دانشگاه ملایر

دومین همایش ملی علوم و فناوری های نوین در آبزیان

دانشگاه ملایر ، دانشکده منابع طبیعی ومحیط زیست، گروه شیلات

۴خرداد ماه ۱۳۹۶

« گواهی ارائه مقاله »

بدین وسیله گواهی می شود، مقاله با عنوان :

بررسی تنوع ژنتیکی سه جمعیت از قزل آلای رنگین کمان

(*oncorhynchus mykiss*) با استفاده از توالی یابی mt-DNA

توسط نویسندگان:

تقی عبدالله، علی جوادمنش، امید صفری، محمد رضا نصیری

در دومین همایش ملی علوم و فناوری های نوین در آبزیان به صورت**پوستری** ارائه شده است.

دبیر علمی همایش

دکتر لیماطیبی

بررسی تنوع ژنتیکی سه جمعیت از قزل آلای رنگین کمان (*oncorhynchus mykiss*) با استفاده از توالی یابی mt-DNA

تقی عبدالله [۱]، علی جوادمنش [۲*]، امید صفری [۳]، محمد رضا نصیری [۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

پست الکترونیک: hatabab@yahoo.com

[۲*] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

پست الکترونیک: javadmanesh@um.ac.ir *نویسنده مسئول

[۳] امید صفری، استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد

پست الکترونیک: omidsafari@um.ac.ir

[۴] محمد رضا نصیری، استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

پست الکترونیک: nassiryr@gmail.com

چکیده

قزل آلای رنگین کمان دارای اهمیت اقتصادی بالای در پرورش ماهی ایران است. با توجه به دامنه وسیع پرورش کشت این ماهی در واحدهای پرورش، ظرفیت مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی سه جمعیت مختلف قزل آلای رنگین کمان ایجاد شده است. در این مطالعه، با بررسی DNA میتوکندری، تنوع ژنتیکی سه جمعیت مختلف قزل آلای رنگین کمان حاضر در مزرعه پرورش ماهی کلات نادری (اهلی ایران، فرانسه و دانمارکی) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور قطعه ای ۶۲۵ جفت بازی از ژن سیتوکروم اکسیداز زیرواحد C، با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز تکثیر و سپس نمونه ها توالی یابی دو طرفه شدند.پس از مقایسه توالی ها، نتایج این تحقیق نشان داد که هیچ تنوع ژنتیکی بین سه جمعیت حاضر در این مزرعه از لحاظ ژن سیتوکروم اکسیداز وجود ندارد. لذا نیاز است جهت ایجاد تنوع از برنامه های اصلاحی مناسب استفاده کرد.

کلمات کلیدی ماهی قزل آلا، واکنش زنجیره ای پلیمراز، mt-DNA، درخت فیلوژنتیکی.

مقدمه

پرورش صنعتی ماهی قزل آلای رنگین کمان در آب های ایران از سال های ۱۹۶۵-۱۹۶۷ شروع شد. در این سال‌ها شرکت ماهیسرای کرج تخم های چشم زده قزل آلای رنگین کمان را وارد کشور نمود و باعث توسعه این صنعت شد (Yadollah Mehrabi, 2002). بعد از آن شرکت های دیگر، تخم‌های چشم زده و سرخ را از کشورهای اروپایی وارد کشور کردند (Iran fisheries org, 2011). سپس ماهیان بالغ رشد داده شدند و شروع به تولیبد مثل کردند (Shamspor et al,2012). پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان در مزارع آب شیرین سرد به دلیل سازگاری اختیاری، نرخ رشد بالا، تخم ریزی آسان و طیف گسترده ای از تغذیه ترجیح داده شد.

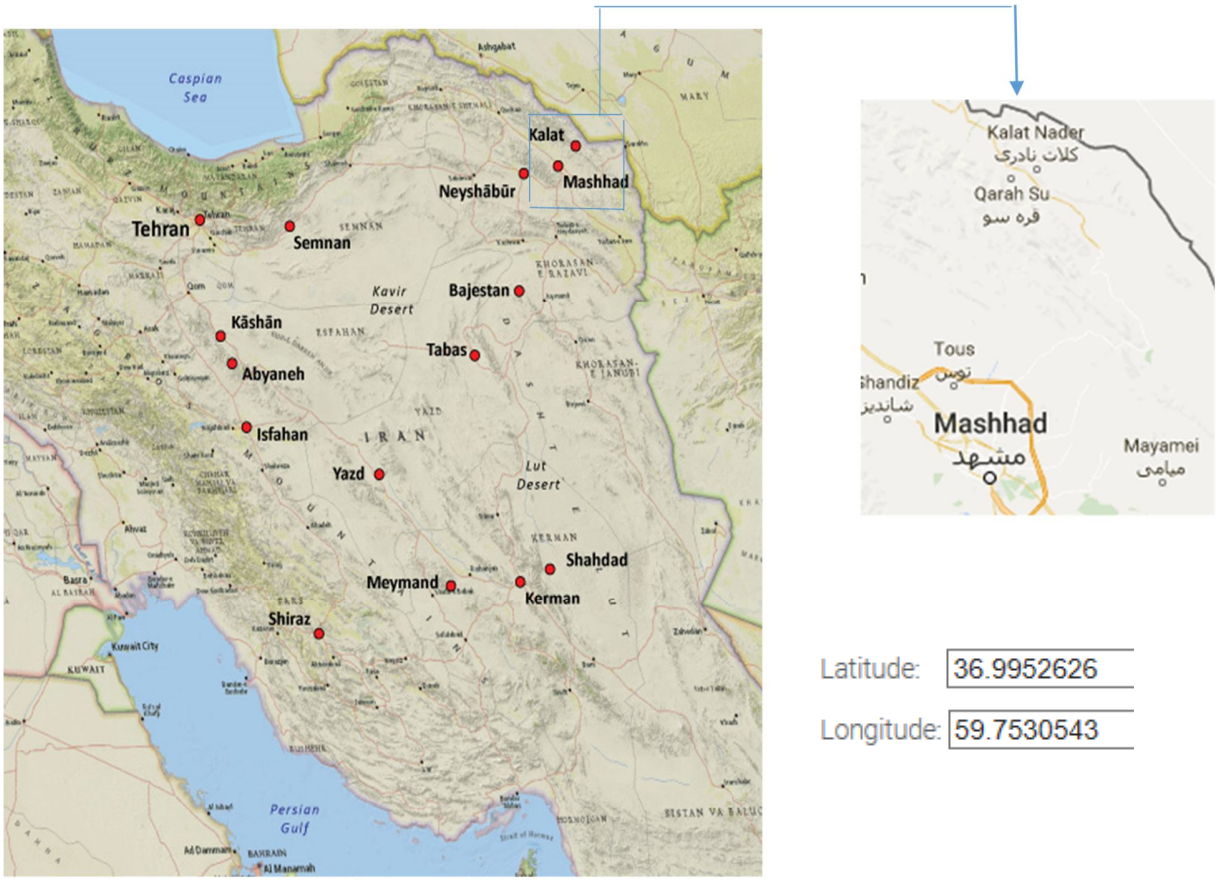
ترکیبی از تغییرات مورفولوژیکی که در طول زندگی قزل آلاهای رنگین کمان اتفاق افتاده نشان دهنده دامنه طبیعی این گونه است (Bematchez et al, 1992). با این حال، تنوع در میان قزل آلاهای رنگین کمان بیشتر به دلیل انعطاف پذیری محیطی و فنوتیپی آنهاست، بنابراین نیاز است تا طبقه بندی از جمعیت های این ماهی براساس تنوع ژنتیکی به منظور حفاظت و مدیریت بهتر ایجاد گردد (Laikre, 1999). مارکرهای مولکولی می توانند اطلاعات ژنتیکی جدید و فوق العاده ظریفی را ایجاد نمایند (Al-Samaria and Al-kazaz, 2015). در حال حاضر، تجزیه و تحلیل ژنوم میتوکندری مهمترین نقش را در مقایسه ژنتیکی جمعیت های مختلف ماهی برعهده دارد (Davey et al, 2011).

ژن سیتوکروم اسیداز C زیرواحد ۱ (COX1) از ژنوم میتوکندری به عنوان ژن استاندارد در مطالعات فیلوژنتیک ماهی ها شناخته می شود (Dettai et al, 2011). از اینرو، در این مقاله مطالعه تنوع ژنتیکی بر سه جمعیت ماهی قزل آلای رنگین کمان گونه های داخلی ایران، فرانسوی و دانمارکی به منظور برآورد تنوع ژنتیکی جمعیت گونه بومی ایران و برآورد تنوع ژنتیکی بین گونه اهلی ایران با نمونه های فرانسوی و دانمارکی انجام شد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه

۹۰ نمونه ماهی قزال آلا رنگین کمان از سه جمعیت (هر جمعیت ۳۰ قطعه) اهلی ایران، فرانسوی و دانمارکی از واحد پرورش منصوریان واقع در منطقه کلات نادری شهر مشهد جمع آوری شد (شکل ۱). همه ماهی ها با استفاده از تور دستی گرفته شدند و سپس با استفاده از محلول میخک (۱۰ گرم در هر لیتر آب مقطر) بیهوش شدند. سپس، ۱-۲ سانتی متر از باله دمی به عنوان نمونه جدا گردید و به داخل تیوپ حاوی اتانول ۹۶ درصد منتقل شد. نمونه ها بر روی یخ قرار به آزمایشگاه منتقل و سپس در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.



شکل ۱. منطقه نمونه برداری از جمعیت ماهی قزال آلا رنگین کمان سه جمعیت اهلی ایران، فرانسوی و دانمارکی.

آماده سازی نمونه و استخراج DNA

بدین منظور، ۲۵ میلی گرم از باله دمی با استفاده از روش کوبیدن در ۳۰۰ میکرو لیتر از بافر هضم کننده (۱۰۰ میلی مولار NaCl، ۱۵ میلی مولار EDTA pH=8، ۱۰ میلی مولار Tris pH=8 و ۰/۵ درصد SDS) هموژن شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از آنزیم پروتئیناز K (۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به محلول اضافه گردید. تیوپ بخوبی تکان داده شد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس تیوپ به مدت ۱۰ ثانیه در ۱۰۰۰۰ rpm سانترفیوژ گردید. استخراج DNA از محلول رویی با استفاده از پروتکل استاندارد کیت استخراج DNA دیاتوم (ISOGENE kit DIATOM DNA PREP.100-RUSSIA) صورت گرفت. بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی از روش الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد صورت پذیرفت.

واکنش زنجیره ای پلیمراز

به منظور تکثیر قطعه ۶۲۴ جفت بازی ژن COX1، آغازگرهای رفت و برگشت با استفاده از نرم افزار PRIMER Biosoft طراحی گردید. پرایمر رفت ۵' GGCATTCCCTCGAATAAATAACATA 3' و برگشت ۵' TCCACGTCTATCCCTACAGTGAACA 3' انتخاب شدند. واکنش PCR با استفاده از مستر میکس PCR (۱۰ میلی مولار) شرکت آمپلیکون (دانمارک)، اب مقطر (۸ ماکرولیتر) و آغازگرهای رفت و برگشت (۱ ماکرولیتر) انجام شد. تیوپ حامل این مواد به داخل دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal با برنامه ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه یک چرخه، ۹۴ درجه سانتیگراد

۴۵ ثانیه و ۶۴ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۴۵ ثانیه برای ۳۵ چرخه، ۷۲ درجه سانتیگراد ۱۰ دقیقه یک چرخه، قرار داده شد.

خالص سازی محصولات PCR و توالی یابی

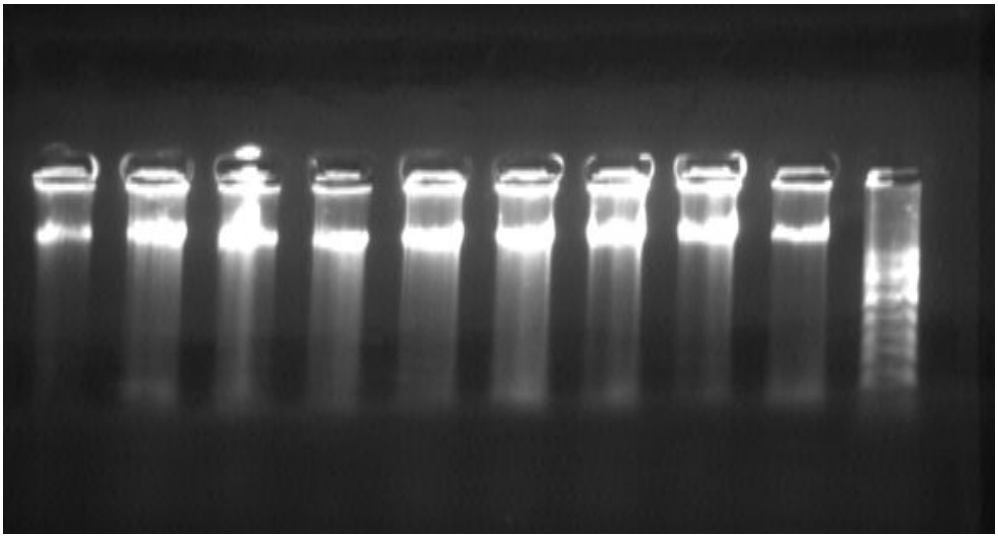
خالص سازی محصولات PCR با استفاده از روش رسوب با اتانول انجام شد. پس بررسی کیفیت نمونه ها بر روی ژل آگارز، ۴۰ ماکرولیتر از نمونه ها به منظور توالی یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI ۷۳۰۰ به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی گردیدند.

آنالیز نتایج توالی یابی

با استفاده از ابزار BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI میزان شباهت توالی‌های بدست آمده سنجیده شد. به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی گونه مورد مطالعه، ماتریس فواصل ژنتیکی به کمک الگوریتم ارائه شده توسط Tamura et al. (2004)، بوسیله نرم افزار Mega v.7 مورد محاسبه قرار گرفت (Tamura et al., 2011).

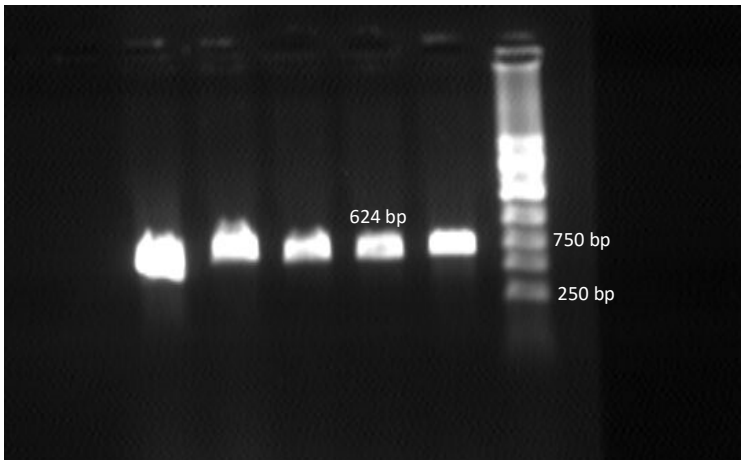
نتیجه و بحث

استخراج DNA از باله دمی در تمام نمونه ها با موفقیت انجام شد. DNA های استخراج شده با استفاده از روش گوانیدین تیوسیانات - سیلیکاژل مولکولهای بزرگی در حدود ۱۶-۱۵ کیلو باز تولید نمود و نشان داد که اندازهٔ این مولکول ها جهت تحقیقات مولکولی مناسب می باشد. پس از الکتروفورز نمونه‌های DNA بر روی ژل آگارز، هیچ گونه باند اضافی و اسمیر مشاهده نشد، که این امر نشان دهندهٔ این است که شکستگی در رشته های DNA به وجود نیامده است.



شکل ۲. بررسی کیفیت DNA استخراج شده از باله دمی ماهی قزل آلای رنکین کمان به روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد.

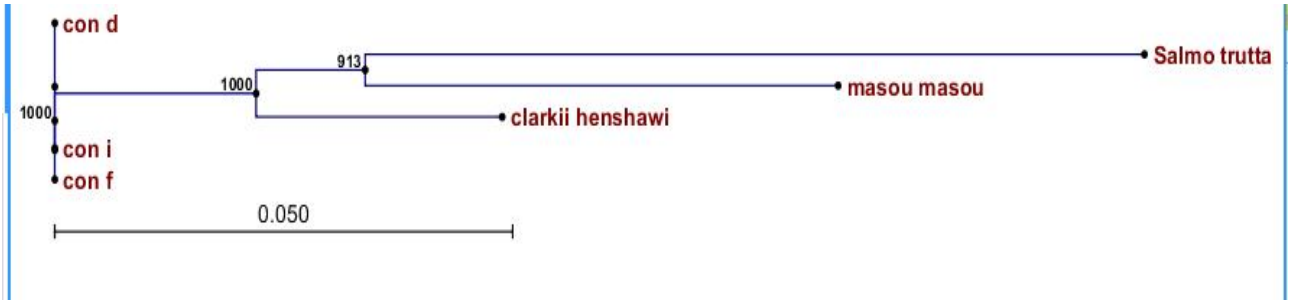
الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که پرایمرها به خوبی فعالیت نموده و قطعات اختصاصی برای ناحیه COX1 به طول ۶۲۴ جفت باز می باشد، تولید شده است (شکل ۳). وجود کنترل منفی پاک و قطعات اختصاصی، نشان از دقت و صحت انجام واکنش داشت. علاوه بر این، وجود یک باند اختصاصی نشان داد که توالی مشابه‌ای برای جفت شدن آغازگرهای مورد استفاده در محل‌های دیگر ژنوم وجود نداشته است.



شکل ۳- الکتروفورز محصولات PCR برای ناحیه COX1 میتوکندریایی به طول ۶۲۴ جفت باز، نشانگر کیفیت مناسب قطعات تکثیر شده می باشد.(نشانگر وزنی ۵۰ جفت بازی=M، کنترل منفی= C-)

با مقایسه بین توالی های مورد مطالعه با توالی های موجود در پایگاه NCBI مشخص شد که میزان هم پوشانی[1] پایین و هومولوژی[2] بالایی بین توالی های موجود در این پایگاه با توالی های مورد مطالعه ما وجود دارد. بررسی درخت فیلوژنتیک رسم شده به منظور تعیین تنوع ژنتیکی میان ۳ گونه مورد مطالعه در این پژوهش و ۳ گونه ثبت شده در بانک جهانی ژن، نشان داد که سه گونه ماهی قزل آلای رنگین کمان اهلی ایران، فرانسه و دانمارکی دارای کمترین فاصله ژنتیکی هستند و در یک کلد خواهری قرار می گیرند (شکل ۴). با اینحال سه گونه *Salmo trout*، *Oncorhynchus masou masou* و *Oncorhynchus clarkia henshawi* دارای فاصله ژنتیکی با گونه‌های حاضر در ایران هستند. بنابراین این نتیجه نشان می دهد که تنوع ژنتیکی در این سه نژاد در ایران به دلیل قرار گرفتن در کنار یکدیگر در یک مزرعه، به کمترین میزان ممکن رسیده است. تانگ و همکاران (۲۰۱۳) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۹ گونه قزل آلای رنگین کمان در چین، از ژن COX1 استفاده کردند. طول قطعه مورد مطالعه در آن تحقیق ۱۵۰۰ جفت باز بود. نتایج آنها نشان داد که تنوع ژنتیکی در میان این ۹ گونه در سطح متوسط است. همچنین مطالعات دیگر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و برآورد فاصله ژنتیکی نشان داده که ژن COX1 گزینه مناسبی برای این منظور می باشد (Gordeeva et al., 2017). اکثر محققین بر این باورند که جمعیتهای پرورشی به دلایل گوناگون نظیر استفاده از نسبت های جنسی نابرابر در تکثیر مصنوعی، بقای متفاوت نتاج حاصل از آمیزش درون خانواده ها و همچنین آمیزش خویشاوندی کاهش تنوع ژنتیکی را بدنبال خواهند داشت (Hansen et al., 2000) .

[1] Coverage
[2] Homology



شکل ۵- درخت فیلوژنتیک رسم شده برای سه گونه ماهی قزل آلای رنگین کمان اهلی ایران ((Iranian *rainbow trout* (con i)، فرانسوی((French *rainbow trout* (con F)، دانمارکی ((Danish *rainbow trou*t (con d) و گونه های گرفته شده از بانک جهانی ژن *Salmo trout*، *Oncorhynchus masou masou* و *Oncorhynchus clarkia henshawi*

نتیجه گیری

کاهش در ذخایر ژنتیکی جمعیتهای ماهیان یکی از مشکلات مهم آبزی پروری محسوب می شود و مطالعات تنوع ژنتیکی در زمینه های مختلف بخصوص اصلاح نژاد می تواند به کار گرفته شود. امروزه تنوع ژنتیکی بسیاری از جوامع ماهیان دچار تغییر شده و از طرف دیگر فعالیتهای انسانی تا حدی ساختار جمعیتها را تغییر می دهند که حتی از طریق افزایش تکثیر مصنوعی سبب یکسان سازی ژنتیکی می شوند (Ferguson et al., 1995; Zhao et al.,2005).

امروزه کاربرد نشانگرهای مولکولی منجر به پیشرفت سریع در مطالعات مربوط به تشخیص تنوع ژنتیکی و آمیزش درون گونه‌ای، تعیین والدین، تشخیص گونه و نژادها و بازسازی نقشه های دقیق خویشاوندی برای گونه های آبزیان شده است (Hansen *e al.*, 2000). DNA میتوکندریایی در بسیاری ازمطالعات فیلوژنتیک و تاکسونومیک به عنوان یک نشانگر مناسب ژنتیکی محسوب می شود زیرا میزان جهش در آن بالا بوده و نوترکیبی در آن اتفاق نمی افتد (Na-Nakorn et al., 2006). در این مطالعه ژن COX1 که به عنوان یک ژن استاندارد جهت تعیین فاصله ژنتیکی در ماهیان است، به عنوان نشانگر انتخاب گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که براساس نشانگر COX1، فاصل ژنتیکی بین سه گونه اهلی ایران، فرانسه و دانمارکی وجود ندارد.

از انجا که یک نشانگر تنها نشان دهنده وضعیت دقیق تنوع ژنتیکی در جمعیت های ماهیان نمی باشد، توصیه می شود ژن های شاخص دیگر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گیرد تا بعد از آن بتوان با تصمیمات صحیح مدیریتی، تنوع ژنتیکی را در بین ماهیان قزل آلای رنگین کمان ایجاد نمود.

منابع

Dennis Dahlmans, Alexandre Houzelle, Patrick Schrauwen, Joris Hoeks. 2016, Mitochondrial dynamics, quality control and miRNA regulation in skeletal muscle: implications for obesity and related Metabolic disease. Clinical Apr. 22, 130, (11) 843- 852.

Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodohl, P. A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., Mcginnity, P. and Hynes, R. A., 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to Salmo. Journal of Fish Biology, 47 (Supplement A): 103-126.

Firas Rashad Al-Samarai, Abdulkareem A. Al-Kazaz, 2016; Molecular Markers: An Introduction and Applications. European Journal of Molecular Biotechnology. vol. (9), Is. 3.

Gordeeva N. V., I. B. Shakhovskoi. 2017. Efficiency of DNA barcoding for phylogenetic analysis and species identification in flying fish (Exocoetidae). Journal of Ichthyology. March 2017, Volume 57, Issue 2, pp 287–296.

Hansen, M., Nielsen, E., Ruzzante, D., Bouza, C. and Mensberg, K., 2000. Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (Salmo trutta L.) using microsatellite DNA markers. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 57: 2130-2139.

Iran fisheries organization, Deputy of planning and. development manager, Office of Budget and Planning, pp: 60.

J. M. Durant, N. C. Stenseth. 2013; Harvested fish stocks in a changing environment. Marine Ecology Progress Series, vol. 408, (199-287).

L. Skuza, S. Keszka, R. Panicz, p. Smietana 2016; Molecular characterization of the noble crayfish (Astacus astacus L.) population from Pomeranian lakes (north-western Poland) based on mitochondrial DNA, Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 417, 13

Na-Nakorn, U., S. Sukmanomon,M. Nakajima, N. Taniguchi, W. Kamonrat, S. Poompuang, and T. T. T. Nguyen (2006), MtDNA diversity of the critically endangered Mekong giant catfish (Pangasianodon gigas Chevey, 1913) and closely related species: implications for conservation, Animal Conservation, 9: 483–494.

Shamspor, S., H. Khara and H. Golshahi, 2012; The effect of age on the fertility and natality function of producer of rainbow trout. Second public (284).

Tong, G., Kuang, Y., Yin, J., et al. (2013). Population genetic structure of taimen, Hucho taimen (Pall.), in China. Archives of Polish Fisheries, 21(3), pp. 199-203. Retrieved 5 May. 2017, from doi:10.2478/aopf-2013-0017

Zhao, N., Ai, W., Shao, Z., Zhu, B., Brosse, S.,Chang, J., 2005. Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipencer sinensis* Gray) genetic variability. Journal of App1ied Ichthyology, 21: 7-13.