Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 11:23 +0430 on Tuesday June 18th 2019

تولید ماهیان آکواریومی رنگی با فن‌آوری زیستی انتقال ژن

شیرین جمشیدی[۱*]، سمیرا ناظم‌رعایا[۲]، مریم منصف شکری[۳]

* s.jamshidi@abrii.ac.ir

۱- پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری شمال کشور، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات و ترویج و آموزش کشاورزی، رشت، ایران.

۲-پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

۳- موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران.

چکیده

در این مقاله سعی بر آن شده است تا در ابتدا اهمیت صنعت تولید ماهیان زینتی در دنیا و ایران مشخص گردد. به روش انتقال ژن اشاره می‌کند که توانایی تولید ماهیان آکواریومی با ویژگی‌های خاص را دارد. سپس انواع ژن‌ها و پیشبرهایی که ماهیان آکواریومی با رنگ‌های خاص را تولید می‌کنند مشخص می‌گردند. در نهایت ما پیشنهاد می‌کنیم که محققان از زیست‌فناوری انتقال ژن برای تولید ماهیان آکواریومی با ارزش زیبا و جذابتر بهره بگیرند، زیرا ماهیان آکواریومی برای مصرف خوراکی ندارند و پتانسیل تولید ماهیان زینتی با توجه به تنوع گونه ای ویژه و وجود مراکز تکثیر و پرورش در کشور ایران وجود دارد.

کلمات کلیدی: ماهیان زینتی، مهندسی ژنتیک، انتقال ژن، تراریخته.

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 11:23 +0430 on Tuesday June 18th 2019

مقدمه

اهمیت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی در ایران

در ایران آب‌های لب شور و شور دریا و آب‌های شیرین داخلی مثل رودخانه‌ها، دریاچه‌ها، جویبارها و قنات‌ها حاوی منابع عظیمی از آبزیان و ماهیان زینتی هستند. در خلیج فارس و دریای عمان گونه‌هایی از خانواده «شقایق ماهیان»[۱] وجود دارند که برای استفاده زینتی در آکواریوم آب شور مناسب می‌باشند. برخی از ماهیان آب‌های داخلی که برای نگهداری در آکواریوم مناسب هستند به عنوان «حیوان خانگی»[۲] مطرح می‌باشند. از این گروه می‌توان به راسته «کپور دندان‌داران»[۳] اشاره کرد. در سال‌های اخیر تجارت ماهیان آکواریومی رونق زیادی پیدا کرده است. براساس مطالعات انجام گرفته در ایران با تولید هر ۲۵ هزار قطعه ماهی زینتی می‌توان دست کم برای یک نفر اشتغال زایی ایجاد کرد (اکبری، ۱۳۹۴). در سال ۱۳۹۰ در ایران ۱۱۰ میلیون قطعه ماهی زینتی تولید و بر اساس آمار گمرک نزدیک به ۱۴/۵میلیون قطعه ماهی زینتی از مالزی، تایلند، اندونزی، سری‌لانکا، چین، کنیا، ترکیه، مالت و تایوان وارد شده است. تولید ماهیان زینتی، صنعتی نوپا در کشور است که با استقبال نیز مواجه شده و می‌تواند بستر مناسبی برای ایجاد اشتغال و فعالیت‌های اقتصادی باشد. از یک سو توانایی تکثیر نزدیک به ۷۰ گونه ماهی زینتی در ایران وجود دارد، از سویی دیگر می‌توان با تولید این ماهیان در داخل کشور و افزایش تمایل به خرید آن‌ها از راه زیباتر کردن و افزایش کیفیت نسبت به محصولات وارداتی، این بازار را در اختیار گرفت. همچنین علاوه بر استفاده از ماهیان آکواریومی در بازار داخل کشور، می‌توان با صادرات آن‌ها به کشورهای همسایه و حاشیه خلیج‌فارس، در اشتغال‌زایی و همچنین صرفه‌جویی ارزی تغییر ایجاد کرد. طبق آخرین گزارش سازمان خواروبار و کشاورزی (FAO)،[۴] کشور سنگاپور در سال ۲۰۰۹ با در دست داشتن سهم ۱۸/۴ درصدی از صادرات ماهیان زینتی، رتبه اول صادرکنندگان این موجودات زیبا را در اختیار دارد. از دیگر کشورهای مهم صادر کننده ماهیان زینتی می‌توان به کشورهای ژاپن، مالزی، جمهوری چک، سریلانکا، تایلند، ایالات متحده آمریکا، هلند، اندونزی و اسپانیا اشاره نمود. با وجود آنکه کشور ایران از یک سو امکانات مناسب و استعداد جغرافیایی برای پرورش ماهیان زینتی دارد و از سویی دیگر ماهیان آب‌های داخلی با قابلیت اهلی‌سازی و بهبود صفات ژنتیکی در اختیار دارد، اما متاسفانه از بازار ۲۰ میلیارد دلاری ماهیان آکواریومی در دنیا (ایسنا، ۱۳۹۳) هیچ سهمی را به‌خود اختصاص نداده است. لذا می‌توان روی صنعت پرورش آبزیان آکواریومی خصوصا ماهیان با صفات قابل توجه، مثل رنگ سرمایه‌گذاری کرد. تعداد زیادی از ماهیان آب‌های داخلی اهلی شده و به راحتی تکثیر و پرورش می‌شوند، اما این ماهیان صفات قابل توجه اندکی برای فروش دارند. بنابراین این امکان وجود دارد که با تغییر رنگ، بازارپسندی آنها را افزایش داد. برخی از گونه‌ها با تغذیه با برخی از جلبک‌ها و مواد غذایی خاص و هورمون تراپی تغییر رنگ می‌دهد (روزنامه جوان، ۱۳۹۱) که از طرف مشتری بیشتر مورد پسند واقع می‌شود و می‌توان این گونه را با قیمت‌هایی بسیار بالاتر به فروش رساند. این مواد همگی وارداتی هستند و برای خرید آنها ارز بسیاری از کشور خارج می‌شود. در صورت استفاده از تکنولوژی که بتواند به صورت ذاتی و ژنتیکی مهمترین خصوصیت بازارپسند بودن ماهی را افزایش دهد، می‌توان وابستگی به این مواد را کاهش داد و گونه یا گونه‌هایی را با ویژگی‌های خاص به بازار معرفی کرد.

ماهیان تراریخته تولید شده در دنیا

تنها تولید دو ماهی تراریخته تأییدیه سازمان غذا و دارو ایالات متحده (FDA)[۵] را گرفته است، که یکی از آنها برای تغذیه انسان از خانواده آزاد ماهیان به نام « Aqua Advantage Salmon» است و دیگری ماهی گورخری (زبرا فیش)[۶] است که با سازه حاوی ژن «پیشبر»[۷] پروتئین عضلات اسکلتی و ژن «گزارشگر»[۸] حاوی پروتئین‌های فلورسنس تراریخته شده است و با نام تجاری «GloFish» شناخته می‌شود. این ماهی مصرف خوراکی ندارد. با توجه به مواردی که ذکر شد این ماهی تراریخته از نظر زیبایی شناسی اهمیت زیادی دارد. اما

[۱] Pomacentridae
[۲] pet fish
[۳] cypriniodontiformes
[۴] Food and Agriculture Organization
[۵] Food and Drug Administration
[۶] *Danio rerio*
[۷] promoter
[۸] reporter

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 11:23 +0430 on Tuesday June 18th 2019

مهمتر آن است که این ماهی نشان‌دهنده مدل تولید شده توسط زیست فن‌آوری آبزیان است و مدل موفقی است که نشان دهنده تغییرات ژنتیکی صفتی است که در جانور ایجاد شده است. اولین بار ماهی زبرا تراریخته رنگی تولید شد، اما بعد از آن ماهیان آکواریومی دیگر مثل تترا از جنس (*Gymnocorymbus* sp.)، ماهی بارب ببری آکواریومی (*Puntius tetrazona*) و ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*) با استفاده از ژنهای مولد رنگ، تراریخته رنگی شده‌اند (Chen *et al*., 2015).

چگونگی تولید ماهی آکواریومی رنگی

برای تولید ماهی تراریخته رنگی از ژن پروتئین مولد رنگ سبز (GFP)[1] که اولین بار از ژله‌ماهی گرفته شده استفاده شده است. گفتنی است که نوع خاصی از (GFP) که بتوان با چشم غیرمسلح آن را دید وجود ندارد اما دیده شدن رنگ فلورسنس در عضلات اسکتی ماهی آکواریومی کاملا به قدرت فوق‌العاده پیشبر (عضله یا پوست) مربوط می‌باشد که می‌تواند این رنگ را به میزان سه تا پنج برابر در بافت عضله و یا پوست بیان کرده و مثل یک بیوراکتور عمل کند (Gong *et al*., 2003). تجاری کردن این گروه از ماهیان مشکل بوده است و یک گروه از دانشمندان در تایوان و سنگاپور مبادرت به تراریخته کردن ماهیان آکواریومی از سال ۱۹۹۵ کردند. اولین ایده برای تراریخته کردن ماهی زمانی قوت گرفت که از دو پیشبری فقط در بافت‌های ویژه بیان می‌شوند، استفاده شد. این دو پیشبر یکی در بافت پوست و دیگری در بافت عضله بیان می‌شوند.

برای اولین بارگروه سنگاپوری، پیشبری که فقط در بافت پوست بیان می‌شود را از ژن (keratin) و پیشبری که فقط در بافت عضله بیان می‌شود را از ژن (mylz2) جدا کردند. این گروه سپس این ژن‌ها را به عنوان پیشبر با ژن گزارشگر (GFP) در یک (سازه)[2] قرار داده و با موفقیت ماهی زبرا فیش فیش کایمر (جانداری که حاوی سلول هایی با ژنتیک متفاوت است) تولید کردند. پروتئین (GFP) در هر دو لاین تولید شده با دو پیشبر پوست و عضله دیده شد. لاین ماهی تراریخته‌ای که با پروتئین (GFP) به‌عنوان ژن گزارشگر و پیشبر ژن کراتین به‌وجود آمده رنگ سبز را تنها در لایه ای از پوست نشان می‌دهد (Gong *et al*., 2002)، اما لاینی از ماهی تراریخته که با پیشبر (mylz2) تولید شده بود علاوه بر نور ماورای بنفش با نور معمولی هم رنگ فلورسنس را در بافت عضله نشان داد (Ju *et al*., 2003). با استفاده از فن-آوری بیان ژن پیشبر در بافت خاص، دانشمندان موفق شدند تا ماهیانی تراریخته با رنگ هایی قرمز و زرد ایجاد کنند (Gong *et al*., 2003).

ماهی گورخری از اهمیت ویژه‌ای در مطالعات مدل زیست شناسی برخوردار است. این ماهی در خارج از بدن مادر به رشد جنینی خود ادامه داده و نور به راحتی از آن عبور می‌کند و کاملاً شفاف است که این موضوع این امکان را فراهم می‌سازد تا مطالعه رشد و نمو جنین راحت باشد. دوره تجدید نسل آن کوتاه و بین ۳-۲ ماه است که برای مطالعات ژنتیک کلاسیک مناسب است. از سال ۱۹۸۸ روی سازه‌هایی از DNA کار شده است که برای تراریخته کردن ماهی گورخری لازم می‌باشد. در همان سال برای اولین بار مشخص شد که درصورتیکه DNA به سیتوپلاسم تخم ماهی گورخری لقاح یافته تزریق شود، قابلیت به ارث رسیدن در جانور را دارد. در سال ۱۹۹۱، مشخص شد که تنها ۲۰ درصد از ژرم لاین توانسته بودند که DNA انتقال داده شده را در ژنوم خود بپذیرند. با وجود اینکه انتقال ژن در این سالها در ماهی گورخری موفقیت آمیز بوده است اما ناسازگاری و عدم بیان ژن‌ها از مشکلات قابل اشاره این فعالیت بوده است (Nusslein-Volhard and Dahm, 2002).

از اولین باری که از پروتئین (GFP) برای تولید ماهی تراریخته رنگی استفاده شده است تا سال ۲۰۱۴ دانشمندان تقریبا ۲۰۰ گونه از آبزیان را شناسایی کردند که دارای فلورسنس طبیعی می‌باشند. رنگ‌ها از موجودات دریایی گرفته می‌شوند و یا با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک تولید می‌شوند. ژن مولد رنگ اولین بار از ژله ماهی و موجودات دریایی استحصال شده و با استفاده از تکنیک مهندسی ژنتیک و تغییر اسید آمینه‌های پروتئین مولد ژن رنگ، طیف‌های بسیار متنوعی از رنگ برای استفاده در زیست فن‌آوری تولید ماهی زبرا با رنگ‌های متفاوت، ایجاد شده است. از منابع ژن‌های پروتئین‌های فلورسنس شامل GFP ژله ماهی (*Aequorea victoria*)، GFP بنفشه دریایی (*Renilla*

[1] Green fluoresce protein
[2] construct

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 11:23 +0430 on Tuesday June 18th 2019

reniformi)، dsRed (مولد رنگ قرمز) از مرجان قارچی (*Discosoma* sp.)، شقایق دریایی (*Entacmaea quadricolor*)، مرجان سنگی (*Montipora efflorescens*) و شقایق ونوس (*Anemonia sulcata*) را می‌توان برشمرد که حاوی رنگ های زیبایی می‌باشند (Chiang *et al*., 2014).

برای اینکه رنگ‌های متنوع بیشتری ایجاد گردد، چنانچه دو لاین ماهی گورخری حاوی پیشبر (mylz2) و پروتئین (GFP) و (RFP) با هم تلاقی داده شود، نسل حاصل رنگ نارنجی فلورسنس دارد. با مخلوط کردن عصاره استخراج شده عضله دو ماهی با عضلات فلورسنس قرمز و سبز، رنگ‌های فلورسنسی بینابینی از سبز، زرد، نارنجی تا قرمز دیده می‌شود (شکل ۱) (Wan *et al*., 2002). بنابراین هیچ محدودیتی از نظر تولید رنگ ماهی تراریخته وجود نخواهد داشت. می‌توان دو رنگ را با استفاده از پیشبرهایی که قدرت تولید رنگ فلورسنس متفاوتی دارند با نسبت‌های متفاوت با هم مخلوط کرد.

شکل۱: گورخرماهی تراریخته تولید شده با استفاده از ژن GFP، RFP و رنگ های تولید شده با استفاده از مهندسی ژنتیک و تغییر اسیدآمینه های پروتئین مولد ژن رنگ

در صنعت تولید ماهیان رنگی از پیشبرهای بسیار متنوع دیگری نیز استفاده شده است. یکی از آنها پیشبر ویروسی (sv40)[۱] یا (RSV)[۲] می‌باشد (شکل ۲) (Chen *et al*., 2015). از دیگر پیشبرهای مورد استفاده (xenopus elongation factor 1α) یا پروتئین (HSP)[۳] است. همچنین از ژن‌های گزارشگر متفاوتی استفاده شده است از آن جمله می‌توان به (lac Z) و (GFP) و کلرآمفینکل استیل ترانسفراز (CAT)[۴] اشاره کرد. از مشکلات استفاده از ژن‌های پیشبرهای دیگر غیر از خود جانور، عدم هماهنگی آن‌ها می‌باشد که باعث می‌شود بیان ژن انتقال داده شده به جانور به حالت (خاموش)[۵] یا حالت (متنوع)[۶] باشد یا اصلا بیان ژنی دیده نشود (Chen *et al*., 2015).

شکل۲: ماهی آکواریومی آنجل تولید شده توسط محققان تایوانی با استفاده از پیشبر ویروسی

با استفاده از این تکنولوژی در ماهی مداکا هم ژن‌های فلورسنس با رنگ‌های متفاوت کلون شدند که این ماهیان را با چشم غیرمسلح هم می‌توان دید. با انتقال ژن فلورسنس نوعی از مرجان‌های دریایی با پروموتر (mylz2)، لاینی از ماهی مدکا تراریخته ای را ایجاد شده است که رنگ سبز روشن تری دارد (شکل۳) (Zeng *et al*., 2005).

شکل۳: ماهی آکواریومی مداکا با استفاده از پیشبر mylz2

[۱] simian vacuolating virus 40 or simian virus 40
[۲] Rous sarcoma virus
[۳] heat shock protein
[۴] Chloramphenicol acetyltransferase
[۵] silent
[۶] variegated

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 11:23 +0430 on Tuesday June 18th 2019

سازه حاوی ژن پروموتر (mylz2) ماهی گورخری را همراه با ژن گزارشگر (RFP) به ماهی تترا (*Gymnocorymbus ternetzi*) در ژرم لاین هشت سلولی این ماهی انتقال داده شده اما میزان بیان به جهت اینکه انتقال سازه در زمان هشت سلولی انجام شده است به صورت پخش در بافت عضله بوده است (Pan *et al*., 2008). امروزه ماهی تترا و ماهی گورخری و ماهی بارب ببری (*Puntius tetrazona*) به شکل تراریخته تولید شده است.

در ماهی آکواریومی سیچلاید (*Archocentrus nigrofasciatus*) با استفاده از پیشبر ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) و ژن گزارشگر پروتئین فلورسنس قرمز مرجان تایوانی می‌توان در نسل F1 به ماهیان آکواریومی صورتی زیبای خوشرنگ دست یافت (شکل ۴) (Lin *et al*., 2014).

شکل ۴: ماهیان سیچلاید نسل F1 با رنگ قرمز تایوانی

چنانچه مشخص گردید، در خارج از کشور فعالیت‌های بسیاری در زمینه تراریخته کردن ماهی انجام شده است و مطالعات انتقال ژن در اواسط دهه هشتاد با استفاده از روش میکرواینجکشن آغاز شده است (Zhu *et al*., 1985). در ایران سابقه ای مبنی بر تولید ماهی تراریخته وجود ندارد و محصولی تولید نشده است. اما از آنجایی‌که در دهه اخیر دانش انتقال ژن در گیاهان در کشور ما بومی‌سازی شده است و امکان تهیه ماهی تراریخته نیز وجود دارد. همچنین از مطالعات صورت گرفته در سراسر دنیا چنین بر می‌آید که انتقال ژن‌های مختلف به ماهیان آکواریومی با موفقیت همراه بوده است. هرچند که استفاده از موجودات تراریخته در آبزی‌پروری بحث برانگیز است، اما کوتاه‌ترین و مؤثرترین راه برای ایجاد ماهیان با ویژگی‌های خاص مانند رنگ‌های خاص استفاده از روش انتقال ژن می‌باشد بنابراین با وجود بستر مناسب، به پژوهشگران توصیه می‌شود با توجه به اولویت‌های آبزی‌پروری بر شناسایی و امکان انتقال ژن‌های مختلف کارکردی در ماهیان آکواریومی تمرکز داشته باشند.

منابع

اکبری، ح.، ۱۳۹۴. آمارتولید ماهیان زینتی استان مرکزی. مدیر شیلات و امور آبزیان سازمان جهادکشاورزی استان مرکزی. ۱۲ ص.

ایسنا (خبرگزاری دانشجویان ایران)، ۲۲ دیماه ۱۳۹۳. تجارت ۲۰ میلیارد دلاری ماهیان زینتی در جهان. کد خبر ۹۳۱۰۲۲۱۲۱۴۱، (https://www.isna.ir).

روزنامه جوان (ضمیمه هفتگی جوانی)، ۹ دیماه ۱۳۹۱. کار من رنگ کردن است رنگی کردن ماهی‌ها (گفتگو با فرشاد کوشیار – جوان برگزیده استان قزوین و تولید کننده عمده ماهیان زینتی). شماره ۳۸۶۷. ۱۱ ص.

Chen, T.T., Lin, C.M., Chen, M.J., Lo, J.H., Chiou, P.P., Gong, H.Y., Wu, J.L., Chen, M.H.C. and Yarish, C., 2015. Transgenic Technology in Marine Organisms, in: S.-K. Kim (Ed.), Springer Handbook of Marine Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 387-412.

Chiang, C.Y., Chen, Y.L. and Tsai, H.J., 2014. Different visible colors and green fluorescence were obtained from the mutated purple chromoprotein isolated

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 11:23 +0430 on Tuesday June 18th 2019

characterization and promoter activity analysis of the tilapia (*Oreochromis niloticus*) myosin light chain 3 promoter in skeletal muscle of fish. Transgenic Research. 23, 125-134.

Nusslein-Volhard, C. and Dahm, R., 2002. Zebrafish. Oxford University Press, United States. 120 P.

Pan, X., Zhan, H. and Gong, Z., 2008. Ornamental expression of red fluorescent protein in transgenic founders of white skirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*). Mar. Biotechnol. 10, 497-501.

Wan, H., He, J., Ju, B., Yan, T., Lam, T.J. and Gong, Z., 2002. Generation of two-color transgenic zebrafish using the green and red fluorescent protein reporter genes gfp and rfp. Mar. Biotechnol. 4, 146-154.

Zeng, Z., Liu, X., Seebah, S. and Gong, Z., 2005. Faithful expression of living color reporter genes in transgenic medaka under two tissue-specific zebrafish promoters. Developmental Dynamics. 234, 387-392.

Zhu, Z., He, L. and Chen, S., 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). Journal of Applied Ichthyology. 1, 31-34.

from sea anemone. Mar. Biotechnol. 16, 436- 446.

Gong, Z., Ju, B., Wang, X., He, J., Wan, H., Sudha, P.M. and Yan, T., 2002. Green fluorescent protein expression in germ-line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from Keratin8. Developmental Dynamics. 223, 204-215.

Gong, Z., Wan, H., Tay, T.L., Wang, H., Chen, M. and Yan, T., 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. Biochemical and Biophysical Research Communications. 308, 58-63.

Ju, B., Chong, S.W., He, J., Wang, X., Xu, Y., Wan, H., Tong, Y., Yan, T., Korzh, V. and Gong, Z., 2003. Recapitulation of fast skeletal muscle development in zebrafish by transgenic expression of GFP under the mylz2 promoter. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. 227, 14-26.

Lin, Y.H., Peng, K.C., Pan, C.Y., Wen, Z.H. and Chen, J.Y., 2014. Expression

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 11:23 +0430 on Tuesday June 18th 2019

Producing colorful aquarium fish by gene transfer biotechnology

Jamshidi Sh.[1]*; Nazemroaya S.[2]; Monsef Shokri M.[3]

* s.jamshidi@abrii.ac.ir

1-ABRII North- Region Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Guilan, Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
2-Aquaculture Research Center-South of Iran. Iran Fisheries Science Research Institute. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahwaz, Iran
3-International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

Abstract

In this article, it tries to highlight the importance of the ornamental fish species industry in the world and Iran. It implicates the gene transfer method being able to produce aquarium fish species possessing special characteristics. Then, a variety of genes and promoters which can create colorful aquarium fish are defined. Finally, we recommend that researchers use the gene transfer biotechnology to produce worth and more attractive aquarium fish species because the ornamental fish are not for food purpose and the potential of producing ornamental fish is present due to species diversity and breeding center in Iran.

Keywords: Ornamental fish, Genetic engineering, Gene transfer, Transgenic.