دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"
دوره ششم، شماره چهارم، زمستان ۹۷
http://jair.gonbad.ac.ir

بررسی الگوی بیان ژن bone gla protein و matrix gla protein به‌عنوان شاخص‌های اسکلت زایی در تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* Bordin, 1897

حمید اسحق‌زاده[۱]، آرش اکبرزاده*[۲]، مهتاب یارمحمدی[۳]، انریک گیسبرت[۴]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
[۲]دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
[۳]استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.
[۴]محقق ارشد موسسه تحقیقات غذا و کشاورزی (IRTA)، تاراگونا، اسپانیا

تاریخ ارسال: ۹۶/۴/۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۷

چکیده

bone gla protein و matrix gla protein از نظر تکاملی منشا مشترکی دارند و دارای ویژگی‌های ساختاری مشابه هستند و در شکل‌گیری ساختارهای اسکلتی نقش دارند. در مطالعه حاضر روند بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های وابسته به ویتامین K (VKDPs) در اسکلت تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) در زمان تفریخ (۰)، ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۲۰، ۳۰، ۵۰ روز پس از تفریخ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از qRT-PCR (quantitative real-time PCR) نشان داد که بیان ژن (VKDPs) شامل bgp and mgp به‌طور قابل توجهی در زمان شروع تغذیه خارجی افزایش یافت و تائیدکننده احتمال نقش این پروتئین‌ها در غضروف‌سازی در مراحل اولیه لاروی می‌باشد. حداکثر بیان ژن bgp و mgp در انتهای مرحله لاروی از روز ۲۰ پس از تفریخ می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت این ژن‌ها در معدنی شدن اسکلت خارجی باشد. نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان شاخصی در جهت پاسخ به نیازهای عملکردی ماهی (عوامل زیستی و غیر زیستی پرورش) و مقایسه با فرآیند کلسیم‌گیری بین ماهیان استخوانی و خاویاری، کیفیت لاروی و بروز ناهنجاری اسکلتی در ماهیان خاویاری کمک کند.

واژه‌های کلیدی: ***A. persicus*، تکامل لاروی، بیان ژن، اسکلت، ژن‌های کدکننده پروتئین‌های وابسته به ویتامین K**

*نویسنده مسئول: akbarzadeh@ut.ac.ir

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

مقدمه

سیستم اسکلتی ماهیان حمایت مکانیکی بافت‌های نرم و تعادل ماهیچه‌های حرکتی را فراهم می‌سازد و همچنین در فراهم کردن سیستم حرکتی بهینه، منبع تامین فسفر و کلسیم در مراحل مختلف فیزیولوژیک و همچنین هموستازی کلسیم نقش به‌سزایی دارند (Boglione *et al.*, 2013a). شناسایی نحوه اسکلت‌زایی ماهیان نه تنها از نظر فهمیدن تغییرات در رفتار شنا (Osse and Van den Boogart, 1995)، بلکه همچنین برای ارزیابی کیفیت ماهیان تولیدشده در تفریخگاه دارای اهمیت به‌سزایی می‌باشند (Boglione *et al.*, 2013a, b). ناهنجاری‌های اسکلتی عموماً در خلال مراحل لاروی و بچه‌ماهی، زمانی که فرآیند شکل‌گیری اسکلت ماهی به ساختار نهایی خود دست یابد، ظاهر می‌شود (Boglione *et al.*, 2013a). این فرآیند تحت تأثیر فاکتورهای زیادی مانند فیزیولوژی، محیط زندگی و تغذیه قرار می‌گیرد (Boglione *et al.*, 2013b). بنابراین، زمانی که تولید ماهی جهت بازسازی ذخایر و مصرف انسانی مطرح باشد، شناسایی تأثیر این عوامل در مراحل رشد و تکامل لاروی یک شاخص مؤثر برای ارزیابی شرایط پرورشی (مانند محیط زندگی و تغذیه) و کیفیت لارو محسوب می‌شود. به علاوه، رشد و توسعه اسکلت به عنوان یک مدل جذاب برای مطالعه پروتئین و بیان ژن‌های دخیل در اسکلت‌زایی مطرح است (Gavaia *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2011). شکل‌گیری استخوان و غضروف در ماهیان تحت تأثیر دامنه وسیعی از ژن‌ها می‌باشد (Boglione *et al.*, 2013a). در این مطالعه، گروه خاصی از ژن‌های کدکننده پروتئین وابسته به ویتامین K (VKDPs) مورد توجه هستند که به پروتئین‌های گاما کربوکسی گلوتامیک اسید معروف می‌باشند که شامل گلاپروتئین استخوان (BGP)، گلاپروتئین غضروف (MGP) و پروتئین غنی از گلا (GRP) می‌باشند (Dourado-Villa *et al.*, 2017). این گروه از پروتئین‌ها متعلق به خانواده (VKDPs) در اتصال کلسیم به بخش آلی غضروف و استخوان نقش دارند و به وسیله وجود چندین شاخه گلا در ساختار خود شناخته شده می‌باشند. این شاخه‌های گلا بر اثر تبدیل و تغییرات پس از ترجمه گلوتامیت (Glu) به کربوکسی گلوتامیک اسید (Gla) براثر فعالیت آنزیم گاما گلوتامیل کربوکسیلاز (GGCX) به وجود می‌آید (Vermeer 1990; Viegas *et al.*, 2008). پروتئین BGP و MGP در تنظیم جذب مواد معدنی در بافت‌های معدنی شده ساختارهای اسکلتی دارای اهمیت می‌باشند (Viegas *et al.*, 2013). پروتئین BGP توسط سلول‌های استئوبلاست و ادئنتوبلاست ساخته می‌شود و به‌عنوان یک تنظیم‌کننده در بلوغ استخوان نقش دارد (Boskey *et al*,, 1998; Krossøy *et al.*, 2009). پروتئین MGP همچنین توسط سلول‌های استئوبلاست ساخته می‌شود اما در مقابل با BGP، این پروتئین همچنین توسط انواع سلول‌های دیگر مانند کوندروسیت و سلول‌های عضلات صاف بافت‌های عروقی ساخته می‌شود (Krossøy *et al.*, 2009). اعتقاد بر این است که پروتئین MGP برای تنظیم جذب مواد معدنی در سیستم عروقی و بافت غضروف دارای اهمیت بیشتری است و دارای نقش کمی در تنظیم بلوغ سلول‌های کوندروسیت می‌باشد

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

(Luo *et al.*, 1997). مطالعات گذشته در ماهیان استخوانی عالی نشان داد که افزایش بیان ژن bgp و mgp مطابق با معدنی شدن ساختار ستون فقرات در خلال تکامل لاروی می‌باشد (Gavaia *et al.*, 2006). علیرغم نقش VKDPs در کنترل فرآیند معدنی شدن ساختارهای اسکلتی و شکل‌گیری ماده زمینه‌ای موجود در استخوان و غضروف، اطلاعاتی در ارتباط با بیان ژن‌های کدکننده VKDPs مانند bgp و mgp در خلال تکامل لاروی تاسماهیان گزارش نشده است. اگرچه، مشخص شده است که bgp و mgp در تاسماهیان در تمام بافت‌های نرم و سخت بیان می شود ولی این دو ژن از نظر میزان بیان ژن در بافت‌های مختلف متفاوت هستند و میزان بیان ژن در بافت استخوان و غضروف تاسماهیان در مقایسه با پستانداران (Viegas *et al.*, 2008; Viegas *et al.*, 2013) و ماهیان استخوانی عالی (Krossøy *et al.*, 2009) بالاتر می‌باشد.

کاهش شدید ذخایر طبیعی تاسماهیان در ۳۰ سال گذشته و افزایش تقاضا برای خاویار منجر به توسعه روش‌هایی برای پرورش این ماهی در مزارع پرورشی خصوصاً با هدف استحصال خاویار شده است. برطبق گزارش برونزی و همکاران (Bronzi *et al.*, 2011)، میزان خاویار پرورشی ۲۶۰ تن در سال ۲۰۱۱ گزارش شد و تخمین زده شد که این میزان به ۵۰۰ تا ۷۵۰ تن در ده سال آتی برسد. تاسماهیان متعلق به زیر رده ماهیان غضروفی-استخوانی می‌باشند و می‌توانند در فراهم کردن اطلاعات مؤثر در مکانیسم تکامل مهره‌داران خصوصا ماهیان عالی نقش داشته باشند (Viegas *et al.*, 2013). این ماهیان حدود ۴۵۰ میلیون سال پیش از اجداد خود انشقاق یافته و برخلاف ماهیان عالی اسکلت پوستی خود را حفظ کرده‌اند (Jollie 1980; Grande and Hilton 2006; Hilton *et al.*, 2011). با توجه به اینکه اسکلت غضروفی داخلی، ۵ ردیف صفحات استخوانی و فلس‌های گانوئیدی در سطح بدن، نداشتن مهره در ستون فقرات و اسکلت‌زایی منحصر به فرد آن‌ها از ویژگی‌های خاص اسکلتی در تاسماهیان به شمار می‌آید (Viegas *et al.*, 2008)، بررسی الگوی ژن‌های دخیل در روند اسکلت‌زایی و شناخت مراحل مهم در زمان اسکلت‌زایی این گونه با ارزش تجاری و در معرض خطر از اهمیت بالایی برخوردار است. بنابراین، با توجه به این که bgp و mgp در سطح پروتئین دارای قرابت نزدیک هستند و همچنین دارای یک منشاء اجدادی مشترک در طول تکامل می‌باشند (Viegas *et al.*, 2013)، هدف مطالعه حاضر در جهت بررسی الگوی تغییرات بیان ژن bgp و mgp در طول تکامل لاروی می‌باشد که در شکل‌گیری و معدنی شدن بافت اسکلتی نقش دارند. این اطلاعات می‌تواند به عنوان شاخصی برای تکامل طبیعی لاروی، مطالعات مربوط به ناهنجاری‌های اسکلتی و تغذیه‌ای مورد استفاده قرار گیرد و باعث ارتقاء و موفقیت برنامه‌های پرورش لاروی این گونه با ارزش شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها از تکثیر مصنوعی مولدین تاسماهی ایرانی در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری دکتر شهید بهشتی در شهرستان رشت جمع آوری شد. تکثیر مصنوعی توسط تزریق داخل صفاقی، ۳ میکروگرم

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

در کیلوگرم وزن بدن LHRH-α2 انجام شد. تخم‌های گرفته شده از هر ماده با مخلوط اسپرم چندین نر آمیخته شد. تخم‌های لقاح یافته پس از ۷ روز در دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد تفریخ شدند. سپس لاروهای تازه هچ شده به ترافهایی که به سیستم آب رودخانه و چاه متصل بود انتقال داده شدند. لاروهای تازه هچ شده در مرحله شروع تغذیه خارجی با آرتمیا تغذیه شدند و رژیم نوری ماهیان در طول دوره پرورش (۱۲L:۱۲D) و دمای آب ۱۹-۱۳ درجه سانتی‌گراد بود. نمونه‌ها در ۱۰ زمان مختلف شامل: زمان تفریخ (۰)، ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۲۰، ۳۰، ۵۰ روز پس از تفریخ جمع‌آوری شدند. در هر مرحله زمانی ۱۰ عدد لارو بطور تصادفی نمونه‌برداری شد (۶ لارو به‌عنوان تکرار بیولوژیک و ۳ تکرار تکنیکال از هر لارو در هر مرحله زمانی استفاده شد). پس از نمونه‌برداری، شستشوی نمونه‌ها با آب دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC) انجام شدو بلافاصله به درون تیوب‌های عاری از RNase قرار داده شد و سپس در نیتروژن مایع فرو برده شد و تا شروع استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد در مرکز بانک ژن ماهیان خاویاری کشور نگهداری شدند (Akbarzadeh *et al.*, 2011).

RNA تام از نمونه‌های انتخاب‌شده با استفاده از واکنش‌گر BIOZOL (Bioflux–Bioer, China) و بر پایه دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت RNA از روش اسپکتروفتومتری (Thermo Scientific, Wilmington, DC, USA) و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. به طور معمول جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود و در این نسبت برای RNA خالص بین ۲-۱/۸ مشخص گردید. یک میکروگرم از RNA تام جهت ساخت اولین رشته cDNA با استفاده از کیت BioRT (Bioflux-Bioer) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده آن ساخته شد.

در مطالعه حاضر از توالی ژن‌های bgp و mgp در تاسماهی آدریاتیک (accession numbers: EF413584, EU482149.1) استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی ژن mgp با توجه به نواحی محافظت‌شده و یکسان این ژن در گونه‌های مختلف ماهیان موجود در بانک ژن NCBI (تاسماهی آدریاتیک: HM182000.1، شانک سر طلایی: AY065652.1، توربوت: DQ304476.1) طراحی گردید. به این منظور طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 (v 0.4.0) صورت پذیرفت. اختصاصیت و سایز قطعات بدست آمده با جفت پرایمرهای ساخته شده از طریق ژل آگاروز ۱/۵٪ بررسی شد. سپس قطعات تکثیر یافته در یک مرکز تجاری تعیین توالی (Bioneer, Daejeon, South Korea) به‌وسیله کیت (CloneJET TM PCR Cloning Kit, Fermentas, France) توالی‌یابی شد. صحت کروماتوگرام‌های به‌دست آمده از توالی‌یابی ژن‌های هدف توسط نرم‌افزار BioEdit (version 7.0.8) مورد بررسی قرار گرفت و سپس توسط این نرم‌افزار به طور دستی هم‌ردیف گردید. همچنین شباهت‌های موجود در توالی ژن‌های هدف در تاسماهی ایرانی نسبت به توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI (http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

بلاست شد. ژن RPL6 به عنوان ژن کنترل داخلی جهت نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن‌های هدف در مراحل تکوینی تاسماهی ایرانی، انتخاب گردید (جدول ۱) (Akbarzadeh *et al.*, 2011).

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده برای ژن‌های هدف و رفرنس تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) در واکنش quantitative real-time PCR.

Genes	Primers, Forward/Reverse	طول قطعه
Bone Gla protein	F- TCTGACGCTGTTTTGCTCCAGTAAATCTCG R- CGTTTCAGGGAAAATACCCAAAAGCAATA	۹۳
Matrix Gla protein	F- CTGGCTACTACTATGAGAGGTTAATGG R- GGTCACATGGGGTGTGCT	۱۱۷
Ribosomal protein L6	F- GTGGTCAAACTCCGCAAGA R- GCCAGTAAGGAGGATGAGGA	۱۴۹

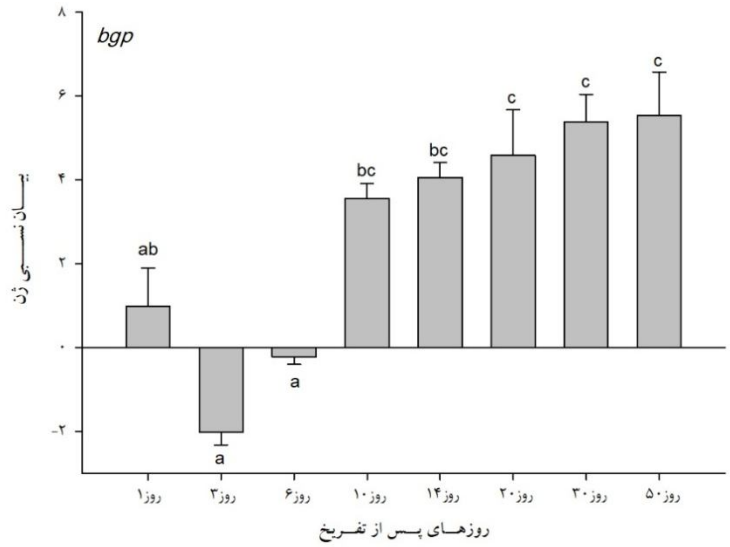
واکنش Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) با استفاده از دستگاه CFX96 (BIO-RAD,USA) و نرم‌افزار CFX Manager انجام شد. آنالیز کمی PCR برای ژن‌های هدف با استفاده از SYBR ® Green I (Bioflux-Bioer) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده آن و در ۳ تکرار جداگانه برای هر نمونه انجام گردید. تمامی واکنش‌ها در دستگاه تحت شرایط: ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشته‌سازی و فعال‌سازی اولیه، در ادامه ۴۰ چرخه حرارتی شامل ۱۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله الحاق ۱۵ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و مرحله بسط ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. هر واکنش در حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر با ۶ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۰/۱۸ میکرولیتر آغازگر پیشرو و ۰/۱۸ آغازگر پس‌رو، ۰/۲۴ میکرولیتر محلول ROX، ۰/۰۷ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۳/۳۳ آب مقطر استریل و ۲ میکرولیتر نمونه cDNA انجام شد. میزان Baseline، threshold برای محاسبه Ct، آنالیز منحنی ذوب برای تأئید اختصاصیت ژن هدف و عدم حضور پرایمر دایمر و منحنی استاندارد برای کارایی PCR برای نمونه‌های مورد مطالعه براساس اکبرزاده و همکاران (Akbarzadeh *et al.*, 2011) تعیین گردید. قبل از آنالیز آماری، راندمان تکثیر (E) ژن اختصاصی و ژن رفرنس بر مبنای $E\% = (10^{1/slope} - 1) \times 100$ محاسبه شد (Radonic *et al.*, 2006). راندمان تکثیر برای ژن‌های هدف و رفرنس بیم ۹۱ تا ۹۹ درصد گزارش شد. بیان نسبی ژن هدف به ژن مرجع بر اساس رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید (Livak and Schmittgen, 2001) که در آن ابتدا ΔCt ژن هدف= (Ct ژن هدف − Ct ژن مرجع) و سپس ΔCt ژن کالیبراتور= (Ct ژن کالیبراتور − Ct ژن مرجع) محاسبه شد. در مرحله بعد تمامی داده‌ها با توجه به مقدار به‌دست‌آمده ΔCt کالیبراتور و ΔCt ژن هدف و طبق فرمول $\Delta\Delta Ct$ = (ΔCt ژن هدف- ΔCt ژن کالیبراتور)، نرمال‌سازی شدند. شایان ذکر است که در میان تمامی داده‌ها، نمونه ۱ روز پس از تفریخ به‌عنوان نمونه کالیبراتور، جهت اندازه‌گیری تفاوت مقدار بیان ژن هدف، انتخاب گردید.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

تمامی داده‌های کمی به شکل $\log_2$ تبدیل شد و به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) ارائه شد. از آزمون بارتلت و کولموگروف-اسمیرنوف جهت بررسی یکنواخت بودن واریانس و نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. جهت مقایسه‌های آماری میزان بیان ژن در مراحل تکوینی از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به‌دنبال آن آزمون چند دامنه توکی در سطح ۹۵٪ ($P<0.05$) استفاده شد. تمامی آنالیزهای آماری در نرم‌افزار (SPSS-20) و (SigmaPlot version 11.0) انجام شد.

نتایج

بیان ژن bgp و mgp در تمام مراحل تکاملی لارو تاسماهی ایرانی از آغاز تا پایان مطالعه قابل تشخیص بود. میزان بیان ژن bgp در طول تکامل لاروی تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P<0.05$). همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، بیان ژن bgp در تاسماهی ایرانی از آغاز تغذیه خارجی (۱۰ روز پس از تفریخ) تا ۵۰ روز پس ازتفریخ به طور معنی‌داری افزایش یافت. بالاترین میزان بیان ژن bgp در ۳۰ روز پس از تفریخ و در مرحله بچه‌ماهی مشاهده شد.

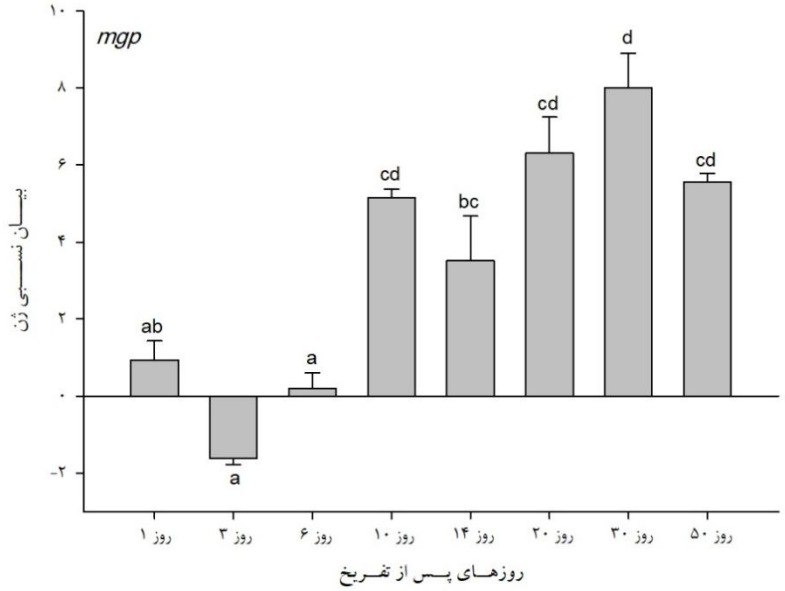


شکل ۱- مقادیر نسبی بیان ژن bgp نسبت به ژن رفرنس rpl6 در مراحل مختلف رشد و تکامل لاروی تاسماهی ایرانی (*A. persicus*)

تغییرات بیان ژن mgp در طول تکامل لاروی تاسماهی ایرانی در شکل ۲ نشان داده شده است. تغییرات معنی‌داری در میزان بیان ژن mgp در مرحله پیش‌لاروی، لاروی و بچه‌ماهی مشاهده شد

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

(P<۰/۰۵). این تغییرات مانند بیان ژن bgp دارای یک روند افزایشی می‌باشد. اگرچه میزان بیان ژن mgp در خلال مرحله پیش‌لاروی اختلاف معنی‌داری نشان نداد، اما همزمان با آغاز تغذیه خارجی روندی افزایشی مشاهده شد.



شکل ۲- مقادیر نسبی بیان ژن mgp نسبت به ژن رفرنس rpl6 در مراحل مختلف رشد و تکامل لاروی تاسماهی ایرانی (*A. persicus*)

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، میزان بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های خارج سلولی bgp و mgp از روز ۱۰ پس از تفریخ و همزمان با آغاز تغذیه خارجی در تاسماهی ایرانی مشاهده شد. صرف نظر از این حقیقت که ژن‌های bgp و mgp فقط در ساختارهای اسکلتی بیان نمی‌شود (Dourado-Villa *et al.*, 2017)، بیان ژن‌های مذکور در تاسماهی ایرانی با نتایج بدست آمده اسحق‌زاده و همکاران (EshaghZadeh et al., 2017) در شروع فرآیند استخوانی شدن و توسعه ساختارهای غضروفی مرتبط با فعالیت‌های تغذیه‌ای، تنفسی و شنا همسو بود. نتایج به دست آمده نشان داد که در صورت مناسب بودن سرعت تبدیل mRNA به پروتئین (بهره‌وری ترجمه) و همزمان بودن بیان ژن با ترجمه، نقش پروتئین‌های خانواده گالا موجود در بافت استخوان و غضروف در استخوانی‌شدن اسکلت تاسماهیان امکان‌پذیر می‌باشد. اهمیت بیولوژیک روند افزایشی در بیان ژن bgp و mgp در مطالعه حاضر می‌تواند مرتبط با نیاز برای مکانیسم کارآمدتر برای کنترل معدنی شدن، تکامل اندام و سیستم‌های مختلف در جهت

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

تامین نیازهای عملکردی لاروهای در حال رشد باشد (Gavaia *et al*., 2006; Wang *et al*., 2014). مقایسه نتایج به‌دست آمده از این مطالعه و سایر مطالعات گذشته از مهره‌داران عالی (Gavaia *et al*., 2006; Viegas *et al*., 2013) حاکی از تائید فرضیه عملکرد یکسان پروتئین‌های خانواده گالا از تاسماهیان تا انسان در طول یک دوره تکاملی بیش از ۴۵۰ میلیون سال می‌باشد. بیان ژن bgp از آغاز تغذیه خارجی تا انتهای مطالعه افزایش یافت. این پروتئین توسط سلول‌های استئوبلاست موجود در ساختارهای در حال معدنی شدن و اودونتوبلاست در خلال اسکلت‌زایی تولید می‌شود (Pinto *et al*., 2001). بیان ژن bgp به طور قابل توجهی در بافت‌های استخوانی نسبت داده شده است که در مطالعات انجام شده روی دوزیستان (Viegas *et al*., 2002)، ماهیان عالی (Bensimon-Brito *et al*., 2012) و تاسماهیان (Viegas *et al*., 2013) گزارش شده است. افزایش بیان ژن bgp از ۱۰ روز پس از تفریخ مشاهده شد که در مطالعات پیشین به منظور بررسی شروع و روند معدنی‌شدن ساختارهای پوستی قسمت سر و تنه در خلال تکامل لاروی تاسماهی ایرانی مطابقت داشت (Eshaghzadeh *et al*., 2017) که نشان‌دهنده نقش این پروتئین در فرآیند اسکلت‌زایی است.

روند افزایشی بیان ژن bgp در تاسماهی ایرانی مشابه با مطالعات انجام شده در سی‌باس اروپایی (*Dicentrachus labrax*) (Darias *et al*., 2010)، زبرا فیش (*Danio rerio*) و کفشک‌ماهی (*Solea senegalensis*) (Gavaia *et al*., 2006) است. این مطالعه اولین گزارش از بیان ژن mgp در خلال تکامل لاروی تاسماهیان ماهیان است. پائین‌ترین میزان بیان ژن mgp در زمان تغذیه داخلی مشاهده شد. بعد از این مرحله میزان بیان ژن mgp تا روز ۳۰ پس از تفریخ روند افزایشی داشت و سپس همزمان با آغاز مرحله جوانی تا روز ۵۰ پس از تفریخ روند کاهشی مشاهده شد. در مطالعات گذشته مشخص شده که پروتیئن MGP در تاسماهیان بالاترین شاخه‌های گالا را در بین تمام مهره‌دارن داراست. این پروتئین به عنوان تنظیم‌کننده در فرآیند معدنی شدن اجزاء غضروفی و ساختارهای درون غشایی (intramembranous) و همچنین عامل اصلی برای تمایز و بلوغ سلول‌های کوندروسیت شناخته شده است (Viegas *et al*., 2013). مطالعات اخیر وجود بیان ژن mgp در طیف وسیعی از بافت‌های نرم، غضروفی و استخوانی در تاسماهیان (Viegas *et al*., 2013)، ماهیان عالی مانند ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar* L.)، (Krossøy *et al*., 2009) و کفشک‌ماهی (*Scophtalmus maximus*) (Roberto *et al*., 2009) را تأئید کرده است. مطابق با مطالعات مورفولوژیک گذشته در تاسماهی ایرانی، افزایش قابل توجه بیان ژن mgp از روز ۲۰ پس از تفریخ خصوصاً در روز ۳۰ پس از تفریخ در تاسماهی ایرانی می‌تواند در ارتباط با معدنی شدن شدید ساختارهای پوستی مختلف در قسمت سر و تنه مانند استخوان زیر سرپوش آبششی (subopercle)، فوق غرابی (supracleithrum)، استخوان آهیانه (parietal) و صفحات استخوانی پشتی، جانبی و شکمی باشد. این روند افزایشی در میزان بیان ژن mgp

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

در ماهیان عالی مانند زبرافیش (*Danio rerio*)، کفشک‌ماهی (*S. senegalensis*) و شانک سرطلایی (*Sparus aurata*) گزارش شده است که به ترتیب در خلال تکامل لاروی همزمان با شروع تغذیه خارجی، متامورفوز و پایان مرحله لاروی مشاهده می‌شود (Gavaia *et al*., 2000 and 2006).

نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده افزایش بیان ژن‌های کدکننده پروتئین bgp و mgp در خلال تغذیه خارجی می‌باشد که مطابق با مطالعات گذشته مربوط به روند مورفولوژیک و شروع روند معدنی شدن استخوان در تاسماهی ایرانی می‌باشد و همچنین نشان دهنده اهمیت این پروتئین‌ها در معدنی شدن ساختارهای پوستی در خلال تکامل لاروی تاسماهیان است. نتایج این مطالعه می‌تواند به عنوان یک شاخص در مطالعات ارزیابی کیفیت لارو در زمان اسکلت‌زایی تاسماهیان و وقوع ناهنجاری‌های اسکلتی مورد استفاده قرار گیرد و با توجه به ارتباط عملکردی این پروتئین‌ها با ویتامین K می‌توان در مطالعات مقایسه‌ای مشابه اثر فاکتورهای زیستی و غیر زیستی و همچنین تغذیه‌ای مانند به‌کارگیری درصدهای مختلف ویتامین K در غذای فرموله شده یا غنی‌سازی در غذای زنده به نقش آنها در میزان تلفات لاروی، رشد و درصد بروز ناهنجاری‌های اسکلتی اشاره نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از ریاست محترم موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور جناب آقای دکتر پورکاظمی، مسئولان و کارشناسان محترم موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر و مرکز بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی و همچنین راهنمایی‌های دکتر کاظمی و مهندس پرشکوه به‌دلیل همکاری‌های بی‌کران و صمیمانه‌شان سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Akbarzadeh A., Farahmand H., Mahjoubi F., Nematollahi M.A., Leskinen P., Rytkönen K., Nikinmaa M. 2011. The transcription of l-gulono-gamma-lactone oxidase, a key enzyme for biosynthesis of ascorbate, during development of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Comparative Biochemistry and Physiology B, 158: 282-288.

Bensimon-Brito A., Cardeira J., Cancela M.L., Huysseune A., Witten P.E. 2012. Distinct patterns of notochord mineralization in zebrafish coincide with the localization of Osteocalcin isoform 1 during early vertebral centra formation. BMC Developmental Biology, 12: 1-28.

Boglione C., Gavaia P., Koumoundouros G., Gisbert E., Moren M., Fontagné S., Witten P.E. 2013a. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. Reviews in Aquaculture, 5: 99-120.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

Boglione C., Gisbert E., Gavaia P., Witten P.E., Moren M., Fontagné S., Koumoundouros G. 2013b. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. Reviews in Aquaculture, 5: 121-167.

Boskey A., Gadaleta S., Gundberg C., Doty S., Ducy P., Karsenty G. 1998. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. Bone, 23: 187-196.

Bronzi P., Rosenthal H., Gessner J. 2011. Global sturgeon aquaculture production: an overview. Journal of Applied Ichthyology, 27: 169-175.

Darias M., Lan Chow Wing O., Cahu C., Zambonino-Infante J., Mazurais D. 2010. Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Journal of Applied Ichthyology, 26: 280-285.

Dourado-Villa J.K., Diaz M.A.N., Pizziolo V.R., Martino H.S.D. 2017. Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: a review of mechanisms of action and evidences. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(18): 3959-3970.

Eshaghzadeh H., Akbarzadeh A., Yarmohammadi M., Gisbert A. 2017. Ontogenesis trending Respiratory and feeding structure of head skeleton in (*Acipenser persicus* Bordin, 1897). Journal of Aquatic Ecology, 6: 55-63. (In Persian).

Fernández I., Darias M., Andree K.B., Mazurais D., Zambonino-Infante J.L., Gisbert E. 2011. Coordinated gene expression during gilthead sea bream skeletogenesis and its disruption by nutritional hypervitaminosis A. BMC Developmental Biology, 11: 1-7.

Gavaia P.J., Sarasquete C., Cancela M.L. 2000. Detection of mineralized structures in early stages of development of marine Teleostei using a modified alcian blue-alizarin red double staining technique for bone and cartilage. Biotechnic & Histochemistry, 75: 79-84.

Gavaia P.J., Simes D.C., Ortiz-Delgado J., Viegas C.S., Pinto J.P., Kelsh R.N., Sarasquete M.C., Cancela M.L. 2006. Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal S. senegalensis: Comparative gene and protein expression during larval development through adulthood. Gene Expression Patterns, 6: 637-652.

Grande L., Hilton E.J. 2006. An exquisitely preserved skeleton representing a primitive sturgeon from the Upper Cretaceous Judith River Formation of Montana (Acipenseriformes: Acipenseridae). Journal of Paleontology, 80: 1-39.

Hilton E.J., Grande L., Bemis W.E. 2011. Skeletal anatomy of the shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesueur, 1818, and the systematics of sturgeons (Acipenseriformes, Acipenseridae). Fieldiana Life and Earth Sciences, 3: 1-168.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

Jollie M. 1980. Development of head and pectoral girdle skeleton and scales in Acipenser. Copeia, 2: 226-249.

Krossøy C., Ørnsrud R., Wargelius A. 2009. Differential gene expression of bgp and mgp in trabecular and compact bone of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vertebrae. Journal of Anatomy, 215: 663-672.

Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expressiond using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods, 25: 402-408.

Luo G., Ducy P., McKee M.D., Pinero G.J., Loyer E., Behringer R.R., Karsenty G. 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. Nature, 386: 78-81.

Osse J., Van den Boogaart J. 1995. Fish larvae, development, allometric growth, and the aquatic environment. ICES Marine Science Symposia, 201: 21–34.

Pinto J., Ohresser M., Cancela M. 2001. Cloning of the bone Gla protein gene from the teleost fish (*Sparus aurata*). Evidence for overall conservation in gene organization and bone-specific expression from fish to man. Gene, 270: 77-91.

Radonic L.M., Zimmermann J.M., Zavallo D., Lopez N., Lopez Bilbao M. 2006. Rooting in Km selective media as efficient in vitro selection method for sunflower genetic transformation. Electronic Journal of Biotechnology, 9(3): 315-319.

Roberto V.P., Cavaco S., Viegas C.S., Simes D.C., Ortiz-Delgado J.B., Sarasquete M.C., Gavaia P.J., Cancela M.L. 2009. Matrix Gla protein in turbot (*Scophthalmus maximus*): Gene expression analysis and identification of sites of protein accumulation. Aquaculture, 294: 202-211.

Vermeer C. 1990. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. Biochemical Journal, 266: 625-636.

Viegas C.S., Pinto J., Conceicao N., Simes D., Cancela M. 2002. Cloning and characterization of the cDNA and gene encoding *Xenopus laevis* osteocalcin. Gene, 289: 97-107.

Viegas C.S., Simes D.C., Laizé V., Williamson M.K., Price P.A., Cancela M.L. 2008. Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates. Journal of Biological Chemistry, 283: 36655-36664.

Viegas C.S., Simes D.C., Williamson M.K., Cavaco S., Laizé V., Price P.A., Cancela M.L. 2013. Sturgeon Osteocalcin Shares Structural Features with Matrix Gla Protein evolutionary relationship and functional implications. Journal of Biological Chemistry, 288: 27801-27811.

Wang S., Furmanek T., Kryvi H., Krossøy C., Totland G.K., Grotmol S., Wargelius A. 2014. Transcriptome sequencing of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) notochord prior to development of the vertebrae provides clues to regulation of positional fate, chordoblast lineage and mineralisation. BMC Genomics, 15: 141-147.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-11-05]