نقش نشانگرهای ژنتیکی در تعین تنوع و حفظ ذخایر ژنتیکی آبزیان

سعید تمدنی جهرمی*[1]، محسن گذری[1]، سجاد پورمظفر[2]

۱ - پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

۲- ایستگاه تحقیقات شیلاتی نرم‌تنان خلیج‌فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرلنگه، ایران
stamadoni@gmail.com

تاریخ دریافت : مهر ماه ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۸

چکیده

انواع مختلفی از مارکرهای ملکولی هم‌اینک به صورت گسترده در بررسی ژنتیکی آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرند. مارکرهای میکروساتلایت (ریز ماهواره)، درزمینهٔ شیلات و آبزی‌پروری برای توصیف ذخایر ژنتیکی، انتخاب ذخایر مولدین، شناسایی ژن‌های کدگذاری کنندهٔ صفات مهم اقتصادی، برنامه‌های تولیدمثلی و مطالعات ساختار جمعیتی، کارایی بالایی دارند. از تحقیقات مرتبط با موضوع می‌توان به بررسی جمعیت‌های مختلف میگوی موزی *Penaus merguiensis* در سه منطقهٔ عمدهٔ صید این گونه با نمونه‌برداری از مناطق جاسک، گواتر و هرمز به روش ترال اشاره کرد. از ویژگی‌های کاربردی میکروساتلایت‌ها وجود آلل‌ها یا جایگاه‌های ژنی اختصاصی جهت شناسایی یک جمعیت یا یک ذخیرهٔ ژنتیکی خاص بوده و یا به عنوان یک ردیاب مناسب در شناسایی جریان ژنی در جمعیت‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. برخی از محققین بر این باورند که توانایی تکنیک استفاده از میکروساتلایت‌ها در آشکار سازی جایگاه‌های ژنی اختصاصی (آلل‌های بی‌همتا) جهت تفکیک درون جمعیتی و بین جمعیتی در میگوهای غیر پرورشی (دریایی)، از نقاط قوت این‌گونه مارکرهاست. این آلل‌های بی‌همتا یا اختصاصی می‌توانند در برنامه‌های تولیدمثلی همانند مولدسازی و همچنین دورگه گیری در میگوهای گونه موزی و سفید هندی در خلیج‌فارس و دریای عمان مورد توجه قرار گیرند. این نگرش در استفاده از میکروساتلات‌ها برای آنالیز تنوع ژنتیکی در برنامه‌های تولیدمثلی و همچنین مطالعه بر روی جداسازی و ارائه جایگاه‌های جدید میکروساتلایتی و کاربرد آن‌ها به عنوان مارکرهای ژنتیکی می‌تواند در تعین تنوع و حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های مختلف آبزیان مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: نشانگرهای ژنتیکی، میکروساتلایت، میگوی موزی، هتروزیگوسیتی

مقدمه

مارکرهای میکروساتلایت یا توالی‌های کوتاه تکراری (SSRs)، درواقع توالی نوکلئوتیدی تکراری ساده از ژنوم موجود می‌باشند که بین ۱ تا ۶ جفت باز تکرار شده‌اند و میزان بالایی از پلی‌مورفیسم آللی را نشان می‌دهند. آن‌ها به‌طور عمده در نقاط خاصی از ژنوم پراکنده‌اند. مزیت استفاده از آن‌ها به جهت کوچک بودن جایگاه ژنی آن‌ها، توارث مندلی آن‌ها در نتاج و نشان دادن تنوع در مقیاس بسیار بالا است (Liu *et al.,* 2001). میکروساتلایت‌ها به راحتی در PCR تکثیر می‌شوند و همین امر اساس کاربرد بالای آن در زمینه‌های علوم پایه، بیولوژی عملی، پزشکی ازجمله اپیدمیولوژی مولکولی (همه‌گیرشناسی مولکولی)، ژنتیک جمعیت و توصیف ویژگی‌های ژنی است. به علت داشتن چند شکلی بالا، قابلیت استفادهٔ مارکرهای یک گونه در گونه‌های نزدیک را دارند (Chistiakov *et al;* 2005).

میکروساتلایت‌ها درزمینهٔ شیلات و آبزی‌پروری برای توصیف ذخایر ژنتیکی، انتخاب ذخایر مولدین، شناسایی ژن‌های کدگذاری کنندهٔ صفات مهم اقتصادی، برنامه‌های تولیدمثلی، مطالعات ساختار جمعیتی، تفکیک نژادهای پرورشی از طبیعی، ارزیابی رابطهٔ ژنتیکی والدین با فرزندان، مدیریت والدین، تشخیص ژینوژنز، پلی‌پلوئیدی، تشخیص دورگه‌ها و ارزیابی تکاملی کارایی بالایی دارند (Chistiakov *et al*., 2005).

SSRs در ساختمان DNA، شبکه کروماتین، تنظیم DNA، رونویسی، ترجمه، بیان ژن و چرخهٔ سلولی شرکت دارند. هنوز تمامی اطلاعات و صفات ویژهٔ میکروساتلایت‌ها شناسایی نشده است و در صورتی که شناسایی صفات جدید و اختصاصات دیگر SSRs فراهم شود، این شناسایی به طرح زمینه‌های جدید کاربری عملی این مارکرها کمک می‌کند. استفاده از میکروساتلایت‌ها در مقایسه با استفاده از آلوزیم‌ها اطلاعات مفیدتری در مورد پلی‌مورفیسم و بالعکس اطلاعات کمتری از آنالیز توالی جهش می‌دهد (Chistiakov *et al*., 2005).

۱- پراکنش ژنومی میکروساتلایت‌ها

وجود SSRs در ژنوم یوکاریوت‌ها از دههٔ ۱۹۷۰ شناخته شد (Bruford *et al*., 1996). واژهٔ میکروساتلایت در سال ۱۹۸۵ توسط Jeffery مطرح گردید و مفهوم آن توالی‌های کوتاه تکرارشونده در ژنوم موجودات است (صفری، ۱۳۸۵). Hamada و همکاران (۱۹۸۲)، ثابت کردند که این توالی‌ها به تعداد زیاد و در پهنهٔ وسیعی از موجودات از مخمرها تا مهره‌داران وجود دارد. Tautz و Renz (۱۹۸۴)، گزارش کردند که توالی‌های متمایز هیبرید شدهٔ میکروساتلایت در ژنوم DNA ارگانیزم‌ها، متنوع بوده و انواع زیادی از توالی‌های ساده نیز وجود دارد. SSRs در محدودهٔ بین ۲۰ تا ۱۰۰ جفت باز قرار دارند و آن‌ها در ژنوم تمام یوکاریوت‌ها، پروکاریوت‌ها و حتی باکتری‌ها وجود دارند.

میکروساتلایت‌ها را می‌توان در همه جای ژنوم، در پروتئین‌های کد شده و کد نشدهٔ DNA یافت. فراوانی میکروساتلایت‌ها متفاوت است و بستگی به‌اندازهٔ ژنوم دارد. برای مثال برآورد شده که فراوانی میکروساتلایت‌ها در ژنوم انسان به‌طور متوسط ۱۰ برابر ژنوم گیاهان است و توزیع میکروساتلایت‌ها نه‌تنها در گونه‌های مختلف متفاوت است بلکه در درون یک ژنوم و در بین کروموزوم‌های مختلف نیز متفاوت است. از لحاظ توزیع و سازمان‌دهی میکروساتلایت‌ها در ژنوم‌ها با نقشه‌های ژنتیکی مشخص شد که میکروساتلایت‌ها در یک ناحیه جمع نشده و به‌طور یکنواخت در نواحی مختلف کروموزوم توزیع شده‌اند و طول توالی میکروساتلایت‌ها در ژنوم موجودات خونسرد بیشتر از ژنوم سایر موجودات است (صفری، ۱۳۸۵). تکرارهای دی‌نوکلئوتید در ژن‌های گونه‌های متنوعی ماهیان ازجمله گربه ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) (Liu *et al.,* 1999) و آزاد ماهی اطلس (*Salmo salar*)، توصیف شده‌اند (Grimholt *et al*., 2002).

۲-مزایای میکروساتلایت‌ها

این نشانگرها دارای مزایای متعددی به شرح ذیل می‌باشند:

- از توارث سادهٔ مندلی تبعیت می‌کنند، یعنی می‌توان افراد هتروزیگوت را از هموزیگوت به راحتی تفکیک نمود.
- در ژنوم موجودات فراوان بوده و پراکندگی آن‌ها نیز در سطح ژنوم موجودات عالی یکنواخت هست.
- چند شکلی بالایی دارند و علاوه بر این توانایی آن‌ها در تشخیص میان افراد در صورت استفاده از ترکیبی از جایگاه‌ها، این تکنیک را در مطالعهٔ جریان ژنی و تعیین هویت بسیار توانمند ساخته است.
- مقدار بسیار کمی DNA نیاز دارند و به وسیلهٔ PCR قابل تکثیر هستند.
- قابلیت استفادهٔ نشانگرهای یک گونه در گونه‌های بسیار نزدیک دیگر وجود دارد.
- رتبه دهی آن‌ها آسان و دقیق است (O'reilly and Wright 1995).

۳-معایب و مشکلات میکروساتلایت‌ها

از محدودیت‌ها و مشکلات کار با میکروساتلایت‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

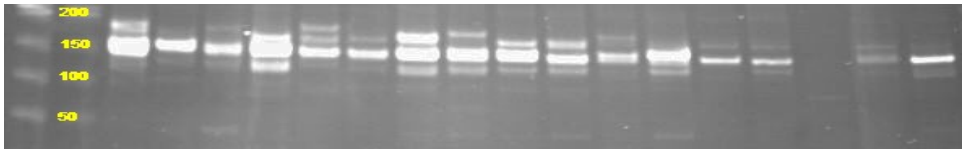
۳-۱- تعیین توالی: یکی از مشکلات میکروساتلایت‌ها که درواقع مشکل عملی و ابتدایی آن‌هاست، تعیین توالی برای ساخت و طراحی نشانگر موردنیاز است که در ابتدا باید این عمل انجام شود که انجام آن مستلزم صرف وقت و هزینهٔ زیادی است.

۳-۲- اشتباهات آلل خوانی: این اشتباهات در اثر لغزش DNA پلیمراز رخ می‌دهد که منجر به تولید باندهای پهن و متعددی می‌گردد که همچون سایه در اطراف باند اصلی قرار گرفته و این باندها را باندهای نارسا می‌نامند و گفته می‌شود که در اثر حوادث Slipage در طول PCR به وجود می‌آیند. این باندها معمولاً وضوح کمتر از باندهای اصلی دارند و می‌توان از آن‌ها صرف‌نظر کرد اما اگر با فرآورده‌های مربوط به یک فرد هتروزیگوت هم‌پوشانی داشته باشند، آنگاه تشخیص این دو باند مشکل می‌شود (O'reilly and Wright 1995).

۳-۳- ایجاد آلل‌های صفر: آلل‌های صفر آلل‌هایی هستند که ضعیف تکثیر شوند و یا پس از تکثیر و تفکیک قابل‌رؤیت نباشند. وجود جهش در توالی‌های مجاور میکروساتلایت‌ها (Flanking) از اتصال آغازگر جلوگیری کرده و درنتیجه هیچ فرآورده‌ای در PCR تولید نمی‌شود. البته کیفیت پایین DNA استخراجی و جهش در درون ترتیب مورد تکثیر نیز می‌توانند باعث ایجاد آلل‌های صف شوند. وجود آلل‌های خنثی موجب برآورد نادرست هتروزیگوسیتی در داخل یک جمعیت می‌گردد (Hansen, 2003).

۴-تحقیقات مرتبط با موضوع

بررسی جمعیت‌های مختلف میگوی موزی در سه منطقهٔ عمدهٔ صید این گونه که نمونه‌برداری از مناطق جاسک، گواتر و هرمز به روش ترال کف انجام (۴۰ نمونه از هر منطقه) و استخراج Total DNA با استفاده از فنل – کلروفورم (Taggart *et al*., 1990) انجام گرفت. معمولاً در این نوع تحقیقات از آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی توالی‌های میکروساتلایتی استفاده می‌شود که در این رابطه و برای تحقیق درزمینهٔ تنوع ژنتیکی میگوی موزی از پنج جفت آغازگر استفاده گردید. در ارتباط با ارزیابی محصول PCR در گونهٔ میگوی موزی از مناطق هرمز، گواتر و جاسک می‌توان به مناسب‌ترین دما برای اتصال این آغازگرها پس از بهینه‌سازی واکنش PCR با دمای اتصال ۵۵ درجه و با اجرای ۳۵ چرخه اشاره کرد. شکل ۱ مثالی در این مورد را نشان می‌دهد.



شکل ۱. دامنهٔ آللی ۱۵۰ تا ۱۶۵ متعلق به نمونه‌های میگوی موزی منطقهٔ گواتر

در این‌گونه مطالعات جدا بودن و یا نزدیک بودن دو یا چند جمعیت موردمطالعه از لحاظ ژنتیکی بسیار مهم است که معمولاً با محاسبهٔ Fst (F- Statistic)، اندازه‌گیری می‌شود. این فاکتور درواقع یک فاکتور استاندارد جهت تمایز جمعیت‌ها بر اساس پلی‌مورفیسم بوده و از این فاکتور برای اندازه‌گیری اختلاف ژنتیکی کل موجود در یک زیر جمعیت و مقایسهٔ آن نسبت به اختلاف ژنتیکی کل استفاده می‌شود و مقدار آن همیشه مثبت و بین صفر (هیچ اختلافی بین جمعیت‌ها وجود ندارد) و عدد یک (جدایی کامل دو جمعیت)، است که برای مثال در بررسی به‌عمل‌آمده حداکثر میزان Fst بر اساس فراوانی آلل‌ها در هر جایگاه ژنی در میگوی موزی بین نمونه‌های مناطق هرمز و گواتر که دارای کمترین جریان ژنی بودند و حداقل آن بین مناطق هرمز و جاسک که دارای بیش‌ترین جریان ژنی بودند دیده شد (جدول ۱). جریان ژنی (Nm) نیز به تعداد مولدین مهاجر از یک منطقه به منطقهٔ دیگر در طی یک نسل اطلاق می‌شود. هر چه Nm بیشتر باشد مهاجرت بین مناطق بیشتر و تنوع ژنتیکی کمتر است.

جدول ۱. میزان Fst بر اساس فراوانی آلل‌ها در میگوی موزی و رابطهٔ آن‌ها با میزان مهاجرت (Nm)

جمعیت ۱	جمعیت ۲	Fst (via Frequency)	*Nm*
هرمز	جاسک	۰/۰۱۶	۱۵/۷۳۳
هرمز	گواتر	۰/۰۸۸	۲/۵۸۰
جاسک	گواتر	۰/۰۷۳	۳/۱۵۸

از نکات دیگری که می‌توان اشاره کرد این است که میزان Fst به‌طورمعمول زیر ۰/۰۵ مطرح می‌شود که ممکن است این‌طور تصور شود که ساختار بین زیر جمعیت‌ها ضعیف است ولی همیشه عدد به‌دست‌آمده نشانگر همهٔ جمعیت حقیقی نیست و دیگر اینکه میزان Fst در اکثر مواقع به یک نمی‌رسد زیرا اثر پلی‌مورفیسم (ناشی از جهش)، به‌طور چشمگیری مقدار Fst را کاهش می‌دهد (Wright, 1978; Nagylaki, 1998; Hedrick, 1999).

به‌طور خلاصه میکروساتلایت‌ها منبع خوبی برای ارائه نشانگرهای اختصاصی هستند و می‌توانند در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک با جد و نیای مشترک به راحتی استفاده شوند. استفاده از میکروساتلایت‌ها در گونه‌هایی که باهم خویشاوندی نزدیکی دارند متداول است اما با افزایش فاصلهٔ فیلوژنتیکی، میزان موفقیت کاهش می‌یابد که علت آن می‌تواند قرار گرفتن بازهای جانشین در مناطق پهلوگیری میکروساتلایت‌ها باشد (نوروزی، ۱۳۸۶). مارکرهای ملکولی به خصوص مارکرهای میکروساتلایت می‌توانند به صورت ابزاری مناسب در جهت تفکیک جمعیت‌های آبزیان بکار روند. در این گونه مطالعات در برخی مواقع هتروزیگوسیتی یا وجود تنوع ژنتیکی بین آلل‌ها کمتر از هتروزیگوسیتی قابل‌انتظار است که این امر نشان‌دهندهٔ کاهش در تغییرپذیری جمعیت‌های موردمطالعه در شرایط مختلف محیطی است که علت آن می‌تواند به خاطر استرس وارد به جمعیت‌ها در اثر صید بی‌رویهٔ آبزی (برای مثال میگوی موزی در مطالعهٔ یادشده)، ازجمله صید قاچاق در تمام طول سال بوده باشد. از دیگر عوامل ایجاد تنوع ژنتیکی که با نشانگرهای میکروساتلایتی قابل‌ردیابی است، می‌توان به اثر فاکتورهایی از قبیل ساختار هیدرودینامیک بین منطقه‌ای (جریان‌های دریایی) اشاره کرد که به‌طور مثال وجود جریان‌های گردابی (Eddy)، در بین منطقهٔ تنگه هرمز و گواتر و عبور جریان‌های دریایی اشاره کرد. همچنین نقش جنگل‌های حرا (مانگرو) به عنوان یکی از مهم‌ترین

مناطق از لحاظ منطقهٔ نوزادگاهی می‌تواند در افزایش میزان تنوع مؤثر باشد. در هر حال محاسن این گونه از مارکرها از معایب آن‌ها کمتر بوده و می‌توان از آن‌ها در شناخت ذخایر ژنتیکی آبزیان در سطح وسیعی بهره‌برداری کرد.

توصیه ترویجی

با توجه به نقش مارکرهای ملکولی درزمینهٔ شناسایی ذخایر مختلف آبزیان و همچنین با توجه به نقش گونه‌های مختلف میگو در سبد اقتصادی ساکنین حاشیهٔ خلیج‌فارس، انجام هرگونه برنامهٔ بازسازی ذخایر و مولدسازی جهت تکثیر گونه‌های میگوی موزی را می‌توان با آموزش کارشناسان مرتبط با بخش‌های مختلف تکثیر و پرورش و استفاده از مارکرهای ژنتیکی و با در نظر گرفتن ذخایر ژنتیکی گونه‌های فوق انجام داد. این گونه مارکرها منبع خوبی برای پرایمرهای اختصاصی بوده و می‌توان در گونه‌هایی با خویشاوندی نزدیک با جد و نیای مشترک، به راحتی استفاده کرد. با استفاده از این نشانگرها می‌توان با برنامه‌ریزی و شناسایی ذخایر اقتصادی و قابل برداشت از استرس وارد به جمعیت‌ها در اثر صید بی‌رویهٔ میگوی موزی ازجمله صید قاچاق در تمام طول سال و همچنین برداشت بی‌رویه از مولدین میگوی سفید هندی جلوگیری کرد.

منابع

۱- نوروزی، م.، ۱۳۸۶. بررسی ساختار جمعیت‌های ماهی ازون برون (*Acipenser steilatus*) دریای خزر با استفاده از روش ملکولی میکروساتلایت. رساله دکتری رشته بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، ۱۶۹ صفحه.

۲- صفری، م.، ۱۳۸۵. بررسی ساختار جمعیت ماهی شیپ (*A. nudiventris*) دریای خزر با استفاده از روش ماکروساتلایت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۰۸ صفحه.

3- Bruford, M.W., 1996. Microsatellites and their application in conservation genetics. *Molecular Genetics Approaches to Conservation*. *Oxford University press, Oxford*, pp. 278- 297.

4- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Haley, C.S., Law, A.S., Tsigenopoulos, C.S., Kotoulas, G., Bertotto, D., Libertini, A. and Volckaert, F.A., 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass Dicentrarchus labrax L. *Genetics*, *170*(4), pp.1821-1826.

5- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Haley, C.S., Law, A.S., Tsigenopoulos, C.S., Kotoulas, G., Bertotto, D., Libertini, A. and Volckaert, F.A., 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass Dicentrarchus labrax L. *Genetics*, *170*(4), pp.1821-1826.

6- Hansen, M.M., 2003. *Application of molecular markers in population and conservation genetics, with special emphasis on fishes* (Doctoral dissertation, University of Aarhus).

7- Hedrick, P.W., 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, *53*(2), pp.313-318.

8- Liu, Z., Li, P., Kocabas, A., Karsi, A. and Ju, Z., 2001. Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding

region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and biophysical research communications*, *289*(2), pp.317-324.

9- Liu, Z., Tan, G., Li, P. and Dunham, R.A., 1999. Transcribed Dinucleotide Microsatellites and Their Associated Genes from Channel CatfishIctalurus punctatus. *Biochemical and biophysical research communications*, *259*(1), pp.190-194.

10- Nagylaki, T., 1998. Fixation indices in subdivided populations. *Genetics*, *148*(3), pp.1325-1332.

11- O'reilly, P. and Wright, J.M., 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Journal of Fish Biology*, *47*, pp.29-55.

12- Taggart, J.B., Hynes, R.A., Prodöuhl, P.A. and Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal of fish Biology*, *40*(6), pp.963-965.

13- Tautz, D. and Renz, M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*, *12*(10), pp.4127-4138.

14- Wright, S., 1978. *Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: Vol. 4: variability within and among natural populations*. University of Chicago Press.