وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان:

بررسی اثر دماهای مختلف بر بیان ژن HSP 70 و بروز گونه‌های مختلف ویبریو در صدف محار (*Pinctada radiata*) در طول دوره نگهداری

مجری:
سجاد پورمظفر

شماره ثبت
٦٤٠٠٢

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان طرح/پروژه: بررسی اثر دماهای مختلف بر بیان ژن HSP 70 و بروز گونه‌های مختلف ویبریو در صدف محار (*Pinctada radiata*) در طول دوره نگهداری
کد مصوب: ۹۸۱۲۳٦-۰۳٤-۱۲-۷۵-۲٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: سجاد پورمظفر
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری: سجاد پورمظفر
نام و نام خانوادگی همکار(ان): حسین رامشی، شهرام صیدمرادی، سعیدتمدنی جهرمی، محسن گذری، سیامک بهزادی، رامین کریم زاده، ذبیح الله بهمنی، کیومرث روحانی قادیکلائی، عبدالرضا جهانبخشی، محمدرضا زاهدی، مریم معزی، فریبرز احتشامی، شاپور کاکولکی، محمدخلیل پذیر، مریم میربخش، رقیه خاوند، ابراهیم صفری
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): سیده لیلی محبی نوذر
نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -
محل اجرا: استان هرمزگان
تاریخ شروع: ۱۳۹۸/۱۰/۰۱
مدت اجرا: ۲ سال و ٦ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ۱٤۰۲
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 اثر دماهای مختلف بر بیان ژن HSP 70 و بروز گونه‌های مختلف ویبریو در صدف محار (*Pinctada radiata*) در طول دوره نگهداری

کد مصوب : ۹۸۱۲۳۶-۰۳۴-۱۲-۷۵-۲۴

شماره ثبت (فروست) : ۶۴۰۰۲ تاریخ : ۱۴۰۲/۵/۲۸

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سجاد پورمظفر دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته تکثیر و پرورش آبزیان است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان در تاریخ ۱۴۰۲/۵/۱۵ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ☐ پژوهشکده ■ مرکز ☐ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۲. صدف محار ۳
۱-۳. مشخصات صدف محار ۵
۱-۴. باکتری *Vibrio* ۶
۱-۴-۱-*Vibrio parahaemolyticus* ۷
۱-۴-۲. *Vibrio harveyi* ۸
۱-۴-۳. *Vibrio alginolyticus* ۹
۱-۴-۴. *Vibrio anguillarum* ۹
۱-۵. ژن HSP ۱۰
۱-۵-۱. ژن HSP 70 ..... ۱۱
۱-۶. ا. همیت و ضرورت انجام تحقیق ۱۱
۱-۷. فرضیه‌های تحقیق ۱۱
۱-۸. اهداف تحقیق ۱۲
۲-مروری بر مطالعات انجام شده ۱۳
۲-۱. مروری بر مطالعات انجام شده در ایران ۱۳
۲-۲. مروری بر مطالعات انجام شده در خارج از کشور ۱۴
۳-مواد و روش‌ها ۱۸
۳-۱. جمع‌آوری صدف ۱۸
۳-۲. بررسی بروز گونه‌های ویبریو ۲۰
۳-۲-۱. شناسایی باکتری‌ها ۲۰
۳-۲-۲. رنگ‌آمیزی گرم ۲۰
۳-۲-۳. بررسی فعالیت اکسیدازي ۲۱
۳-۲-۴. بررسی فعالیت کاتالازی ۲۱
۳-۲-۵. بررسی اکسیداسیون - تخمیر ۲۱
۳-۲-۶. بررسی توانایی تجزیه ژلاتین ۲۱

۳-۲-۷. بررسی توانایی مصرف سیترات ۲۱
۳-۲-۸. تست متیل رد (Methyl Red test) ۲۲
۳-۲-۹. تست وژپروسکوئر (Vegeprosquare test) ۲۲
۳-۲-۱۰. بررسی توانایی تولید آنزیم آرژنین دي هیدرولاز ۲۲
۳-۲-۱۱. بررسی توانایی تولید آنزیم لیزین دکربوکسیلاز ۲۲
۳-۲-۱۲. بررسی توانایی تولید آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز ۲۳
۳-۲-۱۳. بررسی مصرف منابع کربن ۲۳
۳-۲-۱۴. بررسی محدوده دمای رشد ۲۳
۳-۲-۱۵. بررسی توانایی رشد در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم ۲۳
۳-۲-۱۶. بررسی فعالیت اوره آزي (Urease activity test) ۲۴
۳-۲-۱۷. بررسی فعالیت نیترات ردوکتازي (Nitrate reductase test) ۲۴
۳-۲-۱۸. بررسی توانایی تولید آنزیم β گالاکتوزیداز ۲۴
۳-۲-۱۹. استخراج DNA ژنومیک به منظور شناسایی مولکولی ایزوله‌های باکتری‌هایی براساس تکنیک آنالیز توالی 16s rRNA ۲۵
۳-۲-۲۰. الکتروفورز جهت تائید صحت انجام عملیات استخراج DNA ۲۵
۳-۲-۲۱. تهیه بافر الکتروفورز (TBE (0.5X ۲۵
۳-۲-۲۲. تهیه ژل آگارز ۱% ۲۵
۳-۲-۲۳. نحوه انجام واکنش PCR به منظور تکثیر ژن 16s rRNA ۲۶
۳-۲-۲۴. انتخاب و تعیین آغازگرهای مناسب ۲۷
۳-۲-۲۵. برنامه PCR ۲۷
۳-۲-۲۶. الکتروفورز و مشاهده باند حاصل از تکثیر ژن 16s rRNA ۲۸
۳-۲-۲۷. تعیین توالی نوکلئوتیدی محصول PCR ۲۸
۳-۲-۲۸. تعیین بهترین تطابق‌ها ۲۹
۳-۲-۲۹. ترسیم درخت فیلوژنی و فاصله ژنتیکی ۲۹
۳-۳- سنجش بیان نسبی ژن HSP ۲۹
۳-۳-۱- نمونه‌برداری از بافت صدف ۲۹
۳-۳-۲- استخراج RNA ۳۰
۳-۳-۳- ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده ۳۱

۳-۳-۴- دستگاه ژل داک ۳۱
۳-۳-۵- ارزیابی کمی غلظت RNA ۳۲
۳-۳-۶- حذف DNA ۳۲
۳-۳-۷- سنتز cDNA ۳۲
۳-۳-۸- طراحی آغازگرها ۳۳
۳-۳-۹- انجام PCR برای تست cDNA و آغازگرها ۳۳
۳-۳-۱۰- Real time PCR ۳۴
۳-۳-۱۱- ارزیابی عملکرد آغازگرهای به‌کار رفته با استفاده از منحنی استاندارد ۳۴
۳-۳-۱۲- آنالیز داده‌ها ۳۴
۴-نتایج ۳۵
۴-۱. بیان ژن HSP 70 ..... ۳۵
۴-۲. نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی کلونی‌های ویبریو ۳۵
۴-۳. شناسایی ژنتیکی جدایه های ویبریو ۳۷
۴-۳-۱. استخراج DNA ۳۷
۴-۳-۲. تکثیر ژن 16S rRNA جدایه های ویبریو ۳۸
۴-۳-۳- آنالیز تطابق توالی ژن 16S rRNA جدایه های ویبریو ۳۹
۴-۴-بررسی تعداد کلونی‌های باکتری *Vibrio parahaemolyticus* ۴۰
۵-بحث ۴۲
۶- نتیجه‌گیری ۴۵
پیشنهادها ۴۶
منابع ۴۷
چکیده انگلیسی ۵۳

چکیده

صدف مروارید ساز محار (*Pinctada radiata*) به عنوان گونه غالب صدف مروارید ساز اقتصادی در خلیج‌فارس به خصوص در سواحل ایرانی به شمار می‌رود. صدف‌ها به دلیل خاصیت فیلترکنندگی میزبان بسیاری از عوامل بیماری‌زا می‌باشد که در صورت طبخ ناقص قادر به بیمار کردن انسان می‌باشد. اما متأسفانه تاکنون در ایران، مطالعه‌ای در خصوص شناسایی گونه‌های غالب ویبریو در صدف‌های پرورشی انجام نگرفته است. لذا هدف از این مطالعه، بررسی گونه‌های غالب ویبریو در این صدف و همچنین بیان ژن HSP70 در دماهای مختلف می‌باشد. برای این منظور، صدف‌ها پس از پرورش در محیط دریا و رسیدن به اندازه تجاری به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه، به منظور بررسی گونه‌های غالب ویبریو از گوشت آن‌ها نمونه‌برداری شد. سپس ۲۴۰ عدد صدف (هر تیمار ۶۰ عدد) با طول پشتی و شکمی ۰/۴۵ ± ۵/۳ سانتی‌متر به مدت ۳۰ روز در معرض دماهای ۲۲ (دمای محیط)، ۲۵، ۲۷ و ۲۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در پایان دوره نگهداری، نمونه‌برداری از صدف‌ها به منظور بررسی بیان ژن HSP 70 و شناسایی گونه‌های غالب ویبریو انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گونه‌های غالب ویبریو در این صدف *V. parahaemolyticus*، *V. rotiferianus*، *V. alginolyticus*، *V. hepatarius* و *V. harveyi* می‌باشد. بیان ژن HSP 70 در تیمار ۲۲ درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشت (P < ۰/۰۵). در حالی که در سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری میان تیمارها مشاهده نشد (P < ۰/۰۵). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که این صدف حاوی گونه‌های بیماری‌زا در آبزی پروری همچون *Vibrio parahaemolyticus*، *V. harveyi* ، *V. rotiferianus* و *V. alginolyticus* می‌باشد.

کلمات کلیدی: دما، صدف مهار، ویبریو، بیان ژن