مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال ششم، شماره چهارم، پیاپی بیست و چهارم، بهار ۱۳۹۷ (۴۰-۳۵)

تعیین تنوع ژنتیکی گونه بومی و نادر آب‌های داخلی ایران، ماهی گورخری گنو *Aphanius ginaonis* با استفاده از مارکر مولکولی PCR-RFLP

عصمت سلیمی[۱*]، حسین ذوالقرنین[۲]، بیتا ارچنگی[۳]
۱. کارشناسی ارشد، اکولوژی دریا، بوشهر
۲. دکتری زیست دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خوزستان
۳. دکتری اکولوژی مولکولی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خوزستان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/٤ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲٤)

چکیده
کشور ایران با پراکندگی بسیار وسیع جغرافیایی دارای زیستگاه‌های متعدد و اهمیت بوم‌شناسی بسیار بالایی می‌باشد. در میان مطالعات بوم‌شناسی، بررسی‌های انجام‌شده بر روی آب‌های داخلی ایران بسیار اندک است. آگاهی از ویژگی‌های زیست‌شناسی و همچنین بوم‌شناسی گونه‌های مختلف آبزیان می‌تواند اطلاعات مفیدی جهت مدیریت مؤثر ذخایر ماهیان در آینده فراهم نماید. ماهی گورخری گنو (*Aphanius ginaonis*) گونه‌ای بومی ایران می‌باشد که منحصراً در چشمه آب گرم هرمزگان وجود دارد و در خطر انقراض می‌باشد. اهمیت این ماهی در مهار زیستی پشه‌ها و ارزش زیبایی‌شناسی از نظر ماهیان زینتی و آکواریومی می‌باشد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت ماهی گورخری گنو با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی گردید. جهت تعیین تنوع ژنتیکی این ماهی در حوضه خلیج فارس، تعداد ۳۰ نمونه ماهی گورخری گنو از چشمه آب گرم گنو در استان هرمزگان جمع‌آوری گردید. جهت هضم آنزیمی محصول PCR به طول ۵۵۰ جفت باز در ناحیه D-loop میتوکندریایی، از ۵ آنزیم محدودگر *Alu*I, *Dpn*I, *Eco*47I, *Hind*III, *Hin*fI استفاده شد. در نتیجه این آنالیزها، ۹ هاپلوتیپ به دست آمد. ٤ هاپلوتیپ به‌دست‌آمده در این ماهی جزء هاپلوتیپ‌های نادر بودند. هاپلوتیپ‌های EABAB، EACAB و CABAB بیشترین فراوانی را نشان دادند. تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی، تنوع بالایی را در این گونه نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: *Aphanius ginaonis*، تنوع ژنتیکی، PCR-RFLP.

* نویسندهٔ مسئول: E-mail: e_salimi87@yahoo.com

Determining the genetic diversity of mtDNA of endemic and rare species of Aphanius ginaonis in Iran internal waters by PCR-RFLP in D-loop region

Esmat Salimi[1*], Hosein Zolgharnine[2], Bita Archangi[3]
1. Former M. Sc. Student, Marine Ecology, Booshehr, Iran
2. Ph.D., Khorramshahr Marine Science and Technology University, Iran
3. Ph.D. of Molecular Ecology, Khorramshahr Marine Science and Technology University, Iran
(Received: Feb. 3, 2014 - Accepted: May 14, 2018)

Abstract
Iran with a vast geographical distribution has several habitats and a high ecological importance. Among the ecological studies done a few studies have been conducted on Iran's internal waters. Knowing the biological and ecological characteristics of different aquatic species in Iran can provide useful information for effective fish stock management in future. *Aphanius ginaonis* is an endangered species and have high ecological importance. In this study, Genetic diversity of *Aphanius ginaonis* was studied through PCR-RFLP method through mitochondrial DNA in D-loop region. To conduct this study, 30 *Aphanius ginaonis* from Geno hot spring in Hormozgan taken. The samples'DNA was extracted through phenol chloroform method. The length of PCR product was 550 bp. To digest PCR product, 5 restriction enzymes (*Alu*I, *Dpn*I, *Eco*47I, *Hind*III, *Hin*fI) have been used. The data was analysed through Arlequin 3.11 software. 9 different haplotypes were revealed through analysis which four haplotypes were rare haplotype. Haplotypes EABAB, EACAB and CABAB showed the highest frequency. High haplotype and nucleotide diversity is resulted in this species. Results obtained from this research would be applicable to understand conservation genetics and management of this important fish species in Iran.

Keywords: Genetic Diversity, *Aphanius ginaonis*, PCR-RFLP.

مقدمه

خانواده کپورماهیان دنداندار (Cyprinodontidae) از معمول‌ترین ماهیان آب‌های داخلی ایران است. مطالعات محدودی بر روی ماهیان این خانواده در زیستگاه‌های مختلف انجام شده است. علت انتخاب ماهی گورخری جهت مطالعه، اهمیت این ماهی در مهار زیستی پشه‌ها، ارزش اکولوژیک و ارزش زیبایی‌شناسی از نظر ماهیان زینتی و آکواریومی می‌باشد. ماهی گورخری گنو منحصراً در چشمه آب گرم گنو در استان هرمزگان وجود دارد و تنها گونه بومی این منطقه است (Esmaeili *et al*., 2008).

شکل ۱. ماهی گورخری گنو (*Aphanius ginaonis*)

کار کمی روی جمعیت‌های ایرانی آفانیوس انجام شده است (Hrbek *et al*., 2006). اصولاً مطالعه کپورماهیان دنداندار در ایران بر اساس ریخت‌شناسی می‌باشد (Esmaeili *et al*., 2008). بنابراین به‌کارگیری روش‌های دیگر مثل مطالعات مولکولی، اکولوژیکی، تکوینی ممکن است در شناخت هرچه بهتر این گروه پیچیده از ماهیان مؤثر باشد (Esmaeili & Gholami, 2007). کاربرد روش‌های غیر مورفولوژیکی همچون مطالعات مولکولی در سال‌های اخیر منبعی از داده‌های مکمل برای دقت بیشتر و شناسایی دقیق این ماهی‌ها ایجاد کرده است (Esmaeili *et al*., 2007, 2008).

جنس *Aphanius* تنها جنس از تیره کپور دندان ماهیان موجود در ایران است (Coad, 1988). گونه‌های متعدد آفانیوس در جمعیت‌های کم و مناطق کوچک وجود دارند و امروزه به علت زهکشی، استفاده از زمین و آلودگی اطراف زیستگاه‌های بومی در لیست گونه‌های در معرض خطر قرار گرفته‌اند (Reichenbacher *et al*., 2009).

DNA میتوکندریایی در یوکاریوت‌ها در خارج از هسته و درون میتوکندری یافت می‌شود که به سبب دارا بودن ۵ تا ۱۰ برابر موتاسیون در مقایسه با هسته‌ای به مولکول ساعت تکامل معروف است و در بررسی‌های خویشاوندی و جمعیت‌شناسی کاربرد وسیع دارد (Cronin *et al*., 1994). RFLP از قدرتمندترین و معتبرترین نشانگرهای DNA است که از جمله نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر PCR است. مارکرهای مولکولی از جمله RFLP به‌طور گسترده برای آنالیز ساختار جمعیت و تعیین روابط ژنتیکی چندین گونه استفاده می‌گردد.

تنها مطالعه مولکولی صورت گرفته بر روی ماهی گورخری گنو، توسط خواجه در سال ۱۳۸۸ بوده است؛ که به بررسی چندشکلی ژنتیکی ماهی گورخری گنو با استفاده از منطقه D-loop پرداخت و میزان تنوع هاپلوتیپی بالایی را در این گونه گزارش داد.

هر چه دانش ما از زیست‌شناسی، پراکنش و زیستگاه یک گونه بیشتر باشد تلاش برای حفاظت از آن گونه موفقیت‌آمیزتر است. مطالعات زیست‌شناختی حاکی از آن است که سطوح مختلف تنوعات زیست‌گونه‌ای و اکوسیستمیک عمیقاً متأثر از تنوعات ژنتیکی درون گونه‌ای است. در این مطالعه تلاش شد تا با بررسی چندشکلی احتمالی موجود در mtDNA جمعیت ماهی گورخری گنو با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP این امر مهم حاصل شود و نظر به اینکه ماهی گورخری یکی از ماهیان مهم اکولوژیکی آب‌های داخلی ایران می باشد که در خطر انقراض قرار دارد و تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای بر روی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این گونه در آب‌های داخلی ایران با نشانگر RFLP صورت نگرفته است. لذا این تحقیق می‌تواند راهگشای تعدادی از سوالات در خصوص ویژگی‌های جمعیتی این ماهی باشد.

مواد و روش‌ها

چشمه آب گرم گنو در استان هرمزگان، ۳۵ کیلومتری شهر بندرعباس در دامنه شرقی کوه گنو با موقعیت جغرافیایی ۲۷ درجه و ۲۸ دقیقه و ۲۹/۸۶ ثانیه عرض شمالی و ۵۶ درجه و ۱۷ دقیقه و ۲/۶۷ ثانیه طول شرقی و ارتفاع ۱۹۷ متر از سطح دریا قرار گرفته است. نمونه‌های ماهی گورخری گنو از چشمه آب گرم گنو با استفاده از توردستی صید، در الکل ۹۶٪ تثبیت و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردیدند.

به علت کوچکی ماهی‌ها، قسمتی از بافت ماهیچه‌ای ناحیه شکمی ماهی جهت استخراج DNA برداشته شد. استخراج DNA با بهینه کردن روش فنل-کلروفرم انجام شد (Hillis & Moritz, 1990). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش ژل آگارز ۱٪ و روش اسپکتروفتومتری محاسبه گردید.

برای واکنش PCR بخشی از توالی D-loop ژنوم میتوکندریایی استفاده شد، که علت انتخاب این ناحیه، میزان چندشکلی بالا و سریع‌تر بودن میزان موتاسیون نسبت به DNA ژنومی می‌باشد. یک جفت پرایمر مورد استفاده در این تحقیق از سایت NCBI[1] اقتباس گردیده است.

توالی نوکلئوتیدهای پرایمرها به شرح زیر می‌باشد:

DL S: 5´_ CCC ACC ACT AAC TCC CAA AGC _ 3´

DL R: 5´_ CTG GAA AGA ACG CCC GGC ATG_ 3´

واکنش PCR در سیکل‌های دمایی، ۹۵ درجه برای ۵ دقیقه (واسرشته شدن اولیه)، ۹۴ درجه ۴۵ ثانیه (واسرشته شدن)، ۵۲ درجه ۹۰ ثانیه (الحاق)، ۷۲ درجه ۹۰ ثانیه با تعداد ۳۵ چرخه (بسط) و یک بسط نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه برای ماهیان گورخری انجام گرفت.

محصول PCR حاصل با استفاده از روش الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱٪ مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به محصول PCR و جایگاه اختصاصی هر آنزیم و با استفاده از نرم‌افزار DNAsis لیست آنزیم‌هایی که در محدوده ناحیه کنترلی mtDNA یعنی D-loop جایگاه اختصاصی دارند، مشخص گردید. جهت این کار نمونه‌ای از توالی DNA ماهی گورخری گنو که به روش تعیین توالی[2] تهیه شده بود، به نرم‌افزار داده شد. که در نهایت ۴۵ آنزیم محدودالاثر برای ما مشخص شد. در این راستا ۵ آنزیم محدودکننده با نام‌های *Alu*I, *Dpn*I, *Eco*47I, *Hin*dIII, *Hin*fI جهت هضم محصول PCR و مشاهده قطعات هضم شده بر روی ژل مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱. آنزیم‌های مورد استفاده و محل‌های قطع هر آنزیم

نام آنزیم	محل قطع آنزیم	تعداد باز محل شناسایی
*Alu*I	AG↓CT	۴
*Dpn*I	GA↓TC	۴
*Eco*47I	G↓GWCC	۵
*Hin*fI	G↓ANTC	۵
*Hin*dIII	A↓AGCTT	۶

نتایج

طول تقریبی قطعه تکثیر شده، در حدود ۵۵۰ جفت باز می‌باشد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی به روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز مورد سنجش قرار گرفت و پس از اطمینان از مطلوب بودن DNA نسبت به تکثیر ناحیه D-loop به کمک دستگاه PCR اقدام شد.

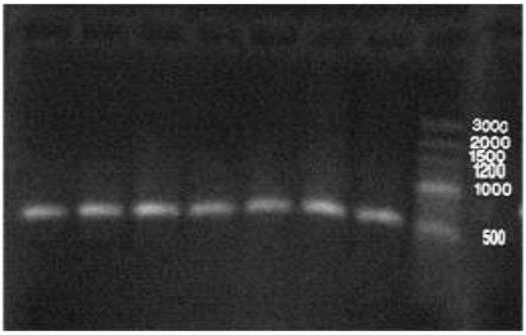
محصول هضم آنزیمی مربوط به هر آنزیم در هر ماهی به‌صورت جداگانه بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید برده شد. در همه نمونه‌ها مجموع اندازه باندها با اندازه محصول PCR برابری داشت. باندها قادر به نشان دادن اندازه عددی ژنوتیپ‌ها بودند.

اندازه قطعات ایجادشده بر اثر هضم آنزیمی

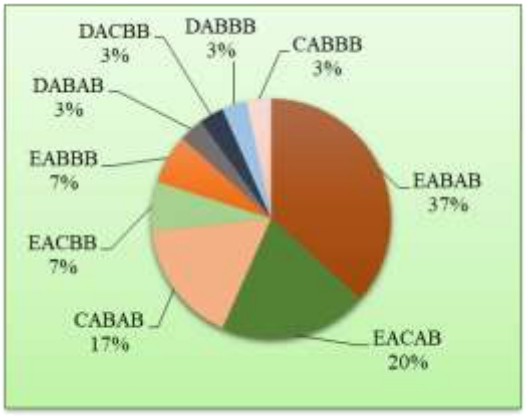
1. National Center for Biotechnology Information

2. Sequencing

محصول PCR برای هر آنزیم محاسبه گردید. بر اساس اندازه قطعات ایجاد شده، ژنوتیپ‌ها مشخص و نامگذاری گردید. ژنوتیپ‌های حاصله برای ۵ آنزیم محدودگر، ۹ هاپلوتیپ متفاوت را نشان دادند. از ۹ هاپلوتیپ مشاهده شده ۴ هاپلوتیپ شامل فراوانی ۳٪ بودند که هاپلوتیپ نادر[1] نامیده می‌شوند (DABAB، DACBB، DABBB، CABBB). هاپلوتیپ‌های EABAB، EACAB و CABAB به ترتیب با ۳۶، ۲۰ و ۱۶ درصد فراوانی، رایج‌ترین هاپلوتیپ‌های مناطق مورد بررسی بودند. تنوع هاپلوتیپی پس از آنالیز داده‌ها با ۵ آنزیم محدودگر نشان داد که ماهی گورخری گنو، ۹ هاپلوتیپ و ۱۰ سایت چندشکلی و ۱ لوکوس با تنوع هاپلوتیپی ۰/۷۹ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۱۹را دارا می‌باشد.



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR ماهی گورخری گنو برروی ژل آگارز ۱٪



شکل ۳. فراوانی هاپلوتیپ‌های به دست آمده از *Aphanius ginaonis*

جدول ۲. فراوانی هر یک از هاپلوتیپ‌های به دست آمده از *Aphanius ginaonis*

شماره هاپلوتیپ	هاپلوتیپ	فراوانی	درصد
۱	EABAB	۱۱	۳۷
۲	EACAB	۶	۲۰
۳	CABAB	۵	۱۷
۴	EACBB	۲	۷
۵	EABBB	۲	۷
۶	DABAB	۱	۳
۷	DACBB	۱	۳
۸	DABBB	۱	۳
۹	CABBB	۱	۳

بحث

مطالعه DNA میتوکندریایی در زمینه ژنتیک حفاظت، اهمیت خود را حفظ کرده است. به ویژه به علت استفاده از روش واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) برای تکثیر DNA حاصل از قطعات بافتی کوچک، به دست آوردن اطلاعات mtDNA گونه‌ها، زیرگونه‌ها و جوامع در معرض خطر، بسیار آسان‌تر شده است. امروزه مطالعات ژنتیکی با استفاده از روش RFLP و همچنین استفاده از دو یا چند روش هم زمان جهت تکمیل نتایج به دست آمده بسیار رایج و معمول می‌باشد (Eimanifar *et al*., 2006).

در این مطالعه آنزیم‌های محدودگر برای کشف موقعیت واقعی توالی نوکلئوتیدهای درون ژنوم موردنظر به کار رفتند. مقایسه موقعیت این توالی‌ها در میان نمونه‌های مورد مطالعه به مشاهده تفاوت در توالی ناحیه D-loop در منطقه mtDNA و در نتیجه به تخمین تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای منجر گشت. با توجه به تعداد نمونه‌های آنالیز شده در این تحقیق (۳۰ نمونه از چشمه آب گرم گنو) و مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج سایر مطالعات می‌توان گفت تحقیق حاضر یک مطالعه اولیه محسوب می‌شود.

تنوع بالای هاپلوتیپی نشان می‌دهد که تنوع در ژنوم میتوکندریایی ماهی آفانیوس در منطقه مورد مطالعه بالا است. در بین هاپلوتیپ‌های مورد مطالعه،

1. Rare Haplotype

هاپلوتیپ‌های نادری (با فراوانی ۱) دیده شد که احتمالاً یا در گذشته جزء هاپلوتیپ‌های غالب بوده و به مرور زمان جمعیت آنها کاهش یافته است، یا هاپلوتیپ‌های جدیدی هستند که در جمعیت ایجاد شده و ممکن است شرایط زیستی سبب افزایش تعداد آنها در آینده گردد و از وضعیت نادر خارج شوند و یا در اثر بروز موتاسیون و یا موارد نوترکیبی احتمالی به وجود آمده باشند.

در مطالعات انجام شده، شرایطی دیده شده است که در آن هاپلوتیپ‌های با فراوانی بسیار، کم بوده و در عوض هاپلوتیپ‌های نادر بسیار زیاد می‌باشند که این اغلب به دلیل وجود جهش‌هایی است که در آن جمعیت اتفاق افتاده است (Durna *et al*., 2010). میزان تنوع هاپلوتیپ می‌تواند از صفر (تمام افراد جمعیت دارای هاپلوتیپ یکسان) تا یک (همه افراد دارای هاپلوتیپ متفاوت) متغیر باشد. بر این اساس می‌توان گفت تنوع هاپلوتیپی در ماهی گورخری گنو بالا است.

در طول زمان، به دلیل خصلت سازگاری سریع ماهی گورخری گنو به محیط خود عادت کرده و صفات کاملا متمایزی را نشان داده است. در تحقیقی که توسط Hrbek انجام گرفت نیز نتایج مشابهی به دست آمد مبنی بر اینکه فعالیت‌های آتشفشانی و حرکات زمین در اوایل ائوسین میانی باعث شده جمعیت گونه آفانیوس در مرکز آناتولی مستور شده و جریان ژنی بین گونه‌های مذکور با افرادی که قبلاً جزء یک جمعیت محسوب می‌شدند متوقف گردد. در این شرایط، اختلافات بین گونه‌ای ایجاد شده، پس از مدت زمانی طولانی بر شکل ظاهری گونه‌های جدا شده نیز مشاهده می‌گردد.

به طور کلی می‌توان این گونه نتیجه‌گیری نمود که جدایی‌های جغرافیایی، تاریخچه ژئولوژیک، حرکات صفحات تکتونیکی در طول زمان در کنار مطالعات مولکولی می‌تواند چشم‌انداز روشن و واضحی از تاریخچه تکاملی گونه‌ها و حوادثی که در طول زمان رخ داده و باعث ایجاد گونه‌های حد واسط یا جدید شده‌اند در اختیار قرار دهد. باید توجه داشت مطالعات دقیق‌تر و کامل‌تری نیاز است تا همانند حلقه‌های زنجیر بتواند اطلاعات قبلی را کامل نماید.

هدف اصلی این پروژه ارزیابی اولیه تنوع ژنتیکی گونه آفانیوس با استفاده از روش RFLP بوده است، نتایج به دست آمده توانسته است اطلاعات پایه‌ای مفیدی را جهت انجام مطالعات تکمیلی بعدی فراهم آورد. این مطالعه با معرفی آنزیم‌هایی که قادر به ایجاد چندشکلی در این گونه آفانیوس بود بیان داشت که این آنزیم‌ها می‌توانند در تحقیقات RFLP بر روی سایر گونه‌های آفانیوس نیز مورد استفاده قرار گیرند. مطالعه حاضر نشان داد که ماهی گورخری گنو با وجود نادر و بومی بودن و ضمن قرار گرفتن در لیست IUCN، توانسته است نسبت به محیط زندگی خود سازش یافته و قادر به حفظ وضعیت و بقای ژنتیکی خود باشد. با این حال این نتایج تأکیدی بر ضرورت حفاظت فعال از این گونه است.

REFERENCES

Khajeh, P.; (2010). Genetic polymorphism study of *Aphanius ginaonis* (Holly, 1929) using dicotian D-loop mitochondrial region. M. Sc. thesis. 89 pages.

Coad, B.W.; (1988). *Aphanius vladykovi*, a new species of tooth-carp from the Zagros Mountain of Iran (Osteichthyes: Cyprinidontidae). Environmental Biology of Fishes; 23: 115-125.

Cronin, M.A.; Hilis, S.; Born, E.W.; Potton, C.; (2001). mtDNA variation in Atlantic and Pacific walruses. 1994. Genetics; 3(72): 1035-1043.

Durna, S.; Bradkci, F.; Degerli, N.; (2010). Genetic diversity of *Garra rufa* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia. Biochemical Systematics and Ecology; 30: 83-92.

Eimanifar, A.; Rezvani, S.; Carapetian, J.; (2006). Genetic differentiation of

Artemia urmiana from various ecological populations of Urmia Lake assessed by PCR amplified RFLP analysis. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology; 333: 275-285.

Esmaeili, H.R.; Ebrahimi, M.; Saifali, M.; (2008). Karyological analysis of five tooth-carps (Actinopterygii: Cyprinodontidae) from Iran. Micron; 39: 95-100.

Esmaeili, H.R.; Gholami, Z.; (2007). Investigation on the surface ultra-structure of scale of geno tooth-carp, *Aphanius ginaonis* (Holly,1929) (Actinopterygii: Cyprinodontidae) using scanning electron microscope. Iranian Journal of Biology; 20(2): 307-314.

Esmaeili, H.R.; Piravar, Z.; Shiva, A.H.; (2007). Karyological Analysis of Two Endemic Tooth-carp, *Aphanius persicus* ana *Aphanius sophiae* (Pisces, Cyprinodontidae), from Southwest Iran. Tark. Journal Zoology; 31: 69-74.

Hillis, D.M.; Moritz, C.; (1990). Molecular taxonomy. Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, Massachusetts. U. S. A. 120 p.

Hrbek, T.F.; Keivany, Y.; Coad, B.W.; (2006). New species of *Aphanius* (Teleostei, Cyprinodontidae) from Isfahan province of Iran and a reanalysis of other species. Copeia; 2: 244-255.

Reichenbacher, B.; Feulner, G.R.; Schulz-Mirbach, T.; (2009). Geographic variation in otolith morphology among freshwater populations of *Aphanius dispar* (Teleostei, Cyprinodontiformes) from the Southeastern Arabian Peninsula. Journal Morphology; 270: 469-484.