

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – انستیتو تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر

عنوان:

**بررسی امکان تولید دورگه
بین دو گونه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)
و تاسماهی سیری (*Acipenser baerii*)
و مقایسه رشد آن**

مجری:

محمد پور کاظمی

شماره ثبت

۵۳۹۱۳

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور— انستیتو تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر

عنوان پروژه : بررسی امکان تولید دورگه بین دو گونه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و تاسماهی
سیبری (*Acipenser baerii*) و مقایسه رشد آن

شماره مصوب پروژه : ۸۹۰۸۰-۱۲-۸۶-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : محمد پور کاظمی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد) : -

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محمد پور کاظمی

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : محمد علی یزدانی، هوشنگ یگانه، محمدرضا نوروز فشخامی، محمد

حسن زاده صابر، مهتاب یارمحمدی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -

محل اجرا : استان گیلان

تاریخ شروع : ۹۰/۱/۱

مدت اجرا : ۳ سال و ۹ ماه

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۷

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ
بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه : بررسی امکان تولید دورگه بین دو گونه تاسماهی ایرانی
(*Acipenser persicus*) و تاسماهی سیری (*Acipenser baerii*) و

مقایسه رشد آن

کد مصوب : ۲-۸۶-۱۲-۸۹۰۸۰

شماره ثبت (فروست) : ۵۳۹۱۳ تاریخ : ۱۳۹۷/۴/۹

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمد پورکاظمی دارای مدرک
تحصیلی دکتری در رشته ژنتیک مولکولی می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان در

تاریخ ۹۶/۱۱/۲۹ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت رئیس انستیتو در موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای

خزر مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده		۱
۱- مقدمه		۴
۱-۱- اهمیت و ضرورت تحقیق		۴
۱-۲- اهداف تحقیق		۶
۱-۳- سؤالات تحقیق		۶
۱-۴- فرضیه‌های تحقیق		۶
۱-۵- کلیات		۷
۱-۵-۱- تاسماهی ایرانی (<i>Acipenser persicus</i> Borodin, 1897)		۷
۱-۵-۲- تاسماهی سبیری (<i>Acipenser baerii</i> Brandt, 1869)		۱۷
۱-۵-۳- دو رگه گیری در آبزیان		۲۴
۱-۵-۴- الکتروفورز		۲۵
۱-۵-۵- واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)		۲۵
۱-۵-۶- نشانگرها		۲۶
۲- مروری بر منابع		۲۹
۲-۱- دو رگه گیری مصنوعی تاسماهیان		۲۹
۲-۱-۱- دو رگه گیری مصنوعی تاسماهیان در خارج از کشور		۲۹
۲-۱-۲- دو رگه گیری مصنوعی تاسماهیان در داخل کشور		۳۰
۲-۲- دو رگه گیری مصنوعی کپور ماهیان		۳۰
۲-۲-۱- دو رگه گیری مصنوعی کپور ماهیان در داخل کشور		۳۰
۲-۲-۲- دو رگه گیری مصنوعی کپور ماهیان در داخل کشور		۳۱
۲-۲-۳- دو رگه گیری مصنوعی آزاد ماهیان		۳۱
۳- مواد و روشها		۳۲
۳-۱- تکثیر		۳۲
۳-۲- عملیات پرورش		۳۲
۳-۳- ارزیابی پارامترهای مورفولوژیک و مریستیک		۳۳
۳-۴- بررسی مولکولی		۳۴
۳-۴-۱- مواد و محلولهای مورد استفاده		۳۷

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه
۳-۴-۲- بررسی کمی و کیفی DNA های استخراج شده.....	۳۷	
۳-۴-۳- مراحل انجام PCR.....	۴۱	
۳-۴-۴- الکتروفورز.....	۴۱	
۳-۴-۵- نحوه شمارش الیها.....	۴۲	
۳-۴-۶- نحوه آنالیز و محاسبه الیها.....	۴۳	
۳-۵- بررسی سیتوژنتیک.....	۴۳	
۳-۶- تعیین جنسیت با استفاده روش لاپاراسکوپي.....	۴۴	
۳-۷- آنالیز آماری.....	۴۴	
۴- نتایج.....	۴۶	
۴-۱- نتایج پرورش ماهیان.....	۴۶	
۴-۱-۱- نتایج فاز ۱ پرورش (اوزان ۴۶ تا ۶۶۰۷ میلیگرم دریک دوره ۱۰ هفته ای).....	۴۶	
۴-۱-۲- نتایج فاز ۲ پرورش (اوزان ۶/۵ تا ۷۵۰ گرم دریک دوره ۳۳۰ روزه).....	۵۱	
۴-۲- نتایج ارزیابی مورفولوژیک.....	۷۳	
۴-۲-۲- مقایسه تاسماهی ایرانی شاهد با دورگه ها.....	۷۴	
۴-۲-۳- تحلیل مولفه های اصلی.....	۷۸	
۴-۳- نتایج ارزیابی مولکولی.....	۸۰	
۴-۳-۱- نتایج پرایمر afug 160.....	۸۰	
۴-۳-۲- نتایج پرایمر Ls68.....	۸۲	
۴-۳-۳- نتایج پرایمر afug112.....	۸۳	
۴-۳-۴- نتایج پرایمر afug195.....	۸۴	
۴-۳-۵- نتایج پرایمر afug68b.....	۸۵	
۴-۳-۶- نتایج پرایمر AOX27.....	۸۹	
۴-۳-۷- نتایج پرایمر afug229.....	۹۰	
۴-۳-۸- نتایج پرایمر afug241.....	۹۱	
۴-۳-۹- نتایج پرایمر afug63.....	۹۳	
۴-۳-۱۰- نتایج پرایمر afug56.....	۹۴	

عنوان	فهرست مندرجات	صفحه
۱۱-۳-۴-نتیجه گیری کلی مولکولی.....		۹۸
۴-۴-نتایج بررسی سیتوژنتیک.....		۹۸
۴-۵-نتایج تعیین جنسیت.....		۱۰۴
۵-بحث.....		۱۰۷
۵-۱-استخراج DNA.....		۱۰۷
۵-۲-دورگه گیری (HYBRIDIZATION).....		۱۰۷
۵-۳-ارزیابی مورفولوژی.....		۱۰۹
۵-۴-میکروستلایت (MICROSATELLAIT).....		۱۱۱
۵-۵-مقایسه میکروستلایت با سایر روشها.....		۱۱۵
۵-۶-بررسی های سیتوژنتیک.....		۱۱۶
۶-نتیجه گیری.....		۱۱۸
۶-۱-آزمون فرضیات.....		۱۱۹
پیشنهادها.....		۱۲۰
منابع.....		۱۲۱
چکیده انگلیسی.....		۱۲۸

چکیده

در این پژوهش امکان تولید دورگه حاصل از تلاقی تاسماهی سبیری × تاسماهی ایرانی و مقایسه با گونه‌های خالص با استفاده از روش‌های مورفولوژیک، مولکولی، سیتوژنتیک و روند رشد آنها بمنظور معرفی دورگه‌ای جدید از ماهیان خاویاری به صنعت آبزی پروری که در دو بخش مقایسه رشد طی مراحل لارو (اوزان ۴۶ تا ۶۶۰۷ میلی‌گرم)، بچه ماهی (اوزان ۶/۵ تا ۷۵۰ گرم) و پرواری (اوزان ۶۰۰ تا ۲۰۰۰ گرم) و همچنین تعیین جنسیت ماهیان پرورش یافته بعد از گذشت ۵ سال اجرا گردید. برای این منظور تخمک و اسپرم دو عدد تاسماهی ایرانی با دو عدد تاسماهی سبیری (ماده و نر) بصورت رفت و برگشت در ۴ تیمار تلاقی داده شد.

تیمار ۱ تاسماهی ایرانی شاهد (والدین نر و ماده تاسماهی ایرانی)، تیمار ۲ دورگه (نوع I) حاصل از تلاقی تاسماهی ایرانی نر با تاسماهی سبیری ماده و تیمار ۳ دورگه (نوع II) حاصل از تلاقی تاسماهی سبیری (نر) و تاسماهی ایرانی ماده و تیمار ۴ تاسماهی سبیری شاهد حاصل از تلاقی والدین نر و ماده تاسماهی سبیری تولید گردید.

برای هر تیمار، ۲۰۰ گرم تخمک با یک میلی لیتر اسپرم لقاح داده شد و پارامترهای موفومتریکی و مریستیک مولدین و بچه ماهیان حاصله ثبت گردید. برای مقایسه رشد بچه ماهیان شاهد و دورگه‌ها در سه فاز پرورش طی یک دوره ۱۰ هفته‌ای مورد مقایسه قرار گرفت.

فاز ۱ پرورش لاروی از وزن ۴۶ میلی گرم تا بیش از ۶۶۰۰ میلی گرم در یک دوره ۱۰ هفته‌ای انجام شد که در این مرحله لاروهای شاهد و دورگه هر دو هفته یکبار مورد زیست سنجی قرار گرفتند.

در فاز دوم پرورش مقایسه رشد در یک دوره ۳۳۰ روزه انجام پذیرفت و ماهیان از وزن ۵/۶ گرم تا وزن ۷۵۰ گرمی با زیست سنجی هر ماه یکبار که در آن متوسط رشد روزانه (گرم در روز) ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه (درصد در روز) در افزایش وزن بدن، کارایی غذا و نسبت بازده پروتئین محاسبه گردید.

در فاز سوم پرورش (از وزن ۶۰۰ گرم تا ۲۰۰۰ گرم) در یک دوره ۴۳ هفته‌ای انجام پذیرفت و مشابه فاز دوم پرورش، کلیه زیست سنجی‌ها انجام پذیرفت. در ارزیابی مقایسه مورفولوژیک مولدین شاهد و دورگه ۲۶ پارامتر مورفولوژیک و مریستیک مورد بررسی قرار گرفت و بر مبنای پارامترهای انفرادی و یا نسبی مقایسه‌ها بر مبنای آماری مورد محاسبه قرار گرفت.

جهت ارزیابی ژنتیکی و تعیین تفاوت مولکولی بین ماهیان شاهد و دورگه از روش میکروستلایت استفاده گردید که پس از استخراج DNA از باله مولدین و بچه ماهیان شاهد و دورگه از ۱۰ جفت پرایمر اختصاصی تاسماهیان (Afug160، IS68، Afug12، Afug195، Afug686، ox27، Afug229، Afug241، Afug63، Afug56) استفاده گردید و محصول PCR بر روی ژل پلی آکریلاسید ۶٪ الکتروفورز و سپس رنگ آمیزی نترات نقره انجام گرفت و ال‌ها بر حسب جفت باز (bp) مورد سنجش قرار گرفت.

برای مقایسه سیتوژنتیک و تعیین تعداد کروموزوم های ماهیان شاهد و دورگه، کشت گلبول های سفید خون ماهیان گسترش کروموزومی از نمونه های والدین و بچه ماهیان تهیه و با گیمسا رنگ آمیزی و در زیر میکروسکوپ مورد سنجش قرار گرفت.

جهت ارزیابی رشد گنادهای جنسی با استفاده از روش لاپراسکویی دوربین دار (مدل M-CAM1700) مرحله جنسی و همچنین وضعیت گناد و بیضه ۳۴ عدد از ماهیان شاهد و دورگه مورد سنجش قرار گرفت. در این تحقیق نتایج بررسی رشد نشان داد که در فاز ۱ پرورش بعد از گذشت ۱۰ هفته تغذیه، اختلاف معنی دار آماری ($P < 0.05$) در بین دورگه ها و شاهد وجود داشت که بیشترین سرعت رشد را لارو تاسماهی سبیری و سپس دورگه ماده سبیری و نر تاسماهی ایرانی و پس از آن دورگه نوع دوم و در مرحله کند رشد لارو تاسماهی ایرانی قرار داشت.

در فاز دوم پرورش نیز سرعت رشد تاسماهی ایرانی در مقایسه با تاسماهی سبیری و دورگه ها کمتر بود. تاسماهی سبیری شاهد در طی ۳۳۰ روز دوره پرورش متوسط افزایش وزن ۴/۱ گرم در روز و تاسماهی ایرانی ۳/۱ گرم در روز افزایش رشد داشت. در حالیکه دورگه تاسماهی سبیری ماده و تاسماهی ایرانی نر متوسط رشد روزانه ۵/۱ گرم و دورگه نوع دوم کمترین رشد را داشت.

نتایج فاز ۳ پرورش بیانگر سرعت رشد متفاوت در سنین مختلف ماهیان مورد بررسی بود. به نحوی که سرعت رشد روزانه تاسماهی سبیری شاهد ۴/۵ گرم در روز در حالیکه برای تاسماهی ایرانی شاهد ۶/۲ گرم در روز بود و تاسماهی سبیری در طی ۴۷ هفته از ۶۵۵ گرم به ۲۰۱۶ گرم رسید ولی تاسماهی ایرانی در طی این مدت از ۶۲۸ گرم به ۱۴۱۳ گرم رسید. دورگه نوع I یعنی دورگه حاصل از تلاقی تاسماهی سبیری ماده با تاسماهی ایرانی نر از سرعت رشد بالایی برخوردار بوده که از وزن ۶۵۵ گرم به ۲۲۹۸ گرم رسید ولی دورگه نوع II عکس آن در طی مدت مشابه از ۶۴۰ گرم به ۱۶۸۰ گرم رسید.

در جمع بندی ارزیابی رشد می توان اعلام نمود که دورگه حاصل از تلاقی تاسماهی سبیری ماده با تاسماهی ایرانی نر بالاترین سرعت رشد را نسبت به ماهیان شاهد و دورگه دیگر داشت و این دستاورد مهم میتواند بعنوان گام موثری در تولید گوشت و خاویار تاسماهیان به صنعت آبرزی پروری معرفی می گردد.

در ارزیابی صفات مورفولوژیک از ۲۶ شاخص اندازه گیری شده در ۱۸ شاخص اختلاف معنی دار دارند ($P < 0.05$) که بیانگر آن است که تیمارها به خوبی قابل تفکیک هستند به نحوی که تاسماهی سبیری پوزه بلندتر نسبت به تاسماهی ایرانی و دورگه ها در حد پوزه متوسط می باشد.

در مقایسه نسبی صفات مشخص شده از بین ۹ نسبت اندازه گیری شده در ۷ مورد اختلاف معنی دار ($P \leq 0.5$) مشاهده گردید.

در ارزیابی مولکولی با استفاده از پرایمرهای مایکروستلایت در مجموع ۴۰۰ نمونه DNA از ماهیان شاهد و هیبرید مورد مطالعه قرر گرفت که در این میان ۳۶۳ ال در بین ماهیان شاهد و ۴۲۱ ال در نمونه های هیبرید و

در مجموع ۷۸۴ الل شمارش گردید. در این بررسی ۱۹ الل با اندازه های متفاوت در هیبریدها ظاهر شدند که کمترین اندازه اللی (۱۲۰ جفت باز) در پرایمر AOX27 و بیشترین اندازه اللی (۴۰۰ جفت باز) در پرایمر AFUG229 ظاهر شدند و همین طور در بین کلیه پرایمرها، پرایمر AFUG160 و AFUG195 با دو الل و پرایمر AFUG68b با ۷ الل متفاوت کمترین و بیشترین تعداد الل را دارا بودند.

الگوی باندها در ۶۶ جایگاه نمونه های شاهد و ۶۵ جایگاه نمونه های هیبرید مونوپلوئید، در ۷۷ جایگاه نمونه های شاهد و ۷۳ جایگاه نمونه های هیبرید دیپلوئید، در ۳۱ جایگاه نمونه های شاهد و ۳۹ جایگاه نمونه های هیبرید تریپلوئید، در ۹ جایگاه نمونه های شاهد و ۱۲ جایگاه نمونه های هیبرید تتراپلوئید، و در ۱ جایگاه نمونه های شاهد و ۳ جایگاه نمونه های هیبرید پنتاپلوئید و در ۸ جایگاه نمونه های شاهد و ۶ جایگاه نمونه های هیبرید مبهم بودند. از بین ۱۰ جفت پرایمر ۷ جفت پرایمر دیسومیک و ۳ پرایمر Afug241، Afug686 و Aox27 حالت تتراسومیک نشان داد و پرایمرهای Afug12، IS68، Afug160، Aox27، Afug63 و Aox27 توارث الل ها را بخوبی نشان داد که بیانگر کارآئی روش مایکروستلایت است.

ارزیابی جنسیت تاسماهیان در تیمارهای مختلف و همچنین مرحله رسیدگی جنسی گناد با استفاده از روش لاپراسکوپ نتایج نشان داد که از ۹ عدد تاسماهی ایرانی مورد بررسی، ۴ عدد تاسماهی ایرانی ماده و ۵ عدد تاسماهی ایرانی نر در مراحل رسیدگی جنسی ۲ و ۳ قرار داشتند. همچنین در بررسی ۸ عدد تاسماهی سبیری ۴ عدد تاسماهی سبیری ماده و ۴ عدد نر در مراحل رسیدگی جنسی ۲، ۳ و ۴ بودند. نتایج وضعیت گناد جنسی ۷ عدد دورگه تاسماهی ایرانی ماده و تاسماهی سبیری نر، تعداد ۵ عدد تاسماهی دورگه نر و ۲ عدد تاسماهی دورگه ماده در مراحل ۳ و ۴ رسیدگی جنسی را نشان داد. در بررسی ۱۰ عدد دورگه تاسماهی سبیری ماده و تاسماهی ایرانی نر، تعداد ۳ عدد تاسماهی دورگه ماده، ۶ عدد تاسماهی دورگه نر و ۱ عدد تاسماهی دورگه (گناد دفرمه) مشخص گردید.

در ارزیابی سیتوژنتیک ماهیان مورد بررسی بر اساس تعداد کروموزومهای شمارش شده در ۳۰ عدد پلاک متافازی انجام شده از ۶ ماهی مورد آزمایش مشخص گردید تعداد کروموزوم های ماهیان حاصل از تلاقی بین تاسماهی ایرانی و تاسماهی سبیری دارای $2n=250 \pm 10$ کروموزوم هستند که تمام ماهیان شاهد و دورگه ۲۴۰ عدد کروموزوم دارند و همانند والدین خود تتراپلوئید هستند.

در جمع بندی می توان اعلام نمود که این تحقیق موفق به معرفی دورگه جدیدی برای تولید گوشت و خاویار به صنعت آبرزی پروری شد و با توجه به اسامی علمی والدین استفاده شده جهت تولید دورگه تاسماهی سبیری ماده و تاسماهی ایرانی نردورگه فوق بنام (SiPer) نام گذاری می گردد که Si آن برگرفته از Siberian sturgeon و حروف Per برگرفته از Persian sturgeon میباشد.

کلمات کلیدی: دورگه، تاسماهی ایرانی، تاسماهی سبیری، (SiPer)، آبرزی پروری.