



اثر متقابل تغییرات دما، pH و فنانترن بر روی سطوح بیان ژن پروتئین ماتریکس ناکرین صدف مرواریدساز محار (*Pinctada radiata*) خلیج فارس

فاطمه جعفری^۱، اکرم سادات نعیمی^{۱*}، محمدمهدی سوهانی^۲، محسن نوری نژاد^۳

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. گروه اکولوژی، پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، بوشهر، ایران

چکیده

نوع مقاله

پژوهشی

در مطالعه حاضر تاثیر متقابل تغییر دما و pH به همراه فنانترن به عنوان نماینده آلاینده ها بر چگونگی تعدیل بیان ژن ناکرین از طریق تحلیل بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف مرواریدساز محار *Pinctada radiata* مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین روند تغییرات الگوی بیان ژن مورد مطالعه، صدف های مروارید ساز به مدت ۴ هفته تحت شرایط تیمارهای ترکیبی گرمایش در دو سطح ۲۴ و ۲۸ درجه سانتی گراد، اسیدی شدن در دو سطح ۷/۶ و ۸/۱ و فنانترن در دو سطح ۰ و ۸ نانوگرم بر لیتر در آکواریوم های ۲۰ لیتری با تراکم ۱۵ جاندار در هر تانک آزمایشی بررسی شده است. نمونه برداری در سه مرحله، انتهای ۲۴ ساعت اول، انتهای ۴۸ ساعت دوم و انتهای روز ۲۸ ام انجام شد. بعد از ۲۸ روز معارضه، نتایج، مرگ و میری را نشان نداد. پارامترهای مورد مطالعه به جز دما بصورت منفرد، اثرات دوگانه به جز تقابل دما و فنانترن و اثرات سه گانه بر روی بیان ژن ناکرین کاهش معنی داری نشان دادند. تقابل چهارگانه اثر معنی داری بر روی بیان ژن ناکرین نشان نداد. این نتایج گویای آن است که کاهش اسیدیته آب دریا، گرم شدن آن و حضور آلاینده فنانترن باعث کاهش بیان ژن ناکرین شده و در نهایت ممکن است بر روی کیفیت مروارید و پوسته صدف مرواریدساز محار اثر داشته باشد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۳

تاریخ چاپ الکترونیک: ۱۴۰۱/۱۱/۱۹

*نویسنده مسئول:

akramnaeemi@yahoo.com

کلیدواژه: بیان ژن، تغییر اقلیم، خلیج فارس، صدف مرواریدساز محار، هیدروکربن های چندحلقه ای آروماتیک

مقدمه

حدود ۳۰٪ از انتشار دی اکسید کربن ناشی از فعالیت های انسانی به اتمسفر توسط اقیانوس ها جذب می شود که سبب کاهش pH آب اقیانوس ها به اندازه ۰/۱ واحد شده است. بر طبق ۴ مدل پیش بینی شده، با افزایش انتشار دی اکسید کربن به اتمسفر تا پایان قرن بیست و یکم، متوسط pH دریاها تقریباً به اندازه ۰/۱۳ تا ۰/۴۲ واحد کاهش خواهد یافت که این فرآیند به عنوان اسیدی شدن اقیانوس ها شناخته می شود (IPCC., 2014). افزایش دی اکسید کربن اتمسفری به همراه سایر گازهای گلخانه ای، منجر به افزایش متوسط دمای جهانی می شود و پیش بینی شده است تا انتهای قرن حاضر تقریباً به اندازه ۰/۳ تا ۴/۸ درجه

سانتی‌گراد افزایش یابد (IPCC., 2014). افزایش در غلظت دی‌اکسیدکربن محلول در آب دریا منجر به افزایش یون هیدروژن می‌شود که تغییر در شیمی کربنات اقیانوس‌ها و وضعیت اشباعیت کلسیت و آراگونیت را به دنبال خواهد داشت (IPCC., 2017; Sampaio et al., 2014). تغییرات ممتد دی‌اکسیدکربن در اقیانوس‌ها و اسیدی شدن آنها تهدید بزرگی برای تنوع زیستی دریایی، اکوسیستم دریایی و بویژه جانداران کلسیفیه‌کننده دریایی است (Nardi et al., 2017). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این تغییرات اثر منفی بر روی توانایی ساخت پوسته و اسکلت کلسیمی و نرخ کلسیفیه شدن در جانداران دریایی مثل مرجان‌ها (Holcomb et al., 2014)، خارپوستان (Chan et al., 2015)، نرم‌تنان (Wang et al., 2016) و اکثر دوکفه‌ای‌های با ارزش از لحاظ اقتصادی و اکولوژیکی مثل صدف مرواریدساز (Liu et al., 2017) خواهد داشت. جانداران دریایی همزمان با مواجهه اثرات گرمایش جهانی و اسیدی شدن آب دریا با یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی استرس‌زا یعنی غلظت‌های بالای آلاینده‌ها در محیط زیست خود روبرو هستند. یکی از مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی در محیط دریا، هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک (PAHs) هستند که اثر سمی، سرطان‌زایی و جهش‌زایی بر روی جانداران دریایی دارند. این ترکیبات از ۲-۷ حلقه‌ای از منابع نفتی، زیستی و سوختی تولید می‌شوند. شانزده ترکیب PAHs به‌عنوان آلاینده‌های اولویت‌دار در لیست اژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (US EPA) ثبت شده‌اند که بسیار پایدار بوده و به آسانی در بافت‌های مختلف جانداران دریایی به دلیل خاصیت آبگریزی و چربی‌دوستی تجمع می‌یابند (Akhbarizadeh et al., 2019). فنانترن به عنوان یکی از ترکیبات موجود در این لیست، از فراوانترین آلاینده‌ها در محیط زیست دریایی است و بخاطر وزن مولکولی پایین و چربی‌دوستی به راحتی در جانوران دریایی تجمع می‌یابد (Hannam et al., 2010; Luchmann et al., 2015).

صدف مرواریدساز محار با نام علمی *Pinctada radiata* (Leach., 1814)، یکی از گونه‌های بسیار با ارزش اکولوژیکی و اقتصادی خلیج فارس است که حدود ۹۵٪ جمعیت صدف مرواریدساز در منطقه را تشکیل می‌دهد. به دلیل توانایی ترشح مروارید طبیعی و لایه مادر مروارید در پوسته و داشتن ارزش اقتصادی، این صدف مرواریدساز توجه زیادی را به خود جلب کرده است. پوسته صدف مرواریدساز حاوی ۹۵-۹۹ درصد کربنات کلسیم است که در دو لایه معدنی شده زیستی آرایش یافته‌است. پریسماتیک به عنوان لایه بیرونی، از کریستال‌های کلسیت پایدار ساخته شده و ناکرئوس به عنوان لایه داخلی، از کریستال‌های آراگونیت تشکیل شده است (Liu et al., 2017). باقیمانده پوسته (۵٪-۱۰٪) از مواد آلی شامل لیپیدها، پلی-ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها و پروتئین‌ها تشکیل شده است. این توده آلی نقش مهمی در الگوی ساختاری و هسته‌گذاری کریستال‌های کربنات کلسیم ایفا می‌کند. فرض بر این است که فرآیند معدنی شدن زیستی، ساخت پوسته و مروارید را تحت کنترل دارد (Takeuchi and Endo., 2005; Liu et al., 2012, 2017). پروتئین‌های ماتریکس پوسته مثل ناکرین در ساخت میکروساختار لایه‌های پوسته و مروارید و چند شکلی کریستال‌های کربنات کلسیم (کلسیت و آراگونیت) سهیم هستند. علی‌رغم مقدار بسیار کم این پروتئین‌ها، آنها نقش کلیدی در رشد و نمو پوسته دارند. ناکرین پروتئین ماتریکس پوسته با فعالیت انیدراز کربنیک دارای دومین تکراری Gly-Xaa-Asn که به کلسیم اتصال می‌یابد، در تشکیل کریستال‌های کربنات کلسیم لایه ناکرئوس شرکت داشته و به عنوان کاتالیزور در تشکیل یون HCO_3^- عمل می‌کند و به شدت در کریستاله شدن کربنات کلسیم فعالیت می‌کند (Miyamoto et al., 2005; Yano et al., 2007; Liu et al., 2012).

تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر متقابل تغییرات دما، pH و آلاینده بر روی بیان ژن پروتئین ماتریکس پوسته صدف مرواریدساز محار انجام نشده است. اما با این وجود، مطالعاتی که صرفاً اثر استرس‌هایی مثل افزایش دما و یا کاهش pH را چه به صورت جداگانه و چه به صورت توأم بر روی بیان ژن انجام شده است در اینجا ذکر می‌شوند. Huning و همکاران (۲۰۱۳) اثر کاهش pH آب دریا بر روی روند بیان ژن پروتئین ماتریکس پوسته در ماسل *Mytilus edulis* دریای مدیترانه بررسی کردند. نتایج نشان داد که با کاهش pH آب، میزان بیان ژن کاهش می‌یابد. Liu و همکاران (۲۰۱۲) اثر همزمان افزایش دما و کاهش pH آب دریا را بر روی بیان ژن پروتئین ماتریکس در صدف مرواریدساز *Pinctada fucata* بررسی کردند و مشاهده کردند که این دو پارامتر اثر منفی بر روی میزان بیان ژن داشته است. Liu و همکاران (۲۰۱۷) اثر اسیدی شدن اقیانوس‌ها را بر روی رشد،

کلسیفیکاسیون پوسته و بیان ژن پروتئین ماتریکس در صدف مرواریدساز *Pinctada fucata* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که اسیدی شدن باعث کاهش در رشد، نرخ کلسیفیکاسیون پوسته و بیان ژن شده است. Parvizi و همکاران (۲۰۲۳) بیان تعدادی ژن‌های کلسیفیه کننده پوسته صدف مروارید ساز *Pinctada persica* را در دو فصل سرد و گرم مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که تعدادی از ژن‌ها در فصل سرد بیان بیشتری داشته و تعدادی از آنها مانند ناکرین در فصل گرم بیان بیشتری را نشان دادند.

بنابراین، هدف از مطالعه حاضر تشخیص الگوی بیان ژن ناکرین در صدف مرواریدساز محار تحت شرایط تغییرات دما، pH و فنانترن به عنوان آلاینده مدل است (Hannam et al., 2010) این ژن براساس نقش آن در فرآیند معدنی شدن زیستی در بافت جبه انتخاب شده است. غلظت آلاینده از شرایط محیطی واقعی آب‌های خلیج فارس گرفته شده است (Aagh et al., 2016). pH و دمای انتخاب شده مطابق با پروژه‌های تغییر اقلیم (IPCC., 2014; Wong et al., 2014) می‌باشد که انتظار می‌رود pH به طور متوسط به اندازه ۰/۵ واحد کاهش یابد و دما به طور متوسط چهار درجه سانتی‌گراد برای اقیانوس‌ها و دریاها سراسر جهان افزایش یابد. تحت شرایط استرس، تعدیل و تنظیم بیان ژن بسیار حساس بوده و بازخوردی سریع برای حوادث استرس-زا دارد (Liu et al., 2012). بنابراین، ارزیابی الگوی بیان ژنی که مسئول فرایند کلسیمی شدن است، می‌تواند تکنیک مناسبی برای بررسی اثرات تغییرات اقلیمی بر روی جانداران دریایی در شرایط وقوع تغییر اقلیم باشد.

روش کار

جمع‌آوری و سازگاری دوکفه‌ای‌ها

تعداد ۳۶۰ قطعه صدف مرواریدساز محار که طی عملیات غواصی بوسیله دست از اطراف جزیره هندورابی جمع‌آوری شدند و به وسیله یونولیت به پژوهشکده میگوی کشور واقع در بوشهر منتقل گردیدند. منطقه هندورابی عاری از آلودگی نفتی است و بنابراین به عنوان منطقه تمیز و عاری از هر نوع آلودگی در نظر گرفته شد. به محض رسیدن به پژوهشکده، دوکفه‌ای‌ها به طور تصادفی در سه تانکر ۳۰۰ لیتری حاوی آب دریای فیلتر شده و هوادهی شده به مدت دو هفته در شرایط محیطی (جدول ۱)، سازگار شدند. آب دریا قبل از وارد شدن به داخل مخزن با کربن فعال و فیلتر شنی، فیلتر گردید. صدف‌ها از نظر اندازه تقریباً هم اندازه بودند (طول پوسته، میانگین $\pm$ انحراف معیار، $4/8 \pm 0/6$ سانتی‌گراد). در طی دوره سازگاری، صدف‌های مرواریدساز با جلبک تغلیظ شده *Cheatocerosus* sp. دوازده ساعت قبل از تعویض آب تغذیه شدند. همچنین، خصوصیات فیزیکی آب هر روز اندازه‌گیری و آب به صورت روزانه تعویض شد.

جدول ۱. مشخصات فیزیکی و شیمیایی آب دریا در دوره سازگاری در مطالعه حاضر

دما (درجه سانتی-گراد)	pH	شوری (PSU)	قلیابیت کل ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)	غلظت اکسیژن (mg.l^{-1})	دوره نوری
$0 \pm 24/5$	۸/۱	۳۵	$2521/34 \pm 1/52$	$4/5 \pm 2/1$	طبیعی

طراحی آزمایش

دوره آزمایشی با هشت تیمار متفاوت با دو سطح pH، دو سطح دما و غلظت ثابت فنانترون و هر کدام با سه تکرار به مدت چهار هفته انجام شد. دو هفته اول معارضه به این دلیل است که حداقل زمان مورد نیاز برای سازگاری نرمتن با شرایط جدید در نظر گرفته می شود (Matoo *et al.*, 2013). مشخصات تیمارها در جدول ۲ ارائه شده است. برای این منظور تعداد پانزده عدد دو کفه ای در هر تانک بیست لیتری قرار گرفت.

جدول ۲. مشخصات تیمارهای مختلف در مطالعه حاضر

شماره تیمار	pH	دما (درجه سانتی گراد)	غلظت فنانترون (نانوگرم بر لیتر)
۱ (کنترل)	۸/۱	۲۴	۰
۲	۷/۶	۲۴	۰
۳	۸/۱	۲۸	۰
۴	۷/۶	۲۸	۰
۵	۸/۱	۲۴	۸
۶	۸/۱	۲۸	۸
۷	۷/۶	۲۴	۸
۸	۷/۶	۲۸	۸

تغییر pH با استفاده از تزریق دی اکسید کربن از طریق سنگ هوا به آب انجام شد، بدین صورت که به مدت ۲۴ ساعت گاز CO₂ خالص به آب دریای فیلتر شده در داخل مخزن سر بسته تزریق می شد تا به pH مورد نظر (۷/۶) برسد. تغییر دما با استفاده از بخاری های آکواریومی انجام شد. غلظت آلاینده بر اساس آنچه در آب های خلیج فارس در مطالعات قبلی اندازه گیری شده تعیین گردید (Mirza *et al.*, 2012, Agah *et al.*, 2016). مقدار مشخصی فنانترون در استون حل شد و محلول به دست آمده در دمای منفی ۲۰ درجه و در تاریکی نگهداری شد. غلظت مورد نظر فنانترون بر حسب نانوگرم بر لیتر در تانک ها از طریق رقیق کردن محلول به واسطه اضافه کردن آن به تانک های آزمایشی به دست آمد. برای نگهداری کیفیت و غلظت پایدار فنانترون، آب دریا از آب های ساحلی بوشهر پمپ می گردید و قبل از استفاده به وسیله فیلتر شنی و کربن فعال فیلتر می شد. آب آکواریوم ها هر ۲۴ ساعت یکبار تعویض می گردید. صدف های مروارید ساز در طی دوره آزمایش، روزانه یکبار با فیتوپلانکتون تجاری حدود دوازده ساعت قبل از تعویض آب به اندازه ۳/۵ میلی لیتر در هر تانک تغذیه شدند. تغذیه صدف ها با استفاده از گونه جلبک *Cheatocerosus* sp. به شکل تازه صورت گرفت. دما و pH، با فاصله زمانی ۲ ساعت، طی روز اندازه گیری و کنترل شده تا از عدم تغییر آن اطمینان حاصل شود. هر ۲۴ ساعت یکبار تانک ها برای مرگ و میر بصورت روزانه بررسی می گردید، به این صورت که در حالت عادی صدف جانور باز است اگر پاسخی از جانور دریافت نشود به عنوان مرده در نظر گرفته و از تانک خارج می گردید.

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از جبه صدف مرواریدساز در انتهای ۲۴ ساعت اول، انتهای ۴۸ ساعت اول و انتهای روز بیست و هشتم انجام گرفت. در هر مرحله از نمونه‌برداری تعداد پنج صدف مرواریدساز به صورت تصادفی انتخاب شد، اندام جبه برای مطالعه بیان ژن، در ابتدا در داخل تیوپ دو میلی‌لیتری قرار گرفته و دور آن را فویل آلومینیوم پیچیده و سپس در نیتروژن مایع قرار گرفته تا به سرعت منجمد شده و در نهایت به فریز منفی ۸۰ منتقل گردید.

سنجش میزان بیان ژن

در این مطالعه، استخراج RNA از نمونه‌ها، به وسیله محلول تریزول^۱ (TriPure Isolation Reagent, Roche, Sandhofer, Germany, Cat. No. 11667157001) طبق دستورالعمل انجام گرفت. پس از استخراج، کمیت و کیفیت RNA به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز روی ژل ۱٪ بررسی گردید. در این دستگاه جذب نوری محلول RNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر قرائت شد. برای حذف DNA باقیمانده از محلول RNA استخراج شده، تیمار DNase با استفاده از کیت سیناکلون (SinaClon, Tehran, Iran, Cat. No. MO5401) طبق دستورالعمل انجام شد. cDNA با استفاده از کیت سیناکلون (SinaClon, Tehran, Iran, Cat. No. RT5201) طبق دستورالعمل کیت از روی نمونه‌های RNA تیمار شده ساخته شد. در این پژوهش پرایمرهای ژن ناکرین از مطالعه Takeuchi و Endo (۲۰۰۵) و پرایمرهای ژن gapdh به عنوان ژن مرجع از مطالعه Liu و همکاران (۲۰۱۷) انتخاب شدند (جدول ۳).

جدول ۳. توالی پرایمرهای اختصاصی استفاده شده در مطالعه حاضر

مرجع	توالی پرایمر	کد شناسایی	نام پروتئین	نام ژن
Takeuchi and Endo, 2005	F: CCAGAGGATGGGGAAAATCT	BAA90540	nacrein	nacrein
	R: GCCTCCATAGGTGTGAAACG			
Liu et al., 2017	F: TCTGCTGATGCTCCTATGTTTG	AB205404	gapdh	gapdh
	R: CGTTGATTATCTTGCGAGTG			

جهت بررسی میزان بیان ژن ناکرین در صدف مرواریدساز محار از روش Real-time PCR استفاده شد. به منظور بررسی میزان بیان ژن از پرایمر اختصاصی فوق‌الذکر استفاده گردید. برای انجام واکنش Real-time PCR بر اساس دستورالعمل کیت Amplicon RealQ 2x Master Mix Green, Denmark, Cat. No. A323402) و با استفاده از دستگاه Roche LightCycler 96 thermal cycler (Roche Applied Science, Germany) برنامه دستگاه بدین ترتیب بود: ۱ چرخه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۴۵ چرخه در ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۹°C درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه. آنالیز داده‌های Real time PCR براساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (تیمار شده باآلاینده) و نمونه‌های کنترل (تیمار نشده باآلاینده) محاسبه و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ ، نسبت ژن هدف به ژن مرجع gapdh از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen., 2001). فرمول محاسبه آن به شرح زیر است:

^۱ Trizol

$\Delta Ct = Ct - \text{مرجع} - Ct$ ژن هدف

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{نمونه تیمار شده}$

$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{میزان نسبی بیان ژن مورد نظر}$

آنالیز آماری

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار R studio version 1.3.1093 انجام گردید و نتایج توسط آنالیز واریانس چند طرفه (Multiway ANOVA) مورد آنالیز قرار گرفت. تفاوت بین گروه‌های آزمایشی با روش آماری Duncan محاسبه گردید. اطلاعات به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (mean $\pm$ SD) نمایش داده شده و $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2016 ترسیم شد. برای تعیین وجود همبستگی بین داده‌ها نیز از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد.

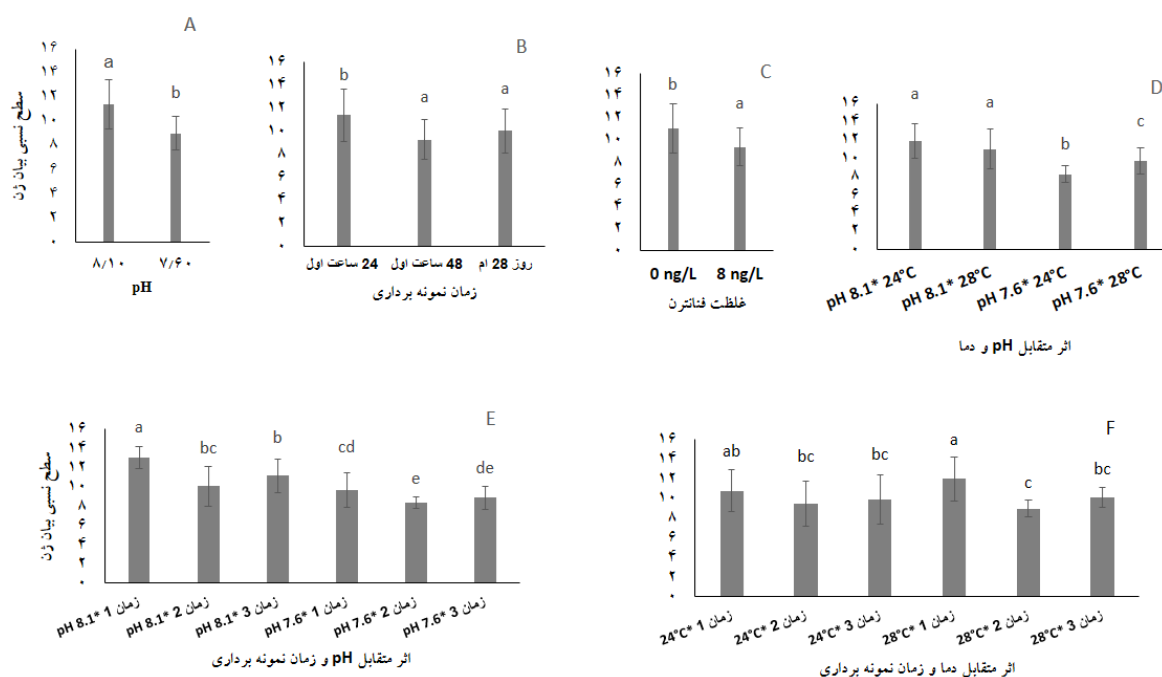
نتایج

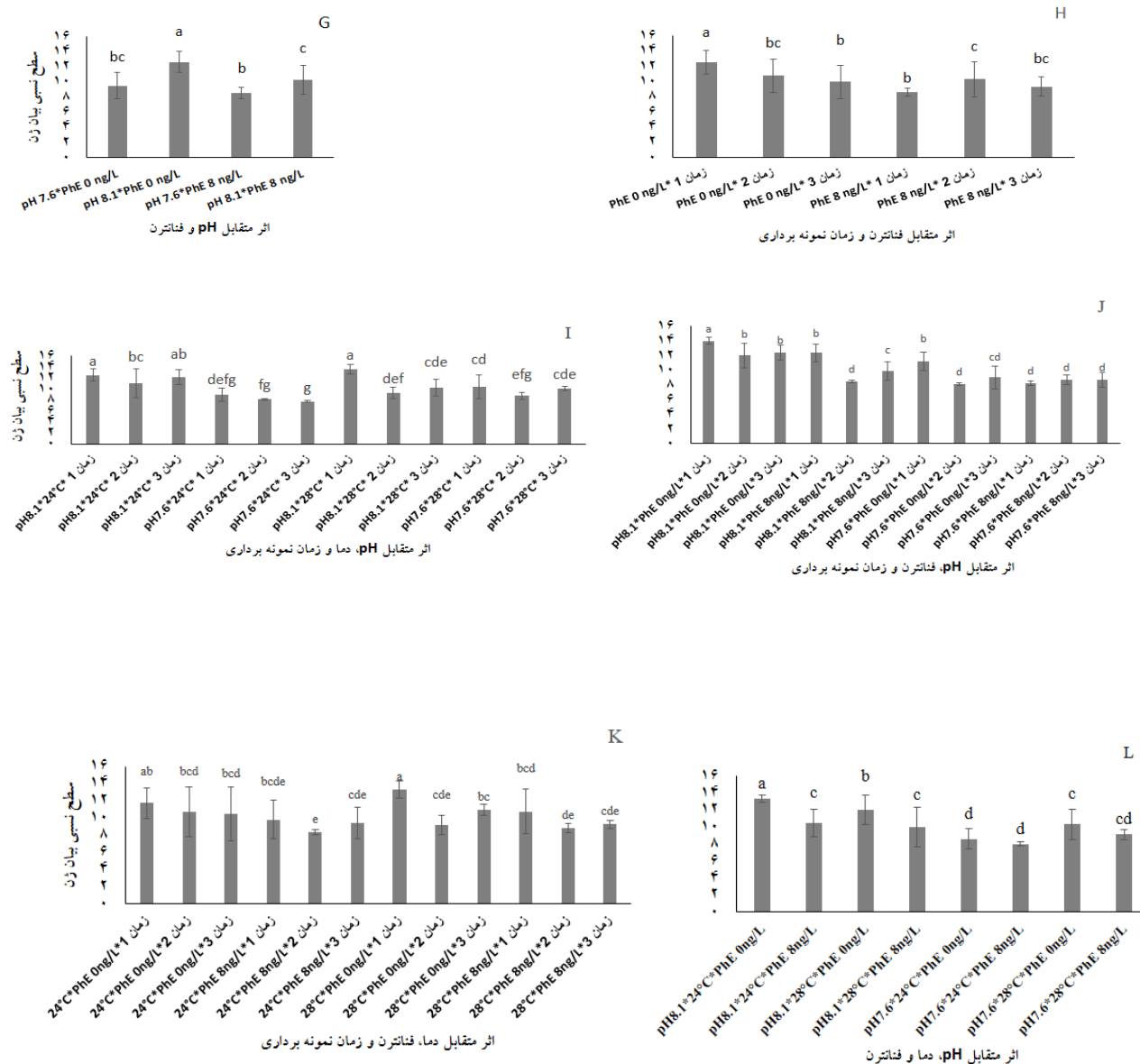
میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار اختلاف معنی داری در عوامل استرس‌زای pH و فنانتین به صورت منفرد نشان داد (جدول ۴ و شکل‌های ۱-A، ۱-C) با گذر زمان میزان بیان این ژن در این بافت کاهش معنی داری داشته است (شکل ۱-B). به طوری که ۲۴ ساعت اول با ۴۸ ساعت و ۲۸ روز اختلاف معنی داری نشان داد. آنالیز ANOVA چند طرفه نشان داد که در این بافت عوامل استرس‌زا اثر متقابل معنی داری بر روی بیان ژن ناکرین داشته است. به طوری که تقابل‌های دوگانه (جدول ۴ و شکل‌های ۱-D تا ۱-H) و تقابل‌های سه‌گانه (جدول ۴ و شکل‌های ۱-I تا ۱-L) بین pH، دما، زمان و آلایندگی اثر کاهنده‌ای بر روی میزان بیان ژن در بافت جبه داشته‌اند. تقابل چهارگانه عوامل استرس‌زا اثر معنی داری نداشته است (جدول ۴).

جدول ۴. آنالیز واریانس میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار

عامل استرس‌زا و اثر متقابل آنها	df	F	p value
pH	۱	۶۳۰/۸۵	۰/۰۰
دما	۱	۰/۳۴۷	۰/۵۵
زمان	۲	۱۶۲/۹۶	۰/۰۰
فنانتین	۱	۲۸۶/۷۶	۰/۰۰
pH * دما	۱	۱۴۲/۲۷	۰/۰۰
pH * زمان	۲	۲۴/۰۲	۰/۰۰
دما * زمان	۲	۲۶/۸۰	۰/۰۰

pH * فنانترون	۱	۵۶/۲۱	۰/۰۰
دما * فنانترون	۱	۱/۵۵	۰/۲۱
زمان * فنانترون	۲	۸/۲۰	۰/۰۰
pH * دما * زمان	۲	۳۳/۵۵	۰/۰۰
عامل استرس‌زا و اثر متقابل آنها	df	F	p value
pH * دما * فنانترون	۱	۱۳/۹۲	۰/۰۰
pH * زمان * فنانترون	۲	۷۲/۰۵	۰/۰۰
دما * زمان * فنانترون	۲	۲۱/۰۶	۰/۰۰
pH * دما * زمان * فنانترون	۲	۱/۶۲	۰/۲



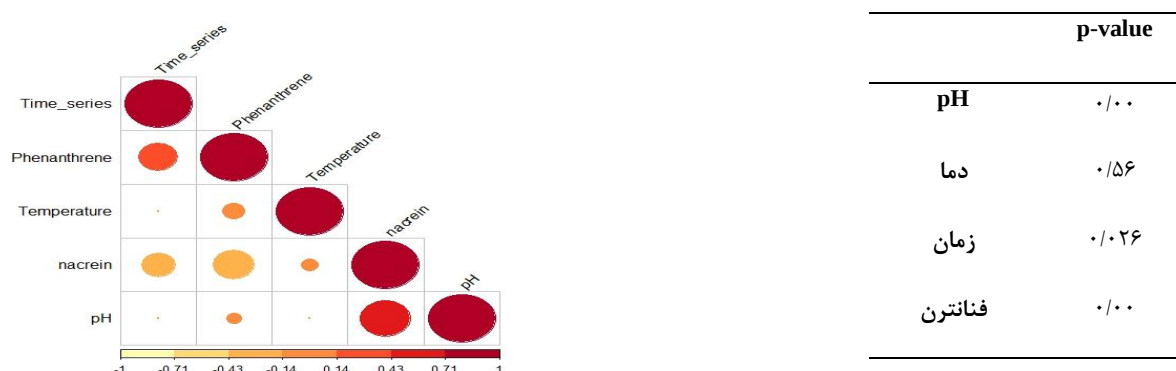


شکل ۱. میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در دو سطح pH (A)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در سه زمان نمونه-برداری (B)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در دو سطح غلظت فناترن (C)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه در اثر متقابل دو سطح pH و دو سطح دمایی (D)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در اثر متقابل دو سطح pH و سه زمان نمونه-برداری (E)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در اثر متقابل دو سطح دمایی و سه زمان نمونه-برداری (F)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در اثر متقابل دو سطح pH و دو سطح فناترن (G)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در اثر متقابل دو سطح فناترن و سه زمان نمونه-برداری (H)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در اثر متقابل دو سطح pH، دو سطح دمایی و سه زمان نمونه-برداری (I)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در اثر متقابل دو سطح pH، دو سطح فناترن و سه زمان نمونه-برداری (J)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در اثر متقابل دو سطح دمایی، دو سطح فناترن و سه زمان نمونه-برداری (K)، میزان بیان ژن ناکرین در بافت جبه صدف محار در اثر متقابل دو سطح دمایی، دو سطح فناترن و سه زمان نمونه-برداری (L). حروف متفاوت استفاده شده در نمودارها به معنای وجود اختلاف معنی دار بین عوامل استرس‌زا و اثرات متقابل آنها است.

ارتباط بین پارامترهای محیطی و بیان ژن

میزان همبستگی بیان ژن پروتئین ماتریکس ناکرین در بافت جبه صدف محار با عوامل استرس‌زا در جدول ۵ و شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج بیانگر این است که تنها متغیر دما است که ارتباط معنی‌داری با بیان ژن ناکرین نداشته است.

جدول ۵. میزان معنی‌داری ارتباط بین بیان ژن پروتئین ماتریکس ناکرین در بافت جبه با عوامل محیطی



شکل ۲. ارتباط بین بیان ژن پروتئین ماتریکس ناکرین در بافت جبه با عوامل محیطی

بحث

سیستم‌های زنده انواع استراتژی‌های مختلف را برای پاسخ به چالش‌های داخلی و خارجی دارند. درحالی‌که این پاسخ‌ها اغلب رفتاری یا متابولیکی هستند، تعدیل بیان ژن می‌تواند به طور گسترده‌ای به عنوان مکانیسمی قدرتمند برای حفظ هموستازی سلولی تحت استرس بکار گرفته شود (Todgham and Hofmann., 2009). در مطالعه حاضر، تغییرات دما و pH به همراه آلایند در گذر زمان که می‌توانند بر روی بیان ژن پروتئین ماتریکس ناکرین اثر داشته باشند بررسی شدند. تشکیل پوسته و مروارید در صدف محار نیازمند مقدار زیادی یون کلسیم و فرایند معدنی شدن شدن زیستی است که بر نقل و انتقال و کنترل یون‌های کلسیم شاره دارد (Chandra et al., 2021).

مطالعه حاضر نشان داد که pH، دما و آلایند فاکتورهای محرک در تغییرات سطوح رونویسی mRNA برای ناکرین بودند. سطح بیان ناکرین با توجه به پارامترهای محیطی چه به صورت منفرد و چه به شکل متقابل، به طور معنی‌داری متفاوت بوده است و نسبت به شرایط نرمال حالت کاهشی داشته است. با گذر زمان میزان بیان ژن ناکرین کاهش داشته است، به‌طوری‌که در نوبت دوم نمونه‌برداری (۴۸ ساعت اول) کاهش معنی‌داری نسبت به نوبت اول نمونه‌برداری (۲۴ ساعت اول) دیده شد و با گذر زمان تا روز بیست و هشتم افزایش غیرمعنی‌داری نسبت به نوبت دوم دیده شده است که این احتمالاً به دلیل سازگاری صدف محار با شرایط جدید است. نتایج آنالیز همبستگی می‌تواند تاییدی بر اثرگذار بودن گذر زمان بر بیان ژن ناکرین در شرایط جدید اقلیمی در حضور آلایند است. اثرات منفی pH پایین بر روی سطوح بیان ژن، همچنین ممکن است در کاهش نرخ کلسیفیه شدن پوسته و فقدان یکپارچگی ساختاری پوسته مشارکت داشته باشد. صرف‌نظر از مکانیسم‌های درگیر، خصوصیات مکانیکی به خطر افتاده پوسته ناشی از معارضه با pH پایین آب دریا، احتمالاً صدف مروارید ساز را نسبت به شکارچیان و انگل‌ها حساس می‌کند (Liu et al., 2017; Knights et al., 2020).

فنانترین به عنوان نماینده PAHs اثر کاهشی بر بیان ژن داشته است. PAHs در محیط سلول منجر به تولید واسطه‌های ROS (گونه اکسیژن فعال) می‌شوند که میل ترکیبی شدیدی به گوانیدین DNA دارند و احتمالاً همین امر باعث کاهش رونویسی mRNA در هسته سلول شده (Sarkar et al., 2018) و همبستگی معنی‌دار بین سطح بیان ژن ناکرین و غلظت فنانترین موکد این مطلب است. از این گذشته، شرایط اسیدی شدن و گرمایش آب اقیانوس‌ها نیز باعث تولید واسطه‌های ROS در دوکفه‌ای‌ها می‌شود (Coppola et al., 2018; Ullah et al., 2021). در جدول ۴ مشاهده می‌شود که بیشترین تاثیر بر روی بیان ژن را فنانترین بصورت منفرد داشته است. در اثرات متقابل دو و سه گانه اثر کاهشی میزان بیان ژن دیده شد که می‌توان گفت عوامل مورد بررسی اثر سینرژیکی دارند، به خصوص زمانی که کاهش pH، افزایش غلظت فنانترین و زمان دوم و سوم نمونه‌برداری همراه هم باشند. در نهایت به نظر می‌رسد که رونویسی این ژن پاسخ‌های متفاوتی به شرایط محیطی متفاوت می‌دهد. تنظیم رو به پایین ژن ناکرین در این مطالعه با مطالعه Liu و همکاران (۲۰۱۲) منطبق است که دریافتند کاهش pH و افزایش دما باعث تنظیم رو به پایین ژن کلسیفیه کننده ناکرین در صدف مروارید ساز *Pinctada fucata* می‌شود. در مقابل این نتایج، مطالعه دیگری نشان داد که با کاهش pH افزایش جبرانی در سطوح رونویسی ژن‌های کلسیفیه کننده در لارو سه روزه توتیای دریای مدیترانه *Paracentrotus lividus* مشاهده شده است (Martin et al., 2009). Zippay و Hofmann (۲۰۱۰) نشان دادند که تغییر در عوامل محیطی ذکر شده، اثری بر روی الگوی بیان ژن‌های پروتئین ماتریکس لارو آبالون نداشته است. این اختلافات در نتایج پیشنهاد می‌کند که پاسخ‌ها ممکن است به دلیل ظرفیت سازگاری گونه‌ها به شرایط تغییرات اقلیم باشد که بین جمعیت‌های با پراکنش جغرافیایی بزرگ متفاوت است.

کاهش در سطح بیان ژن ناکرین ممکن است با کاهش نرخ کلسیفیه شدن در ارتباط باشد. حساسیت بالای این ژن به تغییر عوامل محیطی می‌تواند به دلیل ارتباط منفی بین افزایش فشار CO₂ و کلسیفیکاسیون در دوکفه ای‌های دریایی باشد (Berge et al., 2006). اگر درجه حرارت بالا و pH کاهش یافته برای مدت طولانی‌تر ادامه یابد، این تغییرات می‌تواند اثری آبشاری بر روی رشد پوسته و تشکیل مروارید ایجاد کند. با توجه به تنظیم پایین ژن کلسیفیه کننده مشاهده شده در این مطالعه، ممکن است که اختلالات در تعادل بین تولید هماهنگ ماتریکس آلی و معدنی می‌تواند بر ترکیب و خصوصیات مکانیکی پوسته و مروارید اثر داشته باشد. این در آینده می‌تواند باعث تولید مروارید با کیفیت پایین شود. پروتئین‌های ماتریکس پوسته می‌توانند بر تنوع شکل پوسته بوسیله نظم‌دهی به کریستال‌های کربنات کلسیم در شیوه‌های خاص اثر داشته باشند (Suzuki et al., 2009). علاوه بر این، تولید بخش آلی پوسته هزینه انرژی بسیاری دارد و همین امر باعث می‌شود تحت شرایط استرسی بیان ژن پروتئین ماتریکس پوسته کاهش یابد و در واقع اولین قربانی برای حفظ نگهداری هموستازی بدن جاندار باشد (Huning et al., 2013; Van Colen et al., 2018; Knights et al., 2020). بعضی پروتئین‌ها مثل ناکرین در سنتز لایه‌های پریشماتیک و ناکروئوس صدف مروارید ساز دخیل هستند (Tsukamoto et al., 2004; Samata et al., 1999). Miyamoto et al., 2005). ناکرین فعالیت کربنیک انیدرازی دارد و یون‌های کربنات را برای پوسته فراهم می‌کند (Miyamoto et al., 2005). کاهش در متابولیسم ممکن است کاهشی در نرخ کلسیفیه شدن و تغییراتی در میکروساختارها را به دنبال داشته باشد. بنابراین، علاوه بر ارزیابی رشد پوسته و میکروساختارها، تغییرات در سطح مولکولی در صدف مرواریدساز که تحت شرایط مختلف pH باشد، می‌بایست بررسی شود.

به‌طور کلی، به نظر می‌رسد کاهش pH و افزایش دمای آب دریا در حضور فنانترین منجر به تنظیم معنی‌دار و رو به پایین بیان ژن کلسیفیه کننده ناکرین در صدف مرواریدساز محار می‌شود. بنابراین، یافته‌های این مطالعه می‌تواند اطلاعات بسیار ارزشی را در مورد مکانیسم مولکولی پایه صدف مرواریدساز در خلیج فارس، تحت شرایط تغییرات دما و pH در حضور آلاینده فراهم کند. مطالعات آزمایشگاهی و میدانی بلندمدت بر روی سازگاری صدف محار به شرایط تغییر دما و pH و آلاینده و تاثیر این عوامل بر بیان ژن‌های مختلف پروتئین ماتریکس پوسته بایستی انجام شود تا اطلاعات جامع و کامل‌تری به دست آید.

مراجع

- Aagh, H., Rahmanpour, S., Abedi, E., Arebi, I., Mahdinia, A. 2016. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater and sediments of West-Northern coasts of the Persian Gulf. *Indian Journal of Marine Sciences*. 45(12):1688–1695.
- Akhbarizadeh, R., Moore, F., Keshavarzi, B. 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons and potentially toxic elements in seafood from the Persian Gulf: presence, trophic transfer, and chronic intake risk assessment. *Environmental Geochemistry Health*. [Dio.org/10.1007/s10653-019-00343-1](https://doi.org/10.1007/s10653-019-00343-1).
- Berge, J.A., Bjerkeng, B., Pettersen, O., Schanning, M.T., Oxnevad, S. 2006. Effects of increased sea water concentrations of CO₂ on growth of the bivalve *Mytilus edulis* L. *Chemosphere*. 62:681–687.
- Chan, K.Y.K., García, E., Dupont, S., 2015. Acidification reduced growth rate but not swimming speeds of larval sea urchins. *Scientific Reports*. 5, 9764.
- Chandra, K., Yuan, R., Ziniu, M., Steven, Y., Vengatesen, T. 2021. Oyster biomineralization under ocean acidification: From genes to shell. *Global Change Biology*, 3779–3797.
- Coppola, F., Almeida, Â., Henriques, B., Soares, A. M. V. M. 2018. Biochemical responses and accumulation patterns of *Mytilus galloprovincialis* exposed to thermal stress and Arsenic contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147: 954–962.
- Hannam, M.L., Bamber, S.D., Galloway, T.S., John Moody, A., Jones, M.B. 2010. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere*. 78 (7):779–784.
- Holcomb, M., Venn, A.A., Tambutté, E., Tambutté, S., Allemand, D., Trotter, J., McCulloch, M. 2014. Coral calcifying fluid pH dictates response to ocean acidification. *Scientific Reports*. 4, 5207.
- Hüning, A. K., Melzner, F., Thomsen, J., Gutowska, M. A., Krämer, L., Frickenhaus, S., Rosenstiel, P., Pörtner, H. O., Philipp, E. E. R., Lucassen, M. 2013. Impacts of Seawater Acidification on Mantle Gene Expression Patterns of the Baltic Sea Blue Mussel: Implications for Shell Formation and Energy Metabolism. *Marine Biology*. 160(8):1845–61.
- IPCC. 2014. Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. In: Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. pp. 1820.
- Knights, A. M., Norton, M. J., Lemasson, A. J., Stephen, N., Harvey, B. P. 2020. Ocean Acidification Mitigates the Negative Effects of Increased Sea Temperatures on the Biomineralization and Crystalline Ultrastructure of *Mytilus*. *Frontiers in Marine Science*. 7:1–13.
- Liu, W., Huang, X., Lin, J., He, M. 2012. Seawater acidification and elevated temperature affect gene expression patterns of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *PLoS ONE*. 7(3): 33679.
- Liu, W., Yu, Z., Huang, X., Shi, Y., Lin, J., Zhang, H., Yi, X., He, M. 2017. Effect of ocean acidification on growth, calcification, and gene expression in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Marine Environmental Research*.
- 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):402–8.
- Martin, S.E., Gattuso, J.P. 2009. Response of Mediterranean coralline algae to ocean acidification and elevated temperature. *Global Change Biology*. 15: 2089–2100.
- Matoo, O.B., Ivanina, A.V., Ullstad, C., Beniash, E., Sokolova, I.M. 2013. Interactive effects of elevated temperature and CO₂ levels on metabolism and oxidative stress in two common marine bivalves (*Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 164: 545–553.
- Mirza, R., Faghiri, I., Abedi, E. 2012. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of Khure-Musa Estuarine, Persian Gulf. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 4(2): 136–141.
- Miyamoto, H., Miyoshi, F., Kohno, J. 2005. The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. *Zoological Science*. 22: 311–315.

- Nardi, A., Mincarelli, L.F., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Regoli, F. 2017. Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 169:493–502.
- Parvizi, F., Akbarzadeh, A., Farhadi, A., Arnaud-Haond, S., Ranjbar, M.Sh. 2023. Expression pattern of genes involved in biomineralization in black and orang mantle tissues of pearl oyster, *Pinctada persica*. *Frontiers in Marine Science* 9:1038692.
- Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., Akera, S. 1999. A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 462: 225-229.
- Sampaio, E., Lopes, A.R., Francisco, S., Paula, J.R., Pimentel, M., Maulvault A, L., Repolho, T., Grilo, T. F., Pousao-Ferreira, P., Marques, A., Rosa, R. 2017. Ocean acidification dampens warming and contamination effects on the physiological stress response of a commercially important fish. *Biogeosciences*.1-27. <https://doi.org/10.5194/bg-2017-147>.
- Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., Nishimura, T. 2009. An Acidic Matrix Protein, Pif, Is a Key Macromolecule for Nacre Formation. *Science*. 325, 1388.
- Takeuchi, T., Endo, K. 2005. Biphasic and Dually Coordinated Expression of the Genes Encoding Major Shell Matrix Proteins in the Pearl Oyster *Pinctada fucata*. *Marine Biotechnology*. 8: 52-61.
- Todgham, A.E., Hofmann, G.E. 2009. Transcriptomic response of sea urchin larvae *Stroglyocentrotus purpuratus* to CO₂-driven seawater acidification. *Journal of Experimental Biology*. 212: 2579–2594.
- Tsukamoto, D., Sarashina, I., Endo, K. 2004. Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 320:1175-1180.
- Ullah, F., Chen, H., Gu, H., Wang, T., Dupont, S., Kong, H., Shang, Y., Wang, X., Lu, W., Hu, M., Wang, Y. 2021. Antioxidant responses of the mussel *Mytilus coruscus* co-exposed to ocean acidification , hypoxia and warming. *Marine Pollution Bulletin*. 162: 111869.
- Van Colen, C., Jansson, A., Saunier, A., Lacoue-Labathe, T., Vincx, M. 2018. Biogeographic Vulnerability to Ocean Acidification and Warming in a Marine Bivalve. *Marine Pollution Bulletin*. 126:308–11.
- Wang, X.D., Wang, M.Q., Jia, Z.H., Wang, H., Jiang, S., Chen, H., Wang, L.L., Song, L.S. 2016. Ocean acidification stimulates alkali signal pathway: A bicarbonate sensing soluble adenylyl cyclase from oyster *Crassostrea gigas* mediates physiological changes induced by CO₂ exposure. *Aquatic Toxicology*. 181:124-135.
- Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K., Miyamoto, H. 2007. A novel nacre protein N19in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 362(1): 158-163.
- Zippay, M., Hofmann, G.E. 2010. Effect of pH on gene expression and thermal tolerance of early life history stages of red abalone (*Haliotis Rufescens*). *Journal of Shellfish Research*. 29: 429–439.



Interactive effects of temperature, pH and phenanthrene on matrix protein nacrein gene expression in Persian Gulf pearl oyster *Pinctada radiata*

Fatemeh Jafari¹, Akram Sadat Naeemi^{*1}, Mohammad Mahdi Sohani², Mohsen Noorinezhad³

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Department of Ecology, Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Bushehr, Iran

Abstract

In the present study, the interaction effect of climate change accomplished by phenanthrene as a representative of contaminants was investigated on the expression of nacrein gene in the mantle tissue of *Pinctada radiata*. To determine the studied gene expression pattern changes, pearl oysters were exposed to isolated/ combined warming in two levels (24 and 28 °C), acidification in two levels (8.1 and 7.6) and phenanthrene concentration in two levels (0 and 8 ng/L) for 4 weeks. Experimental setup was arranged in eight exposure treatments with triplicate aquaria per treatment and each aquaria containing 15 animals in 20 L. Sampling was performed three times, i.e., 24 h, 48 h and 28 days after exposure. After 28 days of exposure, although no mortalities were observed in any treatments, the studied parameters caused significant reduction of nacrein expression in isolated exposure except for temperature, double interactions except for temperature and phenanthrene combination, and triple interaction. The quadruple interaction showed no significant effect on nacrein gene expression. These results demonstrated that the decreased seawater pH and elevated temperature in presence of contaminants caused downregulation of the nacrein gene and might impact the quality of pearl and shell of pearl oyster, *P. radiata*.

ARTICLE TYPE Research

Received: 18 August 2021

Accepted: 5 October 2021

ePublished: 8 February 2023

* Corresponding Author:
akramnaeemi@yahoo.com

Keywords: Climate changes, Gene Expression, *Pinctada radiata*, Persian Gulf, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons