تحديد التنوع الجيني للأسماك العراقية باستخدام الشفرة الوراثية

Genetic diversity of Iraqi fish fauna using DNA barcoding

دراسة مقدمة الى مديرية تحسين البيئة الجنوبية

2020-2019

من قبل

الأستاذ المساعد الدكتور مصطفى سامي فداغ

علم البيئة الجزيئي

قسم الفقريات البحرية- مركز علوم البحار- جامعة البصرة

تحديد التنوع الجيني للأسماك العراقية باستخدام الشفرة الوراثية

Genetic diversity of Iraqi fish fauna using DNA barcoding

دراسة مقدمة الى مديرية تحسين البيئة الجنوبية

من قبل

الأستاذ المساعد الدكتور مصطفى سامي فداغ

قسم الفقريات البحرية- مركز علوم البحار- جامعة البصرة

الهدف من الدراسة: أنشاء قاعدة بيانات للشفرة الجينية للأسماك العراقية في المياه العذبة والبحرية وايداعها في البنك الجيني NCBI بالتعاون بين المتخصصين في مركز علوم البحار ومديرية بيئة الجنوب.

الغاية: توثيق الشفرة الجينية للأسماك العراقية في البيئات المختلفة العذبة والبحرية وتسجيل الأنواع العراقية في البرنامج العالمي للتنوع الأحيائيFISH-BOL والبنك الجيني NCBI ورصد الأنواع الجديدة والتغير في الأنواع.

مقدمة

أن مسؤوليتنا في مراكز البحث العلمي بالتعاون مع الدوائر التنفيذية المسؤولة أتجاه الأحياء في البيئة العراقية تفرض أن نتقصى ونتعرف ونشخص التنوع الأحيائي في البيئات المائية في العراق. أن البيئة العراقية الغنية بالتنوع البيئي أتاحت للأسماك الانتشار واستغلال تلك البيئات المتنوعة. بل هناك نظرية كون بلاد ما بين النهرين مركز لنشوء الأنواع.

أن التعود على رؤية الأنواع يجعل من الصعب على العين المجردة تمييز الاختلافات الطفيفة بين الأنواع ولذلك فأن بعض هذه الأنواع تعرف وتصنف خطأً والبعض الأخر غير مصنف لحد الأن. ومن جهة أخرى فأن تصنيف الأسماك بالطرق الكلاسيكية عملية غير يسيرة لغير المتخصصين.

طرق التصنيف القديمة المتبعة

الصفات المظهرية والعددية Morphological and Meristic Characteristics (Biometry)

اعتمدت الصفات المظهرية والعددية في تعريف وتصنيف الأسماك في البيئات المائية العراقية والبيئات المرتبطة بها. بيد ان هذه الطريقة سببت أخطاء في التفريق بين الأنواع أحيانا بسبب تداخل الصفات بين الأنواع وتفريق جماعات تابعة لنفس النوع بسبب ان مدى قياسات الصفات للنوع واسعة وقابلة للتفريق.

التكوين العظمي Osteological composition

استخدمت التكوينات العظمية كعدد الفقرات وتقوس الهيكل العظمي وعظام الجمجمة وشكل الأطراف. وفي الأسماك تعتمد الأسنان البلعومية والأقواس الغلصمية.

الترحيل الكهربائي للبروتينات Proteins Electrophoresis

وفي زمن متأخر اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي للبروتينات والتي كانت كفوءة في التفريق بين الأنواع. ولكن بالرغم من نجاحها في التمييز بين الأنواع إلا انها فشلت في التفريق بين الأنواع الثانوية.

المؤشرات الجينية Genetic markers

أن دراسة التنوع الأحيائي تتطلب الدقة في تعريف الأنواع ولذلك فقد استخدمت الجينات في تعريف والتفريق بين الأنواع وانشاء شجرة علاقات وراثية بين هذه الأنواع. بعد اكتشاف طريقة التفاعل البوليميريزي المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) ومنها طريقة تعدد الأشكال الوراثية لقطع مضخمة Restriction Fragment Length polymorphism DNA (RFLP). باستخدام الأنزيمات القاطعة وتعتمد هذه الطريقة على انتخاب جين وتضخيمه وبعد ذلك يقطع باستخدام أنزيم قاطع أو أكثر وترحيل نتيجة القطع كهربائيا لمعرفة الاختلاف في أطوال القطع ما بين الأنواع. أما طريقة الأشكال الوراثية للتضخيم العشوائي للذخيرة الجينية Random Amplification Polymorphism DNA (RAPD) باستخدام بادئات عشرية والتي تقوم بتضخيم قطع متعددة متباينة الأحجام وترحيل نتائج التضخيم كهربائيا تظهر صورة تمثل بصمة جينية للنوع. وطريقة Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) وطريقة توابع الكروموسومات Simple Sequence Repeat (SSR)

Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMPO) وهي تضخيم منطقة ملحقة بالكروموسومات تتكرر فيها النيوكليوتيدات. وهناك طرق عديدة أخرى غير مشهورة استخدمت لإظهار المؤشرات الجينية.

الشفرة الوراثية DNA barcoding

تقسم الأسماك تبعا للبيئة التي تعيش فيها الى قسمين أسماك بحرية وأسماك مياه عذبة وقسم ثالث يفضل المياه المويلحة.

تتألف المياه العذبة في العراق من عدة أنواع من الأنظمة البيئية المائية وتتضمن الأنهار (الفرات ودجلة وشط العرب) والبحيرات والخزانات والأهوار. تختلف هذه الأنواع من البيئات المائية في الصفات البيئية و الأحواض التي تحتويها وبعد ذلك فهي تختلف في الأحياء التي تقطنها.

تأريخيا, أخذت الأسماك قيمة معنوية في حياة الشعب العراقي في الجانب التغذوي والبيئي والاقتصادي. أن العدد الأكبر من الأسماك العراقية في المياه العذبة تعود الى عائلة الشبوطيات Cyprinidae. هناك أكثر من 32 نوعا منها تعود الى 16 جنسا (Coad, 1998: Coad and Hussain, 2007) وهذا يمثل النصف تقريبا من 65 نوعا سجلت في العراق لأخر تحديث لقائمة الأسماك في المياه الداخلية العراقية والأنواع الباقية تعود الى 15 عائلة (الفيصل.

هناك دراسات كثيرة عالمية .(Heckle, 1843; Gunther, 1868 Berg, 1949; Karaman, 1971) ومحلية كدراسة خلف, 1961 الذي سجل 45 نوعا ودراسة مهدي 1962 ودراسة الحامد 1966 ودراسة مهدي وجورج 1969 والناصري وشمس الهدى 1976. أما دراسة الدهام 1977 الذي نشر كتابا بذلك. وقد لاحظ Banister (1980) أن بعض تلك التسجيلات كانت جمعا للبحوث المنشورة. وان قسما منها لم تكن موجودة في المياه العذبة العراقية لأسباب التوزيع الجغرافي. وقد سجل الرواي وجماعته 1978 قائمة لتجمعات الأسماك في نهر الزاب الصغير. وقد أصدر العالم براين كود 2010 كتابا حول الأسماك العراقية.

أن أحد أهم الأسباب الرئيسة في التشويش في وصف وتسمية الأسماك العراقية هو التشابه المظهري في الأنواع التي تعود الى نفس الجنس والى تجميع البيانات المنشورة من غير فحص الأنواع فعلا (Banister, 198).

أنجزت الدراسات التصنيفية عن الأسماك العراقية بأتباع القياسات المظهرية والعددية مثل عدد الزعانف والأشعة الزعنفية, متفرعة أوغير متفرعة, مرنة أو متصلبة, المسننة أو غير المسننة ، وعدد الحراشف في الخط الجانبي ، الطول الكلي والقياسي ، عرض الجسم ، والنسبة المئوية لطول الرأس إلى أطوال الجسم Heckel، 1843 ؛ Berg، 1949 ؛ Karaman، 1971 ؛ Almaca, (1984 ,Chen, 1989;) ، وعدد الأقواس الغلصمية، الأسنان البلعومية وبعض الصفات الأخرى في العظام (.Chen et al، 1984). ومع ذلك، فإن هذه الصفات المظهرية لها قيمة محدودة لأغراض التعريف والتمايز على مستوى الجنس، (على سبيل المثال *Barbus*) لأن هذه القياسات الحيوية تُظهر تباينًا كبيرًا داخل الأنواع بينما الاختلافات بين الأنواع صغيرة (Ochando and Callejas, 1998).

تم استخدام الترحيل الكهربائي للبروتين للتمييز بين أنواع *Barbus* الأوروبية (Berrebi ، وآخرون ، 1990 ؛ 1995 ؛ Machordom وآخرون ، 1990 ؛ 1995 ؛ Karakousis وآخرون ، 1995) ، وبعض الشبوطيات بما في ذلك الأنواع *Barbus* في العراق (على سبيل المثال: الحسن ، 1984 ، 1985 ؛ الفيصل

، 2008). لكن هذه التقنية غير قادرة على التمييز بشكل كامل بين الأنواع (Callejas و Ochando، 1998).

يحتوي جنس *Barbus* في العراق على أكثر أنواع الأسماك شعبية، وإن التحديد الدقيق في هذا الجنس معقد إلى حد ما بسبب التباينات البيئية والعمر، والتركيبة السكانية والتهجين (Almaca ، 1989).

في الآونة الأخيرة، سمح استخدام تقنية التفاعل البوليميريزي المتسلسل (PCR)بإجراء العديد من الدراسات بشكل أسرع وأسهل.

إن PCR عبارة عن تقنية مختبرية تستخدم إنزيم DNA polymerase وتسلسل oligo-primer لتضخيم جزء مستهدف من الجينات الى ملايين النسخ من أجل دراسة خصائصه (Williams et al، 1990).

تقنية PCR خففت الكثير من الجهود التجريبية في البيولوجيا الجزيئية وحسنت بشكل كبير من حساسية العديد من الإجراءات التشخيصية. لذلك، فإن المزايا العملية لـ PCR لها تأثير عميق على مجالات علم اللاهوت الجزيئي والبيولوجيا المقارنة (Kocher, 1992).

في الوقت الحالي، بدأ الباحثون في تطبيق هذه التقنيات الجديدة المستندة إلى تقنيات PCR مثل الحمض النووي المؤتلف وتعدد الأشكال الوراثية للحمض النووي وبيانات تسلسل الحمض النووي لحل المسائل المتعلقة بتصنيف الأسماك، والتطور، وعلم الوراثة السكانية، والبيولوجيا التطورية.

بسبب المهام العديدة لتطبيقات المؤشرات الجينية لدراسة البنية التصنيفية والجغرافية الحيوية والسكان وتحليل الجينات وتحليل الوالدين، كان هناك مجال جديد في العلوم البيولوجية "البيئة الجزيئية" (Bouck and Vision, 2006). أن علم البيئة الجزيئية ينحدر من العديد من التخصصات العلمية، بما في ذلك البيولوجيا الجزيئية، والبيئة، والتطور، وعلم الوراثة، والسلوك (Hinten, 2006)

تهدف البيئة الجزيئية إلى تحقيق أساس الاستجابات الجينية للتنوع البيئي وفهم توزيع التباين المظهري والنمط الوراثي في المجموعات الطبيعية في مصطلح القوى التطورية مثل الانجراف والاختيار والطفرة والهجرة (Lee and Mitchell- ؛ Vasemagi and Primmer, 2005 ; Feder and Mitchell-Olds, 2003 Olds, 2006).

أن التطور في حقل الذخيرة الجينية Genome والمعلوماتية الحياتية لها أهمية كبيرة لتعزيز العديد من المواضيع في حقل البيئة الجزيئي (Foresti, 2008). وهكذا فأن علماء البيئة الجزيئي يعملون بجد على الأنماط والطرق المعقدة للتنوع الأحيائي على جميع المستويات من الجين والفرد والجماعة والنوع الى النظام البيئي ولكن من مفهوم مركزية الجين. أن العديد من الدراسات والمحلية استعملت الطرق السهلة في فحص الحمض النووي واختلافاته. بينما في البرامج العالمية المعتمدة فقد ركزت على استعمال التتابع النيوكليوتيدي Sequence لجين أو أكثر لكل نوع وأيداع البيانات في البنك الجيني وبنوك برامج أخرى مثل IBOL وهو البرنامج العالمي للشفرة الجينية للأحياء.

إن عدم حصول ازدواج في الحمض النووي المايتوكونديري mtDNA والميراث الأمومي يجعل من الممكن تقييم مدى التهجين بين أنواع الأسماك وتحديد التغيرات الناتجة عن التهجين المحتمل (Callejas و Ochando، 2000). وقد استخدم البحث المنهجي الأخير لهذه العائلة أسلوبًا نسجيًا جزيئيًا ، حيث تم استخدام بيانات تسلسل الميتوكوندريا بسهولة أكبر بينما استخدم جيل وآخرون (2001) الرنا الرايبوزي S16 للميتوكوندريا وجينات *Cyt b* وبيانات تسلسل المنطقة المنظمة لحل العلاقات التطورية في Cyprinidae.

بينما الجين *Cyt b* لتقدير العلاقات التطورية واستنتاج العلاقات التطورية لأنواع الأسماك في آسيا وأوروبا وأمريكا الشمالية.

كان هناك تساؤلات مهمة، هل يمكن اعتبار الشرق الأوسط مركزًا لنشوء الأنواع أو كمنطقة مرور حيوانية؟ الذي يحتوي على جزء من cyprinids ماهو التوزيع الجغرافي؟ أيضا ما هي الروابط مع غيرها من الأنواع السمكية الموجودة في أوروبا وآسيا وأفريقيا؟ لتوضيح الوضع المنهجي لأصناف الشرق الأوسط باستخدام التباين الوراثي لجين السايتوكروم سي والسايتوكروم ب المستخدم في الدراسات الوراثية والكشف عن حقائق جديدة تتعلق بمصدر الإسماك الشرق أوسطي.

المؤشرات الجينية العشوائية:

طريقة التضخيم العشوائي للحمض النووي متعدد الأشكال الوراثية: أن هذا التحليل The random amplification polymorphic DNA (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) تعتمد على تقنية التفاعل البوليميريزي المتسلسل PCR وتستعمل معها بادئات عشرية النيوكليوتيد لغرض مسح كلي للجينوم المستهدف. بيد أن الباحثين Welsh and McClelland (1990) استعملا بادئات عشوائية تتكون من 20 قاعدة نيتروجينية وهي تعطي حزم بأنماط مفيدة معلوماتيا.

أن المؤشرات العشوائية تستخدم لتحليل التنوع الجيني للجماعات الطبيعية والمستزرعة لأنواع الأسماك (Orban and Wu, 2008).

أن طريقة RAPD قادرة على كشف التغيرات الجينية النووية في الأنواع المحفوظة جدا (Bielawski and Pumo, 1997). وقد استعملت الطريقة بكفاءة للكشف عن الهجائن وامهاتها (Yan et al, 2005).

وأن هذه الطريقة سهلة التطبيق ومفيدة في دراسة الأنواع التي لا تتوفر أي معلومات عن الذخيرة الجينية لها. وهي طريقة كفوءة ودقيقة للتمييز بين الأنواع من الطرق الأخرى(Rastogi *et al*., 2007) .

أن ناتج الطريقة العشوائية هو "بصمة جينية جزيئية" والتي تتكون من عشرات المؤشرات الجينية عند ترحيلها على هلام الأكروز بوجود صبغة بروميد الأثيديوم (Gil, 2007; Orban and Wu, 2008Gil, 2007; Orban and Wu, 2008) .

هناك العديد من التطبيقات لبصمة RAPD في حقل البيئة الجزيئي بضمنها تحديد الهوية التصنيفية,

الكشف عن سريان الجينات بين الأنواع، تقدير علاقات القربى وتحليل نماذج الذخائر الجينية المختلطة وأنتاج مؤشرات جينية متخصصة (Hydrys et al, 1992). أن الصفات الجيدة للبصمة العشوائية تستند

على حقيقة انها طريقة لاتعتمد على معرفة التتابع وكل باديء يرتبط بالحمض النووي المستهدف سينتج طيف مختلف من القطع التي تعتبر بصمة مختصة بالجين (Rastogi *et al.*, 2007). وكذلك تستعمل للتصنيف على مستوى الجماعات, لاتحتاج أي معلومات مسبقة عن تتابع الحمض النووي القالب وقليلة الكلفة نسبياً بالمقارنة مع الطرق الأخرى, تستهدف عدة مواقع في تسلسل الحمض النووي في النموذج, تنتج نمطاً من خزم الحمض النووي يسمح بالمقارنة بين عدة مواقع.

ولكن هناك بعض المحددات في الطريقة العشوائية مثل حساسيتها لظروف التفاعل، وأحيانًا منتج تضخيم غير قابل للتكرار واحتمال ترافق انتقال الحزم المتضخمة المتباينة في الحجم (Callejas and Ochando, 2002). بيد أن معظم علامات الطريقة العشوائية السائدة والمتنحية لا تعمل في كل سلالة أو جماعة (Benter *et al.*, 1995). ومع ذلك، يمكن حل هذه المشكلات باتباع بروتوكول صارم مع شروط موحدة، وتكرار التفاعل من أجل رؤية وتسجيل الحزم القابلة للتكرار، وزيادة دقة فصل الفرقة (Hadrys *et al.*، 1992).

أ.م. د. مصطفى سامي فداغ

قسم الفقريات البحرية

مركز علوم البحار

جامعة البصرة

Faddagh2003@yahoo.com

Genetic diversity of Iraqi fish fauna using DNA barcoding

A study introduced to

Directorate of Protect and Improve the Environment the Southern

2020-2019

By

Assist. Prof. Dr. Mustafa Sami Faddagh

Dept. Marine Vertebrate- Marine Science Centre

University of Basrah