

تغییرات بیان ژن Kiss1 در بافت مغز جنس نر و ماده ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) در مراحل مختلف رشد گناد

محدثه داودی^۱ و بهروز حیدری^{۲*}

^۱ ایران، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، رشت، دانشگاه گیلان، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، گروه علوم دریایی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۹

چکیده

ماهی سفید دریای خزر یکی از گونه‌های اقتصادی و بومی دریای خزر می‌باشد. نوروهای کیس‌پپتین (Kisspeptin) به‌عنوان یک پردازش‌کننده مرکزی در بازپخش سیگنال‌های محیطی به نوروهای هورمون‌رهاکننده گنادوتروپین‌ها (GnRH) عمل می‌نمایند. برای بررسی نقش کیس‌پپتین به‌ویژه Kiss1 در تولیدمثل ماهی سفید دریای خزر، میزان بیان ژن Kiss1 در بافت مغز با استفاده از روش Real time PCR ارزیابی شد. بدین منظور ۳۶ قطعه ماهی از آبان ۹۷ تا اردیبهشت ۹۸ با میانگین وزنی 650 ± 50 گرم و طولی 35.5 ± 0.2 سانتی‌متر از سواحل انزلی صید شده و بافت مغز جدا گردید. بعد از استخراج RNA کل و سنتز cDNA از بافت مغز، بیان ژن Kiss1 با استفاده از تکنیک Real time PCR به وسیله ژن مرجع β -actin انجام شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس‌آزمون Tukey و سطح اطمینان ۹۵ درصدی ارزیابی گردید. نتایج نشان دادند که سطح بیان ژن Kiss1 در بافت مغز ماهی سفید نر و ماده تفاوت معنی‌داری را در ماه‌های مختلف نشان دادند ($p < 0.05$). بیشترین میزان بیان ژن Kiss1 در هر دو جنس نر و ماده در ماه اردیبهشت در زمان تخم‌ریزی ماهی سفید دریای خزر گزارش شد. همچنین بافت‌شناسی گنادها نشان داد که بیشترین رسیدگی جنسی در ماه‌های اسفند تا اردیبهشت بود. در مجموع به نظر می‌رسد می‌توان بیان کرد که Kiss1 در ماه‌هایی که ماهی سفید دریای خزر به رسیدگی جنسی خود می‌رسد بیشترین میزان بیان را دارد.

واژه‌های کلیدی: ژن کیس ۱، رسیدگی جنسی، ماهی سفید دریای خزر، دوره نمونه برداری.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: bheidari@guilan.ac.ir

مقدمه

اسیدآمینوای می‌شود که مهم‌ترین محصول ژن کیس ۱ است و این پپتید ۵۴ اسیدآمینوای نیز با تقسیمات بعدی به پپتیدهای ۱۴، ۱۳ و ۱۰ اسیدآمینوای تقسیم می‌شود (۲۴). ترشح هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) به‌عنوان یک محور کلیدی برای شروع و کنترل تولیدمثل، به شمار می‌رود. باوجود نقش مهم GnRH، در مسیر شبکه نورونی محدودیت‌های پیام‌رسانی وجود دارد (۲۷). کیس‌پپتین‌ها از پیام‌رسان‌هایی هستند که در بالادست نوروهای ترشح‌کننده GnRH قرار دارند و نسبت به

ژن کدکننده کیس‌پپتین در سال ۱۹۹۶ به‌عنوان سرکوبگر متاستازی در ملانوما بدخیم انسانی شناسایی شد پپتیدی که به‌وسیله این ژن کد می‌شود، ابتدا متاستین (metastin) و بعدها کیس‌پپتین (Kiss1) (kisspeptin) نام گرفت (۱۲). در ماهیان ساختار ژن کیس مشابه پستانداران است. این تشابه در سایر مهره‌داران نیز دیده می‌شود (۱۳، ۲۲). این ژن کدکننده پیش‌ساز پپتیدی با ۱۴۵ اسیدآمینو که شامل یک پپتید ۱۹ اسیدآمینوای و یک پپتید ۵۴ اسیدآمینوای مرکزی است. پروتئولیز پرو-کیس‌پپتین منجر تولید پپتید ۵۴

کیس‌پیتین/gpr54 در طیف وسیعی از بافت‌های دیگر نظیر گنادها، قلب، ماهیچه، روده، طحال، کبد، کلیه، پانکراس، آبشش، چشم و حتی پوست ماهی نیز به مقدار متغیری بیان می‌شود (۱۸). بر اساس مطالعات ایمونوهیستوشیمی برای نخستین بار نورون‌های حاوی کیس‌پیتین در هسته خلفی پرونتریکولار (NPPv) (Posterioris periventricularis) و هسته شکمی توبریس (NVT) (Nucleus ventralis tuberis) در ماهی مداکا شناسایی شد که تعداد نورون‌ها در NVT ماهیانی که در فصل تخم‌ریزی بودند بیش از ماهیانی که در فصل غیر تخم‌ریزی بودند، مشاهده شد و در ماهیان نر بیش از ماهیان ماده بود. از نتایج این مطالعه چنین استنباط شد که سیستم کیس‌پیتین محوری اصلی برای تنظیم تولیدمثل در گونه‌های ماهیان است (۸). با این حال محل دقیق عناصر سیستم کیس‌پیتین/KISSR در مغز اغلب ماهیان و معادل محل آن در مغز پستانداران در حال حاضر بسیار ناشناخته است. به‌عنوان یک اصل کلی، نورواناتومی مغز جلویی ماهیان استخوانی به‌طور قابل‌توجهی متفاوت است، چرا که تنوع بسیار زیادی در گونه‌های این رده از جانوران وجود دارد که آن‌ها را متمایز می‌کند. درحالی‌که وقایع مورفوژنتیک اصلی در نیمکره‌های مغزی همه ماهیان استخوانی، مکانیسم مشترکی با سایر مهره‌داران دارد (۳۲). در مغز ماهی، بیان گیرنده کیس‌پیتین (Kiss1r) به سلول‌های عصبی GnRH ترجمه می‌شود و در ماهی در ابتدای بلوغ جنسی در مقایسه با قبل یا بعد از بلوغ جنسی، زمانی که مقدار GnRH زیاد است بیان کیس‌پیتین و گیرنده آن نیز افزایش پیدا می‌کند (۱۶، ۱۷). این یافته‌ها شواهد اولیه را که سلول‌های GnRH اهداف مستقیمی برای کیس‌پیتین در ماهی هستند را نشان می‌دهد و کیس‌پیتین‌ها احتمالاً باعث آزاد شدن GnRH در بلوغ از طریق تعامل با Kiss1r می‌شوند، همان‌طور که در پستانداران رخ می‌دهد. مطالعات زیادی نشان می‌دهد که ارتولوگ کیس‌پیتین در ماهی مانند پستانداران یک فعال‌کننده قوی محور تولیدمثل است. نورون‌های GnRH1 mRNA، ژن Kiss2 را در ماهی

بازخورد‌های استروئیدهای جنسی حساس هستند. طبق مطالعات، واکنش بازخورد منفی استروئیدهای گنادی بر ترشح GnRH در هر دو جنس نر و ماده به وسیله نورون‌های کیس‌پیتین ۱ موجود در هسته‌های کمانی مغز کنترل می‌گردد (۱۴).

بعد از اینکه در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار نقش کیس‌پیتین و گیرنده‌های آن در تولیدمثل و بلوغ جنسی معین شد، جهش در ژن گیرنده‌های کیس‌پیتین (ازکارافتادن کیس‌پیتین‌ها) علائم هیپوگنادیسم هیپوگنادوتروپی را نشان داد که این علائم معمولاً در اثر کاهش ترشح گنادوتروپین‌ها صورت می‌گیرد. در مردانی که این جهش اتفاق می‌افتد رشد استخوان‌ها کمتر می‌شود، بیضه‌ها کوچک‌تر هستند، موها کم‌پشت می‌شوند و غلظت هورمون‌های گنادوتروپینی و استروئیدهای جنسی در پلازما به‌صورت چشمگیری کم می‌شود. اگر این جهش در ژن‌ها اتفاق بیفتد علائم هیپوگنادیسم، تکامل نسبی پستان‌ها، سطوح پایین گنادوتروپین‌ها و هورمون‌های استروئیدی جنسی را نشان خواهد داد. این جهش در سایر مهره‌داران مانند ماهی‌ها نیز باعث نقصان در بلوغ جنسی می‌شود که نشان‌دهنده نقش مهم کیس‌پیتین و گیرنده‌ی آن در بلوغ مهره‌داران است (۳۱).

بنابراین کیس‌پیتین‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده اساسی شروع بلوغ جنسی تنظیم ترشح گنادوتروپین‌ها به‌واسطه هورمون‌های جنسی و کنترل باروری شناخته می‌شود (۱۲، ۲۳، ۳۰). ترشحات نورون‌های کیس‌پیتین از طریق سیگنال‌هایی از جمله استروئیدهای گنادی، فاکتورهای متابولیکی و دوره‌های نوری تنظیم می‌شوند (۶).

در بدن ماهی‌ها، بیان ژن‌های کدکننده کیس‌پیتین‌ها و گیرنده‌های آن‌ها در مناطق مختلفی از مغز نظیر هیپوتالاموس، تالن سفالن، تالاموس، مغزیانی، لوب‌های بویایی و تکتوم‌ها و نورون‌های بینایی، منطقه مدولا و هیپوفیز گزارش شده است. درعین‌حال، ژن‌های

و جنوب غربی این دریا بوده و از رودخانه اترک در منطقه قفقاز تا سواحل جنوب ترکمنستان ماهی سفید به‌عنوان یک ماهی اقتصادی ارزشمند صید می‌شود؛ لذا یکی از ماهی‌های بااهمیت در حوضه جنوبی دریای خزر است. این ماهی یک ماهی نیمه مهاجر است که برای تخم‌ریزی به رودخانه مهاجرت می‌کند زمانی که این ماهی در دریا حضور دارد زیستگاه آن تا عمق ۳۰ متری است در ناحیه‌ای که موجودات کف زی مخصوصاً نرم‌تنان حضور دارند می‌باشد. در فصل پاییز و زمستان قسمت‌های عمیق‌تر را ترجیح می‌دهند. در مراحل لاروی تغذیه این ماهی از فیتوپلانکتون‌ها بعد از آن همراه با رشد بدن از زئوپلانکتون‌ها، لارو حشرات آبی، لارو شیرونومیده، نرم‌تنان، سخت‌پوستان و کرم پرتار است. در زمان بلوغ غذای اصلی این ماهی از نرم‌تنان است و در زمان مهاجرت آن به رودخانه تغذیه ماهی متوقف می‌شود. ماهیان مولد نر و ماده پس از رسیدن به مرحله‌ی رسیدگی جنسی کامل و ورود به رودخانه تغییراتی در شکل ظاهری آن‌ها ایجاد می‌گردد (۲). سالیانه این ماهی معمولاً از ۱۰ مهر ماه شروع شده و تا ۱۰ اردیبهشت ادامه می‌یابد و سالانه به طور متوسط ۵ تا ۶ هزار تن از این گونه در سواحل دریای خزر و رودخانه‌های آن صید می‌شود (۲).

با توجه به اینکه نورو پپتید کیس‌پپتین نقش حیاتی در هیپوتالاموس برای آغاز بلوغ و عملکرد تولیدمثل به‌وسیله‌ی پیام‌های هورمونی و محیطی ایفا می‌کنند ولی بیان مکانی و زمانی کیس‌پپتین در مغز و گناد ماهی سفید در مراحل مختلف رسیدگی نامشخص است. پی بردن به میزان تغییرات Kiss1 در ماهی سفید درک بهتری از سیستم تولیدمثلی ماهی سفید به ما خواهد داد. از طرف دیگر، در تکثیر مصنوعی ماهی سفید دریای خزر این اطلاعات پایه‌ای می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد؛ بنابراین در این تحقیق به مقایسه میزان تغییرات کیس‌پپتین ۱ در مراحل مختلف رسیدگی جنسی ماهی سفید دریای خزر در دو جنس نر و ماده در طی فصل تولیدمثلی پرداخته شد.

سیکلید بیان می‌کند (۲۱). علاوه بر این، چندین مطالعه *in vivo* در سی بس راه‌راه نشان داده است که تزریق پپتید Kiss2 ترشح گنادوتروپین‌ها را تقویت می‌کند (۲۶). علاوه بر این، آنتاگونیست‌های کیس‌پپتین برای جلوگیری از تولید اسپرم یافت شده است. در گورخرماهی (*Danio rerio*) جهش در Kiss و حذف Kissr باعث بلوغ طبیعی غدد جنسی می‌شود (۱۰، ۴) و این نشان‌دهنده این است که پیام‌رسانی کیس‌پپتین برای تولیدمثل این گونه ضروری نیست. چندین مطالعه نشان داده‌اند که سلول‌های عصبی GnRH گیرنده‌های کیس‌پپتین را در مداکا (*Oryzias latipes*) یا (*Dicentrarchus labrax*) بیان نمی‌کنند (۱۰). در اواسط بلوغ ماهی قنات تزریق کیس‌پپتین ۱ سبب افزایش بیان گیرنده *gpr54-2b* و *GnRH3* در مغز شد، اما در مورد *GnRH2* تغییری رخ نداد (۵). تزریق سیستمیک کیس‌پپتین ۱ به ماهی ماده زبرا در حالت بلوغ جنسی نیز تغییری در بیان *GnRH2* و *GnRH3* ایجاد نکرد (۱۰). درحالی‌که تزریق سیستمیک کیس ۱ در ماهی ماده بالغ از نظر جنسی گروپر راه‌راه سبب افزایش قابل‌توجه بیان *GnRH1* در هیپوتالاموس شد که فرم هیپوفیزیوتروپیک گنادوتروپین این گونه در حالت بلوغ جنسی است (۲۹). همچنین در ماهی ماکرل، بررسی الگوی بیان دو کیس ۱ و ۲ و گیرنده‌های آن‌ها در طی بلوغ جنسی، نشان داد که در ماهیان نر کیس‌پپتین ۲ و سطح بیان *GnRH1* درست قبل از شروع میوز در بیضه‌ها، افزایش یافت. در ماهیان ماده نیز بیان کیس ۱ و ۲ هم‌زمان با افزایش سطوح کیس، کیس ۲ و *GnRH1*، درست قبل از شروع زرده‌سازی در تخمک‌ها، افزایش یافت (۱۹).

ماهی سفید *Rutilus kutum* متعلق به خانواده کپور ماهیان است. ماهی سفید مهم‌ترین ماهی استخوانی دریای خزر بوده و با توجه به ارزش غذایی بالا، کیفیت عالی گوشت مورد توجه مردم کشور ما قرار گرفته است. این ماهی جز ماهیان رود کوچ و از خانواده کپور ماهیان است (۹). عمده پراکنش ماهی سفید در دریای خزر مربوط به مناطق جنوبی

مواد و روشها

منظور از Thermo Scientific DNAase I استفاده شد. از آنجایی که RNA ناپایدار است و به سرعت تخریب می‌گردد لذا باید RNA به مولکول پایدار cDNA تبدیل شود. ساخت رشته cDNA با استفاده از کیت سنتز First Strand cDNA (سیناکلون، ایران) در دو مرحله انجام شد. در مرحله ی اول، ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده به یک میکرولیتر پرایمر Oligo(dT) و یک میکرولیتر dNTP با غلظت 10 mM افزوده شد و تا حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر آب DEPC به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت و سپس به مدت ۲ دقیقه تا ۴ درجه ی سانتیگراد سرد شد. در ویال جداگانه مخلوط حاوی ۴ میکرولیتر بافر M-MuLV، ۱ میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس M-MuLV، ۰/۵ میکرولیتر مهار کننده ی RNase و ۴/۵ میکرولیتر آب DEPC مخلوط شد. در مرحله دوم محتویات ویال دوم به محصول مرحله ی اول افزوده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۵۰°C قرار گرفت و سپس برای غیرفعال شدن آنزیم، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت. در نهایت، cDNA به دست آمده به فریزر ۸۰- درجه منتقل شد و به عنوان رشته الگو برای مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی RNA با دستگاه نانودرآپ: میانگین غلظت RNA های مورد استفاده در نمونه‌های آزمایش شده بین ۵۰۰ ng/μl تا ۲۰۰۰ ng/μl بوده است و نسبت جذب‌های به دست آمده در محدوده ۱/۸-۲ قرار داشتند.

بررسی کیفیت RNA با استفاده از ژل الکتروفورز ۱ درصد: بمنظور بررسی کیفیت RNA استخراج شده و اطمینان از عدم تخریب آن، روش الکتروفورز افقی انتخاب شد. پس از انجام الکتروفورز، عکس برداری از ژل توسط دستگاه Gel Doc صورت گرفت. شکل ۱، نمونه‌ای از ژل ۱٪ است که در آن RNA های، 18s، 28s و 5.8s به همراه DNA Ladder قابل مشاهده است. تصویر ارائه شده حاکی از کیفیت مناسب RNA استخراج شده است که فاقد

تهیه نمونه‌ها: در تحقیق حاضر از ماه آبان تا اردیبهشت هر ماه ۶ قطعه ماهی سفید از سواحل انزلی دریای خزر با روش تور پره ساحلی صید شد. در هر بار صید ۳ قطعه ماهی ماده و ۳ قطعه ماهی نر با میانگین وزنی 650 ± 50 گرم و میانگین طولی $35,5 \pm 0,2$ سانتی متر صید شد. برای تشریح و جداسازی بافت‌های گناد و مغز میانی به آزمایشگاه دانشکده علوم پایه گیلان منتقل شدند. نمونه‌ها پس از استخراج در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

مورفوهیستولوژی گناد: مراحل توسعه تخمدان و بیضه هر نمونه پس از تثبیت گناد در بوئن (این محلول شامل ۷۵ میلی لیتر اسید پیکریک اشباع شده، ۲۵ سی سی فرمالین غلیظ و ۵ سی سی اسید استیک گلاسیال می باشد) و انجام مراحل معمول بافت‌شناسی یعنی تثبیت نمونه (fixation)، آب‌گیری و شفاف‌سازی (Dehydration and Clearing)، حمام پارافینی و قالب‌گیری (Infiltration with paraffin and Embedding)، برش بافت (Paraffin Sectioning)، رنگ‌آمیزی (Staining) هماتوکسیلین-ئوزین مشخص گردید.

مراحل استخراج RNA: استخراج RNA کل از ۱۰۰-۵۰ میلی گرم بافت مغز میانی هموزن شده انجام گرفت. در این تحقیق استخراج کل RNA با استفاده از RNX PLUS (سیناکلون، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای تعیین کیفیت RNA های استخراج شده، از الکتروفورز نمونه‌ها با ژل ۱٪ آگارز استفاده شد. همچنین برای تعیین کمیت RNA های استخراج شده از دستگاه NanoDrop Spectrophotometer استفاده شد. بدین صورت که با قرار دادن مقدار ۲ میکرولیتر از هر نمونه در جایگاه دستگاه، نسبت میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانو متر خوانده شد و میزان غلظت RNA نانوگرم بر میکرولیتر موجود در هر نمونه مشخص گردید. قبل از آغاز سنتز cDNA نمونه باید عاری از وجود DNA شود بدین

بمنظور بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمر برای هر دو ژن Kiss1 و B-actin از روش مرسوم PCR با گرادیان دمایی در مرحله ی اتصال پرایمر استفاده شد. مخلوط آنزیمی فرآیند PCR از کمپانی Ampliqon (Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED) تهیه شد و محتوای هر ویال بر مبنای دستور کار شرکت سازنده تهیه شد. سیکل PCR پس از ۵ دقیقه پیش انکوباسیون در دمای ۹۵ °C به صورت ۳۰ ثانیه دمای ۹۵ °C، ۳۰ ثانیه محدوده ی دمایی ۵۵ تا ۶۲ °C و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ °C، ۳۵ بار تکرار شد. فرآیند تکثیر با ۵ دقیقه دمای ۷۲ °C بمنظور تکمیل فرآیند همانندسازی پایان یافت. در انتها محصول نهایی در ژل ۲٪ آگارز بررسی شد و از بهترین دمای اتصال برای Real-time PCR استفاده شد.

مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های Kiss1 و B-actin در جدول ۱ آورده شده است. پرایمرهای forward و reverse به صورت آنلاین و از طریق سایت NCBI طراحی شده و در شرکت تکاپو زیست ساخته شده‌اند.

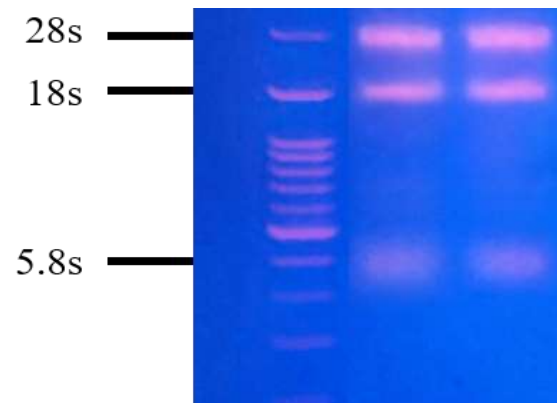
جدول ۱- مشخصات پرایمر سنتزی Kiss1 و کنترل داخلی β -actin.

پرایمر	رو به جلو	رو به عقب
Kiss1	TGAGTGCAAATCCTCACCGAA	CAAGATTTAGCCCGACCCAG
β -actin	GACTTCGAGCAGGAGATGGG	CCGCAAGATTCCATACCCAGG

طول ۹۴ جفت باز از ژن Kiss1 شکل (۲) و قطعه‌ای به طول ۱۳۳ جفت باز از ژن β -actin شکل (۳) تکثیر شد.

سنجش میزان بیان ژن Kiss1 با واکنش Real-Time PCR
: فرآیند Real-time PCR با استفاده از رنگ سایبرگرین انجام شد. مخلوط آنزیم Taq DNA polymerase و رنگ از شرکت سیناکلون (Sina Green HS-qPCR Mix, 2X) (no ROX) تهیه شد و محتوای هر ویال بر اساس دستور شرکت سازنده تهیه شد. غلظت cDNA در این واکنش ۵۰۰ ng/ μ l، حجم پرایمر مورد استفاده ۱ μ l و حجم

آلودگی پروتئین و DNA بوده و مناسب برای سنتز cDNA می‌باشد.

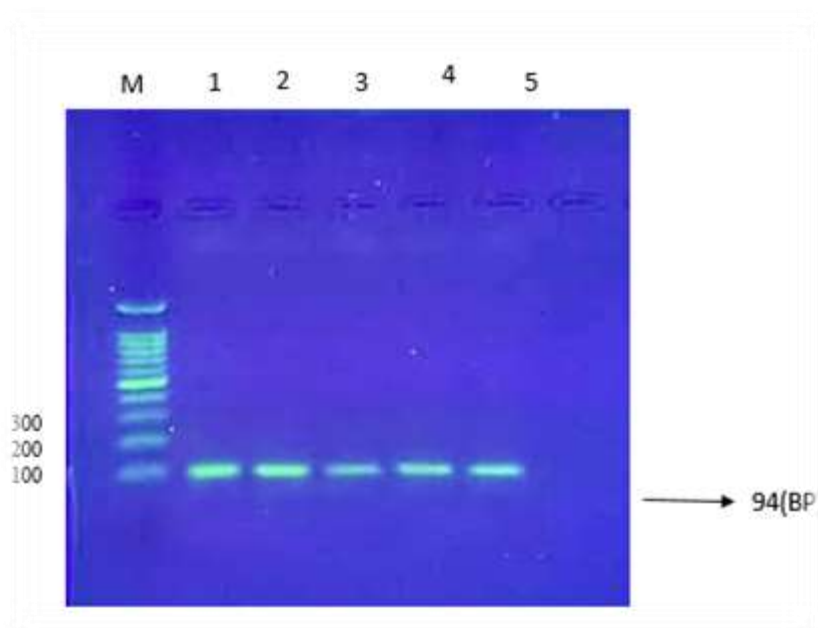


شکل ۱- بررسی کیفیت استخراج Total RNA با ژل آگارز ۱٪. موقعیت سه باند 28s، 18s، 5.8s در ژل مشخص شده است.

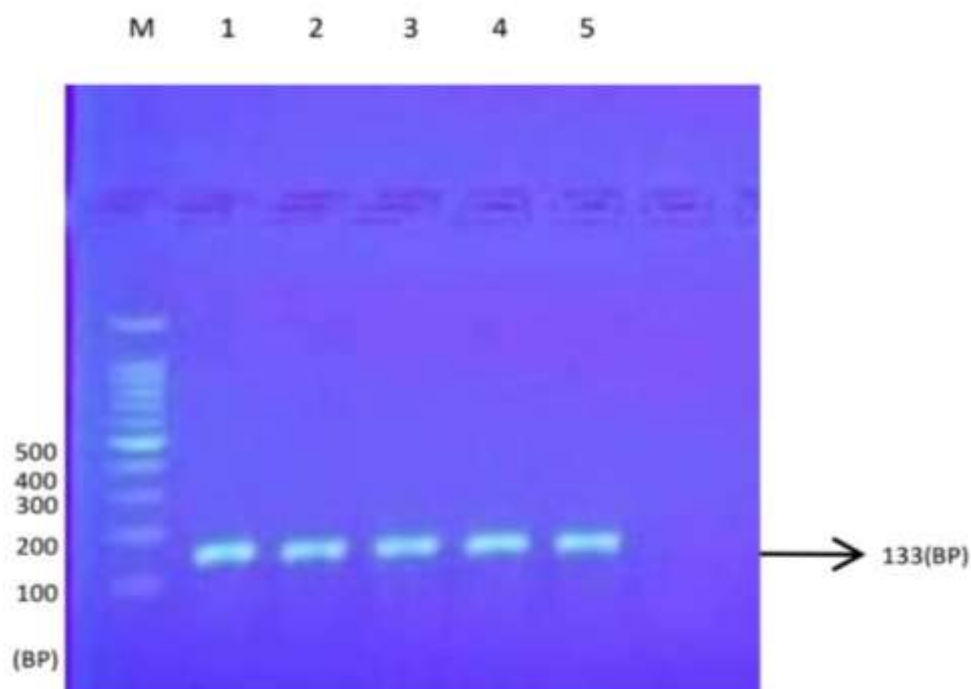
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) جهت بهینه‌سازی شرایط تکثیر ژن Kiss1: کیفیت مرحله استخراج RNA، با استفاده از الکتروفورز و بررسی میزان جذب RNA توسط دستگاه نانودراپ (EzDrop 1000, Taiwan) مشخص گردید.

بررسی کیفیت محصولات PCR: پس از سنجش کمی و کیفی RNA استخراج شده، با توجه به غلظت‌های به‌دست‌آمده و با استناد به پروتکل ذکرشده، سنتز cDNA و RT-PCR انجام شد. بمنظور یافتن بهترین دمای اتصال پرایمر به ژن موردنظر Gradient PCR انجام گرفت. محصولات تکثیر ژن Kiss1 و β -actin در بازه دمایی ۵۴ تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از ژل ۲٪ در دستگاه الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت و ضخیم‌ترین باند مشاهده شده در ژل آگارز ۲٪ در این بازه دمایی قرار داشت. در صورت مناسب بودن شرایط PCR، قطعه‌ای به

نهایی مخلوط واکنش $25 \mu\text{l}$ در نظر گرفته شد. میزان بیان ژن از روش نسبی اندازه‌گیری شد.



شکل ۲- تکثیر قطعه‌ای به طول ۹۴ جفت بازی از ژن Kiss1 در ژل آگارز ۲٪. با استفاده از Ladder ۱۰۰ جفت بازی که در طول قطعه تکثیر شده در شکل مشخص است.



شکل ۳- تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۳۳ جفت بازی از ژن B-actin در ژل آگارز ۲٪. با استفاده از Ladder ۱۰۰ جفت بازی که در طول قطعه تکثیر شده در شکل مشخص شده است

محاسبه شد. سپس مقادیر Fold Change در نرم افزار SPSS ورژن ۱۹ وارد شدند و در صورت مشاهده‌ی اختلاف معنی‌دار، پس‌آزمون Tukey جهت مشخص نمودن معنی‌دار بودن با سطح اطمینان ۹۵ درصد در هر یک از گروه‌ها استفاده گردید. برای رسم نمودارها از نرم افزار Graphpad Prism ورژن ۸٫۲ استفاده گردید.

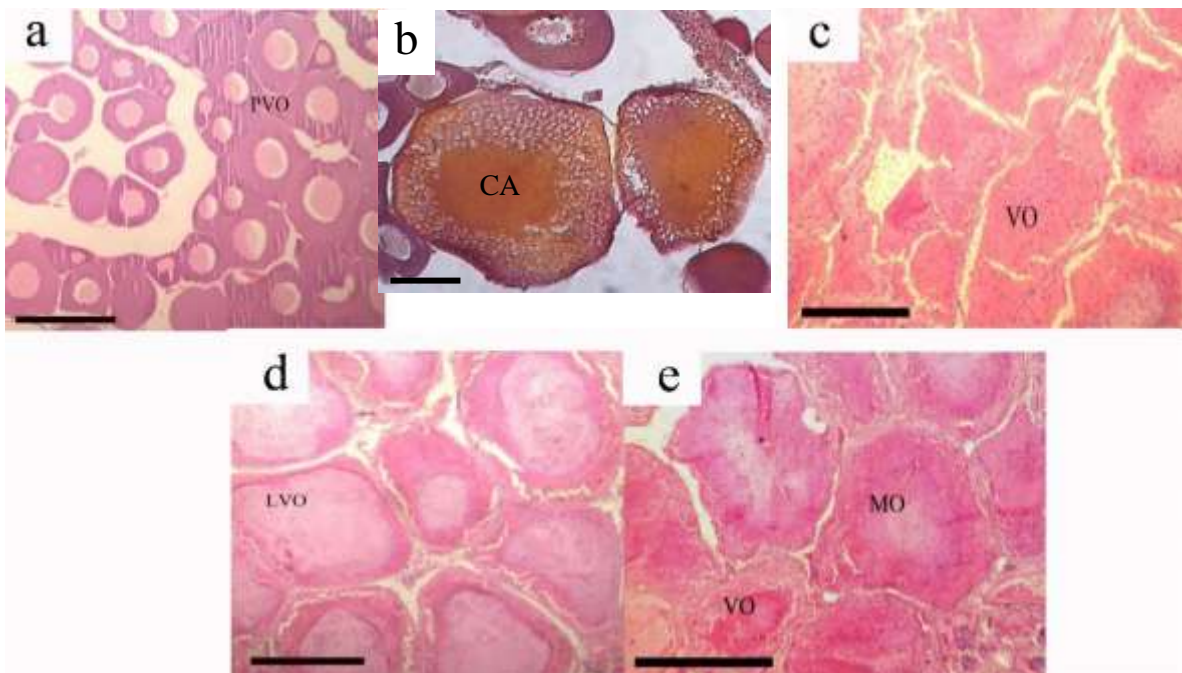
$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta CT - \text{نمونه} - \Delta CT - \text{کنترل})}$$

نتایج

بافت‌شناسی تخمدان: نتایج بافت‌شناسی تخمدان نشان می‌دهد که اووسیت‌ها در تخمدان‌های نمونه‌های آبان و آذر (شکل ۴ a و b) در مراحل اولیه‌ی رشد هستند و اووسیت‌های نمونه‌های اسفند و بهمن در مراحل پیشرفته‌تری نسبت به نمونه‌های آبان و آذر قرار دارند (شکل ۴ d و e) (جدول ۲).

در این پژوهش از B-actin به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شده است. سیکل دمایی دستگاه Real Time PCR (Roche Light Cycler96) کاملاً مشابه PCR شرح داده شده در مرحله‌ی قبل تنظیم شد با این تفاوت که دمای اتصال پرایمر 60°C و تعداد سیکل‌ها ۴۵ تعیین شد.

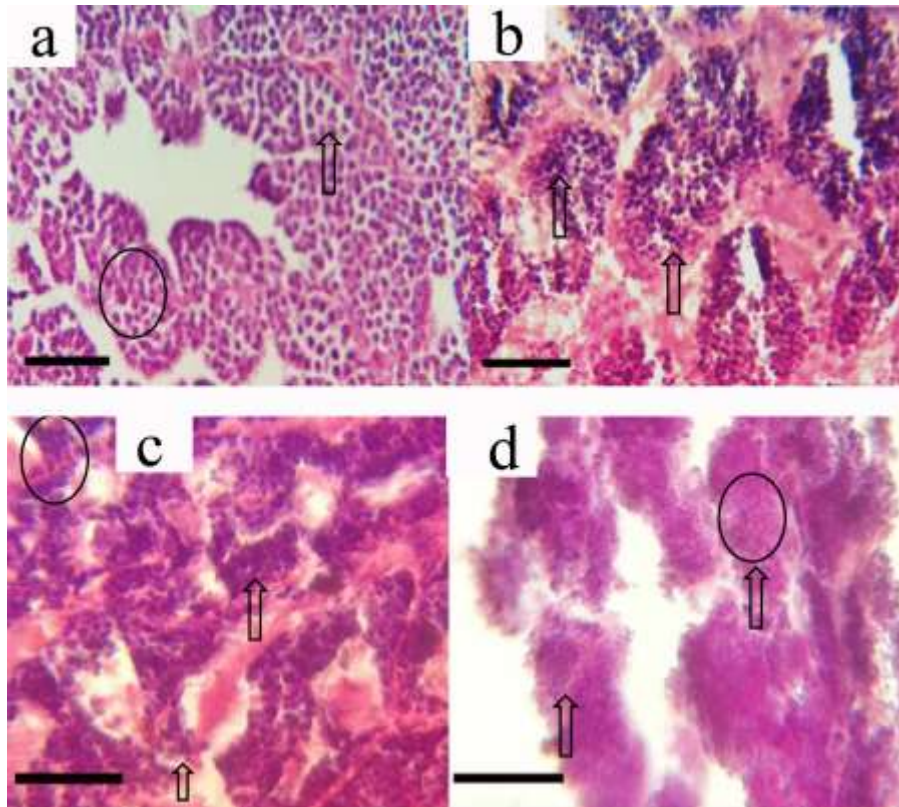
آنالیز آماری: جهت بررسی میزان بیان نسبی ژن Kiss1، از ژن کنترل داخلی β -actin برای نرمال سازی داده‌های خروجی استفاده شد. تکنیک Real-time PCR توسط اندازه‌گیری میزان نور فلورسنت گزارشگر سایبرگرین مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت بدین صورت که هر چه میزان بیان ژن بیشتر بود در سیکل‌های پایین‌تری وارد فاز نمای شده و نور بیشتری را ساطع کرد. برای محاسبه‌ی میزان بیان ابتدا، داده‌های به دست آمده از Real Time PCR ابتدا وارد نرم افزار Microsofr Excel 2016 شدند و پس از محاسبه ΔCT و $\Delta\Delta Ct$ طبق فرمول زیر، Fold Change نیز



شکل ۴- میزان رسیدگی اسپرماتوسیت‌ها ماهی سفید دریای خزر در ماه‌های مختلف. a: وضعیت رسیدگی اووسیت‌ها در بافت تخمدان ماهی سفید خزر در ماه آبان. اووسیت‌ها غالباً در مراحل پیش از زرده سازی PVO قرار دارند. خط مقیاس: ۵۰۰ میکرومتر. b: وضعیت رسیدگی اووسیت‌ها در ماه آذر (اووسیت‌های آلوتل کورتیکال CA). خط مقیاس: ۱۵۰ میکرومتر. c: وضعیت رسیدگی اووسیت‌ها در ماه دی. اووسیت‌ها غالباً در مرحله‌ی زرده سازی (VO) قرار دارند. خط مقیاس: ۵۰۰ میکرومتر. d: وضعیت رسیدگی اووسیت‌ها در ماه بهمن. اووسیت‌ها غالباً در مراحل انتهایی زرده سازی (LVO) قرار دارند. خط مقیاس: ۵۰۰ میکرومتر. e: وضعیت رسیدگی اووسیت‌ها در ماه اسفند. اووسیت‌ها غالباً در مرحله‌ی رسیدگی (MO) قرار دارند. خط مقیاس: ۵۰۰ میکرومتر.

مراحل پیشرفته‌تری نسبت به نمونه‌های آبان و آذر قرار دارند (شکل ۵ d و e) (جدول ۲).

بافت‌شناسی بیضه: نتایج بافت‌شناسی بیضه نشان می‌دهد که اسپرم‌ها در بیضه‌های نمونه‌های آبان و آذر (شکل ۵ a و b) در مراحل اولیه‌ی رشد هستند و نمونه‌های اسفند در

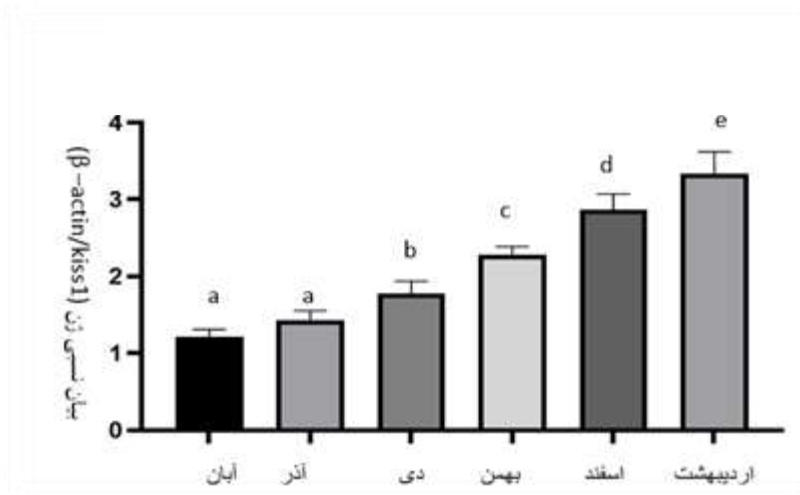


شکل ۵- میزان رسیدگی اسپرماتوسیت‌ها ماهی سفید دریای خزر در ماه‌های مختلف. a: وضعیت رسیدگی اسپرماتوسیت‌ها در بافت بیضه ماهی سفید دریای خزر در ماه آبان. بیضه‌ی ماهی در مرحله‌ی بلوغ اولیه و حاوی اسپرماتوگونمای فراوان (دایره) و اسپرماتوسیت اولیه (نوک فلش). خط مقیاس: ۱۵ میکرومتر. b: وضعیت رسیدگی اسپرماتوسیت‌ها در ماه آذر و دی. بیضه‌ی ماهی در مرحله‌ی بلوغ ثانویه رسیدگی جنسی و سرشار از اسپرماتوسیت اولیه (فلش پایین سمت راست) و ثانویه (فلش بالا سمت چپ). خط مقیاس: ۱۵ میکرومتر. c: وضعیت رسیدگی اسپرماتوسیت‌ها در ماه دی تا اسفند. مرحله‌ی بالغ رسیدگی جنسی که حاوی اسپرماتوسیت اولیه (دایره)، اسپرماتوسیت ثانویه (فلش بالا سمت راست)، اسپرماتید و اسپرماتوزوآهای آزاد (فلش پایین سمت چپ) است. خط مقیاس: ۱۵ میکرومتر. d: وضعیت رسیدگی اسپرماتوسیت‌ها در ماه اسفند تا اردیبهشت. در مرحله‌ی کاملاً رسیده‌ی بیضه لوبول‌های (دایره) حاوی اسپرماتوزوآ (فلش). خط مقیاس: ۱۵ میکرومتر.

جدول ۲- مراحل رسیدگی تخمدان و بیضه ماهی سفید دریای خزر در ماه‌های مختلف.

ماه نمونه برداری	آبان	آذر	دی	بهمن	اسفند تا اردیبهشت
مراحل رشد تخمدانی	پیش از زرده سازی	آلوتل کورتیکال	زرده سازی	مراحل انتهایی زرده سازی	رسیده
مراحل رشد بیضه	بلوغ اولیه یا اسپرماتوگونیا	بلوغ ثانویه یا اسپرماتوسیت اولیه	بلوغ ثانویه یا اسپرماتوسیت اولیه	رسیدگی جنسی، اسپرماتید و اسپرماتوزوآهای آزاد	کاملاً رسیده، اسپرماتوزوآ

که بین ماه آبان و ماه آذر اصلاً تفاوت معناداری از لحاظ آماری مشاهده نمی‌شود ($P=0/3632$) ولی بین ماه آذر و ماه دی تفاوت قابل توجه مشاهده می‌شود ($P=0/0388$) و حتی پس از آن، تفاوت میزان بیان ژن مورد نظر بین ماه‌های بعدی بسیار زیاد می‌شود. بیشترین اختلاف در میزان بیان ژن مورد نظر بین ماه‌های بهمن و اسفند است ($P<0/0001$) که بر روی نمودار نیز قابل مشاهده است.



شکل ۶- نمودار بیان نسبی ژن Kiss1 در بافت مغز جنس نر ماهی سفید طی ماه‌های مختلف. تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۳ قطعه بود و از آن‌وای یک طرفه و پس از آزمون توکی با ضریب اطمینان ۹۵٪ برای تحلیل داده‌ها استفاده شده است.

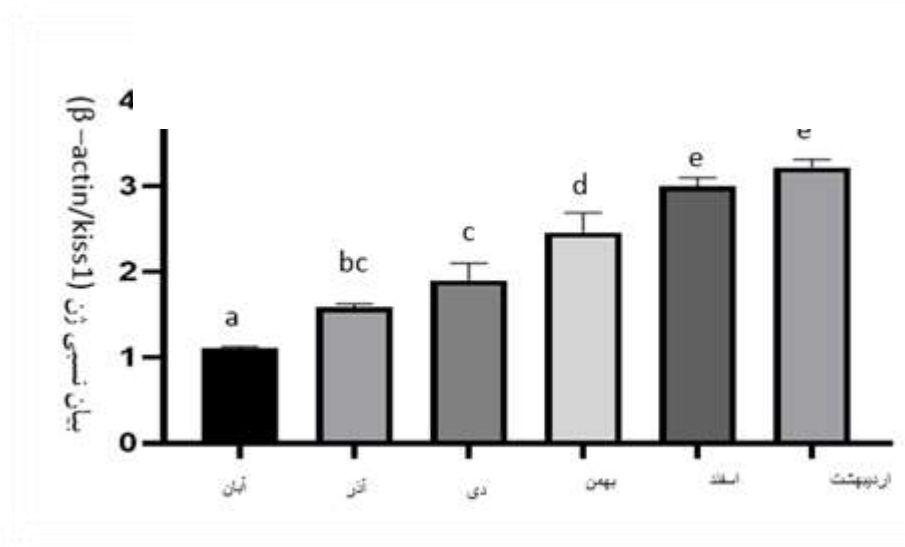
مقایسه‌ی بیان نسبی ژن Kiss1 در جنس نر و ماده: همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری در بیان ژن Kiss1 در دو جنس نر و ماده مشاهده نشده است ($P>0.05$). همچنین ضریب همبستگی مثبت معناداری بین بیان ژن Kiss1 در جنس نر و ماده در ماه‌های مختلف مشاهده شد ($P<0.0567$, $r=75\%$).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر میزان بیان ژن Kiss1 در رسیدگی جنسی ماهی سفید خزر بررسی شده است.

بیان نسبی ژن Kiss1 در بافت‌های مغز در جنس نر ماهی سفید: همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود مقایسه میزان بیان نسبی ژن Kiss1 در بافت مغز ماهی سفید جنس نر در ماه‌های آبان تا اردیبهشت انجام گرفته است. میزان بیان ژن Kiss1 در این جنس به‌صورت صعودی بوده و در تمام طول دوره نمونه برداری افزایش یافته است. این افزایش بیان در ماه‌های ابتدای دوره آزمایش ناچیز بوده و به مرور زمان تفاوت آشکارتر و فاحش‌تر می‌شود به‌طوری

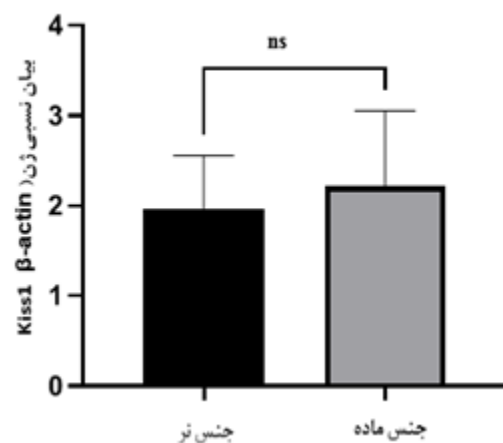
بیان نسبی ژن Kiss1 در بافت‌های مغز در جنس ماده: ماهی سفید: مقایسه میزان بیان نسبی ژن Kiss1 در بافت مغز ماهی سفید جنس ماده در ماه‌های آبان تا اردیبهشت در شکل ۷ آورده شده است. با توجه به میانگین بیان ژن Kiss1 در بافت مغز ماهی سفید جنس ماده، افزایش بیان با مراحل رسیدگی جنسی در ارتباط می‌باشد به‌طوری‌که در ماه اردیبهشت بیشترین میزان بیان قابل مشاهده است. با توجه به نمودار بین ماه‌های اسفند و اردیبهشت ($P=0/4013$) و همچنین ماه‌های آذر و دی ($P=0/1271$) اختلاف معنی‌داری در بیان ژن Kiss1 مشاهده نشد همچنین با توجه به $P<0.0001$ ، اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن Kiss1 در طی ماه‌های آبان تا اردیبهشت مشاهده شد.



شکل ۷- نمودار بیان ژن Kiss1 در بافت مغز جنس ماده ماهی سفید دریای خزر طی ماه‌های مختلف. عداد نمونه‌ها در هر گروه ۳ قطعه بود و از آن‌وای یک طرفه و پس آزمون توکی با ضریب اطمینان ۹۵٪ برای تحلیل داده‌ها استفاده شده است.

که میزان بیان ژن Kiss1 و Kiss2 با آغاز بلوغ در ماهی زبرا افزایش پیدا می‌کند. در سال ۲۰۱۲ میزان بیان ژن Kiss2 را در هیپوتالاموس در فصل تخم‌ریزی و بعد از تخم‌ریزی در دو جنس بررسی کردند و نشان دادند که میزان بیان Kiss2 در هر دو جنس در اوایل فصل تخم‌ریزی در مقایسه با فصل بعد از تخم‌ریزی بیشتر بود (۸).

در مطالعه حاضر نیز، از آبان ماه تا اردیبهشت ماه که فصل رسیدگی جنسی، تولیدمثل و تخم‌ریزی ماهی سفید است میزان رسیدگی جنسی گنادها و سلول‌های جنسی رفته‌رفته افزایش پیدا کرده است طوری که در آبان ماه سلول‌های جنسی نر و ماده در مراحل اولیه رشد قرار دارند و در اردیبهشت ماه به رسیدگی کامل می‌رسند. همچنین بیشترین میزان بیان ژن Kiss1 ماهی سفید دریای خزر در فصل تولیدمثلی و بخصوص تخم‌ریزی (ماه اردیبهشت) گزارش شد. به نظر می‌رسد این ژن می‌تواند در تحریک ترشح هورمون‌های جنسی مرتبط با تخم‌ریزی نقش مؤثری داشته باشد. میزان بیان ژن Kiss1 در هیپوتالاموس مداکا در هر دو جنس طی فصل تولیدمثل نسبت به فصل غیر تولیدمثل افزایش داشته است درحالی‌که در فصل غیر تولیدمثل این افزایش بیان در جنس نر نسبت به جنس ماده بیشتر بود



شکل ۸- مقایسه میانگین بیان نسبی ژن Kiss1 در هیپوتالاموس مغز در دو جنس نر و ماده.

در ماهی‌ها بیشتر تحقیقات کیس‌پتین روی تولیدمثل و به‌ویژه تنظیم شروع بلوغ صورت گرفته است و اطلاعات کمی در مورد اثرات دیگر کیس‌پتین وجود دارد؛ بنابراین احتمال دارد که هر ژن پارالوگ در ماهی اعمال پلی تروپیک داشته باشد. مثلاً در ماهی زبرا ژن Kiss2 در تولیدمثل دخیل است درحالی‌که Kiss1 وابسته به سیگنال‌های متابولیکی است (۱، ۱۱). با مطالعه‌ی بیان ژن کیس‌پتین در بلوغ، Kitahashi و همکاران (۱۰) نشان دادند

شد به طوری که در هنگام اسپرم ریزی (مرحله رسیده) بیشترین بیان ژن Kiss1 گزارش شد.

با توجه به اینکه کیس‌پپتین‌ها در بسیاری از گونه‌های مختلف ماهیان از طریق شبکه‌های عصبی شناخته شده و غیر شناخته شده در موفقیت تولیدمثلی و رسیدگی جنسی نقش دارند در مطالعه‌ی حاضر برای درک نقش ژن Kiss1 در رسیدگی جنسی ماهی سفید دریای خزر، تغییرات بیان ژن Kiss1 در هیپوتالاموس هر دو جنس نر و ماده ماهی سفید در طول ماه‌های مختلف نشان داده شد. مراحل رشد جنسی و بلوغ ماهی سفید دریای خزر از اوایل آبان تا اردیبهشت است و در طی مراحل مختلف جنسی میزان بیان ژن Kiss1 و رسیدگی جنسی گناد نر و ماده افزایش معنی‌داری نشان داد به طوری که در مراحل اولیه رشد گنادها میزان بیان ژن Kiss1 افزایش معنی‌داری را نشان نمی‌دهد ولی با توسعه و رشد گنادها میزان بیان ژن Kiss1 افزایش پیدا می‌کند به طوری که در ماه‌های اسفند و اردیبهشت با حداکثر رسیدگی جنسی میزان بیان ژن Kiss1 افزایش یافته که مصادف با سنتز حداکثری هورمون‌های جنسی است که این نشان‌دهنده ارتباط و تأثیر مستقیم کیس‌پپتین بر روند سنتز و تولید هورمون‌های جنسی ماهی است.

در مجموع، با توجه به نتایج به دست آمده در خصوص بررسی بیان ژن Kiss1 در مغز ماهی سفید دریای خزر با استفاده از تکنیک Real time PCR کمی و افزایش بیان این ژن در ماه‌هایی که ماهی تخم‌ریزی دارد به نظر می‌رسد که Kiss1 یکی از عوامل مهم در سیستم تولیدمثل ماهی سفید دریای خزر است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله نهایت تشکر و قدردانی خود را از سرکار خانم دکتر مهوش هادوی و جناب آقای دکتر عبدالمجید ولی پور به جهت کمک در تهیه مقاله اعلام می‌دارد.

(Kanda et al., 2008). در جنس نر ماهی sea bass اروپایی طی چرخه‌ی تولیدمثلی میزان بیان ژن Kiss1 در مرحله‌ی اسپرماتوزنز میانی و اواخر آن در مقایسه با دوره‌ی پس از اسپرم ریزی به طور قابل توجهی بالا بود (۱۵).

در مطالعه‌ی حاضر میانگین میزان بیان ژن Kiss1 در جنس ماده بیشتر از جنس نر بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود. در این مطالعه نیز در مراحل اولیه‌ی رشد گنادهای نر و ماده (آبان ماه و آذر ماه) میزان بیان این ژن به صورت معنی‌داری نسبت به فصل تخم‌ریزی (اسفند ماه و اردیبهشت ماه) پایین بود. در سال ۲۰۱۰ میزان بیان ژن Kiss1 و Kiss2 در مراحل مختلف رسیدگی جنسی ماهی مارکرل مورد مطالعه قرار گرفت و نشان داده شد که میزان بیان ژن Kiss1 و Kiss2 در جنس نر بین مراحل نابالغ و دوره‌ی اوایل اسپرم ریزی به حداکثر خود رسیده و بعد از اسپرم ریزی این میزان کاهش پیدا کرده است. در جنس ماده میزان بیان ژن Kiss1 در آغاز دوره‌ی ویتلوژنیک به حداکثر میزان خود رسیده است (۲۰). در سال ۲۰۱۰ با بررسی فصلی میزان بیان ژن Kiss2 در طول چرخه‌ی گناد دریافتند که میزان بیان در مغز به طور قابل توجهی در طول دوره‌ی تخم‌ریزی در هر دو جنس بالا بود (۲۸). در سال ۲۰۱۶ با بررسی میزان بیان ژن Kiss1 در ماهی Ruho نشان داد که میزان بیان ژن Kiss1 به طور قابل توجهی در دوره تخم‌ریزی در هر دو جنس بالا بود (۲۵). در سال ۲۰۱۷ با بررسی میزان بیان Kiss1 و Kissr (گیرنده کیس‌پپتین) در ماهی *Odonthestes bonariensis* بیان کردند که میزان بیان Kiss1 و Kissr در طی تکامل بیضه در مقایسه با بیضه نابالغ افزایش یافته و در ماهیان ماده بیان بالایی از گیرنده را در بلوغ نهایی تخمدان نشان دادند (۳). در ماهی سفید دریای خزر، در جنس ماده در مراحل زرده سازی و پیش از زرده سازی، بیان ژن کیس‌پپتین مشاهده شده است اما میزان آن در مقایسه با مرحله رسیده و تخم‌ریزی به طور معناداری کمتر بوده است. همچنین در جنس نر چنین الگویی دیده

منابع

1. Alvarado, M., Servili, A., Molés, G., Gueguen, M.-M., Carrillo, M., Kah, O., Felip, A., 2016. Actions of sex steroids on kisspeptin expression and other reproduction-related genes in the brain of the teleost fish European sea bass. *Journal of Experimental Biology* 219, 3353-3365.
2. Aminian Fatideh, B., Mohammadi, M., Karimzadeh, G., Jafari, A.G., Vahdati Rad, N., 2017. Effect of biological and environmental conditions on the catch rate and migration of *Rutilus Frisii Kutum* in the southeast basin of the Caspian Sea (Golestan Province). *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)* 29, 380-399.
3. Bohórquez, M.O.T., Mechaly, A.S., Hughes, L.C., Campanella, D., Ortí, G., Canosa, L.F., Somoza, G.M., 2017. Kisspeptin system in pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*). Characterization and gene expression pattern during early developmental stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 204, 146-156.
4. Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M., Gómez, A., 2009. Evidence for two distinct Kiss genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology* 312, 61-71.
5. Filby, A.L., Aerle, R.v., Duitman, J., Tyler, C.R., 2008. The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. *Biology of Reproduction* 78, 278-289.
6. Kah, O., 2009. Endocrine targets of the hypothalamus and pituitary. *Fish Physiology* 28, 75-112.
7. Kanda, S., Akazome, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, N., Yamada, S., Tsukamura, H., Maeda, K.-i., Oka, Y., 2008. Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 149, 2467-2476.
8. Kanda, S., Akazome, Y., Mitani, Y., Okubo, K., Oka, Y., 2013. Neuroanatomical evidence that kisspeptin directly regulates isotocin and vasotocin neurons. *PLoS one* 8, e62776.
9. Kiabi, B.H., Abdoli, A., Naderi, M., 1999. Status of the fish fauna in the South Caspian Basin of Iran. *Zoology in the Middle East* 18, 57-65.
10. Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2009. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology* 150, 821-831.
11. Le Page, Y., Vosges, M., Servili, A., Brion, F., Kah, O., 2011. Neuroendocrine effects of endocrine disruptors in teleost fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 14, 370-386.
12. Lee, J.-H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 88, 1731-1737.
13. Luan, X., Zhou, Y., Wang, W., Yu, H., Li, P., Gan, X., Wei, D., Xiao, J., 2007. Association study of the polymorphisms in the KISS1 gene with central precocious puberty in Chinese girls. *European Journal of Endocrinology* 157, 113-118.
14. Matsuda, F., Ohkura, S., Magata, F., Munetomo, A., Chen, J., Sato, M., Inoue, N., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., 2019. Role of kisspeptin neurons as a GnRH surge generator: Comparative aspects in rodents and non-rodent mammals. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 45, 2318-2329.
15. Migaud, H., Ismail, R., Cowan, M., Davie, A., 2012. Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology* 179, 384-399.
16. Mohamed, J.S., Benninghoff, A.D., Holt, G.J., Khan, I.A., 2007. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *Journal of Molecular Endocrinology* 38, 235-244.

17. Nocillado, J.N., Levavi-Sivan, B., Carrick, F., Elizur, A., 2007. Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *General and Comparative Endocrinology* 150, 278-287.
18. Oakley, A.E., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocrine Reviews* 30, 713-743.
19. Ohga, H., Adachi, H., Matsumori, K., Kodama, R., Nyuji, M., Selvaraj, S., Kato, K., Yamamoto, S., Yamaguchi, A., Matsuyama, M., 2015. mRNA levels of kisspeptins, kisspeptin receptors, and GnRH1 in the brain of chub mackerel during puberty. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 179, 104-112.
20. Ohga, H., Selvaraj, S., Matsuyama, M., 2018. The roles of kisspeptin system in the reproductive physiology of fish with special reference to chub mackerel studies as main axis. *Frontiers in Endocrinology* 9, 147.
21. Parhar, I.S., Ogawa, S., Sakuma, Y., 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145, 3613-3618.
22. Pasquier, J., Kamech, N., Lafont, A.-G., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S., 2014. Kisspeptin/kisspeptin receptors. *Journal of Molecular Endocrinology* 52, T101-T117.
23. Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., Tena-Sempere, M., 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews* 92, 1235-1316.
24. Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2008. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29, 48-69.
25. Saha, A., Pradhan, A., Sengupta, S., Nayak, M., Samanta, M., Sahoo, L., Giri, S.S., 2016. Molecular characterization of two kiss genes and their expression in rohu (*Labeo rohita*) during annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 191, 135-145.
26. Selvaraj, S., Ohga, H., Kitano, H., Nyuji, M., Yamaguchi, A., Matsuyama, M., 2013. Peripheral administration of Kiss1 pentadecapeptide induces gonadal development in sexually immature adult scombroid fish. *Zoological Science* 30, 446-454.
27. Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno Jr, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine* 349, 1614-1627.
28. Shahjahan, M., Motohashi, E., Doi, H., Ando, H., 2010. Elevation of Kiss2 and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season. *General and Comparative Endocrinology* 169, 48-57.
29. Shi, Y., Zhang, Y., Li, S., Liu, Q., Lu, D., Liu, M., Meng, Z., Cheng, C.H., Liu, X., Lin, H., 2010. Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during α -methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Biology of Reproduction* 83, 63-74.
30. Skorupskaitė, K., George, J.T., Anderson, R.A., 2014. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human Reproduction Update* 20, 485-500.
31. Tsutsui, K., Bentley, G., Kriegsfeld, L.J., Osugi, T., Seong, J.Y., Vaudry, H., 2010. Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *Journal of Neuroendocrinology* 22, 716-727.
32. Wullimann, M.F., 2017. Nervous system architecture in vertebrates. *The Wiley Handbook of Evolutionary Neuroscience*.

Changes in Kiss1 gene expression in the brain tissue of the male and female Caspian kutum (*Rutilus kutum*) in different stages of gonadal growth

Davoodi M.¹ and Heidari B.^{1,2*}

¹Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

² Dept. of Marine Sciences, Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

The Caspian kutum is one of the most important economic and native species of the Caspian Sea. Kisspeptin neurons act as a central processor in the transmission of peripheral signals to gonadotropin receptor (GnRH) neurons. To investigate the role of kisspeptin, especially Kiss1 in the reproduction of the Caspian kutum, the expression of the Kiss1 gene in brain tissue was evaluated using real-time PCR. For this purpose, 36 pieces of fish were caught from Anzali shores from November 1997 to May 1998 with an average weight of 650 ± 50 g and a length 35.5 ± 0.2 cm and brain tissue was separated. After extraction of total RNA and cDNA synthesis from brain tissue, expression of the Kiss1 gene was performed using real-time PCR technique by reference gene-actin- β . Data were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-test and 95% confidence level and the significant difference in expression of the Kiss1 gene was calculated per month in both sexes. The results showed that the expression level of the Kiss1 gene in the brain tissue of male and female fish showed a significant difference in different months ($p < 0.05$). The highest expression of the Kiss1 gene in both sexes was reported in May during the Caspian kutum spawning. In addition, morphohistology of gonads showed that the highest sexual maturity was from March to May. In conclusion, it seems that it can be stated that Kiss1 has the highest level of expression in the months when the Caspian kutum reaches its sexual maturity.

Key words: Kiss1 gene, sexual maturity, Caspian kutum, sampling period.