وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

عنوان:

امکان سنتز و ارزیابی سه آنالوگ LHRH در تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری با تاکید بر تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)

مجری:
مریم منصف شکری

شماره ثبت
٦٤٧٢٩

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

عنوان طرح/پروژه: امکان سنتز و ارزیابی سه آنالوگ LHRH در تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری با تاکید بر تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)
کد مصوب: ۹۸۰۰۶٤-۰۰۲-۱۲-۳۲-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: مریم منصف شکری
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری: مریم منصف شکری
نام و نام خانوادگی همکار(ان): ایوب یوسفی جوردهی، محمد پوردهقانی، علی حلاجیان، رضوان‌اله کاظمی، تورج سهرابی لنگرودی، محمد حسن‌زاده صابر، رضا قربانی واقعی، فاطمه طهوری، علیرضا شناور ماسوله، زهره رمضانپور طبالوندانی، ناهید بختیاری، سجاد قاسمیان، امین فرهبد رودبارکی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): محمود بهمنی
نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -
محل اجرا: استان گیلان
تاریخ شروع: ۱۳۹۸/۰٤/۰۱
مدت اجرا: ۳ سال و ۳ 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: امکان سنتز و ارزیابی سه آنالوگ LHRH در تکثیر مصنوعی ماهیان خاویاری با تاکید برتاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*)

کد مصوب : ٩٨٠٠٦٤-٠٠٢-١٢-٣٢-٢

شماره ثبت (فروست) : ٦٤٧٢٩ تاریخ : ١٤٠٢/١٠/٢٧

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم مریم منصف شکری دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته شیمی است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح‌نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان در تاریخ ۱۴۰۲/۸/۲۸ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ☐ پژوهشکده ☐ مرکز ■ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۱- مکانیسم‌های کنترل کننده تولید مثل ۲
۱-۱-۱- عوامل محیطی موثر بر تولید مثل ۲
۱-۱-۲- عوامل فیزیولوژیک موثر بر تولید مثل ۳
۱-۲-مراحل مختلف رسیدگی جنسی ۵
۱-۲-۱-رسیدگی جنسی تخمدان مرحله II ۵
۱-۲-۱-۱-مشاهدات ماکروسکوپی ۵
۱-۲-۱-۲ - مشاهدات میکروسکوپی (بافت‌شناسی) ۵
۱-۲-۲- رسیدگی جنسی بیضه مرحله II ٦
۱-۲-۲-۱ مشاهدات میکروسکوپی (بافت شناسی) ٦
۱-۲-۳ - رسیدگی جنسی تخمدان مرحله III ٦
۱-۲-۳-۱- مشاهدات ماکروسکوپی ٦
۱-۲-۳-۲ - مشاهدات میکروسکوپی (بافت‌شناسی) ٦
۱-۲-۴- رسیدگی جنسی بیضه مرحله III ۷
۱-۲-۴-۱- مشاهدات میکروسکوپی ۷
۱-۲-۵- رسیدگی جنسی تخمدان مرحله IV ۸
۱-۲-۵-۱ مشاهدات ماکروسکوپی ۸
۱-۲-۵-۲ مشاهدات میکروسکوپی ۸
۱-۲-۶ -رسیدگی جنسی بیضه مرحله IV ۸
۱-۲-۶-۱- مشاهدات ماکروسکوپی ۸
۱-۲-۶-۲ -مشاهدات میکروسکوپی ۹
۱-۳- شاخص‌های تولید مثلی ۱۰
۱-۳-۱ - هورمون‌های جنسی ۱۰
۱-۴- نارسایی‌های تولید مثلی در ماهیان پرورشی ۱۳
۱-۵- هورمون‌های مورد استفاده در تکثیر مصنوعی مولدین ۱۴

۱-۶- سوابق تحقیق در داخل و خارج از کشور ۱۷
۱-۶-۱- تحقیقات انجام شده در داخل کشور ۱۷
۱-۶-۲- تحقیقات انجام شده در خارج از کشور ۱۸
۱-۷- هدف پروژه ۲۲
۱-۸- فرضیه های تحقیق ۲۲
۲- مواد و روش ها ۲۳
۲-۱- مکان اجرای پروژه ۲۳
۲-۲- مواد و وسایل مورد نیاز سنتز پپتید ۲۳
۲-۳ - طراحی سنتز پپتید و تعیین گروه‌های محافظت کننده براساس نوع رزین و توالی ۲۵
۲-۴- سنتز پپتید ۲۶
۲-۴-۱ -بررسی استراتژی سنتز پپتید به روش فاز جامد ۲۶
۲-۴-۲ -آماده سازي رزين ۲۷
۲-۴-۳ - اتصال اولین آمینو اسید از سر اسیدی ۲۸
۲-۴-۴- مسدود کردن انتهاي بخش‌های فعال رزین عمل نکرده ۲۸
۲-۴-۵ -حذف محافظت Fmoc از سر آميني اسيدآمينه ۲۸
۲-۴-۶- روش عمومي تعيين فاكتور Fmoc ۲۸
۲-۴-۷- اتصال دومین اسید آمینه و سنتز Fmoc-Leu-Pro- O-resin ۲۹
۲-۴-۸ -تست كايزر ۲۹
۲-۴-۹- جدا كردن توالي پپتيد از سطح رزين ۳۰
۲-۴-۱۰-روش محافظت زدایی گروه‌های جانبی موجود در زنجیره پپتید ۳۱
۲-۵ -آمیده کردن توالی‌ها ۳۲
۲-۶- تخلیص پپتیدهای سنتز شده ۳۳
۲-۷- شناسایی پپتیدهای سنتز شده ۳۴
۲-۸ -محل اجرای فاز عملیاتی پروژه ۳۴
۲-۸-۱- زیست سنجی، تعیین جنسیت و پلاک‌گذاری مولدین ۳۴
۲-۸-۲ -تعداد مولدین مورد مطالعه ۳۴
۲-۸-۳ - نمونه‌برداری تخمک ۳۵

۲-۸-۴ -اندازه‌گیری شاخص قطبیت تخمک ۳۵
۲-۹ -تزریق هورمون‌های القایی ۳۶
۲-۹-۱- فاز اول (۱۳۹۸-۱۳۹۹) ۳۶
۲-۹-۲ -فاز دوم (۱۳۹۹-۱۴۰۰) ۳۷
۲-۹-۳ - فاز سوم (۱۴۰۱-۱۴۰۰) ۳۸
۲-۱۰- ارزیابی سطح هورمون‌های استروئیدی در خون ۳۹
۲-۱۱- تعیین میزان تحرک اسپرم ۳۹
۲-۱۲- شمارش اسپرم ۴۰
۲-۱۳- لقاح ۴۰
۲-۱۴- تعیین درصد لقاح تخم ها: ۴۱
۲-۱۵-آنالیز آماری داده‌ها ۴۲
۲-۱۶ - القاء تکثیر مصنوعی در مولدین سایر گونه‌های تاسماهیان ۴۲
۳-نتایج ۴۴
۳-۱-کروماتوگرافی جداسازی و تخلیص نمونه‌های پپتیدی ۴۴
۳-۲- شناسایی توالی‌های سنتز شده ۴۶
۳-۳- نتایج حاصل از بررسی فاکتورهای زیست‌سنجی ۴۷
۳-۴ -نتایج هورمون‌تراپی ۴۷
۳-۴-۱- نتایج هورمون تراپی فاز اول ٤٨
۳-۴-۲- نتایج هورمون‌تراپی فاز دوم ٤٩
۳-۴-۳ - نتایج هورمون‌تراپی فاز سوم ۵۰
۳-۵- سطح هورمون‌های جنسی در سرم مولدین ماده ۵۱
۳-۵-۱- تستوسترون ۵۱
۳-۵-۲- ۱۷- بتا استرادیول ۵۳
۳-۵-۳ -پروژسترون ٥٤
۳-۵-۴- ۱۷-هیدروکسی پروژسترون ۵۵
۳-۶ - نتایج تزریق تلفیق آنالوگ‌های سنتتیک هورمون LHRH و متوکلوپرامید ۵۶
۳-۷ - نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های تکثیر در مولدین نر ۵۶

۳-۸ - نتایج درصد لقاح و تفریخ تاسماهی استرلیاد ۵۷
۳-۹ - نتایج القاء تکثیر مصنوعی در دیگر گونه‌های تاسماهیان ۵۸
۴-بحث ۵۹
۴-۱ -پاسخ مولدین به هورمون‌تراپی ۵۹
۴-۲ -ارزیابی هورمون‌های جنسی ۶۱
۴-۳ - تزریق تلفیق آنالوگ های سنتتیک هورمون LHRH و متوکلوپرامید ۶۳
۴-۴- بررسی شاخص‌های تکثیر ۶۴
۵- نتیجه‌گیری نهایی ۶۵
پیشنهادها ۶۶
منابع ۶۷
چکیده انگلیسی ۷۲

چکیده

در این مطالعه سه آنالوگ هورمون LHRH با مروری بر منابع و با در نظر گرفتن نکات لازم برای پایداری ساختار پپتید ها سنتز شد. پس از اطمینان از خلوص و تایید توالی پپتید های سنتز شده، با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و طیف سنجی جرمی ارزیابی بیولوژیکی هورمون ها در *in vivo* انجام شد. جهت دستیابی به آنالوگ موثر و دوز بهینه آن، در این پژوهش طی سه سال متوالی تعداد ۱۷۴ قطعه مولد استرلیاد (شامل ۱۶۸ مولد ماده و ۶ مولد نر) بررسی شدند. بطوریکه در سال اول مطالعه (۱۳۹۹) ۴۸ مولد ماده،سال دوم مطالعه (۱۴۰۰) ۴۸ مواد ماده و سال سوم مطالعه (۱۴۰۱) ۷۲ عدد مولد ماده در صورت اندازه مناسب GV و ۶ عدد مولد نر از طریق تزریق یک مرحله ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که درصد جوابدهی مولدین طی سه سال متوالی در آنالوگ سنتتیک B و C از آنالوگ تجاری بیشتر می باشد. بطوریکه در سال سوم درصد جوابدهی آنالوگ B و C نسبت به نوع تجاری ۱۲/۵ درصد افزایش نشان داد. همچنین بررسی سطح هورمون های استروئیدی تاسماهی استرلیاد در فاز نهایی مطالعه نشان داد که مقادیر هورمون تستوسترون، ۱۷-بتا استرادیول، پروژسترون و ۱۷- آلفا هیدروکسی پروژسترون در تیمارهای مختلف مولدین ماده قبل از هورمون تراپی و بعد از اوولاسیون در گروه های مختلف تغییر معنی داری پیدا نکرد، تنها در گروهی که هورمون تجاری را دریافت کرده بودند هورمون تستوسترون بعد از اوولاسیون نسبت به قبل از هورمون تراپی افزایش معنی-داری نشان داد ($p<0.05$) . این در حالی است که مقایسه هورمون تستوسترون و پروژسترون همه مولدین اوولە شده نسبته به غیراوولە افزایش معنی داری نشان داده است ($p<0.05$). همچنین شاخص های ارزیابی تکثیر از جمله نرخ لقاح و نرخ تفریخ در این تیمار ها تغییر معنی داری نشان نداد. همچنین ارزیابی این سه آنالوگ در روی گونه های دیگر تاسماهیان نیز نتایج قابل قبولی را نسبت به هورمون های تجاری مرسوم نشان داد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، آنالوگ C و B با دوز ۳ میکروگرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن مولد، در القاء تکثیر مصنوعی در تاسماهی استرلیاد توصیه می‌شود.. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که مصرف آنتی دوپامین تاثیری بر میزان درصد جوابدهی در جنس ماده ندارد. با توجه به نتایج حاصل از بررسی این آنالوگ های در روی گونه های دیگر آنالوگ C به عنوان آنالوگی موثر برای تکثیر سایر گونه های تاسماهیان توصیه می شود.

کلمات کلیدی: تاسماهی استرلیاد ، سنتز پپتید، آنالوگ LHRH، هسته زایشی، درصد جوابدهی مولدین، تکثیر