



تکوین لوله گوارش با اشاره ویژه بر ظرفیت پروتئازهای اسیدی و قلیایی در لارو ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*)

سمیرا ناظم‌رعا^۱، محمدعلی نعمت‌اللهی^{۲*}، راضیه یزدان‌پرست^۳، حمید فرحمنند^۴، آناهیتا رضایی^۵

۱. استادیار پژوهشکده آبروی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، اهواز، ایران

۲. دانشیار گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. استادگروه بیوشیمی مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۵. دانشیار قطب علمی بهداشت و بیماری‌های آبزیان گرمابی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۰

چکیده

هدف این مطالعه، بررسی فعالیت پروتئازهای مهم (پپسین، تریپسین)، بیان نسبی ژن پپسینوژن و همچنین تکامل بافتی لوله گوارش در لارو ماهی صبیتی از زمان تفریح تا ابتدای دوره نوجوانی (۴۰ روز پس از تفریح) بود. نتایج نشان داد که بخش برون ریز لوزالمعده حاوی گرانول‌های آنزیم‌ساز در خلال جذب کیسه زرده مشخص است و در روز ۱۴ پس از تخم‌گشایی بسیار توسعه می‌یابد. پیدایش زودهنگام فعالیت تریپسین پیش از باز شدن دهان، به فرآیندی با برنامه‌ریزی ژنتیکی نسبت داده شد. فعالیت تریپسین الگوی نوسانی (با دو پیک در روزهای ۱۶ و ۳۰ پس از تفریح) نشان داد که این نوسان همزمان با بلع غذا و در پاسخ به تغییر جیره در خلال تغذیه لارو بود. قابل توجه‌ترین تمایز در لوله گوارش تشکیل معده اولیه احاطه شده با سلول‌های عضلانی مخطط و ایجاد غدد معدی در روز ۱۲ پس از تخم‌گشایی بود. معده در روز ۲۵ به شکل کامل با تبدیل سلول‌های ماهیچه‌ای مخطط به صاف تکوین یافته بود. بیان نسبی ژن پپسینوژن تا پیش از روز ۱۲ پس از تفریح قابل تشخیص نبود و به شکل معنی‌داری از روز ۱۴ پس از تفریح مشخص گردید. بیان آن به شکل نمایی در طول مرحله لاروی افزایش یافت و این افزایش مطابق با تغییر در نوع جیره از غذای زنده به ریزجیره بود. فعالیت آنزیم پپسین همراستا با بیان ژن پپسینوژن بود و دو روز پس از آغاز بیان ژن پپسینوژن، مشخص گردید و پس از جایگزینی غذای زنده با غذای خشک (بین روزهای ۲۵ تا ۳۰ پس از تفریح) تا انتهای دوره آزمایش به شدت افزایش داشت. افزایش پیشرونده پپسین همزمان با کاهش در فعالیت تریپسین پس از اتمام مرحله جایگزینی غذای زنده با غذای خشک، بیانگر تغییر در فیزیولوژی هضمی در لارو ماهی صبیتی و حرکت به سمت شکل بالغ هضم پروتئین در لارو ماهی صبیتی بود. نتایج نشان داد که با پیدایش معده اولیه از روز ۱۲ ام پس از تخم‌گشایی، با بیان زودهنگام ژن پپسینوژن و نیز تکامل آنتوزنتیک زودهنگام پپسین و تریپسین، می‌توان در لارو ماهی صبیتی پیش از روز ۲۵ ام پس از تخم‌گشایی، لارو ها را با غذای خشک تغذیه کرد و بدین طریق امکان کاهش مصرف غذای زنده با بکارگیری غذای خشک وجود دارد.

واژگان کلیدی: فعالیت آنزیم، بیان ژن، بافت شناسی، تکامل لاروی، شانک ماهیان.



Ontogeny of the digestive tract with special reference to the acid and alkaline protease capacity in Sobaity (*Sparidentex hasta*)

Samira Nazemroaya¹, Mohammad Ali Nematollahi^{2*}, Razieh Yazdanparast³, Hamid Farahmand⁴, Annahita Rezaie⁵

1. Assistant Professor, South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

2. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Professor, Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran

4. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

5. Associate Professor, Excellence Center of Warm Water Fish Health and Disease, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 17-Jun-2020

Accepted: 21-Jul-2020

Abstract

This study aims to assay the main protease (pepsin and trypsin) activity and pepsinogen relative gene expression, as well as histological development of digestive tract in Sobaity (*Sparidentex hasta*) from hatching up to 40 days post-hatching (DPH). The results showed that exocrine pancreas, including zymogen granules, differentiated during yolk sac absorption and further developed at 14 DPH. The early appearance of trypsin before mouth opening is attributed to a genetically programmed process. The trypsin activity showed fluctuated pattern (with two peaks at 16 and 30 DPH), coincident with food intake, and related to diet shifting during larval feeding. The most obvious differentiation in the digestive tract was the formation of an incipient stomach surrounded by striated muscle fibers and the development of the gastric glands at 12 DPH. The stomach fully developed at 25 DPH with the transition from striated to smooth muscle cells. The pepsinogen relative gene expression was not detectable before 12 DPH and meaningfully detected at 14 DPH. The pepsinogen expression augmented exponentially coinciding with shifting diet from live to microdiet. Pepsin activity trend was considerably parallel to pepsinogen and started two days after pepsinogen, subsequently increased sharply during the weaning period (25-30 DPH) up to the end of the study. The progressive activity of pepsin synchronized with a decrease in trypsin activity after weaning indicates a change in the digestive physiology of Sobaity larvae moving toward the adult-type protein digestion pattern. The study concluded that the appearance of the incipient stomach at 12 DPH, early pepsinogen expression, and ontogenetic development of pepsin and trypsin, make it possible to feed Sobaity larvae by inert diet before 25 DPH to reduce the live food consumption and improve the weaning efficiency.

Key words: enzyme activity, gene expression, histology, larval development, Sparidae.

*Corresponding Author: Mohammad Ali Nematollahi

Email: malahi@ut.ac.ir

مقدمه

آگاهی از ظرفیت گوارشی با مشخص کردن فعالیت آنزیم‌ها و ارزیابی سیر تکامل آنها در خلال دوره لاروی می‌تواند به عنوان شاخصی برای تعیین نوع و مقدار مواد غذایی جای‌گیرنده در ریزجیره برای جایگزینی آنها با غذای زنده به کار آید (Alvarez-González et al., 2010; Yúfera and Darias, 2007). تعیین کننده ظرفیت لارو برای هضم و جذب انواع مختلف مواد مغذی موجود در غذاهای زنده و یا ریزجیره‌های ترکیبی باشد (Gisbert et al., 2009; Tong et al., 2012). زمان دقیق حرکت از سوی غذای زنده به جیره‌های مصنوعی را مشخص کند (Jimenez-Martinez et al., 2012) و همچنین انتقال زود هنگام مناسب به غذای دستی را امکان پذیر سازد (Uscanga-Martínez et al., 2011). معمولاً فعالیت بالای آنزیم‌های گوارشی نشان دهنده زمانی است که لارو ماهی از نظر فیزیولوژیکی آمادگی تغذیه خارجی دارد یا بیانگر زمانی است که در شرایط خوب تغذیه‌ای قرار دارد (Douglas et al., 2000). ارزیابی حضور و میزان فعالیت آنزیم‌های خاصی مانند تریپسین به عنوان شاخص تکامل لارو و پیش‌بینی کننده بقای لارو محسوب می‌گردد (Tong et al., 2012; Suzer et al., 2007a). ترشح تریپسین در بافت پانکراس در پاسخ به بلع غذا اتفاق می‌افتد (Cahu and Zambonino-Infante, 2001). بنابراین به طور مشخص فعالیت این پروتئاز نشانه قطعی توانایی لارو برای استفاده از غذای زنده و تاحدی جیره‌های ساختگی می‌باشد. پروتئاز گوارشی تریپسین یک شاخص کوتاه مدت مناسب منعکس کننده شرایط تغذیه‌ای لارو و ابزاری سودمند برای مطالعه نیازهای غذایی در لارو ماهیان دریایی می‌باشد (Kamaci et al., 2010).

بسیاری از ماهیان دریایی استخوانی در زمان تخم‌گذاری معده ندارند و عملکرد معده را در پایان دوره لاروی به دست می‌آورند (Feng et al., 2008a). به نظر می‌رسد که هماهنگی بین فعالیت تمام آنزیم‌های گوارشی به ویژه پروتئازها در خلال تکامل لاروی، شکل هضم را به طور پیشرونده‌ای از شکل درون سلولی به برون سلولی تغییر می‌دهد (Zambonino-Infante et al., 2008).

موفقیت این تغییر با حضور فعالیت پپسین در معده (Salze et al., 2012) و بیان ژن پپسینوژن به عنوان شاخص تمایز و کارایی معده مشخص می‌گردد (Feng et al., 2008b) که در ماهیان استخوانی به طور چشمگیری پس از زمان تغذیه با غذای ساختگی آغاز می‌گردد (Darias et al., 2007). معده کاملاً تکامل یافته نیز به عنوان اندامی کمک کننده و مهم برای سازگاری به جیره‌های ترکیبی خشک در لارو و بچه ماهی پس از دگردیسی در نظر گرفته می‌شود (Feng et al., 2008b; Wu et al., 2011). در مطالعات متعدد روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی برای تشریح روابط بین رونویسی ژن آنزیم گوارشی خاص و فعالیت آن ژن مانند باس شنی خالدار (Alvarez-González et al., 2008; 2010)، سرخوی گلی خالدار (Galaviz et al., 2012)، سی باس آسیایی (Srichanun et al., 2013)، توتوآبا (Galaviz et al., 2015) و گربه ماهی هندی (Mir et al., 2018) ترکیب شده است. توانایی دنبال کردن بیان ژن‌های آنزیم‌های گوارشی در سطح رونویسی، تخمینی دقیق و صحیح از کارایی دستگاه گوارش را فارغ از نشانه‌های مداخله‌گر آنزیم‌های موجود در غذای زنده ارائه می‌دهد که ممکن است در سنجش بیوشیمیایی تشخیص داده شوند (Murray et al., 2006). همچنین مشخص شده است که برای دستیابی به ظرفیت گوارشی لارو در حال تکامل، سنجش بیان ژن‌های گوارشی مفید می‌باشد زیرا مطالعات بافت شناسی به تنهایی انعکاس دهنده فعالیت واقعی دستگاه گوارش نمی‌تواند باشد (Galaviz et al., 2015).

صبیتی، ماهی بستری متعلق به مناطق گرمسیری با نام علمی *Sparidentex hasta* (Valenciennes, 1820) از خانواده شانک‌ماهیان و راسته سوف‌ماهی شکلان (Bauchot and Smith, 1984) می‌باشد که بومی خورهای بندر امام و ماهشهر بوده و در استان خوزستان و کشور کویت از بازارپسندی بسیار بالایی برخوردار است و در شرایط پرورشی از رشد نسبتاً سریعی برخوردار است (Teng et al., 1999). با وجود افزایش رغبت برای تولید این گونه، مشکلات مربوط به مراحل پرورش لاروی و هزینه‌های بالای سرمایه‌گذاری مربوط به پرورش غذای زنده و غنی‌سازی آن در این بخش همچنان پابرجاست.

استفاده از لامپ‌های فلورسنت بالای سر مخزن‌ها با دوره نوری ۱۲:۱۲ ساعت (روشنایی: تاریکی) انجام شد. در طول دوره پرورش لارو، میانگین شاخص های فیزیکی-شیمیایی: اکسیژن ($0.5 \pm 0.6 \text{ mg/l}$)، شوری ($0.5 \pm 0.5 \text{ ppt}$)، پی‌اچ ($7.7-8.1$) و دما ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) ثبت گردید.

۲.۲. سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی

برای سنجش فعالیت آنزیمی، نمونه برداری از لاروها در سه تکرار زیستی در روزهای ۰، ۲، ۵، ۱۰، ۱۴، ۱۶، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ بعد از تخم‌گذاری انجام گرفت. در ساعات‌های شبانه هیچ غذادهی صورت نمی‌گرفت و برای کاهش خطای تأثیر محتوی آنزیمی غذای زنده، نمونه-گیری صبح هنگام پیش از آغاز تغذیه انجام می‌گرفت (Kolkovski, 2001). با توجه به رشد لاروها، از روز اول تا روز ۱۶ نمونه‌برداری تعداد ۱۰۰ عدد لارو، در روزهای ۲۰ و ۲۵ تعداد ۸۰ لارو و در روزهای ۳۰، ۳۵ و ۴۰ تعداد ۶۰ عدد لارو نمونه‌گیری شدند، سپس در نیتروژن مایع منجمد غوطه‌ور و پس از آن به فریزر -70°C درجه سانتیگراد منتقل شدند (Gisbert *et al.*, 2009). نمونه-ها ابتدا توسط ازت مایع درون هاون چینی پودر و با نسبت ($10:1 \text{ w/v}$) با محلول 0.15 M کلریدسدیم مخلوط و همگن شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد در 15000 g دور سانتریفیوژ شدند تا روشنای حاوی عصاره خام آنزیمی جدا شود. برای تعیین فعالیت ویژه، پروتئین محلول در روشنای حاوی عصاره خام آنزیمی بر اساس mg ml^{-1} به دست آمد (Lowry *et al.*, 1951).

سنجش فعالیت کل و ویژه آنزیم تریپسین با استفاده از سوبسترای اختصاصی «بنزویل-آل-آرژینین-پی-نیتروآلینید» در طول موج 410 nm (Torrissen *et al.*, 1994) و پپسین با استفاده از سوبسترای کازئین در طول موج 220 nm (Rungruangsak- Torrissen *et al.*, 2006) صورت پذیرفت.

۳.۲. سنجش بیان ژن پپسینوژن

نمونه‌برداری برای بررسی بیان ژن تا روز ششم پس از تخم‌گذاری به صورت روزانه، از روز ششم تا بیستم پس از تخم‌گذاری یک روز در میان و از روز ۲۰ تا ۴۰ پس از تخم‌گذاری هر پنج روز یک بار صورت گرفت. با توجه به

بنابراین، آگاهی از ظرفیت هضمی پروتئازی در ارتباط با چگونگی به کارگیری غذای زنده و غذای میکرونایز شده خشک در مراحل پرورش لاروی این گونه ضروری است. لذا، در این مطالعه بررسی ظرفیت هضمی پروتئازهای قلیایی و اسیدی لارو ماهی صبیتی از زمان تخم‌گذاری تا انتهای ۴۰ روزگی (۱۰ روز پس از پایان نسبی دوره لاروی) با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های گوارشی معده (پپسین) و پانکراس (تریپسین)، اندازه‌گیری رونویسی ژن «پپسینوژن» و ارتباط آن با فعالیت آنزیم پپسین و همچنین تکوین لوله گوارش از دیدگاه بافت شناسی پرداخته شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تکثیر و پرورش لارو

نمونه های لارو ماهی صبیتی مورد استفاده از طریق تکثیر نیمه طبیعی مولدین صبیتی در کارگاه تکثیر ماهیان دریایی واقع در روستای بندر معلم از توابع بندر لنگه در غرب استان هرمزگان تأمین شد. پس از انجام عمل لقاح در مخزن، صبح روز بعد تخمهای لقاح یافته توسط توری (150μ) جمع آوری شد و پس از ضدعفونی و شمارش به مخازن 300 لیتری استوانه‌ای انتقال یافت. روش پرورش لاروها بر اساس روش توصیه شده پیشین برای ماهی صبیتی (Teng *et al.*, 1999) با اندکی تغییر صورت گرفت. لاروها با تراکم 80 قطعه در لیتر ذخیره-سازی شدند و به مدت دو روز با کیسه زرده تغذیه کردند. ریزجلبک نانوکروپسیس با غلظت $1 \times 10^6 - 0.5$ سلول در میلی‌لیتر از روز اول تا روز ۱۶ پس از تخم‌گذاری به مخزن پرورش لارو افزوده شد.

روتیفر از روز دوم تا روز ۱۰ (S-type)، به مقدار $10-5$ عدد در میلی‌لیتر) و از روز ۱۰ تا روز ۲۰ (L-type) به مقدار $16-10$ عدد در میلی‌لیتر) و ناپلی آرتمیا از روز ۱۶ (۷-۲ عدد در میلی‌لیتر) تا روز ۳۰ پس از تخم‌گذاری (۱۳ عدد در میلی‌لیتر) به لاروها داده شد. زمان آغاز جایگزینی تدریجی غذای زنده با غذای دستی روز ۲۵ و پایان آن روز ۳۰ پس از تخم‌گذاری به تدریج با مقادیر رو به کاهش غذای زنده و رو به افزایش غذای خشک همراه بود. سپس لاروها از روز ۳۰ تا پایان دوره پرورش با تنها غذای دستی با قطر 100 میکرون تغذیه شدند. نوردهی با

سانتی‌گراد، سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی-گراد و در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

برای نرمال سازی داده‌های مربوط به بیان ژن کد کننده آنزیم پپسین در مرحله لاروی ماهی صبیتی، ژن «بتا-اکتین» به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد. به منظور طراحی آغازگرهای مربوط به ژن بتا-اکتین در ماهی صبیتی، ابتدا توالی این ژن در گونه‌های مشابه هم خانواده آن شامل توالی با طول کامل در سیم دریایی سفید، *Diplodus sargus* (با شماره دسترسی: JN210581)، شانک قرمز، *Pagrus major* (JN226150.1)، سیم دریایی سرسیاه، *Acanthopagrus schlegelii* (AY491380.1) و توالی جزئی در سیم سرطلایی، *Sparus aurata* (AY362763) و دنتکس معمولی، *Dentex dentex* (DQ414528.1) از بانک ژن «NCBI» استخراج گردید و بعد از همردیف کردن آنها با بهره‌گیری از برنامه Clustal omega، نواحی حفاظت شده این ژن مشخص گردید. سپس با استفاده از نرم افزار طراحی آغازگر Primer 3، بر اساس نواحی حفاظت شده، آغازگرها برای تکثیر این ژن به طول ۱۶۱ bp طراحی شدند (جدول ۱).

افزایش اندازه لاروها، از روز اول تا روز ۲۵ نمونه‌برداری تعداد ۱۰۰ قطعه لارو، در روزهای ۳۰، ۳۵ و ۴۰ تعداد ۲۰ عدد لارو (Galaviz et al., 2012) به صورت تصادفی نمونه‌گیری و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد غوطه‌ور و پس از آن به فریزر -80°C درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج RNA با کاربرد محلول استخراج بیوزول صورت پذیرفت. برای بررسی کیفیت و کمیت نمونه‌های RNA به ترتیب از روش الکتروفورز افقی با مشاهده زیر واحدهای ریبوزومی (18S و 28S) و از دستگاه نانودراپ برای تعیین نسبت جذب نور در طول موج $\frac{260}{280}$ و $\frac{230}{260}$ تعیین غلظت RNA بر حسب ng/ μl استفاده شد. پس از انجام تیمار حذف DNAهای احتمالی از RNA بدست آمده با استفاده از ماده «دئوکسی ریبونوکلاز» (DNase)، از کیت iScript cDNA synthesis برای ساخت cDNA استفاده شد. به طور خلاصه، ۱۰ μl از RNA تیمار شده با DNase I با ۴ μl از بافر iScript reaction mix به همراه ۱ μl از آنزیم iScript Reverse Transcription و ۵ μl آب عاری از RNase/DNase با هم ترکیب شدند تا حجم نهایی به ۲۰ μl برسد. سپس طبق روش ارائه شده توسط شرکت سازنده، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه

جدول ۱ - آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر ژن بتا اکتین و پپسینوژن

اندازه قطعه (bp)	دمای اتصال ($^{\circ}\text{C}$)	آغازگر	نام ژن
۱۶۱	۵۸/۴	5'AGCCAACAGGGAGAAGATGA3'	بتا-اکتین
	۶۰/۵	5'CATAGATGGGCACTGTGTGG3'	
۱۲۵۹	۶۰/۷	5'CAGCCCTTGTGGCTTTCTCCG 3'	پپسینوژن
	۵۳/۱	5'TCAGTTTAATGAAAAGGCAGCTA3'	
۱۷۴	۵۸/۴	5'AATCAACTGGATCCCCCTGT3'	پپسینوژن
	۵۸/۴	5'CCAACCCAGGAGTTCATGTT3'	

قرمز، *Pagrus major* (AB678431.1)، شانک سرطلایی، *Sparus auratus* (EU163284.1)، و توالی جزئی در سیم دریایی معمولی، *Pagrus pagrus* (DQ073424.1) از بانک ژن NCBI صورت پذیرفت.

همین روند برای طراحی آغازگرهای مربوط به ژن اختصاصی پپسینوژن با استفاده از توالی این ژن در گونه‌های مشابه هم خانواده صبیتی شامل توالی طول کل در سیم دریایی سفید، *Diplodus sargus* (با شماره دسترسی: EU163285.1)، پپسینوژن ۲ سیم دریایی

۵.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های فعالیت آنزیم‌ها با نرم افزار SPSS (نسخه ۱۶) و بیان ژن پپسینوژن توسط نرم افزار آنالیز بیان نسبی ژن انجام گرفت. پراکنش نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف و همگن بودن واریانس‌ها با آزمون لَوْن سنجیده شد. روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه توکی (Tukey) جهت مقایسه تفاوت آماری بین میانگین فعالیت ویژه هر آنزیم و برای بیان نسبی ژن از روش $\Delta\Delta CT$ بر اساس اختلاف نمونه‌ها و ژن مرجع در لاروهای نمونه برداری شده در زمان‌های مختلف نمونه-گیری استفاده شد. سطح معنی داری در تمامی آزمون‌ها $p < 0.05$ و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند.

۳. نتایج

۱.۳. آنزیم‌های گوارشی

فعالیت ویژه تریپسین (شکل ۱) در لارو ماهی صبیتی هرچند اندک ولی در زمان تخم‌گشایی پیش از باز شدن دهان قابل تشخیص بود ($U\ mg\ protein^{-1} \pm 0.32$) و مقدار آن تا روز پنجم پس از تخم‌گشایی تغییر معنی‌داری نداشت ($p < 0.05$)، اما پس از آن به شکل معناداری در خلال تکامل لاروی به ویژه پس از تغذیه خارجی افزایش یافت ($p < 0.05$). همانند فعالیت کل، فعالیت ویژه تریپسین نیز الگوی نوسانی از خود نشان داد به‌طوری‌که در فعالیت ویژه این آنزیم دو قله بزرگ مشاهده گردید، اولین قله کوچکتر بین روزهای ۱۴ ($U\ mg\ protein^{-1} \pm 0.77$) و ۱۶ ($U\ mg\ protein^{-1} \pm 0.46$) و دیگری بزرگتر در روز ۳۰ ($U\ mg\ protein^{-1} \pm 0.21$) منطبق با انتهای دوره جایگزینی غذای زنده با غذای خشک مشاهده گردید ($p < 0.05$)؛ سپس فعالیت آن به‌طور معناداری در روز

ابتدا آغازگرها برای ایجاد قطعه‌ای با طول ۱۲۵۹ bp طراحی شدند و پس از تکثیر و توالی‌یابی این قطعه، آغازگرهای مورد نظر برای ایجاد قطعه ۱۷۴ bp از روی آن به منظور Real time PCR طراحی گردید.

برای بررسی بیان نسبی ژن پپسین از دستگاه Real-Time (مدل ABI StepOne plus™ Real-Time PCR Applied Biosystem) به همراه پلیت‌های ۴۸ چاهکی مخصوص آن و کیت Real-time PCR EvaGreen استفاده گردید. برای هر نمونه به ترتیب مقدار ۱ μl از cDNA با غلظت ۱۰۰ $\mu g/ml$ ، ۰/۵ μl از هر یک از آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب با غلظت ۱۰ μM ، ۱۴ μl آب عاری از DNase و در نهایت ۱ μl از کیت EvaGreen (تا رسیدن به حجم نهایی ۲۰ μl) در نظر گرفته شد.

شرایط آزمایش مرحله اول یک چرخه شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله دوم ۴۰ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، و منحنی ذوب یک چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و واسرشته سازی انتهایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه بود.

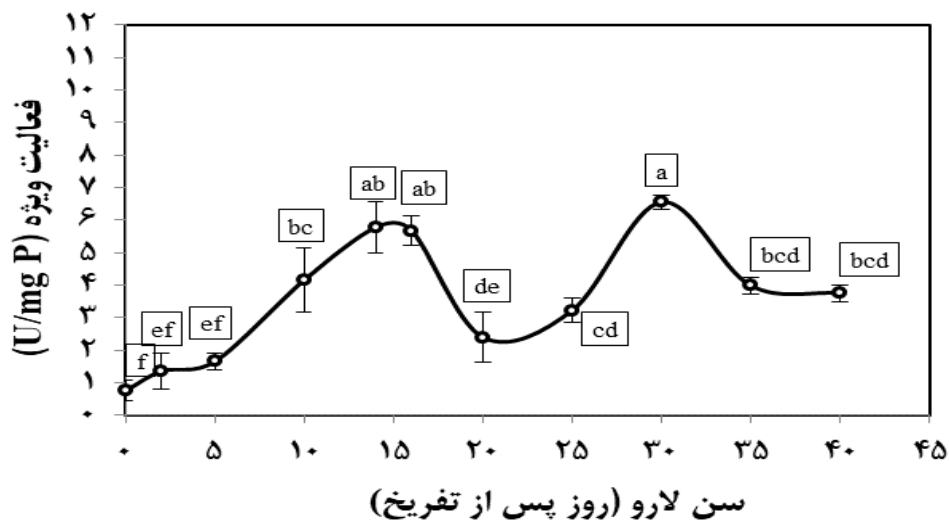
میزان بیان ژن با روش Efficiency adjusted $\Delta\Delta CT$ به صورت $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید (Livak and Schmittgen, 2001).

۴.۲. بافت شناسی

به منظور بررسی بافت شناسی، لاروها در سری اتانول قرار داده شدند و سپس در پارافین غوطه‌ور شدند. بیست برش طولی ($4\ \mu m$) توسط میکروتوم (LeicaRM 2125) جدا شد و پس از آبگیری توسط روش هماتوکسیلین، اتوزین رنگ آمیزی شد. مقاطع بافتی زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند و پس از عکس برداری با نرم افزار Quick Photo Micro 2.3 بررسی شدند.

نمودار فعالیت ویژه پپسین در روز ۱۶ پس از تخم‌گشایی به شکل معنی‌داری مشخص گردید ($U\ mg\ protein^{-1}$ 0.27 ± 0.03) و پس از یک کاهش مشخص در روز ۲۰ ($U\ mg\ protein^{-1}$ 0.19 ± 0.00)، دوباره با شیب تندی افزایش یافت و در روز ۴۰ به بیشترین حد خود (U $1.16 \pm 0.01\ mg\ protein^{-1}$) رسید ($p < 0.05$).

کاهش یافت ($U\ mg\ protein^{-1}$ 0.25 ± 0.195) و تا روز ۴۰ پس از تخم‌گشایی ($U\ mg\ protein^{-1}$ 0.25 ± 0.195) ثابت ماند ($p < 0.05$). فعالیت ویژه پپسین (شکل ۲) تا روز ۱۴ پس از تخم‌گشایی قابل تشخیص نبود (U $0.06 \pm 0.00\ mg\ protein^{-1}$)، اما همگام با تکامل لاروی با افزایش معنی‌داری همراه بود ($p < 0.05$).



شکل ۱- نمودار روند فعالیت ویژه ($U\ mg\ protein^{-1}$) آنزیم تریپسین (میانگین \pm انحراف معیار) در لارو ماهی صبیتی تا روز ۴۰ پس از تخم‌گشایی، حروف متفاوت لاتین بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین روزهای نمونه‌برداری است.

۲,۳. بیان ژن پپسینوژن

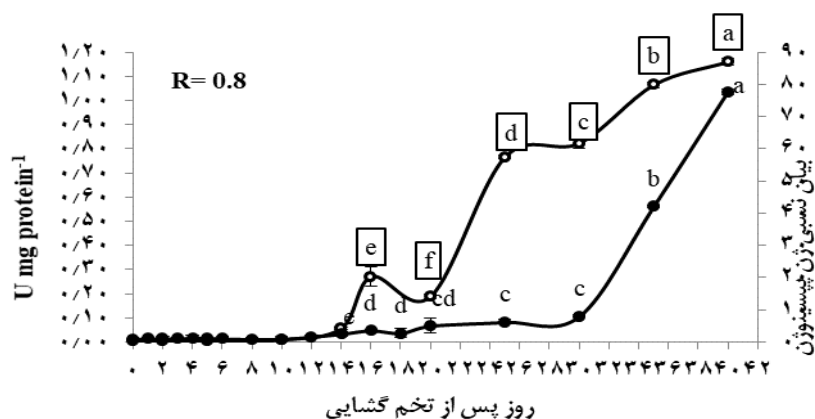
تنهایی تا انتهای دوره پرورش با افزایش ناگهانی همراه بود ($p < 0.05$). ارتباط بیان ژن پپسینوژن و فعالیت آنزیم پپسین مثبت و افزایشی و پس از بیان ژن، فعالیت آنزیم آغاز شده است. در روز ۳۰ با پایان مرحله جایگزینی غذای زنده با غذای خشک مقدار بیان ژن با افزایش ناگهانی همراه بود که به دنبال آن مقدار فعالیت آنزیم پپسین نیز نسبت به روزهای پیشین به بیشینه فعالیت خود رسید.

۳,۳. بافت شناسی

میزان بیان نسبی ژن پپسینوژن در مرحله لاروی ماهی صبیتی، پس از نرمال‌سازی داده‌ها بر اساس بیان ژن بتا-اکتین در شکل (۲) به همراه فعالیت آنزیم آن نشان داده شده است. چنانچه مشخص است، بیان ژن کد کننده آنزیم پپسینوژن به شکل نیمه کمی در مراحل اولیه لاروی تا روز ۱۲ پس از تخم‌گشایی قابل تشخیص نبود، اما پس از آن در روز ۱۴ به شکل معنی‌داری بیان گردید و تا روز ۲۵ افزایش تدریجی را نشان داد و سپس همزمان با پایان زمان جایگزینی غذای زنده با غذای خشک (از روز ۳۰ پس از تخم‌گشایی به بعد) و ارائه غذای خشک به

این مرحله، لوله گوارش تمایز نیافته درست پشت کیسه زرده جای گرفته است و دارای سلول‌های پوششی استوانه‌ای مطبق است (شکل ۳. A).

ویژگی لارو یک روزه صبیتی داشتن یک کیسه زرده بزرگ حاوی مواد ائوزینوفیلیک، بدون مخرج و دهان می باشد. تغذیه لارو درونی وابسته به کیسه زرده است. در



شکل ۲ - فعالیت ویژه آنزیم پپسین ($U\ mg\ protein^{-1}$, ○) و ارتباط بیان نسبی زن پپسینوزن (●) با آن (میانگین \pm انحراف معیار) در لارو ماهی صبیتی تا روز ۴۰ پس از تخم‌گذاری، حروف متفاوت لاتین بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین روزهای نمونه‌برداری است.

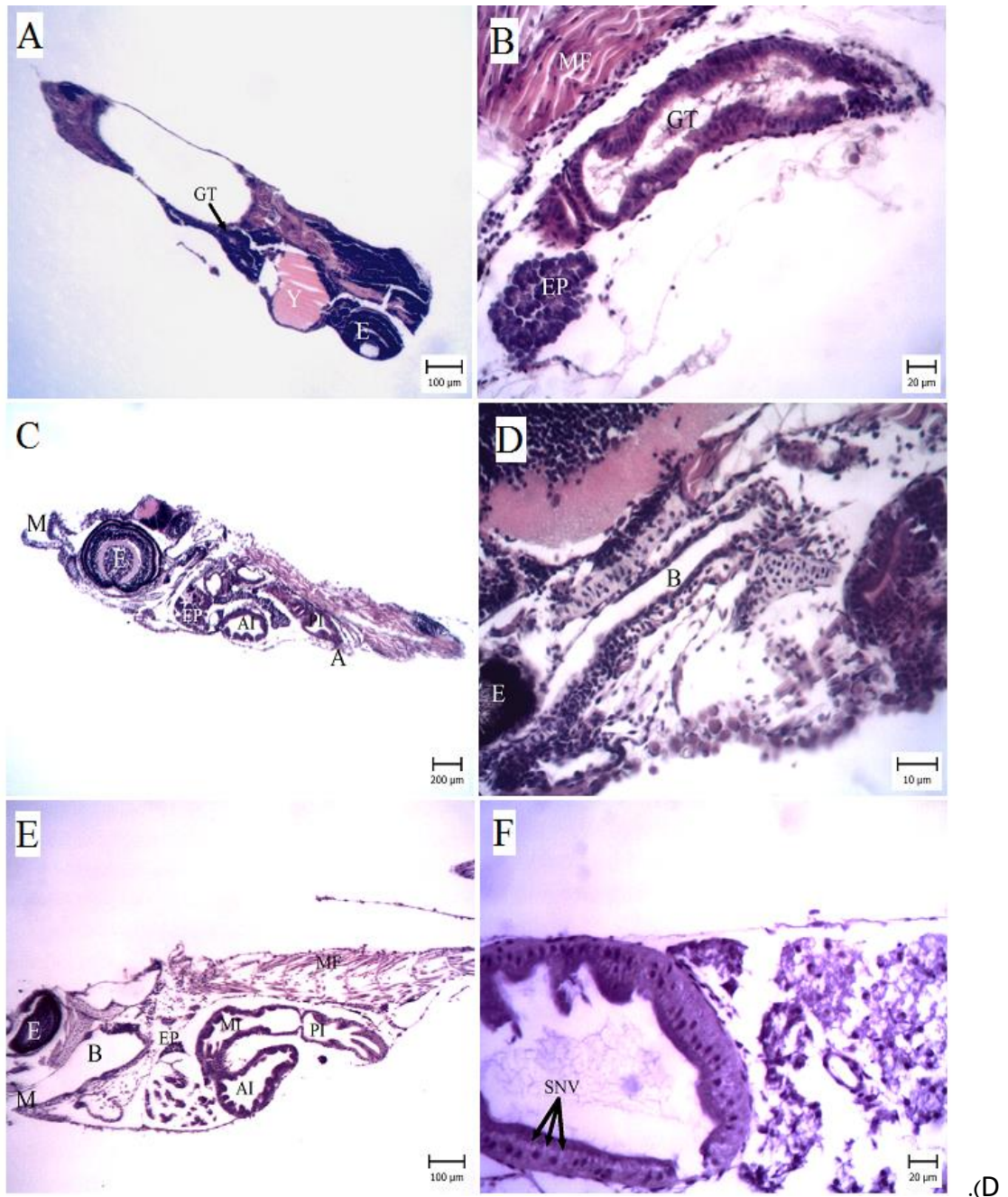
تشکیل واکوئول‌های فوق هسته‌ای در سلول‌های روده‌ای بود. سلول‌های ستونی ساده بافت پوششی روده را تشکیل دادند و اولین پیچ‌خوردگی‌های مخاطی طولی مشاهده شد (شکل ۳. F). در لارو ۱۲ روزه، قابل توجه‌ترین تمایز در لوله گوارش تشکیل معده اولیه (شکل ۴. A) احاطه شده با سلول‌های عضلانی مخطط و ایجاد غدد معدی بود (شکل ۴. B). به علاوه، واکوئول‌های فوق هسته‌ای فراوانی در سلول‌های روده مشاهده شدند (شکل ۴. C) و سلول‌های جامی شکل در روده انتهایی زیاد شدند (شکل ۴). در خلال روزهای ۱۸-۱۴ پس از تفریخ، لوله گوارش تغییرات ساختاری مهمی نداشت پیچ‌خوردگی روده بیشتر و لوزالمعده بزرگتر شد که روده را فراگرفته بود. همچنین، واکوئول‌های چربی فراوانی در سلول‌های کبدی و سلول‌های روده‌ای مشاهده شدند و غدد معدی نیز زیادتر شدند که نشانگر معده در حال تکامل می‌باشد. در لارو ۲۰ روزه، پیچ‌خوردگی بیشتر معده و افزایش اندازه معده قابل مشاهده بود (شکل ۵. A و B). معده در

در خلال جذب کیسه زرده (روزهای ۱-۳ پس از تخم‌گذاری)، اولین رشته‌های عضلانی مشاهده و بخش برون ریز لوزالمعده حاوی گرانول‌های آنزیم‌ساز مشخص شدند (شکل ۳. B). دهان و مخرج در روز چهارم پس از تخم‌گذاری منطبق با تکامل اولیه روده به بخش‌های قدامی، خلفی و حفره حلقی دهانی مشخص گردید (شکل ۳. C). سلول‌های لوزالمعده بیشتری در این مرحله توسعه یافتند. اپی‌تلیوم بافت حلقی دهانی با سلول‌های سنگفرشی ساده پوشش داده شدند. دیگر بخش‌های لوله گوارشی تا مخرج شامل بافت پوششی مطبق بود (شکل ۳. D). اولین سلول‌های جامی در حلق ظاهر شدند و رشته‌های آبشی اولیه و سلول‌های کبدی در روز ۵ پس از تخم‌گذاری مشاهده شدند.

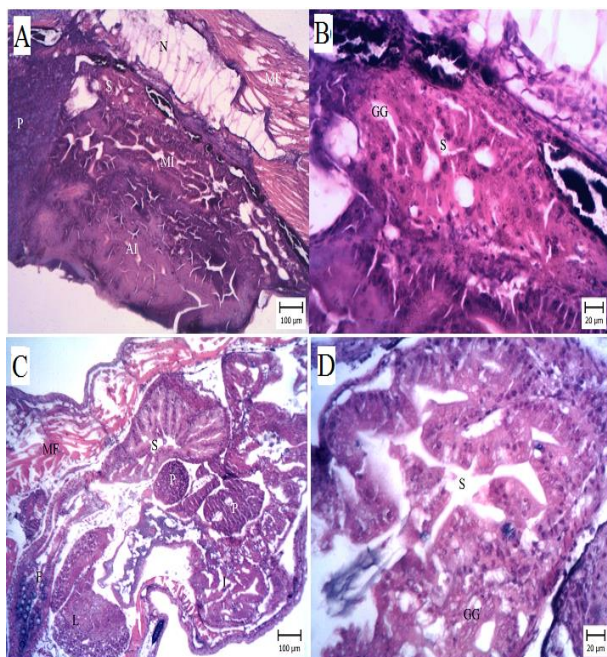
در لارو ۸ روزه، لوله گوارش به سه بخش قدامی، میانی و خلفی تمایز یافت و حاوی ذرات غذایی بود (شکل ۳. E). از وقایع دیگر در خلال روزهای ۱۰-۸ پس از تخم‌گذاری، حضور سلول‌های کبدی حاوی واکوئول‌های چربی و

تمایز بافتی بیشتری رخ نداد. تنها، افزایش سریع در تعداد غدد معدی و اندازه معده ایجاد شد که با دیواره عضلانی ضخیمی پوشانده شده بود.

روز ۲۵ به شکل کامل با تبدیل سلول‌های ماهیچه‌ای مخطط به صاف تکوین یافته بود. پیچ‌خوردگی معده بیشتر شد و غدد معدی در ناحیه خلفی معده هویدا شد (شکل ۵. C و D). از روز ۳۵ پس از تخم‌گذاری به بعد،

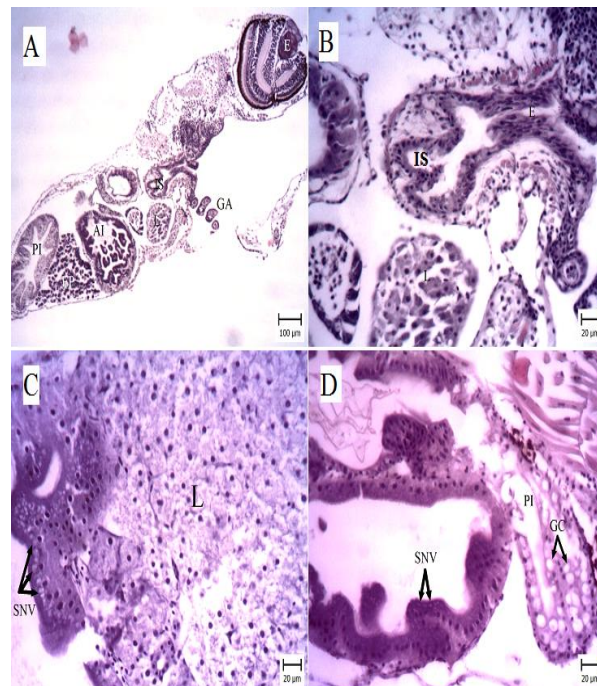


شکل ۳- برش طولی لارو در روزهای مختلف. حروف A, B, C, D, E و F در جعبه سفید روی عکس به ترتیب نشانگر سن لاروهای یک، سه، چهار، هشت و ده روزه‌اند (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین). حروف روی لارو بیانگر: A: مخرج، AI: روده قدامی، B: حلق، E: چشم، EP: پانکراس برون ریز، MF: رشته عضلانی، M: دهان، GT: لوله گوارش، MI: روده میانی، PI: روده خلفی، SNV: واکنش‌های فوق هسته‌ای و Y: کیسه زرده‌اند.



شکل ۵- برش طولی لارو در روزهای مختلف. حروف A و B در جعبه سفید روی عکس نشانگر سن لاروهای بیست روزه و C و D لارو بیست و پنج روزه است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین). AI: روده قدامی، GC: غدد معدی، L: کبد، MI: روده میانی، MF: رشته عصلانی، N: نوتوکورد، P: لوزالمعده، PI: روده خلفی و S: معده است.

زمان تخم‌گذاری مشخص گردید و پس از آن به شدت افزایش یافت که با پیدایش بافت لوزالمعده از بعد باز شدن دهان و بزرگتر شدن آن فاصله روزهای ۱۴-۱۸ پس از تفریح منطبق بود. همچنین این افزایش با ارائه غذای زنده در ارتباط بود همانطور که در دیگر گونه‌های شانک ماهیان مانند سیم پوزه دراز (Suzer *et al.*, 2007a) و دنتکس معمولی (Gisbert *et al.*, 2009) یا دیگر گونه‌های ماهیان دریایی غیر شانک ماهیان مانند شاه‌ماهی دم زرد (Chen *et al.*, 2006) مشاهده شده است. گرچه فعالیت آنزیم تریپسین اولین بار در در شانک قرمز (Suzer *et al.*, 2007b) و در پاندورای معمولی (Suzer *et al.*, 2006) در روز سوم مشخص گردید. دلیل حضور این آنزیم پیش از باز شدن دهان (باز شدن



شکل ۴- برش طولی لارو ۱۲ روزه (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین). حروف روی لارو بیانگر: AI: روده قدامی، E: مری، GA: کمان آبششی، GC: سلول‌های جامی، IS: معده اولیه، L: کبد، PI: روده خلفی و SNV: واکوئول‌های فوق هسته‌ای اند.

۴. بحث

مهمترین عواملی که تکامل آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، ظهور اندام‌های گوارشی، پاسخ به تغییر نوع غذا، تغییراتی که به‌طور ژنتیکی برنامه‌ریزی شده اند و همچنین تغییرات ناشی از سوبستراست (Cara *et al.*, 2007). این عوامل به‌طور مشخصی منجر به شکل‌گیری الگویی در فعالیت آنزیم‌ها می‌گردند که روندی افزایشی یا کاهشی در سطح فعالیت آنها را در طول زمان نشان می‌دهد (Martínez *et al.*, 1999). زمان آغاز فعالیت آنزیم تریپسین وابسته به گونه است و می‌تواند به مرحله تکاملی لارو و نوع تغذیه خارجی بستگی داشته باشد (García-Gasca *et al.*, 2006). در این مطالعه، فعالیت ویژه تریپسین در لارو ماهی صبیتی اولین بار در

تریپسین در روز ۴۰ پس از تخم‌گشایی کاهش یابد، همانطور که در گونه‌های دیگر مانند دنتکس معمولی (Gisbert *et al.*, 2009)، سیم دریایی پوزه دراز (Suzer *et al.*, 2007a)، شانک قرمز (Suzer *et al.*, 2007b) و درام قرمز (Lazo *et al.*, 2007) نیز پس از تکمیل دگرذیسی و آغاز فعالیت پپسین، فعالیت تریپسین کاهش یافته است. هضم پروتئین‌ها در لارو ماهیان عمدتاً توسط پروتئازهای قلیایی (مانند تریپسین و کیموتریپسین) و پپتیدازهای سیتوسولیک صورت می‌گیرد (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). در خلال مراحل لاروی، پپتیدازها ظرفیت محدودی برای هضم مولکول‌های بزرگی را دارند که توسط فعالیت پینوسیتوزی انتروسیت‌ها در روده خلفی جذب می‌شوند. در گونه‌های دارای معده، شکل بالغ فرآیند هضم روی غذا، با هضم اسیدی همراه می‌باشد و در نهایت در برگیرنده هضم برون سلولی پروتئین‌ها است. اولین زمان مشخص شدن غدد معدی در لاروها از چندین روز تا چندین هفته پس از تخم‌گشایی متغیر است و تعداد این غدد ترشح کننده آنزیم به شکل تهاجمی افزایش می‌یابد، به صورتی که اپی‌تلیوم معده بسته به گونه به‌طور کامل یا جزئی با این غدد پوشانده می‌شود (Elbal *et al.*, 2004). اساساً، ترشحات غدد پپسینوزن و اسید هیدروکلریدریک، باعث ایجاد محیطی با پی‌اچ اسیدی در لومن معده و تبدیل شدن پپسینوزن به پپسین می‌گردد (Yúfera *et al.*, 2012) و آغاز فعالیت پپسین به عنوان شاخص کارایی معده در نظر گرفته می‌شود (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). همچنین زمانیکه تغذیه لارو، در حال تغییر از سمت غذای زنده به سمت غذای خشک است، تکامل معده نقش مهمی را در ظرفیت هضمی لارو بازی می‌کند. توالی

دهان در روز چهار) در لارو ماهی صبیتی احتمالاً می‌تواند به یک فرآیند از پیش برنامه‌ریزی شده ژنتیکی مربوط باشد (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). همانند لارو ماهی صبیتی در روز ۲۰ پس از تخم‌گشایی، کاهش قابل ملاحظه‌ای در فعالیت ویژه تریپسین در سیم دریایی سفید (Cara *et al.*, 2003)، پاندورای معمولی (Suzer *et al.*, 2006) و سیم دریایی پوزه دراز (Suzer *et al.*, 2007a) گزارش شده است جایکه فعالیت ویژه در خلال اولین هفته نسبتاً بیشتر بود و پس از آن به طور ناگهانی و به شدت کاهش یافت. به نظر می‌رسد که توالی افزایش و کاهش در فعالیت تریپسین و شکل‌گیری دو پیک در روند فعالیت آن که به ترتیب منطبق با ارائه روتیفر و ریزجیره در لارو ماهی صبیتی است، عمدتاً با بلع غذا در ارتباط باشد و در پاسخ به تغییر جیره در خلال دوره پرورش (Cara *et al.*, 2007) و همچنین بلوغ غشاء پرزهای روده (Suzer *et al.*, 2006) باشد. از آنجاییکه ارتباط قوی بین فعالیت تریپسین و پی‌اچ قلیایی وجود دارد (Zambonino-Infante and Cahu, 2001)، این آنزیم پیش از دگرذیسی و تکامل غدد معدی برای هضم پروتئین از اهمیت بالایی برخوردار است (Perez-Casanova *et al.*, 2006; Zambonino-Infante and Cahu, 2008). به این معنا که، تغییر پیشرونده مشاهده شده در فعالیت آنزیمی از فعالیت پروتئازهای قلیایی به اسیدی در خلال تکامل لاروی انعکاس دهنده این موضوع است که پروتئازهای قلیایی به طور دائمی آنزیم‌های اصلی گوارشی برای هضم پروتئین نمی‌باشند و اشاره بر تغییرات موقتی در شکل هضم و ظهور پروتئازهای مختلف از تریپسین به کیموتریپسین و از کیموتریپسین به پپسین دارد (Lazo *et al.*, 2007). بنابراین، جای تعجب نیست که فعالیت

تغذیه خارجی می‌باشد، هرچند این رخداد تکوینی در لوله گوارش لارو صبیتی با تأخیری یک روزه یعنی بین روزهای ۴-۵ پس از تخم‌گشایی نسبت به گونه‌های گفته شده ایجاد می‌شود. واکوئول‌های فوق هسته‌ای که در روده خلفی صبیتی از روز ۱۰ پس از تخم‌گشایی پیدا می‌شوند، در لارو دنتکس معمولی (*Santamaria et al.*, 2004) نیز مشاهده شده است و به نظر می‌رسد در فرایند هضمی در زمانی که هنوز معده تشکیل نشده است نقش دارند. این واکوئول‌ها با پیدایش معده ناپدید می‌شوند. پیدایش معده اولیه در لارو صبیتی در روز ۱۲ پس از تخم‌گشایی همراه با غدد معدی بود، درحالی‌که در لارو سرخوی گلی خالدار معده و غدد معدی اولین بار به ترتیب در روز ۱۸ و ۲۰ پس از تخم‌گشایی دیده شد و اندازه معده و تعداد غدد تا انتهای دوره لاروی با افزایش همراه بود (Galaviz et al., 2012). از سویی دیگر، این پیدایش معده و غدد در لارو کوبیا به ترتیب در روزهای ۶ و ۸ پس از تخم‌گشایی مشخص گردید (Salze et al., 2012). مطالعات پیشین ایجاد غدد معدی را به عنوان رخدادی مهم در تکوین لوله گوارش می‌دانند که نشان دهنده انتقال از حالت لاروی به نوجوانی در نظر گرفته می‌شود (Peña et al., 2003). بنابراین، ترشح پروتئاز اسیدی پپسین از روز ۱۴ پس از تخم‌گشایی در لارو ماهی صبیتی، بیانگر آغاز زود هنگام تکامل معده (Zambonino-Infante et al., 2008) در این گونه می‌باشد. شواهد ایجاد معده کاملاً تکامل یافته در لارو صبیتی نشانگر این موضوع است که لارو دارای توانایی هضم برون سلولی پروتئین‌هاست و ظرفیت آن برای تغییر تغذیه از غذای زنده به خشک افزایش یافته است. هرچند، اشاره شده است که پیدایش غدد معدی لزوماً گواه عملکرد معده در برخی از گونه‌ها مانند شانک قرمز

زمانی پیدایش غدد گوارشی و بلوغ معده در میان خانواده‌ها و حتی بین گونه‌ها متفاوت می‌باشد (Falk-Petersen, 2005). تکامل غدد گوارشی معدی آخرین رخداد مهم در تکامل لوله گوارش می‌باشد و حضور این غدد و ترشح آنزیم پپسین که منجر به دستیابی به هضم مولکول‌های بزرگ پروتئین می‌شود، مشخصه خاصی از پایان دوره لاروی و آغاز مرحله نوجوانی می‌باشد (Rønnestad et al., 2013). در این مطالعه، در مراحل بسیار اولیه لاروی ماهی صبیتی همانند لارو بسیاری از ماهیان دریایی، زمانی که هضم پروتئین با پروتئازهای قلیایی مانند تریپسین و کیموتریپسین انجام می‌گردد، پپسین قابل تشخیص نمی‌باشد (Lazo et al., 2007; Zambonino-Infante and Cahu, 2007). اولین زمان حضور فعالیت پپسین در میان شانک ماهیان و همچنین غیر شانک ماهیان متفاوت می‌باشد. درحالی‌که فعالیت پپسین اولین بار در لارو ماهی صبیتی از روز ۱۴ پس از تخم‌گشایی تشخیص داده شد، در شانک قرمز از روز ۲۸ (Suzer et al., 2007b)، در سیم پوزه باریک از روز ۳۲ (Suzer et al., 2007a)، در در دنتکس معمولی از روز ۱۹ (Gisbert et al., 2009)، سرخوی گلی خالدار از روز ۲۰ (Galaviz et al., 2012) و در سی باس آسیایی از روز ۱۸ پس از تخم‌گشایی (Srichanun et al., 2013) قابل مشاهده بود.

در این مطالعه، مشاهدات بافت شناسی در صبیتی نشان داد که بین این گونه و دیگر گونه‌های دریایی باس دریایی اروپایی (Giffard-Mena et al., 2006) و سرخوی گلی خالدار (Galaviz et al., 2012) مشابهت وجود دارد، زمانی‌که تکوین حفره حلقی دهانی، روده قدامی و خلفی، مخرج و کبد همزمان با باز شدن دهان و آغاز

پس از اتمام دگرذیسی، بیان ژن‌های آنزیم‌های پروتئولیتیک، ظرفیت گوارشی را برای مصرف پروتئین-های جیره افزایش می‌دهند که در نتیجه منجر به افزایش رشد سوماتیک لارو می‌گردند (Canada et al., 2017). در لارو ماهی صبیتی همانند لارو گونه‌های مختلف مانند باس دریایی سفید (Galaviz et al., 2011)، باراموندی (Srichanun et al., 2013) و گربه ماهی هندی (Mir et al., 2018) زمانی که معده کارا می‌گردد و پپسین در فرآیند هضمی وارد می‌گردد، فعالیت تریپسین کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت تریپسین به دلیل شکل‌گیری غدد معدی و نقش مهمتر پپسین در هضم پروتئین‌هاست که این موضوع بیانگر تغییر در شکل فیزیولوژی هضمی لارو صبیتی به سمت شکل بالغ هضم پروتئین‌ها می‌باشد (Uscanga-Martínez et al., 2011). اما در مواردی چون لارو ماهیان دورادو (Vega-Orellana et al., 2006) و سرخوی گلی خالدار (Galaviz et al., 2012) فعالیت تریپسین پس از افزایش فعالیت پپسین کاهش نیافته و تا انتهای دوره پرورش لاروی همچنان بالا می‌باشد. چون ماهیان از دیدگاه فیزیولوژیکی تنوع بسیار زیادی دارند، این تناقض بین فعالیت دو آنزیم تریپسین و پپسین به طور کامل اثبات نشده است. احتمالاً دلیل این تفاوت در این است که در بعضی از ماهیان حتی زمانی که هضم اسیدی صورت می‌گیرد به آنزیم‌های پانکراسی مانند تریپسین نیاز باشد (Galaviz et al., 2012). در حالیکه در این مطالعه بیان ژن پپسینوژن تا انتهای دوره پرورش روند افزایشی دنبال می‌کرد و به همراه آن فعالیت آنزیم پپسین نیز با افزایش روبرو بود، در لارو سرخوی گلی خالدار (Galaviz et al., 2012) و باراموندی (Srichanun et al., 2013) فعالیت آنزیم پپسین در انتهای دوره

(Darias et al., 2005) نمی‌باشد و زمانی غدد کارا می‌شوند که بیان ژن پپسینوژن و پمپ پروتون (H^+/K^+ ATPase) نیز اتفاق افتاد باشد (Darias et al., 2007). شواهد موجود مبنی بر نسخه‌برداری زودهنگام از ژن پپسینوژن در این گونه ایده فوق را تقویت می‌کند. به-طوریکه به دنبال آغاز بیان ژن پپسینوژن در این گونه از روز ۱۲ پس از تخم‌گشایی، با اختلاف دو روز فعالیت آنزیم پپسین، هرچند اندک، در لارو ماهی صبیتی تشخیص داده شد و به دنبال بیان معنی‌دار ژن پپسینوژن پس از آن، مقدار فعالیت آنزیم پپسین نیز با افزایش معنی‌داری تا انتهای دوره پرورش همراه بود. چنین الگوی توالی زمانی بین بیان ژن پپسینوژن و تاخیر در ترشح آنزیم پپسین، در لارو ماهی سرخوی گلی خالدار (Galaviz et al., 2012) و سی باس آسیایی (Srichanun et al., 2013) نیز مشاهده شده است، چنانچه در لارو این ماهیان بیان ژن پپسینوژن اولین بار در روز ۱۸ پس از تخم‌گشایی مشخص شد، اما اولین پیک در فعالیت آنزیم پپسین به ترتیب تا روز ۲۰ و ۲۴ پس از تخم‌گشایی مشخص نگردید. گفتنی است، شروع ناگهانی افزایش بیان ژن پپسینوژن در این مطالعه از روز ۲۵ پس از تخم‌گشایی منطبق با افزایش ناگهانی دوباره فعالیت آنزیم پپسین از روز ۳۰ پس از تخم‌گشایی (پایان مرحله جایگزینی غذای زنده با غذای خشک) می‌باشد. چنین نتیجه‌ای در ماهی توتوآبا نیز به دست آمده است که افزایش بیان ژن پپسینوژن منطبق با تغییر جیره از غذای زنده به خشک بود (Galaviz et al., 2015). این نتایج چنین ایده‌هایی را تقویت می‌کنند که فرآیند بیان ژن پپسینوژن در مراحل اولیه تکامل لاروی به برنامه ریزی ژنتیکی لارو و در مراحل بعدی به محرک تغذیه‌ای شامل غذای خشک وابسته است (Lazo et al., 2011).

امکان جایگزینی غذای زنده با خشک از اواسط دور لاروی یعنی روز ۱۸ پس از تفریح فراهم است. این کار باعث افزایش رشد، کاهش مصرف غذای زنده و هزینه‌های تولید خواهد شد که از دیدگاه اقتصادی به صرفه خواهد بود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور برای حمایت مالی از این پژوهش با شماره ۹۳۰۳۸۸۶۳ تشکر می‌کنند.

پرورش درحالی در سطح بالایی قرار داشت که بیان ژن پپسینوژن کاهش یافته بود. احتمالاً دلیل افزایش بیان ژن پپسینوژن در انتهای دوره آزمایش در لارو ماهی صبیتی این است که مقدار آنزیم پپسین موجود برای هضم پروتئین‌ها همچنان کافی نبوده است و به دلیل نوع و مقدار پروتئین موجود در جیره خشک، نسخه‌برداری از ژن پپسینوژن ادامه داشته است و مقدار بیان ژن را در سطح بالایی نگه داشته است. روی هم رفته، یافته‌های مولکولی، بیوشیمیایی و بافت شناسی درباره تکامل هضمی پروتئازی لارو ماهی صبیتی، بیانگر آن است که

References

۵. منابع

- Alvarez-González, C., Moyano-López, F., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortíz-Galindo, J.L., Nolasco-Soria, H., Tovar-Ramírez, D., Dumas, S., 2010. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II: Electrophoretic analysis. *Fish physiology and biochemistry* 36(1), 29-37. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9276-4>.
- Alvarez-González, C.A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. I. Biochemical analysis. *Fish Physiology and Biochemistry* 34(4), 373-384. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9197-7>.
- Bauchot, M.L., Smith, M.M., 1984. FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Indian Ocean (Fishing Area 51). in: W. Fischer, G. Bianchi (Eds.), FAO ed, Rome.
- Cahu, C., Zambonino-Infante, J., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200(1), 161-180.
- Canada, P., Conceição, L.E., Mira, S., Teodósio, R., Fernandes, J.M., Barrios, C., Millán, F., Pedroche, J., Valente, L.M., Engrola, S., 2017. Dietary protein complexity modulates growth, protein utilization and the expression of protein digestion-related genes in Senegalese sole larvae. *Aquaculture* 479, 273-284. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.028>.
- Cara, B., Moyano, F., Zambonino-Infante, J., Fauvel, C., 2007. Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *Journal of Fish Biology* 70(6), 1798-1808. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01457.x>.
- Cara, J.B., Moyano, F.J., Cárdenas, S., Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology* 63(1), 48-58. [10.1046/j.1095-8649.2003.00120.x](https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00120.x).
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W., Clarke, S., 2006. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) larvae. *Aquaculture* 256(1), 489-501. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.041>.

- Darias, M., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., Martínez Rodríguez, G., Yúfera, M., 2007a. Larval organogenesis of *Pagrus pagrus* L., 1758 with special attention to the digestive system development. *Histol Histopathol* 22(7), 753-768. doi: 10.14670/HH-22.753.
- Darias, M.J., Murray, H.M., Gallant, J.W., Douglas, S.E., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., 2007b. Ontogeny of pepsinogen and gastric proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): Determination of stomach functionality. *Aquaculture* 270(1), 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.045>.
- Darias, M.J., Murray, H.M., Martínez-Rodríguez, G., Cárdenas, S., Yúfera, M., 2005. Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 248(1), 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.044>.
- Douglas, S.E., Mandla, S., Gallant, J.W., 2000. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture* 190(3), 247-260. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00398-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00398-7).
- Elbal, M.T., García Hernández, M.P., Lozano, M.T., Agulleiro, B., 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture* 234(1-4), 215-238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.028>
- Falk-Petersen, I.B., 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish & Shellfish Immunology* 19(5), 397-412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.006>.
- Feng, S., Li, W., Lin, H., 2008a. Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 149(2), 275-284. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.09.017>.
- Feng, S.Z., Li, W.S., Lin, H.R., 2008b. Identification and expression characterization of pepsinogen A in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Journal of Fish Biology* 73(8), 1960-1978. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01999.x>.
- Galaviz, M.A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Álvarez-González, C.A., López, L.M., 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture* 318(1-2), 162-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.014>.
- Galaviz, M.A., García-Ortega, A., Gisbert, E., López, L.M., Gasca, A.G., 2012. Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 161(1), 9-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.09.001>.
- Galaviz, M.A., Lopez, L.M., Garcia Gasca, A., Alvarez Gonzalez, C.A., True, C.D., Gisbert, E., 2015. Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish physiology and biochemistry* 41(5), 1117-1130. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0073-6>.
- García-Gasca, A., Galaviz, M.A., Gutiérrez, J.N., García-Ortega, A., 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer

- fish Sphoeroides annulatus. *Aquaculture* 251(2), 366-376. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.029>.
- Giffard-Mena, I., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Castille, R., 2006. Digestive tract ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: implication in osmoregulation. *Development, growth & differentiation* 48(3), 139-151. 10.1111/j.1440-169X.2006.00852. x.
- Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Estévez, A., 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* 287(3-4), 381-387. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.039>
- Jimenez-Martinez, L.D., Alvarez-González, C.A., Tovar-Ramírez, D., Gaxiola, G., Sanchez-Zamora, A., Moyano, F.J., Alarcón, F.J., Márquez-Couturier, G., Gisbert, E., Contreras-Sánchez, W.M., Perales-García, N., Arias-Rodríguez, L., Indy, J.R., Páramo-Delgadillo, S., Palomino-Albarrán, I.G., 2012. Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish Physiology and Biochemistry* 38(2), 441-454. 10.1007/s10695-011-9525-9.
- Kamaci, H.O., Suzer, C., Çoban, D., Saka, Ş., Firat, K., 2010. Organogenesis of exocrine pancreas in sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) larvae: characterization of trypsin expression. *Fish physiology and biochemistry* 36(4), 993-1000. DOI: 10.1007/s10695-009-9377-8.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200(1-2), 181-201. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00700-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00700-1).
- Lazo, J.P., Darias, M.J., Gisbert, E., 2011. Ontogeny of the digestive tract, in: G.J. Holt (Ed.), Larval Fish Nutrition. John Wiley & Sons Inc., UK, West Sussex, pp. 5-46. <https://doi.org/10.1002/9780470959862.ch1>.
- Lazo, J.P., Mendoza, R., Holt, G.J., Aguilera, C., Arnold, C.R., 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 265(1-4), 194-205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.043>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *Methods* 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 193(1), 265-275.
- Martínez, I., Moyano, F.J., Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiology and Biochemistry* 21(4), 317-323. 10.1023/A:1007802708459.
- Mir, I.N., Srivastava, P.P., Bhat, I.A., Muralidhar, A.P., Varghese, T., Gireesh-Babu, P., Jain, K.K., 2018. Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of Indian walking catfish (*Clarias magur*). *Aquaculture* 491, 266-272. <https://10.1016/j.aquaculture.2018.03.049>.
- Murray, H., Gallant, J., Johnson, S., Douglas, S., 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture* 252(2), 394-408. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.030>.

- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M., Ortíz-Galindo, J.L., 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219(1–4), 633-644. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00352-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00352-6)
- Perez-Casanova, J., Murray, H., Gallant, J., Ross, N., Douglas, S., Johnson, S., 2006. Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 251(2), 377-401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.007>.
- Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Sæle, Ø., Boglione, C., 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Reviews in Aquaculture* 5(s1), S59-S98. <https://10.1111/raq.12010>.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L., Berg, A., Waagbø, R., 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 32(1), 7-23. <https://doi:10.1007/s10695-005-0630-5>.
- Salze, G., McLean, E., Craig, S.R., 2012. Pepsin ontogeny and stomach development in larval cobia. *Aquaculture* 324, 315-318. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.043>.
- Santamaría, C.A., Marín de Mateo, M., Traveset, R., Sala, R., Grau, A., Pastor, E., Sarasquete, C., Crespo, S., 2004. Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture* 237(1–4), 207-228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.020>.
- Srichanun, M., Tantikitti, C., Utarabhand, P., Kortner, T.M., 2013. Gene expression and activity of digestive enzymes during the larval development of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 165(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.02.005>.
- Suzer, C., Aktülün, S., Çoban, D., Okan Kamacı, H., Saka, Ş., Fırat, K., Albaz, A., 2007. Digestive enzyme activities in larvae of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 148(2), 470-477. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.06.418>.
- Suzer, C., Fırat, K., Saka, Ş., 2006. Ontogenic development of the digestive enzymes in common pandora, *Pagellus erythrinus* L. larvae. *Aquaculture Research* 37(15), 1565-1571. <https://10.1111/j.1365-2109.2006.01598.x>.
- Teng, S.-K., El-Zahr, C., Al-Abdul-Elah, K., Almatar, S., 1999. Pilot-scale spawning and fry production of blue-fin porgy, *Sparidentex hasta* (Valenciennes), in Kuwait. *Aquaculture* 178(1–2), 27-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00039-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00039-3).
- Tong, X.H., Xu, S.H., Liu, Q.H., Li, J., Xiao, Z.Z., Ma, D.Y., 2012. Digestive enzyme activities of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during early developmental stages under culture condition. *Fish Physiology and Biochemistry* 38(3), 715-724. [10.1007/s10695-011-9553-5](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9553-5).
- Torrissen, K., Lied, E., Espe, M., 1994. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. *Journal of Fish Biology* 45(6), 1087-1104. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1994.tb01075.x>.

- Uscanga-Martínez, A., Perales-García, N., Álvarez-González, C.A., Moyano, F.J., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, G.E., Márquez-Couturier, G., Contreras-Sánchez, W.M., Arias-Rodríguez, L., Indy, J.R., 2011. Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish Physiology and Biochemistry* 37(3), 667-680. <https://10.1007/s10695-011-9467-2>.
- Vega-Orellana, O.M., Fracalossi, D.M., Sugai, J.K., 2006. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture* 252(2-4), 484-493. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.002>.
- Wu, X., Washio, Y., Aritaki, M., Fujinami, Y., Shimizu, D., Hashimoto, H., Iwasaki, T., Uji, S., Suzuki, T., 2011. Staging of initial pepsinogen and chitinase expression and complete gastric gland development within the larval stomach of Japanese flounder, spotted halibut, seven-band grouper and greater amberjack. *Aquaculture* 314(1), 165-172. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.002>.
- Yúfera, M., Darias, M., 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268(1), 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.050>.
- Yúfera, M., Moyano, F.J., Astola, A., Pousão-Ferreira, P., Martínez-Rodríguez, G., 2012. Acidic digestion in a Teleost: postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. *PloS one* 7(3), e33687. DOI: 10.1371/journal.pone.0033687.
- Zambonino-Infante, J., Cahu, C., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130(4), 477-487. [https://doi:10.1016/s1095-6433\(00\)80321-9](https://doi:10.1016/s1095-6433(00)80321-9).
- Zambonino-Infante, J., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C.L., 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae, in: J.E.P. Cyrino (Ed.), *Feeding and Digestive Functions of Fish*. Science Publishers, Enfield, USA, 277-344. DOI: 10.1201/b10749-8.