شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

صفحات ۲۰-۱۱

جدا سازی ژن GH-1 از GH-2 در ماهی سفید به وسیله توالی یابی و استفاده از آنزیمهای برشی

نجمه برنجکار[۱]، محمد کاظم خالصی*[۲]، قدرت رحیمی[۳]، ایوب فرهادی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲. استادیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳. استاد، آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۴. استادیار آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۴

چکیده

در ژنوم ماهیان در اثر فرآیند مضـاعف شـدن در طول تکامل، دو کپی از هورمون رشـد (GH-1 و GH-2) وجود دارند. هدف از پژوهش حاضـر جداسـازی ژن GH-1 ز GH-2 در ماهی سفید دریای خزر با استفاده از تکنیک توالی یابی و معرفی آنزیم های برشی اختصاصی برای این دو جایگاه می‌باشـد. به این منظور، ۵ قطعه ماهی سـفید به طور تصـادفی انتخاب و نمونه‌های مورد نیاز برای استخراج DNA از باله دمی جداسـازی شـدند. پس از استخراج DNA به روش نمکی بهینه یافته، قطعه هایی به اندازه ۳۳۳ و ۴۱۰ جفت باز از ناحیه اگزون ۴، اینترون ۴ و اگزون ۵ ژن GH-1 و GH-2 تکثیر و پس از خالص سـازی از روی ژل توالی یابی شدند. توالی جایگاه GH-1 ماهی سفید با توالی GH-1 ماهی کپور معمولی بر روی آلل بلند هیچ گونه تفاوتی نشان نداد و ۱۰۰٪ با یکدیگر هم پوشانی داشتند. اما با توالی GH-1 کپور معمولی بر روی آلل کوتاه در چهار موقعیت ۸۹، ۹۴، ۱۰۵و ۱۶۴ جفت بازی تفاوت داشـته و درصـد هم پوشـانی آن ها ۹۹٪ بود. میزان هم پوشانی GH-1 با توالی GH-2 ماهی کپور معمولی و GH-2 ماهی سفید به ترتیب ۹۹٪ و ۸۶٪ بود. مقایسه توالی های به دست آمده از GH-1 و GH-2 ماهی سفید با یکدیگر نشان داد که تفاوت عمده این دو نسخه در طول اینترون ۴ است. سایر تفاوتها در جهشهای یک یا چند نوکلئوتیدی است. علی رغم وجود شباهت زیاد در توالی نوکلئوتیدی، تفاوتهای موجود به عنوان نشانگرهای ژنتیکی اختصاصی برای جداسـازی GH-1 از GH-2 کاربرد دارند. با شـناسایی و توالی یابی ژن های GH-1 و GH-2، توالی های به دست آمده را می توان برای بازسـازی روابط فیلوژنتیکی، بررسـی دقیق تر شـکلهای مختلف آللی، و ارتباط این جایگاه ها با صفات مهم اقتصادی در ماهی سفید دریای خزر به کار برد.

واژگان کلیدی: GH-1، GH-2، توالی یابی، آنزیم های برشی، ماهی سفید

* نویسنده مسئول مکاتبه Email: khalesi46@gmail.com

۱. مقدمه

ماهی سفید[2] دریای خزر در بین ماهیان استخوانی یکی از گونه های با ارزش اقتصادی در حوزه جنوبی این دریا می‌باشد که با توجه به لذیذ بودن، ارزش غذایی بالا و کیفیت عالی گوشت بیش از ۵۰ درصد کل صید این ماهیان را به خود اختصاص می‌دهد (Ghasemi *et al*., 2008). هورمون رشد در غده هیپوفیز همه ماهیان، به استثنای ماهیان دهان گرد وجود دارد (Sattari, 2001). در بسیاری از گونه های ماهیان، دو ژن ناپیوسته پارالوگ (حاصل از دوبرابر شدن) و وظیفه‌مند از هورمون رشد یعنی GH-1و GH-2 وجود دارند (Devlin, 1993).

مطالعات هیبریداسیون DNA نشان دادند که در ژنوم کپور معمولی دو هورمون رشد مجزا وجود دارد (Koren *et al*., 1989). طبق مطالعات انجام شده مشخص شده است که ساختار ژن هورمون رشد در بین ماهیان استخوانی یکسان نیست. به طور مثال، در کپور ماهیان همانند پستانداران، این ژن دارای پنج اگزون و چهار اینترون است در حالیکه در دیگر ماهیان همانند سایر مهره داران بوده و شامل شش اگزون و پنج اینترون می‌باشد به طوریکه در آن ها اگزون پنجم به وسیله یک اینترون به دو اگزون تقسیم شده است (Ohkubo *et al*., 1996).

علاوه بر این، ثابت شده است که ژن هورمون رشد ماهیان سطوح بالاتری از تنوع و نرخ تکامل را نسبت به سایر مهره داران به نمایش می‌گذارد (Ryynanen and Primmer, 2006) که به احتمال زیاد می‌توان آن را از نظر حضور دو نسخه‌ی عملکردی ژن توجیه کرد (Pankova *et al*., 2013). این هورمون برای رشد توده بدنی و تولیدمثل در ماهیان استخوانی و سازگاری اسمزی در ماهیان یوری هالین ضروری است (Sciara *et al*., 2006). همچنین در میان مهره‌داران، هورمون رشد برای رشد عادی الزامی بوده و در تنظیم بسیاری از فرآیندهای آنابولیک موثر می باشد (Xu *et al*., 2001). علاوه بر این هورمون رشد می‌تواند به عنوان یک عامل مهم محرک رشد در آبزی پروری نقش ایفا کند (Zohar, 1989).

به طور معمول هدف اصلی در آبزی پروری بهبود رشد موجود پرورشی است. مطالعاتی که روی حیوانات انجام شد دلالت بر این دارد که ژن هورمون رشد می‌تواند به عنوان یک ژن کاندید برای صفات تولیدی همانند رشد (Tambasco *et al*., 2003) مقاومت در برابر بیماری و تولید تخم (Duan, 1997) میزان چربی (Knorr *et al*., 2003) در نظر گرفته شود. بنابراین جایگاه ژن هورمون رشد به عنوان یک جایگاه صفات کمی (QTL) مورد آزمون قرار گرفته (Kang *et al*., 2002) و بنابراین یک هدف بالقوه برای مطالعه تنوع ژنتیکی مرتبط با صفات رشد و ژن کاندیدای موثر برای برنامه های انتخاب به کمک نشانگر (MAS)[3] محسوب می شود (Ni *et al*., 2012). همچنین، ماهیت دونسخه‌ای این ژن برای بررسی تکامل مولکولی ارزشمند است و می تواند برای درک بهتر تکامل ژن تکراری پس از دونسخه‌ای شدن ژنوم و مسیرهای درگیر در حفظ و واگرایی تکرارهای ژنی مفید باشد (Oakley and Phillips, 1999; Murakaeva, 2008).

آگاهی پیرامون تفاوتهای توالیها نه تنها جهت ارزیابی وظیفه‌مندی فرآورده‌ی ژن، بلکه برای بررسیهای تنظیم ژن مهم است (Larhammar and Risinger, 1994). همچنین با توجه به شباهتی که بین جایگاه‌های GH-1 و GH-2 وجود دارد شناسایی آنزیم هایی که بتوانند منحصراً یکی از این دو جایگاه را به صورت اختصاصی برش دهند، در مطالعات مولکولی و بررسی چند شکلی های این جایگاه حائز اهمیت است. در این پژوهش جایگاه های GH-1 و GH-2 برای اولین بار در ماهی سفید توالی‌یابی شد. همچنین پژوهش حاضر با هدف تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای توالیهای GH-1 و GH-2 در ژن هورمون رشد *R. kutum* با کمک تکنیک توالی‌یابی و آنزیم های برشی صورت گرفت تا میزان هم پوشانی و تفاوت عملکرد آنزیمهای برشی در آن ها روشن گردد. به علاوه، توالیهای GH-1 و GH-2 ماهی سفید با توالی های مشابه در ماهی کپور معمولی مورد مقایسه قرار گرفت تا جایگاه رده‌بندی این دو گونه نسبت به هم با وضوح بیشتری مشخص شود. روی هم‌رفته، توالی‌یابی و بررسی تفاوتهای موجود در ژن GH-1 و GH-2

[1] *Rutilus kutum*

[2] Marker assisted selection

ماهی سفید به عنوان نشانگرهای ژنتیکی اختصاصی در این پژوهش صورت گرفت تا امکان کاربرد توالیهای به دست آمده برای بازسازی روابط فیلوژنتیکی، بازبینی دقیقتر شکلهای مختلف آللی، و ارتباط این جایگاه‌ها با صفات مهم اقتصادی در ماهی سفید دریای خزر فراهم گردد.

۲. مواد و روشها

۱.۲. نمونه برداری و استخراج DNA

نمونه‌گیری به میزان ۲-۳ گرم از باله دمی پنج قطعه ماهی سفید از کارگاه شهید رجایی ساری انجام شد. نمونه‌های باله دمی در الکل ۹۶ درصد فیکس و سپس تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی دام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل و DNA ژنومی با استفاده از روش نمکی بهینه‌یافته استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد.

۲.۲. تکثیر قطعاتی از ژن های GH-1 و GH-2 ماهی سفید دریای خزر

از یک جفت آغازگر اختصاصی (جدول ۱) برای تکثیر قطعاتی به طول ۳۳۳ جفت‌باز (GH-1) و ۴۱۰ جفت‌باز (GH-2) از ناحیه اگزون ۴، اینترون ۴ و اگزون ۵ استفاده شد (Gross *et al.*, 1996) (جدول ۱). مخلوط واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر یک برابر PCR، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲۰۰ میکرومول dNTP و یک واحد آنزیم Taq- پلیمراز و آب دی یونیزه تهیه شد. تکثیر جایگاههای مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر (BioRad) با شرایط ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه واسرشته سازی اولیه، ۳۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگرها در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. کیفیت محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ و طول قطعه تکثیر شده با نشانگر وزن مولکولی شرکت فرمنتاز (mi-E8200s) مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر قطعات ۳۳۳(GH-1) و ۴۱۰ (GH-2) جفت‌بازی از ناحیه اگزون ۴، اینترون ۴ و اگزون ۵ ماهی سفید

منبع	توالی ($5^{/}$---$3^{/}$)	آغازگر
Gross *et al.* (1996)	5'-GGAAGCTTAACCCCAACCAGCTCACTGAGAA-3'	رفت
	5'-CTACAGGGTGCAGTTGGAATCCAG-3'	برگشت

۳.۲. توالی‌یابی قطعات DNA تکثیرشده

برای بررسی دقیقتر و وضوح بیشتر و اطمینان از تکثیر هر دو نسخه ژن هورمون رشد، محصولات PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ درصد به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با ولتاژ ۴۰۰ ولت الکتروفورز شدند. برای رنگ‌آمیزی ژل اکریل‌آمید از نیترات نقره استفاده شد (Xu *et al.*, 2001). پس از رنگ‌آمیزی دو باند، به اندازه ۳۳۳ و ۴۱۰ جفت‌باز مشاهده شد. هر کدام از باندهای مشاهده شده به وسیله اسکالپل از روی ژل اکریل‌آمید جدا شده، با ۵۰ میکرولیتر آب مقطر در دستگاه PCR با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس هر یک از استوک های به دست آمده مجدداً با واکنش PCR با شرایط دمایی مشابه مرحله اول و با مخلوط واکنش به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۵۰ نانوگرم از هر یک از استوک ها، ۲/۵ میکرولیتر بافر

یک برابر PCR، ۱/۵ میلی مولار MgCl۲، ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲۰۰ میکرومول dNTP و یک واحد آنزیم Taq- پلیمراز و آب دی یونیزه تکثیر شدند. سپس محصولات به دست آمده از روی ژل آگارز جدا سازی شده، پس از انجام مراحل خالص سازی توالی یابی توسط دستگاه ABI3730XL96LB انجام شد.

۴.۲. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک توالیهای به دست آمده

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک توالی های به دست آمده از تعیین توالی ژن هورمون رشد (GH-1) و (GH-2) ماهی سفید و مقایسه آن ها با یکدیگر و با توالی های GH-1 و GH-2 ماهی کپور معمولی و سایر گونه های ماهیان به کمک نرم افزار BioEdit (version7.0.9.0) صورت گرفت. همچنین میزان تشابه توالیهای به دست آمده باهم و با توالیهای مشابه در سایر گونه ها با استفاده از بلاست نوکلئوتیدی در سرور بانک ژنی (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک برای شناسایی آنزیم های برشی اختصاصی در دو جایگاه GH-1 و GH-2 ماهی سفید در سایت Nebcutter (www.tools.neb.com) به منظور شناسایی جایگاه های برش آنزیمی منحصر به فرد در هر جایگاه انجام شد.

۳. نتایج

۱.۳. توالی‌یابی جایگاه GH-1 و GH-2 ماهی سفید و مقایسه آن‌ها با هم

نتایج حاصل از PCR تکثیر موفقیت آمیز قطعه‌های مورد نظر از هر دو نسخه هورمون رشد ماهی سفید را به ترتیب با طول های ۳۳۳ و ۴۱۰ جفت باز نشان داد. توالیهای حاصل از توالی‌یابی قطعات تکثیر شده در شکل ۱ نشان داده شده‌اند. توالیهای مربوط به ژن GH-1 و GH-2 ماهی سفید دریای خزر که در این پژوهش به دست آمدند در بانک ژنی NCBI و با شماره‌های دسترسی KM924290.1 و 1909691 ثبت شدند.

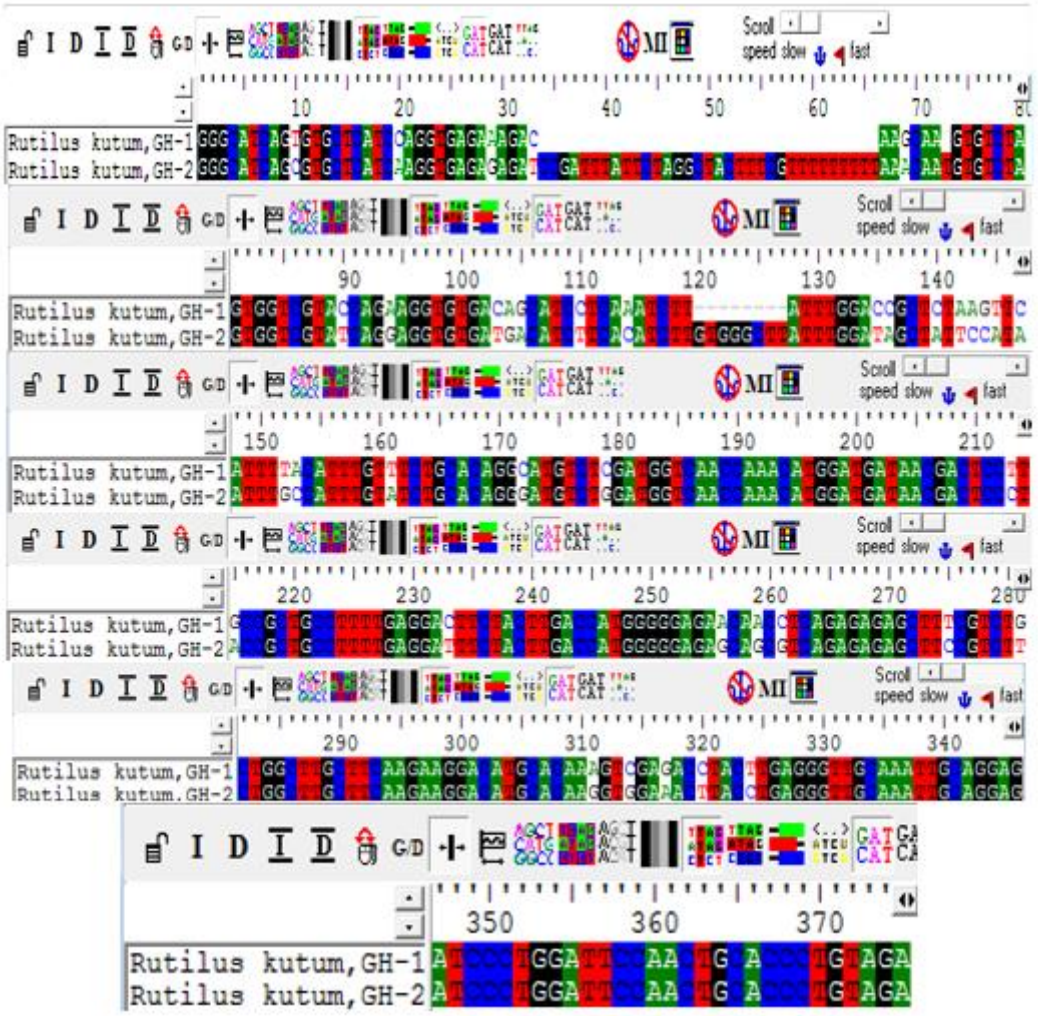
توالیهای به دست آمده در این پژوهش از جایگاه GH-1 و GH-2 ماهی سفید تفاوت های زیادی را با یکدیگر نشان دادند و درصد همپوشانی آنها ۸۶٪ بود (شکل ۱). تفاوتهای بین جایگاه‌های GH-1 و GH-2 ماهی سفید در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

۲.۳. مقایسه توالیهای جایگاه GH-1 و GH-2 ماهی سفید با سایر گونه‌های خانواده کپور

توالی جایگاه‌های GH-1 و GH-2 ماهی سفید با سایر گونه‌های خانواده کپور مورد مقایسه قرار گرفت. میزان هم پوشانی توالی GH-1 ماهی سفید با توالی های ثبت شده از این جایگاه در ماهی کپور معمولی بیشترین هم پوشانی را نشان داد که به ترتیب با توالی GH-1 ماهی کپور معمولی بر روی آلل بلند (با شماره دسترسی AY553378.1) (۱۰۰٪)، سپس با توالی GH-1 ماهی کپور معمولی بر روی آلل کوتاه (با شماره دسترسی AY553379.1) که تنها در چهار موقعیت ۸۹، ۹۴، ۱۰۵و ۱۶۴ جفت بازی تفاوت داشت و با توالی GH-2 ماهی کپور معمولی (با شماره دسترسی AJ640136.1) (۹۹٪) بود. بررسی هم‌پوشانی توالی GH-1 ماهی سفید با سایر گونه ها بیشترین هم‌پوشانی را به ترتیب با ماهی آمور۴ (با شماره دسترسی: X60474.1)، فیتوفاگ۵ (با شماره دسترسی: X60475.1)، کپور سرگنده۶ (با شماره دسترسی: X60473.1)، کپور سیاه۷ (با شماره دسترسی: AF389238.1)، ماهی خواجو۸ (با شماره دسترسی: EF611098.1)، لای ماهی۹ (با شماره دسترسی: HM114351.1) و کاتلا۱۰ (با شماره

[۴] *Cetenopharyngodon idellus*
[۵] *Hypophthalmichthys molitrix*
[۶] *Hypophthalmichthys nobilis*
[۷] *Mylopharyngodon piceus*
[۸] *Schizotorax prenanti*
[۹] *Tinca tinca*
[۱۰] *Catla catla*

دسترسی: AY053360.1) نشان داد (جدول ۳).



شکل ۱- توالی حاصل از توالی یابی جایگاه GH-1 (بالا) و GH-2 (پایین) در ماهی سفید و مقایسه آنها. نوکلئوتیدهای فاقد رنگ نشان‌دهنده تفاوتهای بین دو توالی است.

۳.۳. بررسی تفاوت آنزیمهای برشی دو جایگاه GH-1 و GH-2 در ماهی سفید

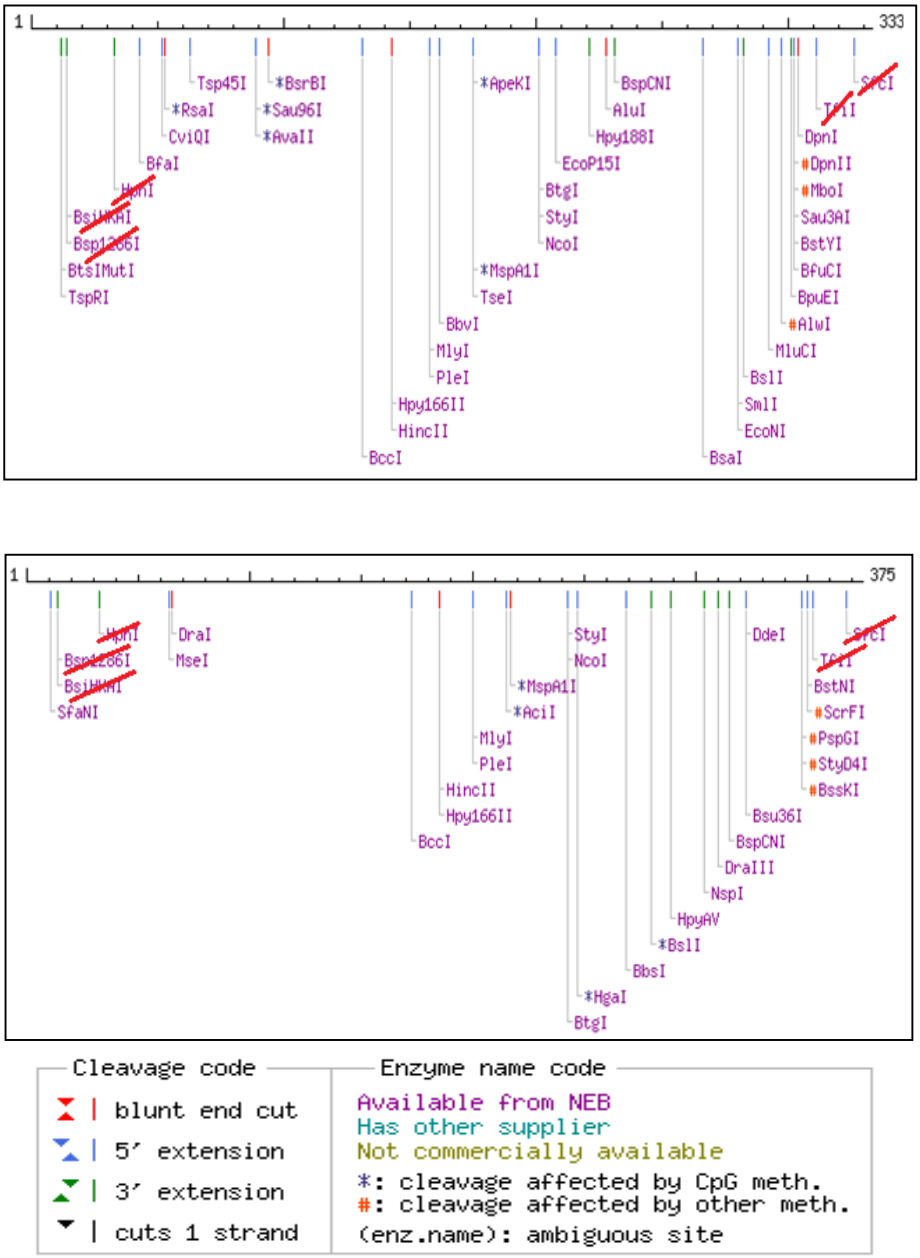
این دو جایگاه از نظر توالی به یکدیگر شبیه هستند اما از نظر طول توالی با یکدیگر تفاوت دارند. با بررسی توالیهای به دست آمده در پژوهش حاضر مشخص گردید که برخی از جایگاههای برش آنزیمهای برشی در آنها به صورت منحصر به فرد وجود دارند. بنابراین، با گرفتن آنزیمهای برشی هر یک از این جایگاه‌ها، آنزیمهای متفاوت برای هر یک از آنها مشخص شد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود آنزیمهای مشابه خط خورده‌اند و از سایر آنزیمها می‌توان برای جداسازی جایگاه مشابه در دیگری استفاده کرد.

جدول ۲- تفاوتهای نوکلئوتیدی مشاهده شده بین GH-1 و GH-2 در ماهی سفید

موقعیت	تفاوتهای نوکلئوتیدی	
	GH-1	GH-2
۱۰	T	C
۲۰	C	A
بین ۳۳ و ۳۴	-	CCGATTTATTCTAGGCTACTTTCGTTTTTTTTT
۳۶	G	A
۳۹	-	T
۵۶	C	T
۶۰	A	G
۶۹	CAG	TGA
۷۶	C	T
۸۰	A	C
بین ۸۵ و ۸۶	-	GTGGGCTT
۹۳ و ۹۴	CC	TA
۹۸	C	A
۱۰۰	AAGT	TCCA
۱۰۵	C	A
۱۱۰	TA	GC
۱۱۹	T	A
۱۳۰	C	G
۱۳۷	C	G
۱۷۱	T	C
۱۷۳	G	A
۱۹۱	C	T
۲۱۴	A	G
۲۱۷	A	G
۲۱۹	C	G
۲۳۳	T	C
۲۳۹	G	T
۲۶۹	A	G
۲۷۲	C	G
۲۷۵	G	A
۲۷۸	C	T
۲۸۲	T	C

جدول ۳- میزان شباهت توالی به دست آمده از GH-1 و GH-2 ماهی سفید با سایر گونه‌های خانواده کپور

گونه	جایگاه	شماره دسترسی	میزان شباهت (درصد)
کپور معمولی	GH-1 آلل بلند	AY553378.1	٪۱۰۰
کپور معمولی	GH-1 آلل کوتاه	AY553379.1	٪۹۹
کپور معمولی	GH-2	AJ640136.1	٪۹۹
آمور	GH	X60474.1	٪۹۳
فیتوفاگ	GH	X60475.1	٪۹۳
کپور سرگنده	GH	X60473.1	٪۹۳
کپور سیاه	GH	AF389238.1	٪۹۳
ماهی خواجو	GH	EF611098.1	٪۹۲
لای ماهی	GH	HM114351.1	٪۸۸
ماهی کاتلا	GH	AY053360.1	٪۸۵



شکل ۲- تفاوت آنزیمهای برشی دو جایگاه GH-1 (تصویر بالا) و GH-2 (تصویر پایین) ماهی سفید (سایت Nebcutter). آنزیمهایی که روی آنها خط کشیده شده است در هر دو توالی GH-1 و GH-2 مشترک هستند، اما سایر آنزیمها به طور اختصاصی برای هر یک از دو جایگاه عمل می‌کنند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش، مقایسه توالیهای به دست آمده از جایگاه های GH-1 و GH-2 در ماهی سفید دریای خزر تفاوتهای زیادی را نشان می‌دهد. این تفاوتهای موجود در ژن GH-1 و GH-2 ماهی سفید می‌توانند به عنوان نشانگرهای ژنتیکی اختصاصی جهت کاربرد این توالیها برای بازسازی روابط فیلوژنتیکی، بررسی دقیقتر شکلهای مختلف آللی، و ارتباط این جایگاهها با صفات مهم اقتصادی در ماهی سفید دریای خزر به کار روند. داده‌های مولکولی مشابهی نیز در کپور معمولی برای توالیهای ژنهای رمزکننده‌ی چندین فرآورده از جمله سوماتوتروپین (هورمون رشد) گزارش شدند که وجود گوناگونی آللی را در این جایگاه نشان دادند

(Larhammar and Risinger, 1994). یک توضیح ممکن برای این گوناگونیها می‌تواند اعمال فشار انتخابی شدیدتر باشد. مشخص شده است که طول و توالی نوکلئوتیدی نواحی اگزون و نیز اینترون در ژن در معرض فشار انتخاب طبیعی هستند (Pankova et al., 2013). ماهیان سفید و کپور معمولی هر دو به خانواده‌ی Cyprinidae تعلق دارند و حاوی تعداد کروموزومهای برابر (۲n=۵۰) و ژن هورمون رشد آن ها نیز دارای ۵ اگزون و ۴ اینترون می‌باشند. Larhammar و Risinger (۱۹۹۴) پیشنهاد کردند که یکی از جایگاههای سوماتوتروپین در کپور معمولی دارای چندین آمینواسید غیرعادی جایگزین بود که می‌تواند سبب عملکردهای جدید و یا بروز ژن های کاذب و جهشهای حذفی شوند. ممکن است این وضعیت در نمونه‌های ماهی سفید این تحقیق نیز با دارابودن تفاوت زیاد در همپوشانی دو نسخه‌ی ژن هورمون رشد موجود باشد که بهتر است در مطالعات روی این توالیها در نظر گرفته شود.

در تحقیق جاری، شباهت بسیار زیادی بین توالیهای به دست آمده از GH-1 و GH-2 ماهی سفید با دیگر گونه‌ی بسیار نزدیک از خانواده کپور یعنی کپور معمولی مشاهده شد که مطرحترین گونه‌ی پرورشی می‌باشد. این یافته از این جهت قابل بررسی است که ماهی سفید نیز ممکن است توان بالقوه‌ی بالایی برای پرورشی شدن داشته باشد که البته لازم است سایر جایگاههای مهم از نظر صفات پرورشی نیز در هر دو گونه مقایسه شوند. همچنین شباهت فوق‌الذکر می‌تواند نشان دهنده‌ی نقش پدیده‌های بوم شناختی در توانایی سازش پذیری هر گونه به محیطهای لب‌شور و شیرین باشد که با توجه به وجود چالشهای بیشتر در زیست بومهای آب شیرین، کپور معمولی را برای محیطهای پرورشی بسیار مستعد ساخته‌اند. این موضوع می‌تواند جدا از تشابه توالیهای هورمون رشد در دو گونه، با فرآورده‌های ژنی متفاوت در سایر جایگاهها در ارتباط باشد که نیازمند مطالعات گسترده‌ای می‌باشد.

در دهه‌های اخیر، بسیاری از داده‌های گردآوری‌شده گواهی می‌دهند که نرخ واگرایی در امتداد اینترونها متفاوت بود و به جایگاه ترتیبی آنها در داخل ژنها بستگی داشت. از آنجایی که توالیهای واقع در نزدیکی انتهاهای '۵ و '۳ اینترون نقش مهمی در ویرایش mRNA بازی می‌کنند، پیشنهاد شده است که این نواحی تحت محدودیتهای انتخاب طبیعی می‌باشند (Gazave et al, 2007; Zhu et al., 2009). با هم‌ترازی توالیهای به دست آمده در این پژوهش و توالیهای ثبت شده از جایگاه GH-1 و GH-2 سایر ماهیها، نواحی مربوط به اگزون۴ و ۵ در جایگاه GH-1 و GH-2 ماهی سفید به ترتیب (<۱...۲۲ و ۱۲۹...۳۳۳< جفت باز) و (<۱...۲۲ و ۱۷۱...۳۷۵< جفت باز) مشخص شد. اگزون ۴ در موقعیت ۲۲ جفت‌بازی پایان می‌یابد و سپس اینترون ۴ شروع می‌شود. طبق جدول شماره ۲ در موقعیت ۳۳، ۳۹ و ۸۵ جفت‌بازی (در جایگاه GH-1)، جایگاه GH-2 به اندازه ۳۳، ۱ و ۸ جفت‌باز از GH-1 بزرگتر است. بنابراین مقایسه توالیهای به دست آمده از GH-1 و GH-2 ماهی سفید با یکدیگر نشان می‌دهد که تفاوت عمده این دو نسخه در طول اینترون ۴ است. سایر تفاوتها جهشهای یک یا چندنوکلئوتیدی می‌باشند. نشان داده شده است که تفاوت در طول اینترون و نواحی تنظیمی در ژنهای مضاعف شده GH-1 و GH-2 می‌تواند باعث ایجاد تفاوت در عملکرد آنها شود (Ryynanen and Primmer, 2006). از سوی دیگر، با توجه به تفاوت عمده GH-1 و GH-2 در اینترون ۴ شاید بتوان ترکیبی از توالیهای دو اینترون از هر دو ژن هورمون رشد را برای بازآرایی روابط فیلوژنی در ماهی سفید بکار برد. دلیل دیگر برای این موضوع آن است که داده‌های برگرفته از توالی‌یابی اینترون از جهات بسیاری با الگوهای فیلوژنی مبتنی بر داده‌های ریختی، بیوشیمیایی و ژنتیکی متفاوت هستند (Radchenko, 2005؛ Oleinik et al., 2007).

علاوه بر این، نتایج حاضر در مورد طول بیشتر اگزونها به ویژه در GH-2 با این یافته مطابق است که عوامل مشترکی (به احتمال زیاد انتخاب طبیعی) در ژنهای همسان وجود دارند که بر ساختار و تکامل اگزون-اینترون تأثیر می‌گذارند و نیز اینکه طول و توالیهای نوکلئوتیدی در نواحی ژنی اگزونها (و نیز اینترونها) تحت تأثیر نیروها و جهت گزینش طبیعی قرار دارند (Zhu et al., 2009).

Pankova و همکاران (۲۰۱۳) واگرایی توالی

اینترون را در دو نسخه ژن هورمون رشد ماهی Charr از جنس Salvelinus مورد بررسی قرار دادند. تحقیقات آنها نشان داد که اینترون ها در ژن GH-1 نسبت به ژن GH-2 بیشتر محافظت شده‌اند و تغییرات اینترونها در ژن GH-2 به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد. اطلاعات به دست آمده از فراکاوی توالیهای اینترون و اگزون در ژن پارالوگ ماهی نشان‌دهنده‌ی تاثیر وجود تفاوتهایی در نیروها و جهت فشار انتخاب طبیعی در این مناطق ژنی است، همان طور که در مطالعه‌ی Pankova و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ماهی Charr از جنس Salvelinus به این موضوع اشاره شده است. مطالعات دقیقتر مولکولی و کاربردی می‌توانند به این سوال که چگونه طیف تکراری ژنوم می‌تواند به شکل‌گیری گونه‌های جدید و پیچیدگی در مهره‌داران منجر شود، پاسخ دهند (Murakaeva, 2008).

علاوه بر موارد بحث شده پیرامون ساختار، تکامل، بیان و عملکرد ژنهای GH دونسخه‌ای ماهی سفید، یکی از جنبه‌های کاربردی یافته‌های حاضر، امکان گسترش رویکردهای جدید برای بهبود ژنتیکی عملکرد رشد در این گونه با اصلاح انتخابی می‌باشد که می‌تواند جهت بررسی همبستگی بین آنها و نرخ رشد گونه مذکور به کار رود. با تایید این نوع همبستگی، ژنوتیپ‌های GH را می‌توان برای توسعه و ایجاد برنامه های انتخاب به کمک نشانگر (MAS) مورد استفاده قرار داد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر و تحقیقات همسو در آینده این امکان را فراهم می‌کنند که با شناسایی و توالی‌یابی ژنهای GH-1 و GH-2، توالیهای حاصل از هر دو ژن هورمون رشد به منظور بازنگری روابط خویشاوندی ژنی، مرور جزئیات شکلهای مختلف آللی و همبستگی این جایگاهها با صفات مطلوب در ماهی سفید دریای خزر بکار گرفته شوند.

۵. تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از آقایان مهندس محمد علی روحی و مهندس خسرو خلیلی کارشناسان محترم آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی دام و آزمایشگاه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و نیز کارگاه شهید رجایی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

Devlin, R., 1993. Sequence of sockeye type 1 and 2 growth hormone genes and the relationships of rainbow trout with Atlantic and Pacific salmon. *Canadian Journal of Fishery and Scientific Aquaculture*, 50, 1738–1748.

Duan, C., 1997. The Insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *American Zoologist*, 37, 491-503.

Gazave, E., Marques Bonet, T., Fernando, O., *et al*., 2007. Patterns and rates of intron divergence between human and chimpanzees. *Genome Biology*, 8, 21.

Ghasemi, F., Pourkazemi, M., Zamini, A., Yarmohammadi, M., 2008. Studing of genetic structure Caspain kutum (*Rutilus kutum*) population of spring and autumn breeds using by microsatellite markers. First National Congress of Caspian Sea Fishery Resource, Gorgan Agricultural Science And Natural Resources University, Iran.

Gross, R., Schlee, P., Stein, H., Rottmann, O., 1996. Detection of allelic variation within the growth hormon gene in common bream using heteroduplex analysis. *Journal of Fish Biology*, 1284, 17-20.

Gross, R., Nilsson, J., 1999. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. *Aquaculture*, 173, 73-80.

Kang, J.H., Lee, S.J., Park, S.R., Ryu, H.Y., 2002. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 68, 494-498.

Knorr, C., Moser, G., Muller, E., Geldermann, H., 2003. Associations of GH gene variants with performance traits in F2 generations of European wild boar, Pietrain and Meishan pigs. *Animal Genetics*, 28, 124-128.

Koren, Y., Sarid, S., Ber, R., Daniel, V., 1989. Carp growth hormone: molecular cloning and sequencing of cDNA. *Gene*, 77, 309-315.

Larhammar, D., Risinger, C., 1994. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular*

Phylogenetics and Evolution, 3, 59-68.

Murakaeva, 2008. Structure, evolution and expression of the duplicated growth hormone genes of common carp (*Cyprinus carpio*). Dissertation Thesis, Humboldt-University of Berlin, Germany.

Ni, J., You, F., Xu, J., 2012. Single nucleotide polymorphisms in intron 1 and intron 2 of *Larimichthys crocea* growth hormone gene are correlated with growth traits. Chinese *Journal of Oceanology and Limnology*, 30, 279-285.

Oakley, T.H., Phillips, R.B., 1999. Phylogeny of Salmonine Fishes Based on Growth Hormone Introns: Atlantic (*Salmo*) and Pacific (*Oncorhynchus*) Salmon Are Not Sister Taxa. Molecular *Phylogenetics and Evolution*, 11, 381-393.

Ohkubo, T., Araki, M., Tanaka, M., Sudo, S., Nakashima, K., 1996. Molecular cloning and characterization of the yellowtail GH gene and its promoter: a consensus sequence for teleost and avian Pit-1/ GHF-1 binding sites. *Journal of Molecular Endocrinology*, 16, 63-72.

Oleinik, A.G., Skurikhina, L.A., Brykov, V.A., 2007. Divergence of Salvelinus species from northeastern Asia based on mitochondrial DNA, *Environmental Biology of Fishes*, 16, 87–98.

Pankova, M.V., Brykov, V.A., Pankova, V.V., Atopkin, D.M., 2013. Fish Growth Hormone Genes: Divergence of Intron Sequence in Charrs of *Salvelinus* Genus. *Russian Journal of Genetics*, 49, 645-651.

Radchenko, O.A., 2005. Izmenchivost' mitokhondrial'noi DNK gol'tsov roda Salvelinus (Variability of Nucleotide Sequences of Mitochondrial DNA in Chars of the Genus *Salvelinus*), Magadan: SVNTs.

Ryynanen, H.J., Primmer, C.R., 2006. Varying signals of the effects of natural selection during teleost growth hormone gene evolution. *Genome*, 49, 42-53.

Sattari, M., 2002. Icthyology 1 anatomy and physiology. Naghsh mehr publications, 423-432.

Sciara, A.A.; Rubiolo, J.A.; Somoza, G.M., Arranz, S.E., 2006. Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) growth hormone. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: *Toxicology and Pharmacology*, 142, 284-292.

Tambasco, D.D., Paz, C.C.P., Tambasco-studart, M., Pereira, A.P., Alencar, M.M., Freitas, A.R., Regitano, L.C.A., 2003. Candidate gene for growth traits in beef cattle crosses *Bos Taurus*× *Bos indicus*. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120, 51-56.

Xu, B., Moriyama, S., Zhang, P., Miao, H., Li, D., Kawauchi, H., 2001. The complete amino acid sequence of growth hormone and partial amino acid sequence of prolactin and somatolactin from sea perch (*Lateo labrax* japonicu). *Aquaculture*, 201, 117-136.

Zhu, L., Zhang, Y., Zhang, W., *et al*., 2009. Pattern of exon–intron variation of genes in eukaryotic genomes, BMC Genomics, 10, 47.

Zohar, Y., 1989. Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction, growth, and smoltification. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7, 395-405