳/۵±۰/۳ a
وزن گناد (میلی‌گرم)	۱۸/۱۷±۱/۱ c	۴۸/۵±۱/۳ b	۶۹/۹±۱/۲ b	۹۹/۷±۲/۶ a
تعداد تخمک در تخمدان	۴۷۹/۷۵±۳۲/۶۲ c	۵۳۵/۲۲±۶۶/۳۰ b	۵۶۶/۳۵±۵۲/۷ b	۵۹۹±۵۶/۳ a
شاخص گنادی (٪)	۱/۱۵±۰/۰۵ c	۱/۷۶±۰/۰۴ b	۲/۴۸±۰/۰۲ b	۲/۸۵±۰/۰۳ a
قطر تخم (میلی‌متر)	۰/۵۴±۰/۰۳ b	۰/۶۱±۰/۰۲ ab	۰/۶۵±۰/۰۱ b	۰/۷۵±۰/۰۳ a
درصد نسبت جنسی (ماده : نر)	۴۵/۸۸ : ۵۴/۱۲	۲۱/۴۳ : ۷۸/۵۷	۱۵/۴۴ : ۸۴/۵۶	۱۲/۷۷ : ۸۷/۲۳

در هر ردیف حروف انگلیسی متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

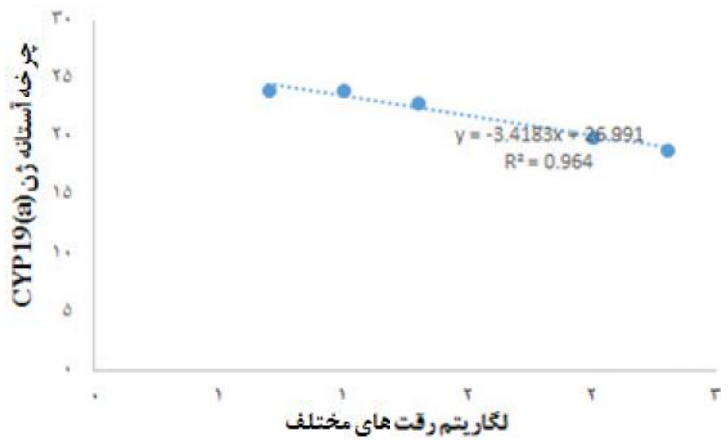
بیان ژن

در ابتدا آغازگرهای ژن هدف CYP19(a) و ژن مرجع *β-actin* مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. به همین جهت با استفاده از یک PCR نرمال آزمایش شدند و محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد رویت شد. نتایج نرمال شده، نشان داد که بیان این ژن در تیمارهای مختلف در روزهای ۴، ۷، ۱۵ و ۳۰ پس از تفریخ تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) ولی در روزهای ۱۰ و ۴۵ پس از تفریخ، بیان این ژن در تیمارهای آزمایشی به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵).

نتایج نشان داد که آغازگرها به جایگاه صحیح ژن متصل شده‌اند. سپس بیان نسبی ژن CYP19(a) در روزهای ۴، ۷، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ پس از تفریخ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). بیان ژن مذکور با استفاده از ژن مرجع *β-actin* نرمال شد.



شکل ۱: بیان نسبی ژن CYP19(a) در روزهای مختلف نمونه‌برداری (میانگین ± انحراف معیار). *: P<۰/۰۵. **: P<۰/۰۱.



شکل ۲: منحنی استاندارد برای جفت آغازگرهای ژن هدف CYP19(a) بر پایه مقادیر مشخصی از cDNA در رقت‌های مختلف لگاریتمی به همراه معادله خط و ضریب همبستگی (R^2) نمایش داده شده است. منحنی استاندارد بر اساس رگرسیون بین لگاریتم رقت‌های مورد استفاده (محور X) و Ct به دست آمده برای هر رقت (محور Y) رسم شده است.

بحث

مطالعات نشان داده‌اند که عصاره گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus castus*) خاصیت استروژنی دارد (Nasri et al., 2004)، از این رو پژوهش حاضر به منظور بررسی خاصیت استروژنی این گیاه بر عملکرد تولیدمثلی و بیان ژن CYP19(a) در ماهی گورخری (*Danio rerio*) صورت گرفت. با مقایسه ویژگی‌های تولیدمثلی ماهیان مانند هماوری، قطر تخم، درصد بازماندگی، طول و وزن لارو که در جدول ۳ ارائه شده است و مقایسه تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد، مشخص شد که عصاره گیاه پنج انگشت در ماهی گورخری نیز دارای یک رفتار استروژنی است. به عبارت دیگر، این عصاره به رشد اووسیت‌ها کمک کرد و سبب افزایش قطر تخم و شاخص گنادی شد. به طوری که در پژوهش حاضر، ماهیان تیمار $T_۳$ نسبت به گروه شاهد، ۱۵روز زودتر به بلوغ رسیدند که علت این امر را می‌توان به وجود ترکیبات فیتواستروژنیک در عصاره گیاه پنج انگشت و خواص مثبت این ترکیب در تسریع رسیدگی جنسی ماهیان نسبت داد (Nasri et al., 2004; Naji et al., 2014).

ثمری (۱۳۸۹) نشان دادند استفاده از ایزوفلاون‌های روغن سویا هم مانند هورمون ۱۷ بتا- استرادیول می‌تواند سبب تسریع بلوغ

نهایی در ماهی گورامی سه خال شود. ترکیب اصلی موجود در عصاره گیاه پنج انگشت نیز ایزوفلاون است (Zahid et al., 2016) که در پژوهش حاضر سبب تسریع در روند تکامل گناد شد. عصاره (۱۳۹۲) مشاهده کردند که در ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster tricogaster*) با افزایش دوز عصاره گیاه چای سبز، شاخص GSI افزایش پیدا می‌کند. همچنین امانی و همکاران (۱۳۹۲) با بررسی اثرات عصاره گیاه ختمی (*Althaea officinalis*) مشاهده کردند با افزایش دوز عصاره این گیاه، شاخص GSI افزایش پیدا کرد که نتایج آن‌ها با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. امانی شمس‌آباد (۱۳۹۲) در بررسی تاثیر عصاره گیاه ختمی و هورمون ۱۷ بتا-استرادیول بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها در ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال، تاثیر مثبت عصاره و هورمون را بر میزان شاخص گنادی، رشد و رسیدگی اووسیت‌ها در مقایسه با گروه شاهد مشاهده کردند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد به طوری که در مطالعه حاضر بالاترین درصد GSI در تیمار T_3 مشاهده شد. ناجی و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی اثرات فیتواستروژنی عصاره بابونه (*Matricaria recutita*) بر ماهی گورامی سه خال بیان کردند میانگین درصد شاخص گنادی با افزایش دوز عصاره بابونه، سیر صعودی داشته است. همچنین تفاوتی بین قطر اووسیت‌ها با افزایش دوز عصاره بابونه مشاهده شد که در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). آن‌ها نتیجه گرفتند افزایش دوز عصاره بابونه موجب تسریع رسیدگی اووسیت‌ها می‌شود (ناجی و همکاران، ۱۳۹۳) که با نتایج مطالعه حاضر درباره اثر عصاره گیاه پنج انگشت بر ماهی گورخری همخوانی دارد.

Kazeto و همکاران (۲۰۰۴) ماهیان گورخری جوان را ۱۷ روز پس از لقاح به مدت ۳ روز در معرض استرادیول (۱۰۰nM) قرار دادند و مشاهده کردند که سطح بیان ژن CYP19(a) به میزان ۱۰۰ برابر افزایش یافت. در مطالعه حاضر نیز بیان ژن CYP19(a) در روز ۴۵ پس از تفریخ نسبت به روز چهارم پس از تفریخ، افزایش داشت که با نتایج این پژوهشگران مطابقت دارد. تفاوت در مقادیر سطوح بیان ژن در مطالعات مختلف، می‌تواند به دلیل تفاوت در مدت زمان قرارگیری ماهی در معرض عصاره، مراحل مختلف تکاملی و همچنین روش‌های مختلف اندازه‌گیری کمی بیان ژن باشد. Fenske و Segner (۲۰۰۴) ماهیان گورخری را بین روزهای ۳۵ تا ۷۱ پس

از لقاح، تحت تاثیر فادروزول (Fadrozole) با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در هر کیلوگرم غذا قرار دادند و منجر به تولید ۱۰۰ درصد جنس نر شد. همچنین آن‌ها مشاهده کردند مقدار بیان ژن CYP19(a) در طی دوره تمایز گناد ماهیان گورخری (از روز ۳۵ تا روز ۷۱ پس از لقاح) افزایش یافت (Fenske and Segner, 2004) که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. مطالعات Chen و همکاران (۲۰۱۴) طی تیمار ماهی قرمز با هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون مشاهده کردند که در تیمار شاهد بیان ژن CYP19(a) پس از خروج از تخم بسیار اندک بود اما ۲۶ روز پس از تفریخ شروع به افزایش کرد که این افزایش در تیمار با ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون مشاهده نشد. بنابراین تیمار ماهی با هورمون ۱۷ آلفا- متیل تستوسترون می‌تواند از افزایش بیان ژن CYP19(a) ممانعت کند. در پژوهش حاضر با توجه به این که عصاره گیاه پنج انگشت حاوی ترکیبات مشابه با هورمون‌های جنسی ماده است، تحت تاثیر عصاره این گیاه بیان ژن CYP19(a) در ماهی گورخری پس از تفریخ و تمایز گنادها افزایش یافت.

به طور کلی، بررسی روند بیان ژن CYP19(a) در پژوهش حاضر، طی دوره تکاملی ماهی گورخری بیانگر افزایش مقدار بیان ژن بود که نشان داد طی دوره تکاملی ماهی و همگام با تکامل غدد تناسلی و افزایش هورمون‌های وابسته به جنس در آن، بیان این ژن که به نحوی در تعیین جنسیت و رشد غدد جنسی نقش دارد نیز افزایش یافت که متاثر از حضور عصاره گیاه پنج انگشت در جیره غذایی ماهی گورخری بود. از طرفی در تیمارهای حاوی عصاره گیاه پنج انگشت، شاخص‌های تولیدمثلی ماهیان از جمله قطر تخم، بقای لاروها، شاخص گنادی، طول و وزن لاروها نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بالاتر گزارش شد که حاکی از این است که با افزایش دوز عصاره در جیره، عملکرد تولیدمثلی ماهیان نیز افزایش یافته است. بنابراین با توجه به نتایج این پژوهش، می‌توان به منظور دستیابی به افزایش عملکرد تولیدمثلی و ازدیاد جنس ماده در ماهی گورخری به عنوان یک گونه مدل در آبزی‌پروری، از عصاره گیاه پنج انگشت با غلظت ۱۵ گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی استفاده کرد.

منابع

امانی شمس‌آباد ن. ۱۳۹۲. مقایسه اثرات عصاره ختمی *Althaea officinalis* و هورمون ۱۷ بتا- استرادیول بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها در ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال. رساله دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی تهران. ۸۹ص.

ثمری ز. ۱۳۸۹. بررسی و مقایسه اثرات هورمون ۱۷ بتا- استرادیول و ایزوفلاون‌های روغن سویا، بر رشد و رسیدگی اووسیت‌ها در ماهی گورامی ماده نابالغ سه خال با نام علمی (*Trichogaster trichopterus*). رساله دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی تهران. ۷۵ص.

حاجی بگلو ع.، سوداگر م.، حسینی س.ع. و جعفری س.م. ۱۳۹۳. بررسی اثر سطوح مختلف عصاره اتانولی (*Corchorus olitorius*) بر روی برخی فاکتورهای تولیدمثلی و رشد در ماهی دم‌شمشیری (*Xiphophorus helleri*). فصلنامه محیط زیست جانوری، ۶(۴): ۵۶-۴۷.

عصاره م. ۱۳۹۲. بررسی اثرات هیستولوژیکی چای سبز (*Camellia sinensis*) و هورمون ۱۷بتا- استرادیول بر کبد و تخمدان ماهی گورامی سه خال با نام علمی (*Trichogaster trichopterus*). رساله دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی تهران. ۸۵ ص.

عنایت غلامپور ط. و ایمانپور م.ر. ۱۳۹۱. ارتباط میان برخی خصوصیات گنادی، اندازه ماهی و شاخص کبدی طی دوره تولیدمثلی مولدین ماده کپور دریایی (*Cyprinus carpio*) در خلیج گرگان. مجله زیست شناسی ایران، ۲۵(۳): ۴۱۷-۴۰۹.

مورگی ن.، دادگر ش. و نادری م.ص. ۱۳۹۳. اثر گیاه جعفری (*Petroselinum sativum*) بر شاخص رشد و بقای ماهی کوی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۸(۲): ۷۲-۶۳.

ناجی ط.، حسین‌زاده صحافی ح. و صفاری م. ۱۳۹۳. بررسی اثرات فیتواستروژنی عصاره بابونه (*Matricaria recutita*) بر رشد و رسیدگی اووسیت‌های ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۱): ۹۵-۸۵.

Cao M., Duan J., Cheng N., Zhong X., Wang Z., Hu W. and Zhao H. 2012. Sexually dimorphic and ontogenetic expression of *dmrt1*, *cyp19a1a* and *cyp19a1b* in *Gobiocypris rarus*. Comparative Biochemistry and Physiology A, 162: 303–309.

Chen X.W., Jiang S., Gu Y.F. and Shi Z.Y. 2014. Molecular characterization and expression of *cyp19a* gene in *Carassius auratus*. Journal of Fish Biology, 85: 516–522.

Fenske M. and Segner H. 2004. Aromatase modulation alters

gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology, 67: 105–126.

Fernandino J.I., Hattori R.S., Shinoda T., Kimura H., Strobl-Mazzulla P.H., Strussmann C.A. and Somoza G.M. 2008. Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. Sexual Development, 2: 316–324.

Ghosal I. and Chakraborty S.B. 2014. Effects of the aqueous leaf extract of *Basella alba* on sex reversal of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 9(2): 162–164.

Hill A.J., Teraoka H., Heideman W. and Peterson R.E. 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicological Sciences, 86 (1): 6–19.

Kazeto Y., Place A.R. and Trant J. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juvenile. Aquatic Toxicology, 69: 25–34**.**

Kolangi Miandare H., Farahmand H., Akbarzadeh A., Ramezanpour S., Kaiya H., Miyazato M. and Nikinma M. 2013. Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. General and Comparative Endocrinology, 182: 41–47.

Larionov A., Krause A. and Miller W. 2005. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinformatics, 6: 62–77.

Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25: 402–408.

Messina M., McCaskill-Stevens W. and Lampe J.W. 2006. Addressing the soy and breast cancer relationship: Review, commentary, and workshop proceedings. Journal of the National Cancer Institute, 98: 275–284.

Naji T., Ghafouri S. and Hosseinzade Sahafi H. 2014. The histological effects of *Cucurbita pepo*, *Silybum marianum*, *Linum usitatissmum*, *Vitex agnus_castus* 17β estradiol on ovarian tissue in three spot gorami (*Trichogaster trichopterus*). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences, 3: 120–127.

Nasri S., Oryan S., Rohani A.H., Amin G.R. and Yahyavi H. 2004. The effects of *Vitex agnus castus* L. extract on

gonadotrophines and testosterone in male mice. Iranian International Journal of Science, 5(1): 25–31.

Radonic A., Thulke S., Mackay I.M., Landt O., Siegert W. and Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications, 313: 856–862.

Spence R., Gerlach G., Lawrence C. and Smith C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biological Reviews, 83(1): 13–34.

Trant J.M., Gavasso S., Ackers J., Chung B.C. and Place A.R. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes *(cyp19a* and *CYP19b*) in zebra fish fry *(Danio rerio*). Journal of Experimental Zoology, 290: 475–483.

Yiwang H., Fengweng C., Chungtu M. and Cheles C. 2001. Synchronization of plasma sexual steroid concentration and gonadal cycle in the sleeper, *Eleotris acanthopoma*. Zoological Studies, 40(1): 14–20.

Zahid H., Rizwani G.H. and Sumaira I. 2016. Phytopharmacological Review on *Vitex agnus-castus*: A potential medicinal plant. Chinese Herbal Medicines, 8(1): 24–29.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 4, No. 3, Autumn 2016

Investigation of expression of CYP19(a) and reproduction in *Danio rerio* fed a diet enriched with *Vitex agnus castus* extract

Tayebeh Enayat Gholampour[1]*, Valiolah Jafari[2], Mohamad Reza Imanpour[3], Hamed Kolangi Miandare[4]

Received: August 2016 Accepted: October 2016

Abstract

P450 aromatase (CYP19(a)) is the key steroidogenic enzyme responsible for conversion of androgens to estrogens which play a critical role in developmental and sex differentiation. Hence, this study was done to evaluate the effect of *Vitex agnus castus* hydroalchoholic extract on reproductive performance, sex ratio and expression of CYP19(a), one of the most important gene related to gender, using RT-PCR method in zebrafish. The larvae were fed post-hatching with diets containing extracts of four levels included 0 (control group T_0), 5 (T_1), 10 (T_2) and 15 (T_3) g/Kg food for 45 days. For gene expression studies, samples of larvae at 4, 7, 10, 15, 30 and 45 days post-hatching were collected. Expression of *β-actin* housekeeping genes was normalized as reference gene. Gene expression was evaluated by using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The reproductive performance was significantly better in T_2 and T_3 than other treatments ($P<0.05$). With increasing concentration of extract in the diet, the ratio of female to male increased ($P<0.05$). T_3 Treatment leading to 87.23% female. The use of plant extract increased the expression of gene CYP19(a), so at the time of differentiation of gonad (45 days after hatching), the highest expression of this gene was occurred. Overall, suggest the use of T_3 treatment to achieve the best reproductive performance and a higher percentage of females in zebrafish as model for aquaculture species.

Key words: *Reproduction, CYP19(a),* Vitex agnus castus, Danio rerio.

1- Ph.D. Student in Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Associate Professor in Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- Professor in Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4- Assistant Professor in Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
*Corresponding Author: v.jafari110@yahoo.com