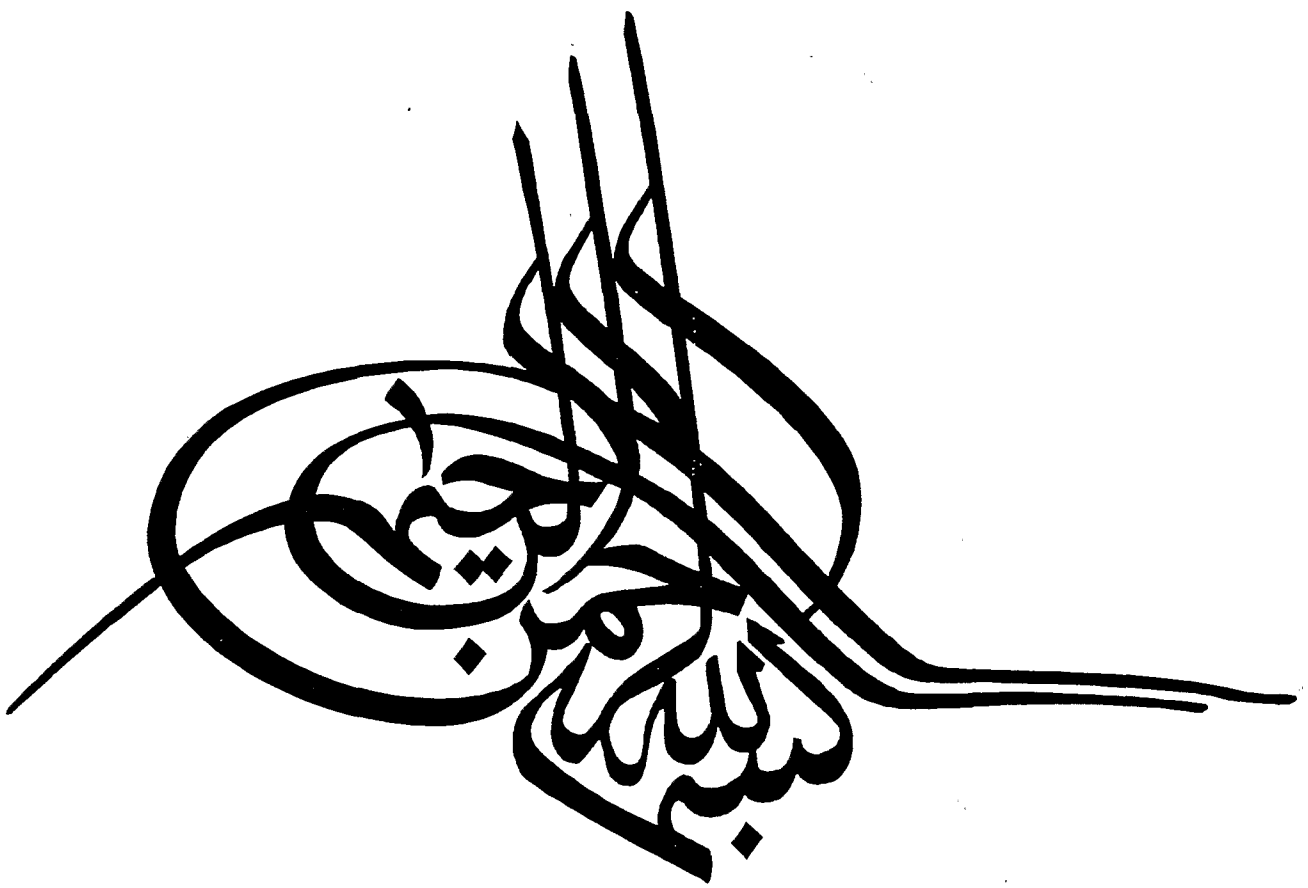
١١٥٠٧



٢٠٠١٧٥١ —— ١١٦٥٤٦

دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی نور
گروه شیلات

دوره دکتری
رشته مهندسی منابع طبیعی-شیلات
گرایش تکثیر و پرورش آبزیان

کلونینگ و توالی یابی ژن های هورمون آزاد کننده گنادوتروپین و بررسی اثر متیل جیوه بر میزان بیان آنها در بچه فیل ماهیان جوان (*Huso huso*)

نگارنده:
احمد قرایی

استادان راهنما:
دکتر عباس اسماعیلی ساری
دکتر فریدون مهبودی

۱۳۸۸/۶/ ۱۶
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

خردادماه ۱۳۸۸

۱۱۶۵۴۶

تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای احمد قرایی رساله ۲۴ واحدی خود را با عنوان : کلونینگ و توالی یابی ژن های هورمون آزاد کننده گنادوتروپین و بررسی اثر متیل جیوه بر میزان بیان آنها در بچه فیل ماهیان جوان *(Hoso huso)*

در تاریخ ۸۸/۳/۲۷ ارائه کردند.

اعضای هیأت داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آن را برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند./ک

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضا
۱- استاد راهنمای اصلی	دکتر عباس اسماعیلی	استاد	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر فریدون مهبودی	دانشیار	
۳- استاد مشاور اول	----------	----------	
۴- استاد ناظر	دکتر صابر خدابنده	استادیار	
۵- استاد ناظر	دکتر محمد رضا کلباسی	دانشیار	
۶- استاد ناظر	دکتر باقر مجازی امیری	استاد	
۷- استاد ناظر	دکترمجید صادقی زاده	دانشیار	
۸- استاد ناظر	دکترعبدالمحمد عابدیان	دانشیار	
۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر مسعود رضایی	دانشیار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه

تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر،رساله دکتری نگارنده **احمد قرایی** در رشته **شیلات – تکثیر و پرورش آبزیان** است که در سال **۱۳۸۸** در دانشکده **علوم دریایی و منابع طبیعی نور دانشگاه تربیت مدرس** به راهنمایی جناب آقایان **دکتر عباس اسماعیلی ساری و فریدون مهبودی** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **احمد قرایی** دانشجوی رشته **شیلات** مقطع **دکتری** تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی:**احمد قرایی**

تاریخ و امضا: ۱۳۸۸/۴/۱۰

تقدیم به خانواده و همسر عزیزم:

که سالی چند در آستانه رنج آلود قصه ای دراز به تماشا نشستند عشق را، اما، صبوری می بایست. جستند و کاویدند و جز رنج نخریدند. همانانکه صبورانه زیستنم آموختند.

رنجشان بی ثمر مباد.

به معلمانم:

که برگ برگ دفتر اندیشه ام از مرکب علم و جوهر ایثارشان زینت یافت.

و به دوستانم :

که کبوتر ذهنم به مدد از ایشان شوق پرواز گرفت.

برگ سبزیست تقدیم به:

آنان که آموختند

چگونه آموختن را...

خداوندگارا

ای آنکه بر پیدا و نهان ما آگاهی و ارتعاش اندیشه را در پرده های لطیف مغز می بینی، تو را به یگانگی و عظمت می شناسم و بر آستان شکوه و قدرت تو پیشانی بندگی بر خاک می سایم.

خودآفرینا

تو را می ستایم و از تو می خواهم بر دلم تابشی از فروغ رحمت بیکرانت بتابانی... بی تردید مجال این توفیق را نمی یافتیم اگر که فروغ یادش روشنگر راه و ذره ای از پرتو لطفش ما را همراه نبود و این همه را چگونه سپاس گوییم که ذره ذره وجودمان وامدارخواه رحمت چنین خداوندگاری است.

قدردانی:

با سپاس و تشکر فراوان از اساتید گرامی جناب آقای دکتر فریدون مهبودی و دکتر عباس اسماعیلی ساری که اگر اعتماد و باور لازم را در من بوجود نمی آوردند و راهنمای های ارزنده و منش علمی آنان نبود هرگز این رساله عملی نمی شد. همچنین نگارنده بر خود لازم می داند که از جناب آقای دکتر مهبودی به جهت مهیا کردن محیط مناسب و پشتیبانی مالی برای انجام آزمایشات مولکولی رساله مزبور در انستیتو پاستور ایران تشکر و قدردانی ویژه نماید.

و با سپاس و تشکر صمیمانه از:

جناب آقای دکتر بهروز وزیری که با صبر و حوصله بخش را طوری مدیریت نمودند که علاوه بر رفع مشکلات آزمایشگاهی باعث شدند تا روحیه همکاری جمعی و منش برخورد علمی نیز در پژوهشگران آن بخش نهادینه شود. از آقایان دکتر مجید صادقی زاده، کلباسی، عابدیان و خدابنده به جهت قبول زحمت داوری و توصیه های ارزشمندشان کمال تشکر و امتنان را دارد.

آقایان و خانمها: دکتر ولی ا... جعفری شموشکی، دکتر خلج، دکتر غفاری، دکتر اکرمی، دکتر مجیدزاده، دکتر عسگری، دکتر منصوری، کمالی، حقدوست، کرمی، عادلی، برخورداری، رزیتا عدالت، صبوری، اسماعیلی، گماری، شیروانی، رودباری، عامل، عقلایی، احمدی فرد، نادری، درودی، کیوان شکوه، حسینی، ناظری، امین زاده، کریم آبادی، پورشجاعی، جرجانی و خانلری بخاطر همراهی شان.

در خاتمه از کلیه اساتید و مدیر گروه شیلات، پرسنل و کارمندان دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی نور، کارگاه تکثیر و پرورش شهید مرجانی و انستیتو پاستور ایران به خاطر همکاری و مساعدتشان نهایت تشکر و قدردانی را دارد.

چکیده

مطالعه حاضر در پاییز سال ۱۳۸۵ در کارگاه تکثیر ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان با هدف بررسی اثرات جیوه آلی بر فاکتورهای زیستی ، میزان تجمع آن در بافتهای مختلف بدن (آبشش، روده، کبد، کلیه و گوشت) و تاثیر آن بر بیان ژنهای GnRH در مغز فیل ماهیان جوان انجام شد. بدین منظور بچه فیل ماهیان جوان با میانگین وزنی ۶±۸۶ گرم با چهار نوع جیره غذایی حاوی متیل جیوه در چهار گروه تیماری شامل: گروه شاهد با ۰/۰۴؛ گروه غلظت پایین با ۰/۷۶؛ گروه غلظت متوسط با ۷/۸ و گروه غلظت بالا با ۱۶/۲۲ میلی گرم متیل جیوه درکیلوگرم غذا طی ۷۰ روز تیمار شدند. نتایج مقایسه نرخ رشد نشان داد که در طی ۳۵ روز اول بین بچه فیل ماهیان گروه تیمار با غلظت بالا و در طی ۳۵ روز دوم بین بچه فیل ماهیان گروه تیمار با غلظت متوسط با گروه شاهد کاهش رشد معنی داری ($P<0.05$) وجود دارد. بررسی نرخ رشد ویژه نیز کاهش معنی داری ($P<0.05$) بین گروه تیمار با غلظت بالا در طی ۳۵ روز اول و گروه تیمار با غلظت متوسط نسبت به گروه شاهد در طی ۳۵ روز دوم را نشان داد. همچنین نتایج نشان دادند که میزان تجمع جیوه در تمامی بافتهای مورد بررسی با غلظت متیل جیوه و زمان در معرض قرارگیری ارتباط مستقیم دارد. در مرحله شناسایی، توالی یابی و کلونینگ ژنهای GnRH در فیل ماهی با استفاده از روش RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends) وجود دو فرم مولکولی mammalian GnRH (mGnRH) و chicken GnRH-II (cGnRH-II) به اثبات رسید که به ترتیب دارای ۲۷۳ و ۲۵۸ جفت باز طول و متشکل از ۹۱ و ۸۶ اسید آمینه بودند که به ترتیب با شماره های دستیابی EF534707 و EF534706 در بانک جهانی ژن ثبت گردیدند. سپس بررسی تغییرات بیان این ژنها در مغز تحت تاثیر متیل جیوه با استفاده از روش Real-time quantitative PCR طی ۳۲ روز نشان داد که در روز ۱۱ ام، میزان بیان این ژنها در گروه تیمار با غلظت بالا نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری داشته است ($P<0.05$). در روزهای ۱۸ و ۳۲ ام نیز میزان سطوح mRNA هر دو ژن در تمامی گروههای تیماری نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد ($P<0.05$). این نتایج نشان می دهد که متیل جیوه می تواند یکی از مختل کننده های نورواندوکرینی مهم باشد که ممکن است باعث ممانعت القای ژنهای GnRH از طریق اثر بر روی مسیر سیگنالی GnRH شده و محور هیپوتالاموسی_هیپوفیزی و رشد را تحت تاثیر قرار دهد.

کلید واژه: فاکتورهای زیستی، RACE-PCR، GnRH، بیان ژن، متیل جیوه، فیل ماهی، دریای خزر.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فهرست جدولها ..... د

فهرست نمودارها ..... ه

فهرست شکلها ..... و

فصل اول : مقدمه

۱-۱ مقدمه ۲

فصل دوم : کلیات

۲-۱ کلیات ۷

۲-۱-۱ ساختار، عملکرد و انواع GnRH در ماهیان ۷

۲-۲ آلودگی جیوه ۱۴

فصل سوم : مروری بر مطالعات انجام شده

۳-۱ مرور منابع ۱۸

فصل چهارم : مواد و روشها

۴-۱ تهیه بچه ماهی ۲۹

۴-۱-۱ تهیه غذا ۲۹

۴-۱-۲ روش تهیه غذا ۳۰

۴-۱-۳ غذادهی و نمونه برداری ۳۲

۴-۲ توالی یابی ژنهای GnRH ۳۵

۴-۲-۱ استخراج Total RNA ۳۵
۴-۲-۲ دستورالعمل استخراج RNA ۳۶
۴-۲-۳ روش RACE-PCR ۳۶
۴-۲-۳-۱ 3′-RACE-PCR ۳۸
۴-۲-۳-۲ استخراج DNA از ژل آگارز (Gel extraction) ۴۱
۴-۲-۳-۳ اتصال قطعات DNA (Ligation) ۴۲
۴-۲-۳-۴ آماده سازی سلولهای میزبان و انتقال پلاسمید (Transformation) ۴۲
۴-۲-۳-۵ Blue – White Screening ۴۳
۴-۲-۳-۶ انتقال پلاسمید (Transformation) ۴۴
۴-۲-۳-۷ استخراج پلاسمید ۴۴
۴-۲-۳-۸ تایید insert از طریق هضم آنزیمی (Digestion) ۴۵
۴-۲-۳-۹ تعیین توالی محصول کلون شده ۴۶
۴-۲-۴ 5′-RACE-PCR ۴۶
۴-۳ اندازه گیری میزان بیان ژنهای GnRH در مغز بچه فیل ماهیان ۵۱
۴-۳-۱ مراحل انجام اندازه گیری میزان بیان ژنهای GnRH ۵۱
۴-۳-۲ انجام واکنش Real time PCR ۵۳
۴-۳-۳ روش انجام واکنش Real time PCR ۵۴

فصل پنجم : نتایج و بحث

۵-۱ اثرات متیل جیوه خوراکی بر خصوصیات زیستی بچه فیل ماهیان ۵۹
۵-۲ شناسایی و توالی یابی ژنهای GnRH در فیل ماهی ۷۴
۵-۳ اندازه گیری بیان ژنهای GnRH در مغز بچه فیل ماهیان تحت تیمار ۹۱

نتیجه گیری کلی ۱۰۱
پیشنهادات ۱۰۳
منابع ۱۰۴

فهرست جدولها

عنوان **صفحه**

جدول ٤ -١: میزان مواد اولیه مورد مصرف در تهیه جیره غذایی ٣١

جدول ۴ -۲: توالی نوکلئوتیدی پرایمر های مورد استفاده در شناسایی ژنهای GnRH ۳۸

جدول ۴-۳: مواد و غلظت های مورد استفاده در سنتز cDNA ۳۹

جدول ۴ -۴: مواد و غلظت های مورد نیاز در 3′-RACE-PCR ۴۰

جدول ۴-۵: برنامه PCR برای تکثیر ناحیه ′3 ژنهای GnRH در فیل ماهی ۴۰

جدول ۴-۶: مواد و مقدار لازم برای انجام فرآیند Ligation ۴۲

جدول ۴-۷: مواد و غلظت های مورد نیاز در 5′-RACE-PCR ۴۷

جدول ۴-۸: برنامه PCR برای تکثیر ناحیه ′5 ژنهای GnRH در فیل ماهی ۴۸

جدول ۴-۹: نام گونه ها و شماره دستیابی ژن mGnRH آنها در بانک ژن ۴۹

جدول ۴-۱۰: نام گونه ها و شماره دستیابی ژن cGnRH-II آنها در بانک ژن ۴۹

جدول ۴-۱۱: مواد مصرفی و حجم استفاده شده در ساخت cDNA ۵۲

جدول ۴-۱۲: پرایمرهای مورد استفاده در اندازه گیری بیان ژنهای 18s rRNA، mGnRH ۵۶

جدول ۴-۱۳: مواد و مقادیر مورد نیاز در واکنش Real Time PCR ۵۶

جدول ۴-۱۴: برنامه دمایی ترموسایکلر برای انجام واکنش Real Time PCR ۵۶

جدول ۵-۱: مقایسه توالی اسید آمینه ای ژن پیش ساز mGnRH فیل ماهی ۸۱

جدول ۵-۲: مقایسه توالی اسید آمینه ای ژن پیش ساز cGnRH-II فیل ماهی ۸۲

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۵-۱: میزان مصرف غذا (ونیرو در روز) در گروههای مختلف تیماری ۶۰

نمودار ۵-۲: وزن بچه فیل ماهیهای گروههای مختلف طی روزهای صفر، ۳۵ و ۷۰..... ۶۱

نمودار ۵-۳: نرخ رشد ویژه (SGR) بچه فیل ماهیها طی ۳۵ روز اول و دوم ۶۲

نمودار ۵-۴: ضریب تبدیل خالص (CGE) در بچه فیل ماهیها طی مدت ۳۵ و ۷۰ روز ۶۳

نمودار ۵-۵: درصد آسیمیلاسیون متیل جیوه در گروههای تیماری مختلف ۶۴

نمودار ۵-۶: تجمع متیل جیوه در بچه فیل ماهیهای جوان طی زمان..... ۶۵

نمودار ۵-۷: رابطه بین میزان متیل جیوه جذب شده به ازای هر روز با غلظت آن ۶۵

نمودار ۵-۸: ارتباط بین میزان تجمع جیوه در بافت گوشت بچه فیل ماهیان با زمان ۶۹

نمودار ۵-۹: ارتباط بین میزان تجمع جیوه در بافت آبشش بچه فیل ماهیان با زمان..... ۷۰

نمودار ۵-۱۰: ارتباط بین میزان تجمع جیوه در بافت روده بچه فیل ماهیان با زمان..... ۷۰

نمودار ۵-۱۱: ارتباط بین میزان تجمع جیوه در بافت کلیه بچه فیل ماهیان با زمان..... ۷۱

نمودار ۵-۱۲: ارتباط بین میزان تجمع جیوه در بافت کبد بچه فیل ماهیان با زمان..... ۷۲

نمودار ۵-۱۳: منحنی استاندارد تکثیر cDNA مربوط به ژن mGnRH ۹۳

نمودار ۵-۱۴: منحنی استاندارد تکثیر cDNA مربوط به ژن cGnRH-II ۹۴

نمودار ۵-۱۵: منحنی استاندارد تکثیر cDNA مربوط به ژن 18s rRNA ۹۴

نمودار ۵-۱۶: تغییرات نسبی میزان بیان ژن mGnRH در مغز بچه فیل ماهی های تحت تیمار..... ۹۶

نمودار ۵-۱۷: تغییرات نسبی میزان بیان ژن cGnRH-II در مغز بچه فیل ماهی های تحت تیمار.. ۹۷

فهرست شکلها

عنوان **صفحه**

شکل ٤-١: خلاصه مراحل روش 3′–RACE-PCR ۴۱

شکل ٤-٢: ساختار وکتور پلاسمیدی pGEM Teasy و محل اثر آنزیم های محدودالاثر ۴۳

شکل ٤-٣: خلاصه نمایش مراحل 5′-RACE-PCR ۴۸

شکل ٤-٤: چیدمان ترادف های بدست آمده با دیگر موجودات در نرم افزار Mega ۵۰

شکل ٥-١: الکتروفورز Total RNA استخراج شده روی ژل آگارز۱/۵ درصد ۷۴

شکل ٥-٢: الکتروفورز محصولات 3′–RACE-PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد ۷۵

شکل ٥-٣: الکتروفورز محصولات هضم شده نواحی 3′–RACE-PCR ۷۶

شکل ٥-٤: الکتروفورز پلاسمیدهای هضم شده و غیر هضمی حاوی قطعه 5′-RACE-PCR ۷۷

شکل ٥-٥: توالی نوکلئوتیدی cDNA پیش ساز ژن mGnRH در مغز فیل ماهی و ترجمه توالی ۷۸

شکل ٥-٦: توالی نوکلئوتیدی cDNA پیش ساز ژن cGnRH-II در مغز فیل ماهی و ترجمه توالی ۷۹

شکل ٥-٧: ثبت توالی نوکلئوتیدی و ترجمه اسید آمینه ای ژن پیش ساز mGnRH ۸۰

شکل ٥-٨: ثبت توالی نوکلئوتیدی و ترجمه اسید آمینه ای ژن پیش ساز cGnRH-II ۸۰

شکل ٥-٩: منحنی دمای ذوب حاصل از آزمایش Real time PCR مربوط به ژن mGnRH ۸۳

شکل ٥-١٠: منحنی دمای ذوب حاصل از آزمایش Real time PCR مربوط به ژن cGnRH-II ۸۴

شکل ٥-١١: منحنی دمای ذوب حاصل از آزمایش Real time PCR مربوط به ژن 18s rRNA ۸۶

شکل ٥- ١٢: الگوی تکثیری حاصل از آزمایش Real time PCR مربوط به ژنهای mGnRH ۸۷

شکل ٥-١٣: چیدمان توالی اسید آمینه ای ژن پیش ساز mGnRH ۹۰

شکل ٥-١٤: چیدمان توالی اسید آمینه ای ژن پیش ساز cGnRH-II ۹۱

شکل ۵-۱۵: ساختارهای درختی فایلوژنتیک براساس توالی پیش ساز ژن cGnRH-II ۹۲

شکل ۵-۱۶: درخت فایلوژنتیک بین فیل ماهی و دیگر مهره داران براساس توالی نوکلئوتیدی..... ۹۲

شکل ۵-۱۷: توزیع انواع مختلف GnRH در بین مهره داران..... ۹۵

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

رشد و تولید مثل در ماهیان وابسته به فعالیت مشترک هورمونهای مختلف همراه با محور مغز- هیپوتالاموس- هیپوفیز- گنادی است. در این میان GnRH[1] ها فاکتورهای کلیدی محسوب می شوند که ترشح آنها توسط عوامل بیرونی یا محیطی (دما، دوره فتوپریود، شرایط فیزیکوشیمیایی آب و ...) و عوامل درونی (فعالیت های بازخوردی هورمونهای هیپوفیزی-گنادی و دیگر هورمونها) کنترل می شود (Evans, 1998). GnRH ها و GTH ها هورمونهایی هستند که در تنظیم عملکرد سیستم های تولید مثلی شرکت دارند. GnRH یک هورمون دکاپپتیدی است که ترشح و رهاسازی آن تابع سیکل های نوسانی[2] است و GnRH پس از اتصال به رسپتورهای خود در سطح سلولهای گنادوتروپ از طریق فعال کردن اینوزیل تری فسفات عمل می کند.

زمان ترشح هورمونهای GnRH در ماهیان از روزهای ابتدایی زندگی آنها به موازات توسعه و تکوین مغز به اثبات رسیده است (Gopinath et al., 2004; Wong et al., 2004). مطالعات حاکی از وجود مکانهای اختصاصی GnRH در محلهایی بجز هیپوفیز نظیر تخمدان، بیضه ها، مغز، کبد و کلیه ماهیها می باشد. با این وجود نقش فیزیولوژیک این مکانها هنوز ناشناخته باقی مانده است (Pati, Habibi and 1993). مطالعات اخیر بر روی شناسایی انواع فرمهای GnRH در ماهیان ثابت نموده است که در ماهیان حداقل دو فرم از GnRH وجود دارد که نوع cGnRH-II[3] در تمامی ماهیان استخوانی و غضروفی حضور دارد (Amano et al., 2002; Sherwood et al., 1993; Lethinonier et

[1] Gonadotropin-releasing hormone
[2] Circhoral pulses
[3] Chicken GnRH-II

.al., 2004; Lovejoy et al., 1992; Dubios et al., 2002)

فلزات سنگین در طبیعت و اثرات آنها بر موجودات زنده در سالهای اخیر به شدت مورد توجه محققین قرار گرفته است. جیوه یکی از این فلزات سنگین است که در حالت متیل جیوه[1] از حیث سمیت به مراتب بیش از جیوه معدنی (Hg^0 , Hg^+ , Hg^{+2}) مورد توجه است (Heath, 1995). چرا که جیوه معدنی حلالیت کمی در آب دارد و به سرعت جذب ذرات می شود یا کمپلکس تشکیل داده و در رسوبات ته نشین می شود (Watras and Huckabee, 1994). جیوه معدنی در محیط ها ی آبی در اثر متیله شدن توسط باکتریها در سطح رسوبات تبدیل به متیل جیوه بسیار سمی می شود و به زنجیره غذایی این محیط منتقل می شود. pH محیط، دما، پتانسیل احیا، قلیائیت و غلظت کربن آلی محلول (DOC)، اکسیژن، سولفات و کلسیم از عواملی هستند که در میزان متیلاسیون جیوه و قابلیت دسترسی به متیل جیوه توسط جانداران مؤثرند (Benes and Havlik, 1979; Carty and Malone, 1979; Choi et al., 1998).

در آبهای سراسر جهان حدود ۲۴۶۰۰ گونه ماهی وجود دارد (Helfman et al., 1977) که در بین آنها از نظر ارزش اقتصادی ماهیان خاویاری گرانترین و با ارزش ترین آنها محسوب می شوند. از نقطه نظر تنوع زیستی و ذخیره ژنی نیز ماهیان خاویاری در حقیقت جزو معدود فسیلهایی از آبزیان زنده محسوب می شوند که از میلیونها سال پیش تا کنون همچنان به صورتی دست نخورده به حیات خود ادامه می دهند و لذا اهمیت آنها از این جنبه نیز قابل توجه و حیاتی است. دریای خزر یکی از دریاچه های بزرگ در جهان است که توسط کشور های روسیه، قزاقستان، ترکمنستان، ایران و آذربایجان احاطه شده است و گونه های تجاری ماهیان خاویاری شامل فیل ماهی (*Huso huso*)، تاسماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) و ماهی ازون برون (*A. stellatus*) و تاسماهی ایرانی (*A. persicus*) که بومی این دریاچه محسوب می شوند. میزان صید ماهیان خاویاری در دریای آزوف و خزر که ۹۰ درصد از ذخائر جهانی را در خود جای داده اند در طی سالهای ۱۹۸۵-۱۹۷۰

[1] MeHg

حدودا ۲۵۰۰۰-۲۴۰۰۰ تن در هر سال بوده است که در سال ۱۹۹۹ به کمتر از ۲۰۰۰ تن رسید. این کاهش صید نتیجه صید بی رویه و تخریب محیط زیست آنها به دلیل احداث سدها در عرض رودخانه ها و آلودگی آب و رسوبات بواسطه آلاینده هایی است که باعث اختلال در مهاجرت و تولید مثل ماهیان خاویاری می شوند (Billard & Lecointre; 2001). در این میان به نظر می رسد آلودگی شیمیایی یکی از فاکتورهای مهم اثر گذار بر روی جمعیت ماهیان خاویاری در دریای خزر است. از آنجا که دریای خزر بسته بوده و خروجی ندارد، آلاینده های مختلف از قبیل تراوش سوختهای فسیلی از چاههای نفت و فاضلابهای حوزه رودخانه ها و منطقه شهری در دریای خزر تجمع یافته است. غلظت فلزات سنگین در آب رودخانه ولگا (که بیش از ۸۰ درصد کل جریان ورودی دریای خزر را تامین می کند) و رسوبات و موجودات کف زی آن به شدت افزایش پیدا کرده است (Karpinsky, 1992) و همچنین برخی از مطالعات، سطوح افزایش یافته از فلزات سنگین و علف کشهای ارگانوکلرین را در بعضی از ماهیان (Kajiwara et al., 1996; Watanabe & Tanabe, 2003) و فک های دریای خزر (Anan et al., 2002) گزارش نموده اند. اخیرا تحلیل رفتن بافت ماهیچه و توسعه غیر طبیعی گنادهای ماهیان خاویاری در دریای خزر مورد توجه قرار گرفته است که به دلیل افزایش یافتن میزان آلودگی در این دریاست (Khodorevskaya et al., 1997). لذا با توجه به مطالب فوق فرضیه ها و اهدافی که در انجام این تحقیق مد نظر بوده است، به شرح زیر می باشد:

فرضیه ها:

۱- توالی ژنی GnRH ها در فیل ماهی با یکدیگر متفاوتند و هر کدام توسط ژن های جداگانه ای کد می شوند.

۲- ژن های کد کننده GnRH در فیل ماهی قابل شناسایی و کلون کردن است.

۳- پپتید هایی که توسط GnRH mRNA های مختلف کد می شوند از لحاظ تعداد اسید آمینه با یکدیگر متفاوتند.

۴- بیان ژنهای GnRH در بچه ماهیان تحت تاثیر متیل جیوه تغییر می کند.

۵- میزان تجمع جیوه در بافتهای کلیه، کبد، آبشش، روده و گوشت بچه ماهیان تحت تیمار با میزان متیل جیوه رابطه مستقیم دارد.

اهداف:

۱- شناسایی اشکال مختلف GnRH در فیل ماهی

۲- کلونینگ ، توالی یابی و بررسی میزان GnRH mRNA ها در بچه فیل ماهیان

۳- شناسایی و توالی یابی اسید آمینه های کدشونده توسط GnRH mRNA های مختلف در فیل ماهی

۴- بررسی تغییرات میزان بیان GnRH mRNA ها در بچه فیل ماهیان در تیمار با غلظتهای مختلف متیل جیوه

۵- اندازه گیری انباشت جیوه در بافتهای کلیه، کبد، آبشش، روده و گوشت بچه ماهیان در طی مدت زمان تیمار