معرفی نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی و جداسازی سه گونه اقتصادی میگوی خلیج فارس و دریای عمان (*P.indicus* و *P. merguiensis* ,*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. semisulcatus*، *P. merguiensis* 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 اندونوکلئاز 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 *HincI, RsaI* و *HinfI* 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 آبزی 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 Gilkolaei, 1997 ؛ Rob, 1996 و Keyvanfar, 1987). در این بررسی گونه‌های پراهمیت میگو شامل *P. nidicus* ، *P. merguiensis* 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 عمل‌آوری 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 (Bermingham *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

نمونه‌برداری از هر سه گونه از مناطق بوشهر و هرمزگان (خلیج فارس و دریای عمان) انجام گرفت و از هر گونه ٦ 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 گیل‌کلائی و همکاران در سال ۱۳۸۰ مورد استفاده قرار گرفتند که پرایمرها دارای توالی 5´CACACATTATTAGCCAAGAATCT3´ Forward و 5´GGTATTCCGTTAAGTCCTAAGA 3´ 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 رنگ‌آمیزی و به کمک لامپ UV قابل مشاهده گردیدند.

محصول PCR گونه‌های مختلف، با آنزیم‌های اندونوکلئاز محدود کننده *(HincII ,HinfI ,HpaII ,DdeI ,HindIII ,PvuII ,TaqI ,RsaI ,AluI)* هضم شده و حدود $\frac{1}{10}$ حجم محصول PCR، جهت الکتروفورز ژل پلی آکریل امید ٦ درصد مورد استفاده قرار گرفت. سپس با نیترات نقره رنگ‌آمیزی و باندها مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنزیمهایی که از خود الگوهای متفاوت (پلی‌مورفیک) نشان دادند و آنزیم‌هائیکه دارای الگوهای مشابه (منومورفیک) بودند کنار گذاشته شدند و الگوهای پلی‌مورفیک برای آنالیز، ثبت و نگهداری شدند.

نتایج

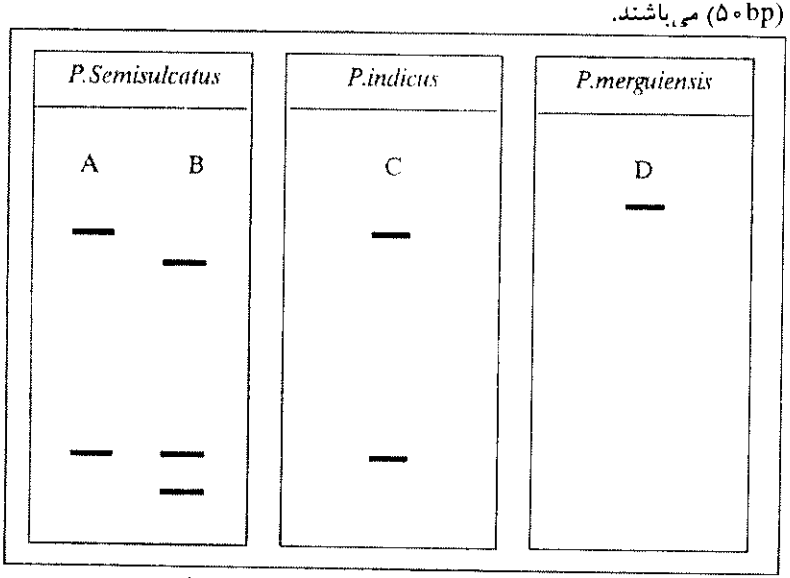
قسمتی از ژن سیتوکروم اکسیداز I(COI) واقع بر روی مولکول mtDNA بعد از PCR تکثیر شد که در نهایت اندازهٔ محصول PCR حاصله در حدود ۵۵۰ جفت باز بوده است. از ۹ آنزیم اندونوکلئاز بکار برده شده جهت هضم آنزیمی، ۷ آنزیم الگوهای متفاوت (پلی مورفیک) و بقیه الگوهای منومورفیک را در تمامی نمونه‌ها نشان دادند. نتایج هضم 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 اندونوکلئاز محدود کننده

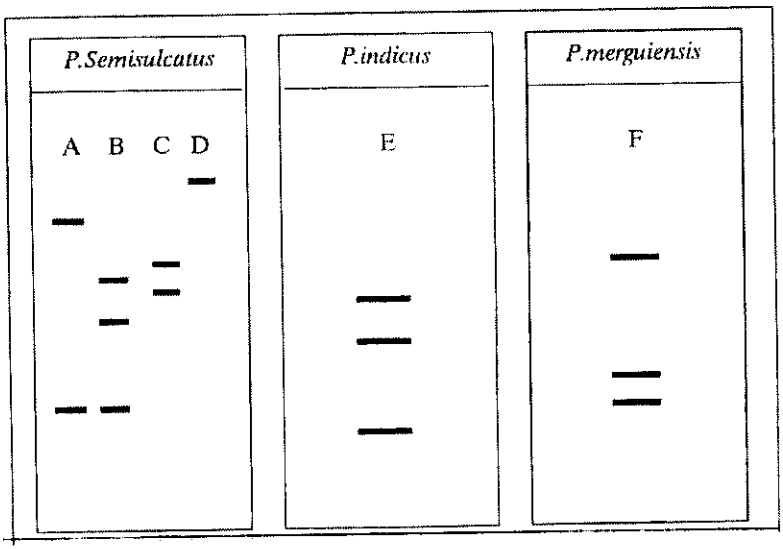
نام آنزیم	الگوهای ژنوتیپ	توزیع ژنوتیپ‌ها در گونه‌ها		
		P. semisulcatus	*P. merguiensis*	*P. indicus*
AluI	(A,B,C)	A,B	A	C
HinfI	(A,B,C,D,E)	A,B,C	E	D
HPAII	(A,B)	A,B	A	B
HincII	(A,B,C,D)	A,B	D	C
RsaI	(A,B,C,D,E,F)	A,B,C,D	F	E
DdeI	(A,B,C)	A,B	B	C
TagI	(A,B)	A,B	B	A
PvuII	A	A	A	A
HindIII	A	A	A	A

شکل شماره ۱ الگوهای هضم آنزیمی ژن سیتوکروم اکسیداز I با استفاده از آنزیم *HinfI* را نشان می‌دهد و شکلهای ۲ و ۳ بترتیب 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 ۶-۱ مربوط به میگوهای گونهٔ *P. semisulcatus*، ستونهای ۱۲-۷ مربوط به گونهٔ *P. indicus*، ستونهای ۱۸-۱۳ مربوط به گونهٔ *P. merguiensis* و ستون M مربوط به مارکر (۵۰bp) می‌باشند.



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



شکل ۳ : ژئوتیپهای حاصل از برش سیتوکروم اکسیداز I (COI) توسط آنزیم *RSAI* در سه گونهٔ *P. semisulcatus*، *P. indicus* و *P. merguiensis*

بحث

مشاهده می‌شود (جدول ۱) بر اثر هضم آنزیمی با *AluI* ژنوتیپ‌های A,B,C مشاهده شد که ژنوتیپ A را در دو گونه *P. semisulcatus* و *P. merguiensis* 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 C,B بطور اختصاصی بترتیب در گونه‌های *P. semisulcatus* و *P. indicus* بدلیل وجود ژنوتیپ A مشترک بین دو گونه *P. merguiensis* و *P. semisulcatus* نمی‌تواند نشانگر مناسب قلمداد کرد.

هر چند که این تفاوتها و شباهتها می‌تواند در بررسی فایلوژنتیک مورد استفاده قرار گیرد. بر اثر هضم آنزیمی با *HinfI* ژنوتیپهای A,B,C فقط در گونهٔ *P. semisulcatus* و ژنوتیپ E فقط در گونهٔ *P. merguiensis* و ژنوتیپ D فقط در گونهٔ *P. indicus* دیده می‌شود (شکل ۱) که این ژنوتیپها می‌توانند بعنوان نشانگر ژنتیکی برای تشخیص این گونه‌ها محسوب شوند.

آنزیم *HpaII* اگر چه الگوهای A را در *P. merguiensis* و B را در *P. indius* نشان داده است

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

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

آنزیم *RsaI* دارای الگوهای متنوعی برای گونه *P. semisulcatus* با ژنوتیپ‌های A,B,C,D می‌باشد، 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 می‌تواند 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. merguiensis* و *P. semisulcatus* مشترک بوده است و ژنوتیپ A را همراه ژنوتیپ B در گونهٔ *P. semisulcatus* نشان داده است.

لذا ژنوتیپ C نشانگر ژنتیکی گونه *P. indicus* است، اما ژنوتیپ A در گونه *P. semisulcatus* فقط دیده می‌شود، اگر چه ژنوتیپ B نیز مشابه *P. merguiensis* در آن دیده می‌شود لذا این آنزیم بیشتر برای بررسی فایلوژنتیک اهمیت دارد و برای استفاده بعنوان نشانگر گونه‌ای دارای اهمیت کمتری است. آنزیم *TagI* به تنهایی قادر به تفکیک گونه نمی‌باشد، بدلیل اینکه گونه *P. semisulcatus* همواره یک ژنوتیپ مشترک را با دو گونه دیگر دارد.

خلاصه اینکه آنزیم‌های *HinfI*, *HincII* و *RsaI* با نشان دادن ژنوتیپ‌های اختصاصی هر یک از سه گونه قادر هستند گونه‌ها را از هم متمایز نمایند. الگوهای آنزیم‌ها برای سه گونه میگو در شکلهای ۱، ۲ و ۳ آمده‌اند.

علاوه براین سه آنزیم، سایر آنزیم‌ها یعنی *AluI, HpaII, DdeI, TaqI* می‌تواند در بررسی فیلوژنتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند. وجود الگوهای ژنتیکی متنوع در گونه *P. semisulcatus* نشانهٔ 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 آبزیان 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 I(COI) 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. ; Frisdland, 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 intraspescific 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.

Roh, D. and Birestein, 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.

Introducing of Genetic Indicators for Identification of three Commercial Shrimps from Persian Gulf and Oman Sea by Using PCR-RFLP Analysis

Rezvani Gilkolaei S.
Rezvani@ifro.org
I.F.R.O. P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran
Received: July 2001 Accepted : February 2002

Key words : Shrimp, PCR, Persian Gulf, Oman Sea, Iran

ABSTRACT

Some bottom trawls were carried out in the Persian Gulf and Oman Sea (Hormozgan and Bushehr provinces) regarding to study the main three commercial species shrimp, namely: *Penaeus indicus*, *P. merguiensis* and *P. semisulcatus*.

Six samples of each species were collected for further examinations. Total DNA of each sample was extracted using the phenol and chlorophorm method.

mtDNA was ampliphied by using a pair of primers from sequencing of two ends of Cytocrom Oxydase unit I. The PCR products were digested using nine restriction endonuclease enzyme. Seven enzymes showed polymorphic patterns among different species, and 3 enzymes of *HinfI*, *HincI* and *RsaI* were recongnized as genetic markers for species indentification of shrimps.