

معرفی نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی و جداسازی سه گونه اقتصادی میگوی خلیج فارس و دریای عمان (*P.indicus* و *P. merguensis*, *Penaeus semisulcatus*) به روش PCR-RFLP

سهراب رضوانی

Rezvani@ifro.org

موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۰

چکیده

شش نمونه از هر یک از گونه‌های *P. merguensis*، *P. semisulcatus* و *P. indicus* از مناطق بوشهر و هرمزگان (خلیج فارس و دریای عمان) در سال ۱۳۷۹ با روش ترال کف جمع‌آوری گردید. DNA به روش فنل و کلروفرم استخراج شده و با استفاده از یک جفت پرایمر با توالی دو انتهای ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) میزان DNA هدف، به روش PCR تکثیر شدند و محصولات PCR با استفاده از ۹ آنزیم اندونوکلیتاز محدود کننده (restriction endonuclease enzymes) هضم آنزیمی شدند. ۷ آنزیم الگوهای پلی مورفیسم را در بین گونه‌های مورد مطالعه نشان دادند که از بین آنزیم‌های پلی مورفیک در این بررسی، سه آنزیم *HinfI* و *HincI*، *RsaI* را می‌توان بعنوان نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی این سه گونه از میگو معرفی نمود.

لغات کلیدی: نشانگرهای ژنتیکی، میگو، خلیج فارس، دریای عمان، ایران

مقدمه

امروز تلاشهای زیادی در جهت شناسایی و معرفی نشانگرهای ژنتیکی آبزیان در آزمایشگاههای مؤسسات تحقیقات در دنیا انجام می‌پذیرد و کشف و معرفی نشانگرها دارای کاربردهای وسیع در کشاورزی و از جمله در ماهیگیری و آبرزی پروری می‌باشد. گونه‌هایی از آبزیان، مانند برخی از ماهیان خاویاری که بعنوان گونه‌های در معرض خطر در سالهای اخیر مورد حمایت Cites قرار گرفته‌اند، از این طریق شناسایی می‌گردند و لذا معرفی نشانگرهای ژنتیکی گونه‌ها بلحاظ حفاظت آنها می‌تواند حائز اهمیت باشد (Rezvani Gilkolaci, 1997؛ Rob, 1996 و Keyvanfar, 1987). در این بررسی گونه‌های پراهمیت میگو شامل *P. nidicus*، *P. merguensis* و *P. semisulcatus* که در اقتصاد شیلاتی ایران نقش عمده‌ای دارند، مورد بررسی قرار گرفتند. تلاش برای یافتن نشانگرهای ژنتیکی برای تشخیص گونه‌ها می‌تواند کمکی در جهت حفاظت گونه‌های مذکور در شرایط بحرانی در آینده باشد و هم می‌تواند در حل اختلاف خریدار و فروشنده محصولات نیمه عمل آوری شده، از نظر گونه‌های میگو مؤثر باشد و کاربرد تشخیصی داشته باشد. مطالعات مشابه در سالهای اخیر روی اسکالوپها (Wilding et al., 1997)، لابستر (Ovenden et al., 1997) و آزاد ماهیان (Birmingham et al., 1991؛ Park et al., 1993) و بسیاری از سایر گونه‌های آبزیان صورت پذیرفته که کارایی بالایی برای تمایز گونه‌ها داشته‌اند. در مورد میگوهای جنس *Penaeus* که اهمیت اقتصادی و شیلاتی زیادی دارند، تحقیقات کمی صورت پذیرفته است، بطوری که تا سال ۱۹۹۸ با استفاده از روشهای مولکولی، تحقیقات فیلوژنتیک و جمعیتی روی آنها انجام می‌گرفت. نتایج این تحقیقات نشان می‌داد که تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها بسیار کم و ناچیز است. اما در بررسی‌هایی که Baldwind و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام دادند تعداد ۱۳ گونه از خانواده Penaeidae را با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) مورد بررسی فیلوژنتیک قرار دادند. این نتایج تنوع ژنتیکی زیادی را بین گونه‌ها نشان داد که مغایر با نتایج بدست آمده از الکتروفورز آلوزایم‌ها بود.

در این تحقیق، هدف معرفی نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی گونه‌های اصلی و اقتصادی

میگو در ذخایر خلیج فارس و دریای عمان است که تاکنون گزارشی از آن با استفاده از روش PCR-RFLP از این گونه‌ها وجود نداشته است.

مواد و روشها

نمونه برداری از هر سه گونه از مناطق بوشهر و هرمزگان (خلیج فارس و دریای عمان) انجام گرفت و از هر گونه ۶ نمونه برای انجام آزمایشات انتخاب شدند.

نمونه‌ها در الکل خالص نگهداری و برای انجام آزمایشهای مولکولی به انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری واقع در رشت منتقل گردیدند. DNA به روش فنل و کلروفرم (Hillis & Moritz, 1990) استخراج شد و با الکتروفورز افقی روی ژل آگارز و نیز دستگاه اسپکتوفتومتر مورد ارزیابی کمی و کیفی قرار گرفتند. پرایمرهای اختصاصی ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) موجود در آزمایشگاه برای تکثیر ژن مذکور (PCR) بوسیله دستگاه ترموسایکلر تحت شرایطی بر طبق گزارش رضوانی گیل کلائی و همکاران در سال ۱۳۸۰ مورد استفاده قرار گرفتند که پرایمرها دارای توالی 5' CACACATTATTAGCCAAGAATCT3' Forward و 3' GGTATTCCGTTAAGTCCTAAGA Reverse بودند. نمونه‌های تکثیر یافته ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) مستقر روی مولکول mtDNA در ژل آگارز ۱ درصد، برای ارزیابی کمی و کیفی، الکتروفورز شدند و ژل، با آتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و به کمک لامپ UV قابل مشاهده گردیدند.

محصول PCR گونه‌های مختلف، با آنزیم‌های اندونوکلاز محدود کننده (*HincII*, *HinfI*, *HpaII*, *DdeI*, *HindIII*, *PvuII*, *TaqI*, *RsaI*, *AluI*) هضم شده و حدود ۱۰٪ حجم محصول PCR، جهت الکتروفورز ژل پلی آکریل امید ۶ درصد مورد استفاده قرار گرفت. سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی و باندها مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنزیمهایی که از خود الگوهای متفاوت (پلی مورفیک) نشان دادند و آنزیم‌هایی که دارای الگوهای مشابه (نومورفیک) بودند کنار گذاشته شدند و الگوهای پلی مورفیک برای آنالیز، ثبت و نگهداری شدند.

نتایج

قسمتی از ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) واقع بر روی مولکول mtDNA بعد از PCR تکثیر شد که در نهایت اندازه محصول PCR حاصله در حدود ۵۵۰ جفت باز بوده است. از ۹ آنزیم اندونوکلاز بکار برده شده جهت هضم آنزیمی، ۷ آنزیم الگوهای متفاوت (پلی مورفیک) و بقیه الگوهای منومورفیک را در تمامی نمونه‌ها نشان دادند. نتایج هضم آنزیمی محصولات PCR از هر سه گونه میگو ناشی از ۹ آنزیم DNA در جدول شماره ۱ آمده است.

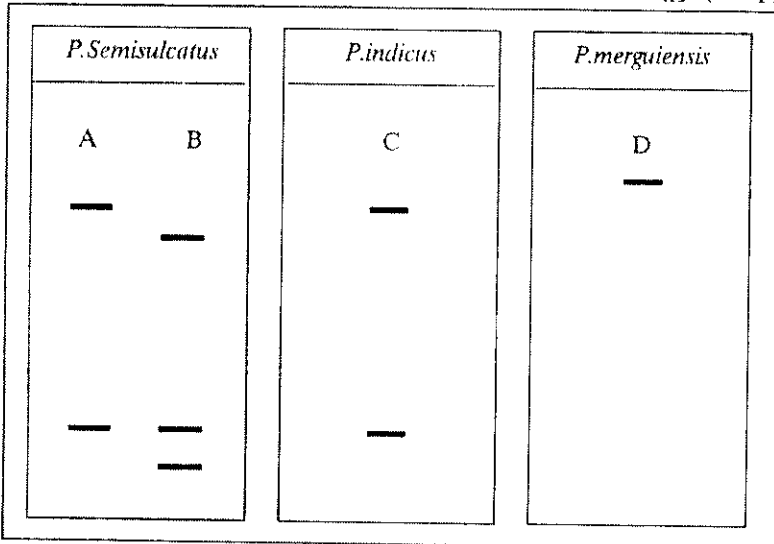
جدول ۱: ژنوتیپ سه گونه میگو ناشی از هضم با ۹ آنزیم اندونوکلاز محدود کننده

نام آنزیم	الگوهای ژنوتیپ	توزیع ژنوتیپ‌ها در گونه‌ها		
		<i>P. semisulcatus</i>	<i>P. merguensis</i>	<i>P. indicus</i>
<i>AluI</i>	(A,B,C)	A,B	A	C
<i>HinfI</i>	(A,B,C,D,E)	A,B,C	E	D
<i>HPAI</i>	(A,B)	A,B	A	B
<i>HincII</i>	(A,B,C,D)	A,B	D	C
<i>RsaI</i>	(A,B,C,D,E,F)	A,B,C,D	F	E
<i>DdeI</i>	(A,B,C)	A,B	B	C
<i>TagI</i>	(A,B)	A,B	B	A
<i>PvuII</i>	A	A	A	A
<i>HindIII</i>	A	A	A	A

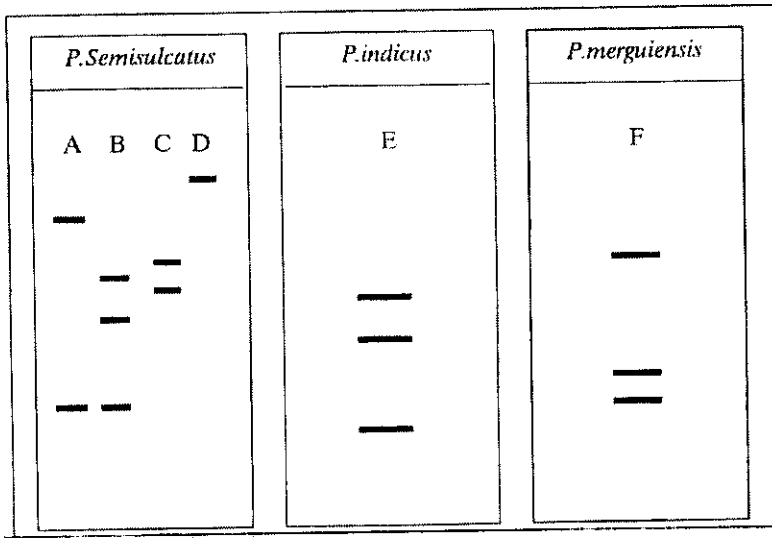
شکل شماره ۱ الگوهای هضم آنزیمی ژن سیتوکروم اکسیداز I با استفاده از آنزیم *HinfI* را نشان می‌دهد و شکل‌های ۲ و ۳ بر ترتیب معرف الگوهای هضمی در سه گونه میگوی مورد مطالعه با استفاده از آنزیم *HincII* و *RsaI* را بطور شماتیک می‌باشند.



شکل ۱: الگوی هضم آنزیمی ژن سیتوکروم اکسیداز I با استفاده از آنزیم *HinfI* (ستونهای ۱-۶ مربوط به میگوهای گونه *P. semisulcatus*، ستونهای ۷-۱۲ مربوط به گونه *P. indicus*، ستونهای ۱۳-۱۸ مربوط به گونه *P. merguensis* و ستون M مربوط به مارکر ۵۰ bp) می باشند.



شکل ۲: ژنوتیپهای حاصل از برش سیتوکروم اکسیداز I (COI) توسط آنزیم *HincII* در سه گونه *P. semisulcatus*، *P. indicus* و *P. merguensis*



شکل ۳: ژنوتیپهای حاصل از برش سیتوکروم اکسیداز I (COI) توسط آنزیم *RSAl* در سه گونه *P. semisulcatus*، *P. indicus* و *P. merguensis*

بحث

مشاهده می شود (جدول ۱) بر اثر هضم آنزیمی با *AluI* ژنوتیپ های A, B, C مشاهده شد که ژنوتیپ A را در دو گونه *P. semisulcatus* و *P. merguensis* و ژنوتیپ B را نیز در گونه *P. semisulcatus* و ژنوتیپ C را در *P. indicus* نشان داد که در این صورت با وجود ژنوتیپ B, C بطور اختصاصی بترتیب در گونه های *P. semisulcatus* و *P. indicus* بدلیل وجود ژنوتیپ A مشترک بین دو گونه *P. semisulcatus* و *P. merguensis* نمی تواند نشانگر مناسب قلمداد کرد. هر چند که این تفاوتها و شباهتها می تواند در بررسی فیلوژنتیک مورد استفاده قرار گیرد. بر اثر هضم آنزیمی با *HinfI* ژنوتیپ های A, B, C فقط در گونه *P. semisulcatus* و ژنوتیپ E فقط در گونه *P. merguensis* و ژنوتیپ D فقط در گونه *P. indicus* دیده می شود (شکل ۱) که این ژنوتیپها می توانند بعنوان نشانگر ژنتیکی برای تشخیص این گونه ها محسوب شوند. آنزیم *HpaII* اگر چه الگوهای A را در *P. merguensis* و B را در *P. indicus* نشان داده است

اما هر دو الگو را در گونه *P. semisulcatus* ظاهر کرد، لذا این آنزیم نمی تواند نشانگر ژنتیکی بین این سه گونه باشد.

آنزیم *HincII* دارای الگوهای C برای گونه *P. indicus* و D برای گونه *P. merguensis* و نیز دارای الگوهای A,B برای گونه *P. semisulcatus* می باشد که این آنزیم می تواند نشانگر ژنتیکی برای تمایز این سه گونه از میگو باشد.

آنزیم *RsaI* دارای الگوهای متنوعی برای گونه *P. semisulcatus* با ژنوتیپ های A,B,C,D می باشد، در حالیکه در گونه *P. indicus* تنها ژنوتیپ E و در گونه *P. semisulcatus* تنها ژنوتیپ F را نشان داده است.

لذا این آنزیم هم می تواند در بروز نشانگرهای ژنتیکی هر سه گونه و تمایز آنها از هم مفید باشد اما در عین حال بخاطر دارا بودن تنوع ژنوتیپ در گونه *P. semisulcatus* در مقایسه با سایر نشانگرها، دارای ارزش کمتری است.

اثر آنزیم *DdaI* روی گونه *P. indius* فقط ژنوتیپ C را نشان داده است، در حالیکه ژنوتیپ B در هر دو گونه *P. merguensis* و *P. semisulcatus* مشترک بوده است و ژنوتیپ A را همراه ژنوتیپ B در گونه *P. semisulcatus* نشان داده است.

لذا ژنوتیپ C نشانگر ژنتیکی گونه *P. indicus* است، اما ژنوتیپ A در گونه *P. semisulcatus* فقط دیده می شود، اگر چه ژنوتیپ B نیز مشابه *P. merguensis* در آن دیده می شود لذا این آنزیم بیشتر برای بررسی فایل ژنتیک اهمیت دارد و برای استفاده بعنوان نشانگر گونه ای دارای اهمیت کمتری است. آنزیم *TagI* به تنهایی قادر به تفکیک گونه نمی باشد، بدلیل اینکه گونه *P. semisulcatus* همواره یک ژنوتیپ مشترک را با دو گونه دیگر دارد.

خلاصه اینکه آنزیم های *HincII*, *HinfI* و *RsaI* با نشان دادن ژنوتیپ های اختصاصی هر یک از سه گونه قادر هستند گونه ها را از هم متمایز نمایند. الگوهای آنزیم ها برای سه گونه میگو در شکل های ۱، ۲ و ۳ آمده اند.

علاوه بر این سه آنزیم، سایر آنزیم‌ها یعنی *TagI*, *DdeI*, *HpaII*, *AluI* می‌تواند در بررسی فیلوژنتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند. وجود الگوهای ژنتیکی متنوع در گونه *P. semisulcatus* نشانه بروز جهش‌های زیاد در مقایسه با دو گونه دیگر است که نیاز به بررسی علل آن بیش از گذشته آشکار می‌شود. این بررسی نشان داد که روش PCR-RFLP مانند سایر بررسیها (Pourkazemi, 1996, 2000) و (Bartlett & Davidson, 1995) برای مطالعات سیستماتیک و بررسیهای جمعیت، روش مناسب و مفیدی می‌باشد و در این بررسی نشانگرهای ژنتیکی مناسبی برای سه گونه مورد بررسی کشف گردیده است. در خاتمه پیشنهاد می‌شود با استفاده از این روش سایر گونه‌های میگو و آبزبان از دو اکوسیستم خلیج فارس و دریای عمان از نظر فیلوژنتیک و جمعیتی مورد مطالعه قرار گیرند.

منابع

رضوانی گیل کلائی، س؛ سید علی بابایی، ع و پورکاظمی، م، ۱۳۸۰. بررسی مولکولی جمعیت میگوی *P. semisulcatus* از دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز (COI)I بروش PCR-RFLP. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۲، سال دهم، تابستان ۱۳۸۰. ۱۲ صفحه.

Balbwin, J.D. ; Bass, A.L. ; Bowen, B.W. and Clark, Jr. W.H. , 1998. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. Mol. Phylogen. Evo. Vol. 10, No.3, pp.399-407.

Bartlett, S.E. and Davidson, W .S. , 1995. Identification of (*Thunnus*) tuna species by polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 48, pp.309-317.

Bermingham, E. ; Forbes, S.S.H. ; Fridsland, K. and Pla, C. , 1991. Discrimination

between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North American and European origin using restriction analysis of mtDNA. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 48, No. 5, pp. 884-893

Hillis, D.M. and Moritz, C. , 1990. Molecular Taxonomy. Sinauer associates , Inc. Publishers. Massachusetts. U.S.A.

Keyvanfar, A. , 1987. Comparison of caviar protein in four species of anadrome sturgeons from the Caspian Sea by ultrathin layer isoelectric focusing. Compets rendus del academic des science. Serie 3. Sciences de lavie. Vol. 304, No. 9, pp.191-193 (infr).

Ovenden, J.R. ; Booth, J.D. and Smolensk, A.J. , 1997. Mitochondrial DNA phylogeny of red and green rock Lobsters (genus *Jasus*) Mar. Freshwater. Res. Vol. 48, pp.1131-1136.

Park, L.K. ; Brainard, M.A. and Winans, G.A. , 1993. Lowlevel of intraspecific variation in the mitochondrial DNA of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Mol. Mar. Biol. Biotechnol. Vol. 2, No.6, pp.362-370.

Pourkazemi, M. , 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. Ph.D. Thesis University of Wales Swansea. U.K. 260 P.

Pourkazemi, M. 2000. A preliminary study on phylogenetic relationship between five sturgeon species in the Iranian coastline of the Caspian Sea. Iranian J. of Fish. Sci. Vol. 2, No. 1, pp.1-12

Rezvani Gilkolaei, S. ,1997. Molecular pulation genetic studies of sturgeon species in

the South Caspian sea. Ph.D. Thesis, School of Biological Sciences University of Wales, Swansea. U.K. 196 P.

Rob, D. and Birstein, V.J. , 1996. PCR identification of black caviar. *Nature*. 381 (16 May), pp.197-198

Wilding, C.S. ; Beaumont, A.R. and Latchford, J.W. , 1997. Mitochondrial DNA variation in the scallop *Pecten maximus* (L.), assessed by a PCR-RFLP method. *Heredity*, Vol.79, pp.178-189.