(DOI): 10.22034/AEJ.2020.132244

اثرات غلظت‌های تحت‌کشنده سولفات مس بر بیان ژن ویتلوژنین در جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*)

- **بهاره شکوهیان‌قهفرخی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **رقیه صفری***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **محمدرضا ایمانپور**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- **علی جافرنوده**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

در این تحقیق تأثیرغلظت‌های تحت‌کشنده سولفات مس بر بیان ژن ویتلوژنین (Vtg) در جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*) بررسی شد. تعداد ۱۸۰ قطعه بچه‌ماهی گورخری ماده با میانگین وزنی وزنی۰/۰۵± ۰/۳ گرم در ۳ تیمار و ۳تکرار به‌مدت یک‌ماه تحت تأثیر دوغلظت تحت‌کشنده سولفات مس ۰/۰۲ و ۰/۰٤ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار شاهد قرار گرفتند. در انتهای دوره جهت مطالعات ژنتیکی از کبد نمونه‌برداری و استخراج RNA انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت Superscript RTase استفاده شد و cDNA حاصله با استفاده از پرایمر ژن مذکور و ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن رفرنس در Real Time PCR استفاده شد. ارزیابی بیان ژن (Vtg) کاهش بیان این ژن را در گروه‌های تیمار شده با سولفات مس نسبت به گروه شاهد نشان داد. هم چنین در گروه‌های تیمار شده با سولفات مس ۰/۰۲ و ۰/۰٤ میلی‌گرم بر لیتر میزان بیان ژن به‌ترتیب ۰/٦٦ و ۰/۵۹ برابر گروه شاهد بود که الگوی کاهشی وابسته به غلظت را نشان می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سولفات مس می‌تواند اثر منفی بر رشد و تکامل سلول‌های جنسی در جنس ماده ماهی زبرا داشته باشد.

کلمات کلیدی: سولفات مس، بیان ژن، ویتلوژنین، ماهی گورخری

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: fisheriessafari@yahoo.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.132244

مقدمه

پیشرفت صنایع و افزایش بی‌رویه جمعیت سبب شده است تا فاضلاب‌های صنعتی، شهری و پساب‌های کشاورزی که دارای ترکیبات شیمیایی مختلفی، از قبیل عناصر سنگین هستند وارد اکوسیستم آبی شده و به‌عنوان یک مسأله مهم و حتی خطرناک مطرح شوند (Guliherm و همکاران، ۲۰۰۸). ماهیان نسبت به سایر مهره‌داران به نسبت گذراندن طول عمرشان در محیط آبی در مواجهه دائم با آلاینده‌ها می‌باشند (Yanga و همکاران، ۲۰۰۸). فلزات سنگین دارای قابلیت تجمع زیستی در بافت‌ها موجودات آبزی طی مدت رشد آن‌ها می‌باشند و اغلب با بزرگ‌نمایی زیستی در طی زنجیره‌های غذایی موجود در اکوسیستم‌ها در سلامت و تولیدمثل انسان‌ها و سایر موجودات مداخله می‌نمایند (Migliarini و همکاران، ۲۰۰۵). از میان فلزات سنگین، مس می‌تواند با غلظت‌های متفاوت برمحیط‌زیست آبزی اثرات سو داشته باشد (Zhang و همکاران، ۲۰۰۵). افزایش مس در آب‌های سطحی ناشی از افزایش ورود فاضلاب‌های صنعتی به آب‌هاست. مس اغلب به‌صورت سولفات مس ($CuSO_4$) برای کنترل رشد فیتوپلانکتون‌ها و جلبک‌های رشته‌ای و کنترل برخی بیماری‌های ماهی‌ها در کارگاه‌های پرورش ماهی استفاده می‌شود (Lin و همکاران، ۲۰۰۸؛ Robinson و همکاران، ۲۰۱۳). فلز مس نقش مهمی در رشد، توسعه، عملکرد سلولی و فاکتوری برای عملکرد تعدادی از آنزیم‌ها مرتبط با متابولیسم اصلی در موجودات زنده از جمله آبزیان می‌باشد. Thiele و Puign (۲۰۰۵) که می‌تواند به‌طور مستقیم از آب جذب شود (Grosell و همکاران، ۲۰۰۳) هم‌چنین این عنصر از طریق ایجاد کمپلکس باعث تأثیر بر ساختار برخی پروتئین‌ها، بیان برخی ژن‌ها، از بین رفتن پروتئین‌های انتقالی هم‌چون Na^+/K^+ ATPase و یا حتی مرگ سلول می‌گردد (Sobha و همکاران، ۲۰۰۷). پروتئین‌های تولیدمثلی از پروتئین‌های پوسته تخمک و پروتئین زرده تخمک تشکیل شده‌اند. در مهره‌داران تخم‌گذار، دو مرحله با اهمیت در تنظیم استروژن به‌نام‌های زوناژنز و ویتلوژنز وجود دارد که این مراحل برای رسیدگی تخمک حیاتی هستند. ویتلوژنز فرایند تولید زرده تخمک که همان ویتلین است، می‌باشد. ویتلوژنین پیش‌ماده پروتئین زرده تخم، ویتلین می‌باشد که انرژی برای رشد و نمو جنین برای جانور تخم‌گذار را فراهم می‌کند. این ماده با چگالی بالا (۳۰۰ تا ۶۰۰ کیلو دالتون) و گلیکوفسفولیپیدی است که دارای لیگاندهای کلسیم و فسفر می‌باشد. در فرایند رشد و نمو تخمک سلول‌های لایه تکا تحت تأثیر گنادوتروپین‌های ترشح‌شده از غده هیپوفیز، هورمون تستوسترون ترشح می‌کنند و در ادامه تستوسترون در لایه گرانولوزا به‌منظور تولید هورمون استروئیدی همانند استرادیول آروما تازه می‌شود. سپس هورمون استرادیول از طریق رگ‌های خونی وارد کبد می‌شود و در آن‌جا کبد را به‌منظور تولید ویتلوژنین تحریک می‌کند (Nagahama و همکاران، ۱۹۹۱؛ Aemen و Gay، ۲۰۰۰؛ Berg و همکاران، ۲۰۰۵؛ Drummond، ۲۰۰۶). ویتلوژنین در بسیاری از گونه‌های ماهی‌ها شناسایی‌شده است که عملکرد متفاوتی در بین ماهیان دارند: سه شکل غالب ویتلوژنین در راسته اکتینوپتریجی و پاراکتینوپتریجی شامل VtgAa، VtgAb و VtgC می‌باشد (Finn و Kristoffersen، ۲۰۰۷). روش‌های سلولی و مولکولی جدید محققین را قادر ساخته تا مکانیسم‌های جدید نحوه عمل هورمون‌های تولیدمثلی طبیعی و تخریب‌کننده‌های سیستم غدد درون‌ریز مثل استروژن‌های مصنوعی و استروژن‌های تولیدشده به‌دست انسان را مورد ارزیابی قرار دهند (جمشیدی، ۱۳۹۱). درحقیقت در سطح مولکولی تغییرات DNA، تغییرات ژنتیکی (تغییر در بیان، عملکرد و تنظیم ژنی)، تغییرات سطوح پروتئینی و تغییرات متابولیکی در موجودات می‌تواند به‌عنوان شاخص مواجهه با آلودگی درنظر گرفته شود مطالعاتی درزمینه اثرات آلاینده‌ها در سطح مولکولی بر بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل در مواجهه با آلاینده در آبزیان صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به اثر آلاینده پلی‌رومینیتد دی فنیل اتر (PBDEs) (Yu و همکاران، ۲۰۱۴)، میکروسیستین (Zhao و همکاران، ۲۰۱۵)، تترا کلرودی بنزو پی‌دیوکسین (Chen و Chan، ۲۰۱۶)، سم کاربازید (Yu و همکاران، ۲۰۱۶)، (Zheng و همکاران، ۲۰۱۶)، (Zhang و همکاران، ۲۰۱۶) و سم دیازینون (درویشی و همکاران، ۱۳۹۷) در ماهی ماده گورخری بر بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل در محور هیپوتالاموس، هیپوفیز و گناد صورت گرفته است. از آن‌جاکه تاکنون مطالعه‌ای در زمینه اثرات آلودگی با غلظت‌های تحت‌کشنده سولفات مس در بیان ژن ویتلوژنین در ماهی گورخری (*Danio rerio*) انجام نشده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی بیان این ژن در مواجهه با سولفات مس صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

بچه‌ماهیان گورخری بامیانگین وزنی ۰/۰۵±۰/۳ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت‌کلا گرگان خریداری و به مرکز تحقیقات آبزی پروری شهیدفضلی‌بر آبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان منتقل گردید. پس از دوهفته سازگاری ماهی‌ها با تراکم ۳۰ عدد در آکواریوم به‌طور تصادفی در معرض ۳ تیمار ۰، ۰/۰۲، ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر سولفات مس برای مدت ۳۰ روز نگه‌داری شدند. در طی دوره ماهی‌ها روزانه به‌میزان ۳ درصد وزن بدن در ۴ نوبت در روز با استفاده از غذای بیومار (فرانسه) تغذیه شدند. به‌منظور هوادهی از سنگ هوا استفاده شد. هم‌چنین دمای آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد و میانگین pH ۸/۲ اندازه‌گیری شد. پس از ۳۰ روز مواجهه با سولفات مس در انتهای دوره آزمایش، ۱۰ ماهی به‌طور تصافی از هر تیمار صید و با استفاده از پودر گل میخک ۰/۵ گرم بر لیتر بی‌هوش و کشته شدند. سپس با استفاده از قیچی و تیغ اسکالپر استریل بافت کبد جمع‌آوری شده و هرکدام به تیوپ‌های جداگانه منتقل شدند و بلافاصله در مخزن ازت قرار گرفتند. در پایان نمونه‌برداری تیوپ‌های حاوی نمونه تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰ـ نگه‌داری شدند. به‌منظور استخراج RNA از پروتکل کیت بایوزول طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biozol- Bioflux- Bioer) استفاده شد. برای تعیین کمیت (غلظت) RNA، با استفاده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100)، مقدار جذب نمونه‌ها در طول‌موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر قرائت شد. کیفیت RNA استخراج شده از طریق الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵٪ بررسی شد. وجود دو باند واضح 18s و 28sRNA ریبوزومی نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج‌شده می‌باشد. برای حذف آلودگی DNA، از تیمار DnaseI طبق روش پیشنهادی شرکت (Fermentase-France)، ۲ میکروگرم RNA به یک تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. به هر تیوپ، ۱ میکرولیتر بافر آنزیم DNase I (10x) و ۱۰ واحد آنزیم RNase inhabitor (۴۰ میکرولیتر) اضافه گردید ۱/۷۵ میکرو لیتر آب دپس (تا رسیدن به حجم ۹ میکرو لیتر) به هر تیوپ اضافه شد. تیوپ‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس ۱ میکرولیتر EDTA ۲۵ میلی‌مولار به هر تیوپ اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دما ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تیوپ‌ها برای ساخت cDNA به فریزر ۸۰ ـ منتقل شدند. برای سنتز cDNA از کیت Superscript RTase استفاده شد. بدین‌صورت که ۵µl از RNA که قبلاً آماده‌شده بود به همراه ۱µl آغازگر الیگو به تیوپ‌های جدید اضافه و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰µl رسید. سپس بر روی بلوک حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه انکوبه گردید و بعدازآن بر روی یخ انتقال داده شد. ۱۰µl مستر حاوی آنزیم ریورس ترانسکریپتاز به آن اضافه و درنهایت با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس محلول حاوی c DNA به حجم ۲۰µl به دمای ۸۰- منتقل شد. در مطالعه حاضر برای تکثیر ژن‌های vtg (مرتبط با تولیدمثل) و بتا اکتین (ژن رفرنس) از مطالعه درویشی (۱۳۹۷) (جدول ۱) استفاده شد. واکنش qPCR بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای طراحی‌شده برای ژن هدف و ژن رفرنس بتا اکتین توسط کیت سایبر بیوپارس در دستگاه iQ5 شرکت بایورد و با استفاده از نرم افزار بایورد iQ5 اپتیکال (BioRad iQ5 optical system software version 2) برای بافت کبد در ۴ تکرار تکنیکی انجام شد. ازآن‌جایی‌که در دمای ۶۰ درجه محصول غیراختصاصی و دایمر مشاهده نشد، این دما به‌عنوان دمای واکنش درنظر گرفته شد. به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط qPCR، سری غلظت‌های مختلف (۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط ۵۰ نمونه از تیمارهای متفاوت از هر دو بافت تهیه و با هر دو پرایمر

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.132244

هدف ورفرنس در ۳ تکرار تکثیر شدند و منحنی استاندارد جهت تخمین کارایی (E) و تکرارپذیری آزمایش برای هر پرایمر ترسیم شد (Bustin و همکاران، ۲۰۰۹).

جدول۱: توالی آغازگرهای استفاده شده

نام پرایمر	توالی (´۳-´۵)	دمای اتصال (C^{o})	کارایی پرایمر
Vtg1 q-PCRF	GCCAAAAAGCTGGGTAAACA	۶۰	٪۹۵
Vtg1 q-PCRR	AGTTCCGTCTGGATTGATGG		
β- actin q-PCRF	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	۶۰	٪۹۵
β- actin q-PCRR	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC		

آنالیز آماری: تغییرات نسبی بیان ژن ویتلوژنین با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد که در آن $\Delta\Delta Ct$ برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیکراتور $[\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Target gene}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}}]$، ΔCt ژن هدف برابر است با مقدار Ct ژن هدف منهای Ct ژن رفرنس $[\Delta Ct_{\text{Target gene}} = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{refrence gene}}]$ و ΔCt کالیبراتور برابر است با ΔCt ژن هدف هر نمونه منهای ΔCt نمونه کنترل (Ling و همکاران، ۲۰۰۹). سپس نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف- اسمیرنوف تست شد. آنالیز داده‌های توسط T-TEST مستقل صورت گرفت. نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار نمایش داده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 16) انجام شد.

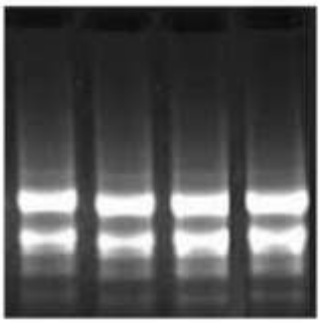
نتایج

نتایج ارزیابی کیفی و کمی RNA: ازلحاظ کمی و کیفی RNA استخراج‌شده مورد ارزیابی قرار گرفت اعداد به‌دست آمده از سنجش RNA در محدوده ۱/۸ تا ۲/۲ قرار داشتند که بیان‌کننده غلظت مناسب RNA جهت سنتز cDNA است. در بررسی کیفی RNAها با استفاده از ژل الکتروفورز وجود ۲ باند مشخص ۱۸S و ۲۸S نشان‌دهنده کیفیت مناسب RNA است (شکل ۱).

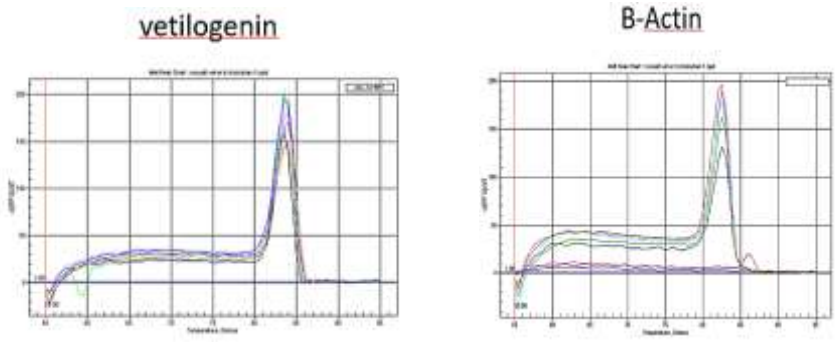
ارزیابی عملکرد آغازگرهای به‌کاررفته در qPCR: تخمین کارایی آغازگرها و تکرارپذیری آزمایش دامنه‌ای، حدود ۹۹-۹۵ درصد نشان داد که بیانگر کارایی بالای آغازگرهاست (جدول ۱).

نتایج بررسی عملکرد اختصاصی آغازگرها از طریق منحنی ذوب: پیک مشاهده شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی است (شکل ۲).

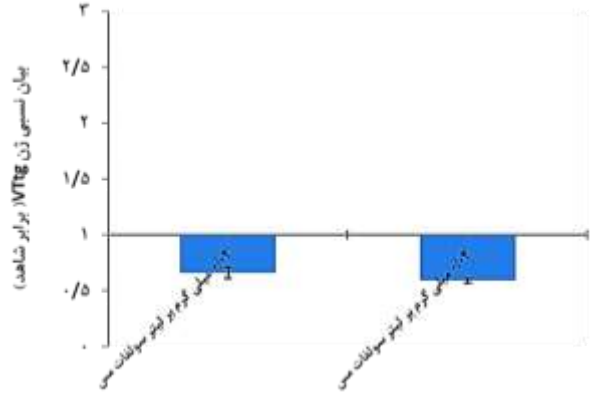
ارزیابی بیان ژن مرتبط با زرده‌سازی (Vitellogenin): ارزیابی بیان ژن (Vtg) کاهش بیان این ژن را در گروه‌های تیمار شده با سولفات مس نسبت به گروه شاهد نشان داد. هم‌چنین در گروه‌های تیمار شده با سولفات مس ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر میزان بیان ژن به‌ترتیب ۰/۶۶ و ۰/۵۹ برابر گروه شاهد بود که الگوی کاهشی وابسته به غلظت را نشان می‌دهد. اختلاف معنی‌داری در میزان بیان در گروه‌های تیمار شده مشاهده نشد ($P>0/05$)(شکل ۳).



شکل ۱: کیفیت RNA استخراج‌شده از کبد ماهی گورخری روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید



شکل ۲: منحنی ذوب ترسیم‌شده از غلظت‌های سریالی برای آغازگر Vtg و B-Actin



شکل ۳: تغییرات نسبی بیان ژن ویتلوزنین (Vtg) در بافت کبد ماهی زبرا در مواجهه ۳۰ روزه با دوزهای مختلف سولفات مس

بحث

در مهره‌داران تخم‌گذار ویتلوژنیز رویدادی ضروری است که رشد تخمک را از طریق ویتلوژنین قادر می‌سازد. سنتز ویتلوژنین به‌طور طبیعی به‌میزان استرادیول که خود تحت کنترل گیرنده استروژنی آلفا(ERα) در کبد جنس ماده می‌باشد وابسته است (Bowman و همکاران، ۲۰۰۲؛ Lange و همکاران، ۲۰۰۳؛ Davis و همکاران، ۲۰۰۸). تمام رویدادهایی که بر ویتلوژنیز تأثیر می‌گذارند می‌توانند موفقیت کلی تولیدمثل را تحت تأثیر قرار دهند (Zhang و همکاران، ۲۰۰۸). بیان ژن‌های ویتلوژنین وابسته به مرحله رسیدگی جنسی و نوع بافت است و عملکرد اصلی آن‌ها تأمین مواد مغذی برای رشد تخمک در ماده‌های بالغ می‌باشد (Kobayashi و همکاران، ۲۰۰۵؛ Marin و Matozzo، ۲۰۰۴؛ Henry، ۲۰۰۹). تمام رویدادهایی که بر ویتلوژنیز تأثیر می‌گذارند می‌توانند موفقیت کلی تولیدمثل را تحت تأثیر قرار دهند (Zhang و همکاران، ۲۰۰۸). ویتلوژنین در کبد یک پروتئین پیش‌ماده تخمک است که در ماده‌ها بیان می‌شود و معمولاً نمی‌تواند توسط نرها بیان شود. اما در حضور موادشیمیایی تخریب‌کننده غدد درون‌ریز استروژنی (EDC)، ژن ویتلوژنین می‌تواند در نرها القا شود که در این‌صورت به‌عنوان نشانگر مولکولی برای مواد استروژنیک درنظر گرفته می‌شود (Marin و Matozzo، ۲۰۰۴؛ Thomas و همکاران، ۲۰۰۷؛ Ankley و همکاران، ۲۰۰۸؛ Park و همکاران، ۲۰۱۰). در مطالعه حاضر ارزیابی بیان ژن ویتلوژنین کاهش بیان را در گروه‌های تیمار شده با سولفات مس نسبت به گروه شاهد نشان داد. در گروه‌های تیمار شده با سولفات مس ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر میزان بیان ژن ویتلوژنین به ترتیب ۰/۶۶ و ۰/۵۹ را نشان می‌دهد. کاهش رشد و مرحله رسیدگی جنسی اووسیت ها به‌ویژه در گروه تیمار ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.132244

گروه شاهد در مواجهه با سولفات‌مس تاییدکننده آسیب‌وارده به تخمدان در مواجهه با این فلز سنگین بود (شکوهیان، ۱۳۹۸). اثرات آلاینده‌ها بر شاخص‌های تولیدمثلی به نوع آلاینده، غلظت و زمان مواجهه، گونه مورد بررسی و جنسیت آن بستگی دارد. Lethimonier و همکاران (۲۰۰۰) کاهش معنی‌دار بیان‌ژن‌های گیرنده استروژن و ویتلوژنین را در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در استفاده کورتیزول و دگزامتازون مشاهده نمودند. در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که گلوکوکورتیکوئیدها در بیان ER تداخل ایجاد می‌کند که می‌تواند اثرات منفی استرس یا کورتیزول بر روی ویتلوژنزیز توضیح دهد. محمدنژاد شموشکی و همکاران(۱۳۹۰) بیان ژن کدکننده ویتلوژنین در کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان نابالغ (*Oncorhynchus mykiss*) تحت تأثیر پساب کارخانه‌های کاغذ ایران مطالعه کردند و افزایش معنی‌دار بیان ژن ویتلوژنین در دوز بالای پساب (500ppm) را مشاهده و ارزیابی بیان ژن ویتلوژنین را به‌عنوان بیومارکری کارآمد برای پساب‌های استروژنیک کارخانه‌های کاغذسازی عنوان نمودند. Zhang و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر پلی‌برومینیتد دی فنیل اتر (PBDEs) بر تولیدمثل ماهی گورخری را در بیش از دو نسل مورد بررسی قراردادند که در جنس ماده منجر به تولید استرادیول پایین‌تر و مهار mRNA ژن آروماتاز سیتوکروم P450 شد. در جنس نر منجر به تولید بیش‌تر تستوسترون و افزایش بیان m RNA سیتوکروم P450 c17 آلفا- هیدروکسیلاز و lase 17, 20 گردید. علاوه بر این mRNA ویتلوژنین کبدی و رونویسی ژن گیرنده استروژن b در ماده‌ها و نرها منعکس شد، بنابراین نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض غلظت‌های پایین PBDE در دریاچه‌های ساحلی می‌تواند منجر به اختلال تولیدمثل شود. در بررسی تغییرات بیان ژن کدکننده‌ویتلوژنین و گیرنده استروژنی‌را در جنین‌ها، لارو و کبد ماهی گورخری بزرگ‌سال پس از مصرف کادمیوم و تتراکلرودی بنزوپی‌دیوکسین (TCDD) بیان mRNA ویتلوژنین توسط کادمیوم مهار شد اما تحت تأثیر TCDD قرار نگرفت. هم‌چنین تغییرات مشابه در سطوح mRNA گیرنده‌های ERα، ERβ1، ERβ2 و GPER (پروتئین همراه گیرنده استروژنی) در سلول‌های کبدی مشاهده شد (Chen و Chan، ۲۰۱۶). اختلال در محور تولیدمثل در ماهی کپور آب‌شیرین (*Catla catla*) پس‌از قرار گرفتن در معرض بیوسفنل ـ A توسط Faheem و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده و نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها نشان داد که BPA (بیوسفنل ـ A) باعث تغییراتی از جمله افزایش وابسته به غلظت fshr، افزایش ۱۵ درصدی بیان آروماتاز تخمدان و هم‌چنین افزایش قابل توجهی از پروتئین‌های mRNA در الگوهای بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل می‌شود که ممکن است منجر به اثرات منفی بر سیستم تولیدمثل در ماهی ماده شود. اثرات تولیدمثلی و رونویسی پروژستین کلرادینون استات در ماهی گورخری توسط Siegenthaler و همکاران (۲۰۱۷) بررسی و کاهش قابل‌توجهی از رونوشت ویتلوژنین در تخمدان، کبد و هم‌چنین افزایش قابل‌توجه رونوشت گیرنده پروژسترون در بیضه‌ها مشاهده شد. کاهش بیان ژن Vtg در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون نسبت به گروه شاهد در مطالعه درویشی و همکاران (۱۳۹۷) مشاهده شد. در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون (۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر) میزان بیان ژن به‌ترتیب ۰/۹، ۰/۶۹ و ۰/۳۹ برابر گروه شاهد بود که الگوی کاهشی وابسته به دوزی را نشان داد. به‌طورکلی در این مطالعه اثرات تخریبی سولفات مس بر فرایند زرده‌سازی مشاهده شد. ارزیابی بیان ژن (Vtg) کاهش بیان وابسته به غلظت این ژن را در گروه‌های تیمار شده با سولفات مس نسبت به گروه شاهد نشان داد دوزی را نشان می‌دهد. ماهی پس از قرار گرفتن در معرض یک آلاینده، بخش قابل توجهی از انرژی دریافتی از طریق غذا را صرف برقراری هوموستازی و حفظ تعادل فیزیولوژیکی خود در جهت مقابله با پیامدهای ناخواسته ورود آلاینده به بدن خود می‌نمایند، در نتیجه انرژی کم‌تری جهت رشد و تکامل غدد جنسی اختصاص خواهد یافت و کاهش تولید کمیت و کیفیت سلول‌های جنسی در تماس با آلاینده‌ها امری طبیعی خواهد بود.

منابع

۱. **بنایی، م.؛ میرواقفی، ع.ر.؛ احمدی، ک. و عاشوری، ر.، ۱۳۸۸.** تاثیر غلظت تحت‌کشنده دیازینون بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه و تخمدان کپورمعمولی. مجله بیولوژی دریا. دوره ۱، شماره ۲، صفحات ۱۴ تا ۲۶.

۲. **درویشی، م.؛ صفری، ر.؛ شعبانی، ع.؛ حسینی‌فر، س.ح.، ۱۳۹۷.** تاثیر غلظت‌های تحت کشنده دیازینون بر بافت تخمدان در ماهی گورخری. فصلنامه محیط‌زیست جانوری. سال ۱۰، شماره ۱، صفحات ۲۵۷ تا ۲۶۲.

۳. **شاپوری، م.؛ عریان، ش.؛ اسماعیلی‌ساری، ع.، ۱۳۸۸.** بررسی تاثیر فلز مس بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت‌های عضله، کبد و گناد کپور معمولی. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد. سال ۳، شماره ۶، صفحات ۲۴ تا ۲۹.

۴. **محمدنژادشموشکی، م.؛ سلطانی، م.؛ شریف‌پور، ع.؛ ایمانپور، م.ر.؛ بهارلویی، ا.؛ نعیمی، م. ا.، ۱۳۹۰.** بررسی اثر غلظت‌های تحت کشنده سم دیازینون بر بافت‌های گناد، مغز و قلب مولدین نر ماهی سفید. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد تبریز. دوره ۵، شماره ۳، صفحات ۱ تا ۱۵.

5. **Boyd, CE., 1990.** Water quality in ponds for aquaculture. Alabama Agricultura. Experiment Station, Auburn University, USA.
6. **De Boeck, G.; aeminck, A. and Blust, R., 1997.** Effects of sublethal Cu exposure on Cu accumulation, food consumption, growth, energy stores, and nucleic acid content in common carp. Arch. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 33, pp. 415-422.
7. **Fanta, E.; Rios, F.S.; Romao, S.; Vianna, A. and Freiberger, S., 2003.** Histopathology of the fish Corydoras paleatus contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 54, pp: 119-130.
8. **Fernandes, A.; Ferreira-Cadoso, J.V.; Garcia-Santos, S.; Monteiro, S.M.; Carrola, J.; Matos, P. and Fontainhas Fernandes, A., 2007.** Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), exposed to waterborne copper. Pesquisa Veterinaria Brasileria. Vol. 27, No. 3, pp: 103-109.
9. **Finpederson, R., 1994.** Ecotoxicological Evaluation of indutrial wast water, Ministry of the Envoronment, Denmark. pp: 360-380.
10. **Jinling, C.; Guodong, W.; Tianyu, W.; Jianjie, Ch.; Guo Wenjinga, P.; Wua, X.H. and Lingtian, X., 2019.** Copper caused reproductive endocrine disruption in zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology. Vol. 211, pp: 124-136.
11. **Kwon, B.; Shin, H.; Moon, H.B.; Ji, K. and Kim, K.T., 2016.** Effects of tris (2-butoxyethyl) phosphate exposure on endocrine systems and reproduction of zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Pollution. Vol. 214, pp: 568-574.
12. **Krishnani, K.K.; Azad I.S.K.; Thirunavukkarasu, A.R.; Gupta, B.P., 2003.** Acute toxicity of some heavy metals to *Lates calcarifer* fry with a note on its histopathological manifestations. J Environ Sci Health A. Vol. 38, pp: 645-655.
13. **Ling, X.P.; Zhu, J.Y.; Haung, L. and Huang, H.Q., 2009.** Proteomic changes in response to acute cadmium toxicity in gill tissue of *Paralichthys olivaceus*. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 27, pp: 211-218.
14. **Liu, C.; Deng, J.; Yu, L.; Ramesh, M. and Zhou, B., 2010a.** Endocrine disruption and reproductive impairment in zebrafish by exposure to 8:2 fluorotelomer alcohol. Aquat. Toxicol. Vol. 96, pp. 70-76.
15. **Mcgeer, J.C.; Szebedinszky, C.; Mcdonald, D.G. and Wood, C.M., 2015.** Effects of chronic sublethal exposure to waterborne cu, cd or zn in rainbow trout. 1: iono-regulatory disturbance and metabolic costs. Aquat. Toxicol. Vol. 50, No. 3, pp: 231-243.
16. **Santos, H.B.; Sato, Y.; Moro, L.; Bazzoli, N. and Rizzo, E., 2008.** Relationship among follicular apoptosis, integrin β1 and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. Cell and tissue research. Vol. 332, pp: 159-170.
17. **Sassi, A.; Darias, M.J.; Said, K.; Messaoudi, I. and Gisbert, E., 2013.** Cadmium exposure affects the expression of genes involved in skeletogenesis and stress response in gilthead sea bream larvae. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 39, No. 3, pp: 649-659.
18. **Shobikhuliatul, J.J.; Andayani, S.; Couteau, J.; Risjani, Y. and Minier, C., 2013.** Some aspect of reproductive biology on the effect of pollution on the histopathology of gonads in *Puntius javanicus* from Mas river, surabaya, indonesia. J. Biol. Life Sci. Vol. 4, pp: 191-205.
19. **Sobha, K.; Poornima, A.; Harini, P. and Veeraiah, K., 2007.** A study on biochemical changes in the fresh water fish. (*Catla catla*) exposed to the heavy metal toxicant cadmium chloride. Journal of Science Engineering and Technology. Vol. 1, No. 5. pp: 1-11.
20. **Yacoub, A.M. and Gad, N.S., 2012.** Accumulation of some heavy metals and biochemical alterations in muscles of Oreochromis niloticus from the River Nile in Upper Egypt. Int. J. Environ. Sci. Eng. Vol. 3, pp: 1-10.
21. **Zhang, Q.F.; Li, Y.W.; Liu, Z.H. and Chen, Q.L., 2016.** Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Aquatic Toxicology. Vol. 177, pp: 1-10.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.132244

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 4, Winter 2020

Effects of different doses of CuSo4 on the expression of vitellogenin in females Zebrafish (*Danio rerio*)

- **Bahareh Shokouhian Ghahfarokhi:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Roghieh Safari*:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Mohamad Reza Imanpour**: Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- **Ali Jafer Nodeh:** Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: April 2019 Accepted: July 2019

Key words: Copper sulfate, Gene expression, Vitologenin, Zebra fish

Abstract

The present study investigates, the effects of sub lethal doses of $CuSo_4$ on the expression of vitellogenin (Vtg) in females Zebrafish (*Danio rerio*). For this purpose, 180 Zebrafish with an average weight of 0.3±0.05 gr were exposed to two doses of 0.02 and 0.046 mg /l of $CuSo_4$, and a control group for 30 days. At the end of experiment RNA extracted from liver, cDNA synthesized with Superscript RTase kit and PCR was done using primers relate to Vtg and Beta-actin as housekeeping genes. The evaluation of Vtg expression genes showed reduction in $CuSo_4$-treated groups compared to the control. In the $CuSo_4$-treated groups (0.02 and 0.04 mg /l), Vtg gene expression was 0.66 and 0.59 fold of control which showed dose-dependent reduction pattern. Results indicated that $CuSo_4$ can have a negative effect on the growth and development of sexual cells in zebra fish.

* Corresponding Author's email: fisheriessafari@yahoo.com