



بیان ژن‌های کد کننده آنزیم آروماتازی CYP19 (a,b) در دوره تکامل لاروی ماهی زبرا (*Danio rerio* Hamilton, 1822)

حامد پاک نژاد^۱، طیبه عنایت غلام پور^{۲*}، رقیه صفری^۱

^۱گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
^۲گروه شیلات، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۵/۰۳/۲۲	
اصلاح: ۹۶/۱۰/۱۰	
پذیرش: ۹۷/۰۳/۲۵	
کلمات کلیدی:	
بیان ژن ماهی زبرا	
CYP19a	
CYP19b	

سیتوکروم P450 آروماتاز (CYP19) یک آنزیم استروئیدساز است که مسئول تبدیل آندروژن به استروژن است و نقش مهمی در تمایز جنسی رشد و چرخه تولید مثل در مهره‌داران ایفا می‌نماید. در ماهی زبرا دانیو، دو نوع ژن CYP19 شامل CYP19a و CYP19b شناسایی شده است. در این تحقیق، بیان ژن‌های کد کننده آنزیمی CYP19a و CYP19b در دوره تکامل ماهی زبرا دانیو در روزهای ۴، ۷، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ پس از تفریح بررسی شد. نرمال‌سازی بیان ژن‌های هدف با استفاده از ژن رفرنس β -actin صورت گرفت. میزان تغییرات سطوح بیان ژن‌های مذکور در دوره های تکامل لاروی به لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0.01$). نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار بیان ژن CYP19a به ترتیب در روزهای ۴۵ و ۱۰ روز پس از تفریح بود و بیشترین و کمترین مقدار بیان ژن CYP19b به ترتیب در روزهای ۴۵ و ۷ روز پس از تفریح مشاهده گردید. در روزهای ۷ و ۱۵ پس از تفریح بیان نسبی ژن CYP19a بطور معنی‌داری بالاتر از ژن مرجع بود ($P < 0.01$) و در روزهای ۴، ۱۰، ۳۰ و ۴۵ پس از تفریح بیان نسبی ژن CYP19b بطور معنی‌داری بیشتر از بیان ژن مرجع گزارش شد ($P < 0.01$). بر طبق نتایج، به نظر می‌رسد روند افزایشی بیان ژن‌های مذکور با گذشت دوره لاروی به دلیل توسعه و تکامل غدد تناسلی ماهیان و افزایش سطوح هورمون‌های جنسی باشد.

مقدمه

ژن CYP19 که آنزیم P450 سیتوکروم آروماتاز را کد می‌کند با تبدیل آندروژن به استروژن مسئول بیوسنتز استروژن است. آروماتاز^۱ یک ترکیب پیچیده آنزیمی است که تبدیل استروژن به استرادیول را کاتالیز می‌کند. در سلول‌های گرانولوزا، آروماتاز برای ایجاد فولیکول و در نتیجه کیفیت اووسیت ضروری است. همچنین بیوسنتز استروژن در بافت‌های مختلف بستگی به بیان ژن کد کننده آروماتاز یعنی CYP19 دارد و سطح استروژن با فعالیت آروماتاز و بیان ژن CYP19 مرتبط است. با توجه به اینکه استروژن سبب افزایش گیرنده هورمون‌های رشد و پرولاکتین در سلول‌های گیرنده می‌شود به طور غیر مستقیم بر لاکتوژن تاثیر دارد و نیز با رشد مرتبط است. ژن CYP19 نیز می‌تواند بر تولید هورمون و صفات رشد تاثیر داشته باشد (Simpson *et al.*, 1994; Chiang *et al.*, 2016).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: t.enayat111@gmail.com

¹ Aromatase

ماهیان استخوانی دارای دو شکل از ژن آروماتاز هستند که شامل CYP19a و CYP19b است و به ترتیب دو پروتئین با ساختار متفاوت P450aromA و P450aromB را کد می‌کنند. این دو پروتئین دارای میل ترکیبی مشابه به سوبسترا (معمولا تستوسترون) اما با خاصیت کاتالیزی متفاوت هستند (خاصیت کاتالیزی نوع b بیشتر از نوع a می‌باشد). ژن CYP19a در اکثر ماهیان درگناد بیان می‌شود و نقش مهمی در تمایز جنسی و رشد اووسیت دارد. در حالیکه CYP19b در مغز بیان می‌شود و به دلیل وابستگی استروژنی نوروژن دارای اهمیت زیادی است، که این فرایند در ماهیان تا بعد از بلوغ هم ادامه دارد. علاوه بر این در تغییر جنسیت، رفتار و تنظیم بازخورد محور HPG نیز نقش دارد (Uno and Ishizuka., 2012). همچنین این ژن در اندام و بافت‌های دیگر از جمله هیپوفیز، شبکیه چشم، بخش قدامی کلیه، طحال، کبد و چربی‌های احشایی نیز بصورت بسیار ضعیف بیان می‌شود که اشاره بر نواحی فعالیت استروژن‌ها در اهداف جنبی مختلف دارد. عوامل مختلفی از جمله فاکتورهای خارجی، فرآیند هرمافرودیت در برخی ماهیان، فسفریلاسیون، ژن‌های بالادست و استروئیدها و گیرنده‌های استروئیدی بر تنظیم فعالیت آروماتازی و بیان ژن آن می‌توانند اثر گذار باشند (Guiguen *et al.*, 2010). در سوف زرد، یک نوع بر انگیختگی استروژنی در جنس ماده مشاهده می‌شود به طوری که ماده‌ها رشد سریعتر و بیشتری از نرها دارند. در این گونه CYP19a1 در کبد ماده‌ها بیان ژنی بالایی دارد به همین دلیل تصور بر این است که این ژن در رشد متفاوت دوشکلی وابسته به جنس نیز نقش داشته باشد (Lynn *et al.*, 2008). در خصوص تنظیم بیان ژن CYP19a در ماهیان در طی تمایز جنسی فاکتور رونویسی ژن‌های foxl2 به همراه nr5a1 (sf1) به همراه cAMP به عنوان تنظیم کننده‌های بالادستی پروموتور CYP19a1a شناخته شده‌اند، گیرنده هسته‌ای Dax1 (Nr0b1) نیز از جمله عوامل رونویسی با پتانسیل تنظیم CYP19a1a عنوان شده است. علاوه بر این فرضیاتی در خصوص سرکوب CYP19a1a توسط فاکتور بالادستی از جمله ژن DMRT1 وجود دارد که هنوز قطعی نیست (Guiguen *et al.*, 2010).

بنابراین ژن CYP19a الگوهای بیان ژن زمانی و مکانی را در همه ماهیان استخوانی بطور واضح نشان می‌دهد. در تمام گونه‌های مورد مطالعه، سطوح بیان ژن CYP19a در تخمدان نسبت به سایر بافت‌ها بالاتر است. همچنین چندین گونه از ماهیان، بیان این ژن را در بخش قدامی کلیه نشان دادند. بخش قدامی کلیه به عنوان اندامی از ماهی که دارای قابلیت تولید استروئید می‌باشد، شناخته شده است (Borg, 1994). حضور ژن CYP19a در مغز، آبشش، قلب، طحال یا اندام‌های دیگر برخی از ماهیان نشان می‌دهد که این اندام‌ها قابلیت تولید هورمون‌های استروئیدی را دارند. نقش احتمالی ژن CYP19a در عملکرد این اندام‌ها هنوز روشن نگردیده است. شواهد نشان می‌دهد که ژن CYP19a در ماهیان و خزندگان قبل از تمایز جنسیت بیان می‌گردد (Fernandino *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2012) و استروئیدهای جنسی نقش مهمی را در تمایز جنسی ماهیان در مراحل بسیار ابتدایی زندگی ایفا می‌نمایند.

CYP19a آنزیم پایانی در مسیر ساخت استروئیدها است که آندروژن‌ها را به استروژن‌ها تبدیل می‌کند. بیان مناسب این آنزیم برای تولید مثل و تمایز جنسیت در اکثر مهره داران حیاتی است (Trant *et al.*, 2001). در پستانداران CYP19a در بافت‌های مختلفی مانند گنادهای پوست، بافت چربی، جفت و مغز بیان می‌شود (Mahendroo *et al.*, 1991). در مقابل، محل اصلی بیان CYP19a mRNA در گونه‌های استخوانی، بافت گنادهای آنها می‌باشد. همچنین در بافت‌های دیگر به ویژه غده هیپوفیز، شبکیه چشم، آبشش، قلب، خون، بخش قدامی کلیه، کلیه، طحال، چربی احشایی، روده و کبد نیز CYP19a mRNA بیان می‌شود. سطح mRNA ژن CYP19a در اوایل تفریح پایین می‌باشد اما پس از تفریح مقدار آن افزایش می‌یابد که در این تحقیق بررسی خواهد شد. همانطور که ذکر گردید، آنزیم آروماتاز که توسط ژن CYP19 کد می‌شود در تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌ها نقش کلیدی دارد. با توجه به نقش مهم استروژن در تنظیم فرآیندهای تولید مثلی، آنزیم‌های تولید کننده استروژن به عنوان نشانگرهای احتمالی برای صفات رشد و تولید مثلی به حساب می‌آیند. ماهی زبرا دانیو (*Danio rerio*) به دلیل همآوری بالا، اندازه کوچک، دوره جنینی شفاف و دوره زندگی کوتاه در مطالعات زیست پزشکی و بیان ژن کاربرد زیادی دارد (Lawrence, 2007; Koerber and Kalishman, 2009). از این رو هدف از پژوهش حاضر مطالعه روند بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آروماتازی CYP19a و CYP19b در روزهای مختلف پس از تفریح و طی دوره تکاملی ماهی زبرا دانیو (*Danio rerio*) است.

مواد و روش‌ها

جهت انجام آزمایش، مولدین (۱ مولد ماده و ۲ مولد نر) ماهی زبرا دانیو از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان تزئینی در استان گلستان تهیه و به سالن آبی پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال یافتند. ماهیان مولد نر و ماده بصورت جداگانه در آکواریوم‌هایی با ابعاد (۷۰×۴۰×۳۰ سانتیمتر) با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و پس از دو هفته سازگاری با شرایط فیزیکی و شیمیایی در محیط آزمایشی، به آکواریوم‌های ویژه تخم‌ریزی منتقل شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، مولدین از آکواریوم‌های تخم‌ریزی خارج شدند. تغذیه لاروها پس از جذب ۷۵ درصد کیسه زرده با زرده تخم مرغ و پس از آن با غذای بیومار به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند. در هر کدام از آکواریوم‌ها یک هیتر (۲۰۰ وات) جهت کنترل دمای آب نصب گردید. جهت انجام آزمایش بیان ژن، نمونه برداری از لاروها در روزهای ۴، ۷، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ پس از تفریح صورت گرفت. نمونه‌های ماهی بلافاصله پس از نمونه برداری با استفاده از ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتیگراد) منجمد شدند و سپس در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

استخراج RNA

RNA کل از نمونه لاروهای منجمد شده با استفاده از ازت مایع بصورت هموژن تبدیل شدند و فرآیند استخراج با استفاده از کیت RNX-Plus مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (SinaColon) انجام شد. این فرآیند به این صورت بود که RNA کل از سه نمونه برای هر مرحله از مراحل نمونه‌گیری و هر مرحله با سه تکرار استخراج شد.

ارزیابی کمی و کیفی RNA

جهت ارزیابی کیفی RNA کل، از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. کمیت (غلظت) RNA از دستگاه نانودراپ ND-1000 (Thermo Scientific) تعیین گردید. با استفاده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100)، مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر قرائت شد.

سنتز cDNA

برای از بین بردن DNA ژنومی احتمالی در RNA استخراج شده، از تیمار DNase I (Invitrogen, CA, USA) استفاده گردید. ساخت رشته اول cDNA بر اساس روش پیشنهادی شرکت GeNet Bio برای نمونه‌ها انجام شد.

طراحی پرایمر

طراحی پرایمر مناسب جهت تکثیر اختصاصی محصولات PCR از روی الگوهای متفاوت، یکی از ملزومات مهم در انجام اکثر آزمایشات Real-Time PCR محسوب می‌گردد. پرایمرهای مورد نیاز برای ژن‌های CYP19a، CYP19b و β -actin برای انجام qPCR، طبق توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI (AF226620.1, NM_131031AY780257.1) طراحی شد (جدول ۱). اندازه محصول PCR با توجه پرایمرها و میزان اختصاصی عمل کردن پرایمر با کمک ژل آگارز یک درصد مورد بررسی گرفت. در این تحقیق، نرمال سازی بیان ژن‌های هدف با استفاده از ژن رفرنس β -actin صورت گرفت.

انجام Real-time PCR (qRT-PCR)

واکنش qPCR با استفاده از دستگاه BioRAD Real Time PCR و با استفاده از کیت سایبرگرین (سایبریوپارس) و بر اساس یک دستورالعمل استاندارد انجام شد. در مرحله اول، واکنش qPCR به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و با ۴۰ چرخه در این دما در ۳۰ ثانیه انجام شده است. در مرحله بعد دما به ۶۵ درجه سانتیگراد در مدت

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

جدول ۱. پرایمرهای به کار برده شده در انجام qPCR

آغازگر	توالی	اندازه قطعه (bp)	دمای ذوب (°C)
ZCYP19b	F:AAAGAGTTACTAATAAAGATCCACCGGTAT R:TCCACAAGCTTTCCCATTTC	148	55.5
ZCYP19a	F:TCTGCTTCAGAAGATTTCATAAATACTTT R:CCTGCAACTCCTGAGCATCTC	121	55
β -actin	F:AGGTCATCACCATCGGCAAT R:GATGTCCACGTCGCACTTCAT	140	58

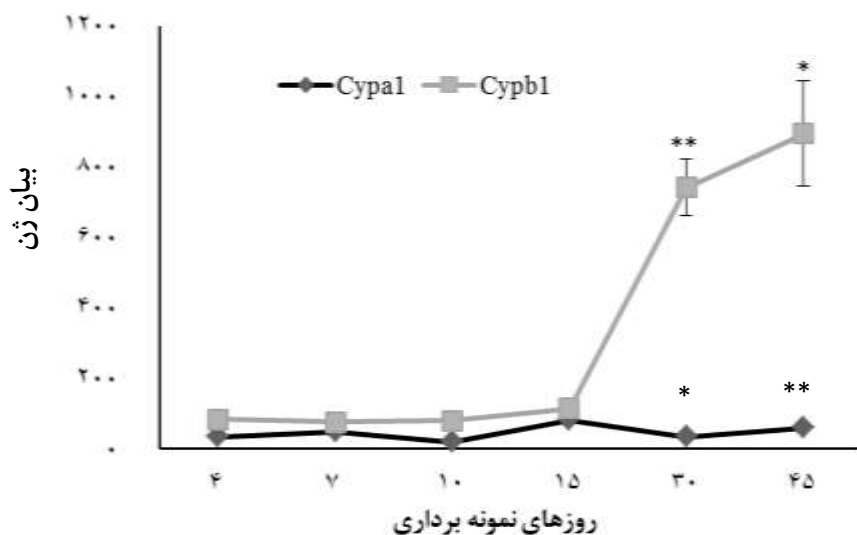
برای انجام Real Time تمامی مراحل زمانی ذکر شده ارزیابی گردید. میزان بیان ژن در دستگاه به صورت Ct ثبت شد. منحنی استاندارد با استفاده از نسبت‌های مختلف رقیق سازی cDNA سری‌های رقیق سازی از ۱۰ تا ۱ به ۲۰۰ رسم شد. بازدهی PCR با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Radonic *et al.*, 2004). تغییرات نسبی بیان ژن‌های CYP19a و CYP19b با دو بار مشتق‌گیری از Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). در بین زمان‌های مورد مطالعه، مرحله‌ای که کمترین Ct را داشت به عنوان کالیبراتور به منظور ارزیابی بیان نسبی ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه آماری سطح بیان ژن‌های CYP19a و CYP19b در مراحل مختلف تکاملی ماهی زبرا دانیو با استفاده از آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس از آزمون Tukey در سطح خطای ۱ درصد ($P < 0.01$) انجام شد.

$$E\% = (10^{1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

رابطه ۱

نتایج

در ابتدا پرایمرهای ژن‌های هدف CYP19a و CYP19b و ژن رفرنس β -actin مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. به همین جهت با استفاده از یک PCR نرمال تست شدند و محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد رویت شد. نتایج نشان داد که پرایمرها به جایگاه صحیح ژن متصل شده‌اند. بیان نسبی ژن‌های CYP19a و CYP19b در مراحل تکاملی ماهی زبرا دانیو مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). بیان ژن‌های مذکور با استفاده از ژن رفرنس β -actin نرمال گردید. نتایج نرمال شده نشان داد که بین بیان ژن‌های مذکور در طی دوره تکاملی لاروها، تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.01$). در روزهای ۴، ۷ و ۱۰ پس از تفریح، بیان ژن‌های مذکور در سطح پایینی قرار داشت و در روز ۱۵ پس از تفریح به تدریج بیان هر دو ژن افزایش یافت که این افزایش در مورد ژن CYP19b با شدت بیشتری تا روز ۴۵ پس از تفریح ادامه داشت؛ ولی در مورد ژن CYP19a بیان آن در روز ۳۰ پس از تفریح، کاهش یافت و مجدداً در روز ۴۵ پس از تفریح افزایش را نشان داد. حروف متفاوت در نمودار بیانگر وجود اختلاف معنادار در سطح ۰/۰۱ می‌باشد. مقایسه آماری با استفاده از آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس از آزمون Tukey انجام شد.



شکل ۱. بیان ژن‌های CYP19a و CYP19b در مراحل مختلف تکامل لاروی و نوجوانی در ماهی زبرا

همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، بیان ژن‌های CYP19a و CYP19b در مراحل مختلف تکاملی لارو ماهی زبرا دانیو یک الگوی افزایشی را نشان می‌دهد. همچنین میزان تغییرات سطوح بیان ژن‌های CYP19a و CYP19b در دوره‌های تکامل لاروی به لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0.01$). نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار بیان ژن CYP19a به ترتیب در روزهای ۴۵ و ۱۰ روز پس از تفریح بود و بیشترین و کمترین مقدار بیان ژن CYP19b به ترتیب در روزهای ۴۵ و ۷ روز پس از تفریح مشاهده گردید. همچنین بیشترین بیان هر دو ژن مذکور در روز ۴۵ پس از تفریح مشاهده شد.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن‌های CYP19a و CYP19b در مراحل مختلف تکاملی لاروی و تمایز جنسی ماهی زبرا دانیو (*Danio rerio*) از نظر آماری معنادار می‌باشد و رابطه مستقیمی بین بیان این ژن‌ها و مراحل مختلف تکامل لاروی مشاهده گردید.

از جمله مطالعات صورت گرفته درباره بیان ژن می‌توان به تحقیق انجام شده توسط Guiguen و همکاران (۲۰۱۰) اشاره نمود. این محققین گزارش کردند که تراوش استرادیول و بیان ژن CYP19 به میزان قابل توجهی در سطوح بالای LH کاهش یافته است، در حالی که در اثر افزودن FSH بطور طبیعی سبب افزایش اندک در cAMP شده که در نهایت منجر به لوتئینه شدن و کاهش بیان CYP19 می‌شود. همچنین پیشنهاد شده است غلظت‌های بیشتر LH سبب فعال شدن مسیر پیامبر ثانویه پروتئین کیناز C شده و به دنبال آن کاهش بیان CYP19 را به دنبال خواهد داشت (Franks *et al.*, 2008).

نتایج تحقیق Chen و همکاران (۲۰۱۴) در رابطه با ماهی قرمز نشان داد که بیان ژن CYP19a در تخمدان پنج برابر بیشتر از مقدار آن در مغز می‌باشد، ولی مقدار آن در سایر بافت‌ها قابل چشم‌پوشی است. نتایج این محققین نشان داد که بیان ژن CYP19a پس از خروج از تخم بسیار اندک است اما ۲۶ روز پس از تفریح شروع به افزایش می‌نماید که با نتایج تحقیق حاضر در ماهی زبرا دانیو مطابقت دارد. همچنین این محققین بیان نمودند که این افزایش بیان ژن در تیمار آزمایشی شامل گروه ۱۷- آلفا متیل تستوسترون مشاهده نگردید. بنابراین تیمار نمودن لاروها با هورمون ۱۷- آلفا متیل تستوسترون می‌تواند از افزایش بیان ژن CYP19a ممانعت نماید.

Kazeto و همکاران (۲۰۰۴) تاثیر مختل کننده‌های غدد دورنریز را بر میزان بیان ژن CYP19 در جویله‌های ماهی زبرا دانیو (*Danio rerio*) بررسی نمودند. نتایج این محققین نشان داد که ترکیبات استروژنی و استرادیولی سبب افزایش قابل ملاحظه

بیان ژن CYP19b می‌گردند و در مقابل بیان ژن CYP19a ثابت باقی ماند و در برخی موارد کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد. اخیراً ثابت گردیده است که تیمار نمودن لاروهای ماهی زبرا دانیو با استرادیول در مراحل اولیه تکامل گنادی سبب تغییر روند تکامل گناد در لاروها شده و جنسیت آنها را به سمت جنس ماده تغییر می‌دهد (Hill and Janz, 2003; Weber et al., 2003). همچنین Kishida و Callard (۲۰۰۱) جنین ماهی زبرا را ۲ روز پس از لقاح در معرض استرادیول (100nM) قرار دادند. نتایج حاصل از RT-PCR این محققین نشان داد که میزان بیان ژن CYP19b به مقدار ۳ تا ۴ برابر نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. این در حالی است که Kazeto و همکاران (۲۰۰۴) لاروهای ماهی زبرا را ۱۷ روز پس از لقاح به مدت ۳ روز در معرض استرادیول (100nM) قرار دادند و مشاهده کردند که سطح بیان ژن CYP19b به میزان ۱۰۰ برابر افزایش یافت. در تحقیق حاضر نیز بیان ژن CYP19b در روز ۴۵ پس از تفریح نسبت به روز چهارم پس از تفریح، به میزان ۱۰ برابر افزایش را نشان داد که با نتایج Kazeto و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت دارد. تفاوت‌های موجود در مقادیر سطوح بیان ژن در مقالات مختلف، می‌تواند به دلیل تفاوت در زمان معروضگذاری لاروها و مراحل مختلف تکاملی و همچنین روش‌های مختلف به کار برده شده در اندازه‌گیری کمی بیان ژن باشد.

Tonga و همکاران (۲۰۰۱) مشاهده نمودند که بیان ژن CYP19b در هر دو جنس نر و ماده ماهی زبرا دانیو (*Danio rerio*), ۱۱ روز پس از لقاح قابل تشخیص است که بطور کلی مشخص گردیده است که این ژن در عملکرد تولید مثلی و رفتارهای جنسی تاثیر گذار است. همچنین این محققین بیان نمودند که اگرچه مقدار تبدیل استروژن توسط ژن CYP19a نسبت به ژن CYP19b بالاتر بود اما الزاما این امر بدین معنا نیست که فعالیت آنزیمی ژن CYP19a بالاتر از ژن CYP19b است، بلکه این امر می‌تواند به دلیل بالاتر بودن سطوح پروتئینی CYP19a نسبت به CYP19b در سلول‌ها باشد.

Segner و Fenske (۲۰۰۴) ماهیان زبرا دانیو را تحت غلظت ۵۰۰ میکروگرم فادروزول (Fadrozole) در هر کیلوگرم غذا، بین روزهای ۳۵ تا ۷۱ پس از لقاح قرار دادند و منجر به تولید ۱۰۰ درصد جنس نر شدند. همچنین مشاهده نمودند که مقدار بیان ژن CYP19a در طی دوره تمایز گناد، ماهیان زبرا (از روز ۳۵ تا روز ۷۱ پس از لقاح) افزایش یافت که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

Trant و همکاران (۲۰۰۱) بیان دو نوع ژن CYP19a و CYP19b را در ماهیان زبرا از روز ۲۴ تا ۴۰۰ پس از لقاح بررسی و مشاهده نمودند که بیان ژن‌های مذکور در جنس ماده افزایش و در جنس نر کاهش داشت. این اختلاف در الگوی بیان ژن نشان داد که تمایز گناد در ماهی زبرا در بین ۳-۵ هفته پس از تفریح رخ می‌دهد. هر چند در بین مطالعات مختلف، در زمان تمایز گناد ماهی زبرا تفاوت‌هایی وجود دارد.

به طور کلی، بررسی روند بیان ژن‌های CYP19a و CYP19b در تحقیق حاضر، طی دوره تکاملی لاروهای ماهی زبرا دانیو، بیانگر افزایش مقدار بیان ژن می‌باشد و نشان می‌دهد طی دوره تکاملی لاروها و همگام با تکامل غدد تناسلی آنها و افزایش هورمون‌های وابسته به جنس در لاروها، بیان این ژن‌ها که به نحوی در تعیین جنسیت و رشد غدد جنسی نقش دارند، نیز افزایش می‌یابد.

منابع

- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology C*. 109:214–245.
- Cao, M., Duan, J., Cheng, N., Zhong, X., Wang, Z., Hu, W., Zhao, H. 2012. Sexually dimorphic and ontogenetic expression of *dmrt1*, *cyp19a1a* and *cyp19a1b* in *Gobiocypris rarus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Molecular & Integrative Physiology*. 162: 303-309.
- Chen, X.W., Jiang, S., Gu, Y.F., Shi, Z.Y. 2014. Molecular characterization and expression of *cyp19a* gene in *Carassius auratus*. *Journal of Fish Biology*. 85: 516–522.

- Chiang, E.F., Yan, Y.L., Guiguen, Y., Postlethwait, J., Chung, B. 2016. Two *Cyp19* (P450 Aromatase) Genes on Duplicated Zebrafish Chromosomes Are Expressed in Ovary or Brain. *Society for Molecular Biology and Evolution*. pp: 542-550.
- Fenske, M., Segner, H. 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 67: 105-126.
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Shinoda, T., Kimura, H., Strobl- Mazzulla, P.H., Stru'ssmann, C.A., Somoza, G.M. 2008. Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sex Developmental*. 2: 316-324.
- Franks, S., Stark, J., Hardy, K. 2008. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Report Update*. 14: 367-78.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., Chang, C.F. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165(3): 352-366.
- Hill, R.L., Janz, D.M. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*). I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic Toxicology*. 63: 417-429.
- Kazeto, Y., Place, A.R., Trant, J. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebra fish (*Danio rerio*) juvenile. *Aquatic Toxicology*. 69: 25-34.
- Kishida, M., Callard, G.V. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*. 142: 740-750.
- Koerber, A.S., Kalishman, J. 2009. Preparing for a semiannual IACUC inspection of a satellite Zebrafish (*Danio rerio*) facility. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 48: 65-75.
- Lawrence, C. 2007. The husbandry of Zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*. 269: 1-20.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25: 402-408.
- Lynn, S.G., Birge, W.J., Shepherd, B.S. 2008. Molecular characterization and sex-specific tissue expression of estrogen receptor alpha (*esr1*), estrogen receptor beta (*esr2a*) and ovarian aromatase (*cyp19a1a*) in yellow perch (*Perca flavescens*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149(1): 126-147.
- Mahendroo, M.S., Means, G.D., Mendelson, C.R., Simpson, E.R. 1991. Tissue-specific expression of human P-450AROM. The promoter responsible for expression in adipose tissue is different from that utilized in placenta. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 11276-11281.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313: 856-862.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Yuji, I., Fisher, C.R., Michael, M.D. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews Journal*. 15:342-355.
- Tonga, S.K., Chianga, E., Hsiao, P., Chung, B. 2001. Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish *cyp19* (P450 aromatase) genes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 79: 299-303.
- Trant, J.M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.C., Place, A.R. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (*cyp19a* and *CYP19b*) in zebra fish fry (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Zoology*. 290: 475-483.
- Uno, T., Ishizuka, M. 2012. Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 34(1): 1-13.
- Weber, L.P., Hill, R.L., Janz, D.M. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*). II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquatic Toxicology*. 63: 431-446.