

Journal

*J. Biol. Chem.
Environ. Sci., 2011,
Vol. 6(1):401-416
www.acepsag.org*

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR GENETIC VARIATIONS OF TOW SYRIAN DOMESTICATED TILAPIA SPECIES

Ibrahim. M. M^{*} , Alsaffouri. H^{}**

*- *Dr. Researcher at the General Committee of Scientific Agricultural Research (GCSAR), Tartous Centre, Amrit, Syria.*

*- *Dr. Researcher at the General Committee of Scientific Agricultural Research (GCSAR), Aleppo Centre, Syria.*

ABSTRACT

This study was achieved during the period from 2003 to 2005 in the Genetics Laboratory Faculty of Agriculture in Ain Shams University, Cairo, Egypt.

Biochemical and molecular genetic variations of tow Syrian tilapia fish (O.a: *Oreochromis aureus* and T.z: *Tilapia zillii*) were estimated using three techniques: SDS-PAGE (applied on soluble proteins), native-PAGE (for isozymes) and RAPD analysis (applied on DNA extracts). Data obtained from soluble skeletal muscle protein and isozymes electrophoresis patterns showed a high level of genetic similarity between O.a and T.z species (0.84). In contrary, this level was low according to DNA-based data (0.37). The estimated values of homogeneities (similarity within species) calculated depending on muscle soluble proteins, isozymes and on the both analyses were found to be lower in O.a than they were in T.z (0.67 ± 0.14 , 0.81 ± 0.09 , 0.75 ± 0.09 , 0.87 ± 0.04 , 0.85 ± 0.11 and 0.86 ± 0.06 , respectively). Species-specific protein markers were detected and found to be positive for T.z species. These markers had a molecular weight of about 18 KDa for alcohol soluble protein and 25 KDa for tris soluble protein. While, they were negative (not existed) for O.a species. Also, RAPD-molecular genetic markers were detected using eight decamer primers. From this study it is observable that the genetic differences were effectively detectable with DNA-based techniques comparably with biochemical methods.

Key words: SDS-PAGE, Native-PAGE, RAPD analysis, Genetic similarity, Molecular markers, Biochemical markers, *Oreochromis aureus*, *Tilapia zillii*, Isozymes, Electrophoresis.

المقدمة

تعتبر أنواع المشط: النيلبي و الأوريا و الزييلي (*T. 'O. aureus 'O. niloticus*) من أكثر أنواع الأسماك أهمية لزراعات المياه العذبة في المناطق الإستوائية و تحت الإستوائية. لسهولة زراعتها و تربيتها في متنوع من نظم الزراعات المائية (Ladwing) and Shwantes, 1984 و (Rashed *et al.*, 1998).

إن الاستخدام الرشيد للمصادر الوراثية و الإدارة الملائمة لمخزونات المشط النيلبي المزروعة (و بالتالي باقي أنواع المشط) يتطلب مرحلتين متكاملتين: (1) توصيف التباينات الوراثية داخل العشائر و بينها و على مدى الإنتشار الجغرافي للأنواع المدروسة. و (2) تحديد المواقع التشخيصية (diagnostic) التي تسمح بتتبع مخاطر الإدخالات الوراثية (introgression) بين الأنواع المدروسة ذات الصلة (Rognon *et al.*, 1996).

إنه من المهم و الضروري التفريق بين الوحدات التقسيمية (taxa) و التحقق من علاقات القرابة بين الأنواع باستخدام صفات أخرى غير الشكلية التي ووجد أنها مشوشة في

المشط (McAndrew & Majumdar, 1983) و (Macaranas *et al.*, 1996) إن التقسيم الأكثر حداثة لأنواع المشط مبني على صفات التكاثر و التطور و التغذية و الصفات التركيبية للجسم و البيوجغرافيا -الصفات البيولوجية الناتجة عن تغير المناطق الجغرافية – (Trewaves, 1983). و لكن مثل هذه الصفات ذات قيمة محدودة عند استخدامها لأغراض تحديد هوية العشائر و الأنواع و ذلك لأنها تُبدي تباينات هامة داخل العشائر و الفروقات بين الأنواع صغيرة (Fryer and Iles, 1972) و (Abban, 1988). و قد استخدم التفريد الكهربائي للبروتينات بكثافة للتمييز بين أنواع المشط (Kornfield *et al.*, 1979) و (McAndrew & Majumdar, 1983, 1984) و (Abban, 1988). و استخدمت للتفريق بين هُجنها أيضا (Macaranas *et al.*, 1986) و لكنها لا تستطيع التمييز بين تحت أنواع (subspecies) المشط النيلبي (Seyoum, 1989).

إن استخدام الطرق البوكيماوية كالتفريد الكهربائي للبروتينات و المشابهات الأنزيمية لأغراض تحديد هوية الأنواع طُبِّق بشكل واسع في الأسماك. و مشاكل تحديد هوية الأنواع تنقسم لثلاث اتجاهات: (1) تحديد هوية الأطوار المبكرة من النمو (بيوض و يرقات). (2) الفصل بين الأنواع التي يشترك فصلها. (3) تحديد هوية الهجن الناتجة عن التداخلات الوراثية بين الأنواع (introgressive hybridization). و تحديد هوية الأنواع المشتكلة يشبه تحديد هوية العشائر المتميزة ضمن النوع الواحد. و إنه من الضروري معرفة و تقدير التباينات داخل العشائر و بينها و تقدير علاقات القرابة التطورية بين العشائر السمكية لمساعدة مربّي الأسماك في برامج التربية و لكشف أي تلوث (تداخل) وراثي (Puerto *et al.*, 2001).

بأستخدم ثمانية عشر موقعا وراثيا بما فيها أربع مواقع للإستريز (EST) لاستكشاف التباينات الوراثية في سلالات مختلفة من المشط النيلبي في الصين ووجدت كلها متماثلة الشكل

(monomorphic) باستثناء موقعين للإستريز أبديا اختلافات في التكرارات الأليلية بين السلالات المختلفة (Li *et al*, 2001) .

إن تطور تقنية الإكثار العشوائي لمناطق متعددة المظهر من المادة الوراثية (RAPD) بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) سمح باختبار التباينات الوراثية بدون أية معرفة مسبقة عن تتابعات المادة الوراثية : DNA (Williams *et al.*, 1990, 1993) و (Welsh & McClelland, 1990) و (Hadrys, 1992) . إن التعدد المظهري الناتج عن تطبيق تقنية ال RAPD يُورث بطريقة مندلية و يمكن استخدامه ككشّافات وراثية : genetic markers (Bardakci and Skibinski, 1994) .

إن معظم المواقع الوراثية المستكشفة سواء للأنزيمات أو الناتجة عن تقنية ال RAPD تتعزل بطريقة مندلية و الكشّافات المستنبطة من الأنزيمات (allozyme markers) تُبدي نموذج السيادة المشتركة في التوريث : co-dominant ، بينما الكشّافات المستنبطة من ال RAPD تتسجم مع توقعات وجود الحزمة أو غيابها وفق نموذج الأليل السائد : dominant allele (Appleyard and Mather, 2000) .

إن الهدف من هذه الدراسة هو الحصول على المزيد من المعلومات عن الخلفية الوراثية لأنواع المشط السورية الأوريا و الزيلي . بدراسة التباينات الوراثية داخل هذه الأنواع وفيما بينها على المستويين البيوكيماوي و الجزيئي . و لاستكشاف وجود الكشّافات الوراثية (genetic markers) على المستويين المذكورين أنفا و التي تخدم ككشّافات وراثية خلال عمليات الانتخاب و التهجين بما يساعد المربين على تحسين بعض الصفات القيّمة تجاريا في الأنواع المدروسة . و لتنفيذ هذه الدراسة اختيرت ثلاثة تقنيات هي : التفريد الكهربائي للبروتينات (SDS-PAGE) و التفريد الكهربائي للأنزيمات (native-PAGE) و التفريد الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل الناتجة من استخدام بادئات عشوائية (RAPD assay) .

نفذت هذه الدراسة خلال الفترة الممتدة من العام 2003 الى العام 2005 في مخبر الوراثة التابع لكلية الزراعة بجامعة عين شمس ، القاهرة.

مواد وطرق البحث

جمع العينات :

جُمعت العينات من مزرعة السن في مدينة بانياس السورية . حيث جُمعت عينات من الزعنفه الزيلية لعشرة أفراد لاستخلاص المادة الوراثية وقد حُفظت في الإيثانول 75 % وعشرة من العضلات الهيكلية البيضاء لاستخلاص البروتينات و الأنزيمات من كلٍ من المشط الأوريا و الزيلي و حُفظت في محلول ملحي مخفف لكلور الصوديوم بتركيز : 0.85 % و جُمدت بالأزوت السائل في الحقل و من ثم نُقلت الى المخبر و وضعت في مجمدة على الدرجة المثوية : (- 20° C) .

التفريد الكهربائي للبروتينات الذوابة :

التفريد الكهربائي للبروتينات الذوابة على جل من البولي أكريلاميد و بوجود مادة ال SDS (SDS-PAGE technique) استخدمت لاستكشاف التباينات الوراثية داخل الأنواع و فيما بينها . استخلصت البروتينات الذوابة من العضلات الهيكلية لكل فرد باخذ 0.2 غرام

من العضلات و طحنها بالأزوت السائل في هاون من البورسلان و إضافة حجم ملائم من محلول الاستخلاص المكون من 100 مل من التريس القاعدي (tris-base) بتركيز 0.1 مولر و 10 مل من الجليسرول و 100 ميكروليتر من 2-مركابتوايثانول. كذلك نفس الكمية من العضلات طُحنت و استخلصت بالكحول الإيثيلي 75 % و من ثم بالماء المقطر المعقم . و من الرائق الحاوي على البروتينات الذوابة أخذت كمية مناسبة و مُدّدت بكمية مساوية لها من محلول لانس المنظم (Lan's buffer) ذي درجة الـ $PH = 8.8$ و التركيز المساوي لـ 2X . ثم هُضمت العينات لمدة 5 دقائق في حمام مائي حرارته $100^{\circ}C$ و بعد ذلك حُفّن في حُجيرات صغيرة على جل من البولي أكريلاميد تركيزه 15 % .

إن إجراءات تحضير الجل و ظروف التفريد الكهربائي و التيار و كذلك الصبغ و إزالة الصبغ نُفذت طبقاً لإجراءات لامللي (Laemmlli, 1970) . و بعد إزالة الصبغ تم تصوير الجل و توثيقه .

التفريد الكهربائي للأنزيمات :

استُخدمت تقنية التفريد الكهربائي للأنزيمات على جل من البولي أكريلاميد المحضّر بطريقة تحافظ على الكفاءة الحيوية للأنزيم و المعروفة بـ : native-PAGE لدراسة وجه آخر من التباينات الوراثية البيوكيماوية . تم الحصول على نماذج البصمة الأنزيمية للأنزيم α -إستريز و للأخر β -إستريز باستخدام أربعة من مواد التفاعل الصناعية المتخصصة على الإستريز (synthetic esterase-specific substrates) و هي ألفا نفتايل أسيتات و بيتا نفتايل أسيتات و ألفا نفتايل بيوتيرات و ألفا نفتايل بربونات . و لاستخلاص الأنزيمات الفعالة طُحن مقدار 0.5 غرام من العضلات الهيكلية بالأزوت السائل و استخلصت الأنزيمات منها في حجم ملائم من محلول الإستخلاص المكون من ملح التريس القاعدي ذي التركيز 0.1 مولر و درجة الحموضة $PH = 7.5$ ، ثم تمت مجانسة خليط الإستخلاص ثم تم الطرد المركزي على 12000 دورة بالدقيقة و لمدة عشرة دقائق. ثم فُصل الرائق و استُخدم لفصل مكوناته بالتفريد الكهربائي. و كانت ظروف التفريد الكهربائي و طريقة تحضير الجل و طريقة الصبغ و إزالته مُنفذة طبقاً للعلماء تانكسلي وريك (Tanksley and Rick, 1980) و تانكسلي و أورتون (Tanksley and Orton, 1983) . فُلبت كل عينة ألياً لمدة 15 ثانية و أعيد الطرد المركزي لها ثانية لمدة 10 دقائق على السرعة 10000 دورة بالدقيقة و عند الدرجة $5^{\circ}C$. و من ثم نقل الرائق لأنابيب جديدة و حُزّن على الدرجة $-20^{\circ}C$ للإستخدام اللاحق و التفريد على جل من البولي أكريلاميد ذي التركيز 8 % و درجة الحموضة : $PH = 8.6$

اختبارات الأنزيمات :

تم صبغ الجلات بعد التفريد الكهربائي و حُضّنت على الدرجة $37^{\circ}C$ في مكان مظلم حتى اكتمال الصبغ بعد إضافة مادة التفاعل الصناعية و محلول الصبغ و التفاعل المناسبين وفق الآتي :

α -إستريز (α - نفتايل أسيتات) :

المحلول المنظم صوديوم-فوسفات ذي درجة الموضة $PH = 6.2$ و التركيز 0.1 مولر 100 مل
 α - نفتايل أسيتات 50 مغ
 صبغة (Fast blue RR salt) 100 مغ

α - إسترز (α - نفتايل بروبيونات) :

المحلول المنظم صوديوم-فوسفات ذي درجة الموضة PH = 6.2 و التركيز 0.1 مولر 100 مل
 α - نفتايل بروبيونات
 صبغة (Fast blue RR salt) 100 مغ

 α - إسترز (α - نفتايل بيوتيرات) :

المحلول المنظم صوديوم-فوسفات ذي درجة الموضة PH = 6.2 و التركيز 0.1 مولر 100 مل
 α - نفتايل بيوتيرات
 صبغة (Fast blue RR salt) 100 مغ

 β - إسترز (β - نفتايل أسيتات) :

المحلول المنظم صوديوم-فوسفات ذي درجة الموضة PH = 6.8 و التركيز 0.1 مولر 100 مل
 β - نفتايل أسيتات
 صبغة (Fast blue RR salt) 100 مغ

استخلاص المادة الوراثية (DNA) :

استخلصت المادة الوراثية (DNA) من نسيج الذيل وفق بروتوكول باردافي و سكيبينسكي (Bardakci and Skibinski, 1994) مع بعض التعديلات الطفيفة كما يلي :
 حوالي 0.2 غرام من نسيج الزعنفة الزيلية قُطعت لأجزاء صغيرة عُلقت في 700 مل من محلول الإستخلاص STE (الذي يتكون من : كلور الصوديوم بتركيز 0.1 مولر و تريس حامضي : تركيزه 0.05 مولر و EDTA بتركيز 0.01 مولر و درجة حموضة PH = 8) و من ثم أُضيفت مادة الـ SDS بمقدار 30 ميكروليتر و بتركيز 10 % ، وكذلك أُضيف أنزيم هاضم للبروتين (proteinase K) بمقدار 30 ميكروليتر و تركيز 10 مغ /مل . بعد ذلك تم تحضين هذا الخليط على الدرجة 50 °م لمدة ليلة كاملة . ثم نُقيت المادة الوراثية الـ DNA بالإستخلاص المتتابع باستخدام مزيج من الفينول : الكلورفورم : الأيزوأميل (25 : 24 : 1) ثم بالكلورفورم : أيزوأميل (24 : 1) على الترتيب . ثم تم ترسيب المادة الوراثية الـ DNA باستخدام كحول الإيثانول المطلق البارد و بعد ذلك عُسلت المادة الوراثية باستخدام كحول الإيثانول ذي التركيز 70 % ثم جفف راسب المادة الوراثية و أُعيد تعليقه في 100 ميكروليتر من الماء المقطر المعقم المنزوع الأيونات .

ظروف إكثار المادة الوراثية بواسطة الـ PCR و ظروف التفريد الكهربائي :

تمت عملية تضخيم و إكثار المادة الوراثية وفقا لبروتوكول وليام (Williams *et al*, 1990) و تمت العملية في جهاز التدوير الحراري (primus PCR apparatus) .
 الدورة الأولى : كانت درجات الحرارة للعمليات المتتابة الثلاثة من تغيير الطبيعة (denaturation) و التحام البادئ (annealing) و الإستطالة (extension) هي 94 °م لمدة 2 دقيقة و 35 °م لمدة 1 دقيقة و 72 °م لمدة 2 دقيقة على الترتيب . ثم تم تخفيض وقت عملية تغيير الطبيعة ليصبح 30 ثانية خلال كل الدورات الأربعة و أربعين اللاحقة .
 إن مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل حُضّر بحجم 30 ميكروليتر من المواد التالية : 3 ميكروليتر من القواعد الأزوتية الثلاثية الفوسفات (DNTPs) تركيزها 2.5 مليمولر و 3

ميكروليتر من كلور المغنيزيوم ($MgCl_2$) تركيزه 25 مليمولر و 3 ميكروليتر من المحلول المنظم (10 X Buffer) و 0.2 ميكروليتر من أنزيم بلمرة المادة الوراثية (Taq DNA Polymerase) تركيزه 250 وحدة دولية (U) و 2 ميكروليتر من المادة الوراثية المستخدمة كقالب بتركيز 25 نانوغرام (DNA Template) و 16.8 ميكروليتر من الماء المقطر المنزوع الأيونات .

وقد تم تنفيذ تفاعل البلمرة المتسلسل مع ثمانية بادئات عشوائية عشوائية عشوائية القواعد الأزوتية التي أبدت نماذج تفريد كهربائي لنواتج تفاعل البلمرة قابلة للتكرار بشكل متطابق ، وقد عُرض رمزها التجاري و تتابع قواعدها الأزوتية في الجدول رقم (1) .

جدول رقم (1) : الرمز التجاري و تتابع القواعد الأزوتية المكونة للبادئات المستخدمة خلال تفاعل البلمرة المتسلسل.

الرمز التجاري للبادئ	تتابع القواعد الأزوتية للبادئ	الرمز التجاري للبادئ	تتابع القواعد الأزوتية للبادئ
OPA03	3'-AGTCAGCCAC-5'	OPB08	3'-GTCCACACGG-5'
OPA04	3'-AATCGGGCTG-5'	OPC20	3'-ACTTCGCCAC-5'
OPA10	3'-GTGATCGCAG-5'	OPC12	3'-TGTCATCCCC-5'
OPA19	3'-CAAACGTCGG-5'	OPC13	3'-AAGCCTCGTC-5'

حوالي 10 ميكروليتر من نواتج إكثار المادة الوراثية فُرِدَّت كهربائياً على جل (هلام) من الأجاروز (Agarose) ذي التركيز 1.4 % في المحلول المنظم : TBE المكوّن من 5.4 غرام من التريس-القاعدي و 2.75 غرام من حمض البوريك و 2 مل من محلول الـ EDTA ذي التركيز 500 مليمولر والحموضته يجب أن تكون : $PH = 8$. و استمر التفريد إلى أن وصلت الصبغة المرافقة لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل لمسافة 2 سم من نهاية حقل التفريد على الجل . او حتى يصبح وضوح الحزم كافياً ثم صُوِّرت الجلات مباشرة بعد التفريد باستخدام جهاز توثيق الجل من النوع بيوراد (Bio-Rad) (GelDoc2000) .

تحليل الجلات :

تم تصوير كل الجلات (نماذج التفريد الكهربائي) الناتجة من تفريد البروتينات الذوابة و المشابهات الأنزيمية و نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وكذلك حُلَّت باستخدام برنامجين متخصصين هما : TotalLab v2 و SPSS 15 .

النتائج والمناقشة

النتائج:

أظهر تحليل النتائج مستوى مرتفع من التشابه الوراثي بين كل من المشط الأوربا و المشط الزيلي و ذلك عندما قُدِّر اعتماداً على نماذج التفريد الكهربائي للبروتينات الذوابة و المشابهات الأنزيمية حيث كانت القيمة 0.48 لكلا الطريقتين . بينما كانت هذه القيمة

منخفضة (0.37) عندما قُدِّرت اعتمادا على البيانات المستمدة من نواتج التفريد الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام بادئات عشوائية . كما هو موضح في الجدول رقم (2).

جدول رقم (2) : درجة التشابه الوراثي بين كل من نوعي المشط الأوريا و الزيلى (O.a و T.z) مُقدِّرة اعتمادا على نماذج التفريد الكهربائي البروتينات الذوابة و المشابهات الأنزيمية و نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

الطرق	درجة التشابه الوراثي بين النوعين الأوريا و الزيلى
مقدِّرة اعتمادا على نماذج التفريد الكهربائي للبروتينات الذوابة	0.84
مقدِّرة اعتمادا على نماذج التفريد الكهربائي للمشابهات الأنزيمية	0.84
مقدِّرة اعتمادا على نماذج التفريد الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل	0.37

القيم المتوسطة للتشابه الوراثي (similarity's average) و المعروفة أيضا بالتجانس (homogeneity) داخل النوع المشط الأوريا محسوبة على أساس نماذج تفريد البروتينات الذوابة (في الكحول و التريس و الماء) كما هو مبين في الصورة (1) كانت 0.14 ± 0.67 و كانت 0.09 ± 0.81 محسوبة على أساس نماذج التفريد الكهربائي للمشابهات الأنزيمية الموضحة في الصورة (2) و كانت هذه القيمة 0.09 ± 0.75 محسوبة على نماذج تفريد البروتينات الذوابة و المشابهات الأنزيمية معا . كذلك كانت هذه القيم للتشابه داخل النوع الزيلى 0.04 ± 0.87 و 0.11 ± 0.85 و 0.06 ± 0.86 على الترتيب (انظر الجدول رقم 3).

جدول رقم (3) : القيم المتوسطة للتشابه الوراثي (similarity's average) داخل نوعي المشط الأوريا و الزيلى محسوبة على أساس نماذج تفريد البروتينات الذوابة و المشابهات الأنزيمية .

القيم المتوسطة للتشابه الوراثي \pm SD		طرق تقدير القيم المتوسطة للتشابه الوراثي
داخل الزيلى (T.z)	داخل الأوريا (O.a)	
0.04 ± 0.87	0.14 ± 0.67	مقدِّرة اعتمادا على نماذج التفريد الكهربائي للبروتينات الذوابة
0.11 ± 0.85	0.09 ± 0.81	مقدِّرة اعتمادا على نماذج التفريد الكهربائي للمشابهات الأنزيمية
0.06 ± 0.86	0.09 ± 0.75	مقدِّرة اعتمادا على نماذج التفريد الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل

تم اكتشاف وجود (إيجابية) كسَّافات وراثية بيوكيماوية (positive protein markers) متخصصة على النوع الزيلى و ذلك على مستوى البروتينات الذوابة في الكحول و التريس كما هو مشار إليه بالأسم على الصورة رقم (1) و كانت أوزانها الجزيئية بالكيلو دالتون (18 KDa) لكشاف البروتينات الذوابة في الكحول و (25 KDa) لكشاف

البروتينات الذوابة في محلول ملح التريس (tris) وهذه الكشّافات كانت غائبة (سلبية) في المشط الأوريا (انظر الجدول رقم 4) . و لم تكتشف كشّافات بيوكيمائي متخصصة على نوع محدد استنادا للبروتينات الذوابة في الماء.

جدول رقم (4) : كشّافات وراثية متخصصة على النوع (species-specific protein markers) و أوزانها الجزيئية بالكيلو دالتون (KDa) مكتشفة على مستوى البروتينات الذوابة في الكحول و التريس.

الوزن الجزيئي للكشاف البروتيني المتخصص نوعيا بالكيلو دالتون		الطرق
الأوريا (O.a)	الزيلي (T.z)	
18 ⁽⁺⁾	18 ⁽⁻⁾	كشّافات مستنبطة على أساس البروتينات الذوابة بالكحول
25 ⁽⁺⁾	25 ⁽⁻⁾	كشّافات مستنبطة على أساس البروتينات الذوابة بالتريس
0	0	كشّافات مستنبطة على أساس البروتينات الذوابة بالماء

(+): تدل على تواجد الكشّاف (إيجابي) ، (-) تدل على غياب الكشاف (سليبي)

كذلك اكتشفت الكشّافات الوراثية الجزيئية (molecular genetic markers) اعتمادا على نماذج التفريد الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئات عشوائية (انظر الصورة 3) و لكن فقط بعض هذه الكشّافات اتسم بالوضوح الجيد و يمكن الاعتماد عليه بدون غموض و قد فُدرالوزن الجزيئي لهذه الكشّافات الوراثية الجزيئية كما هو مبين في الجدول رقم (5) .

جدول رقم (5) : الكشّافات الوراثية الجزيئية (molecular genetic markers) اعتمادا على نماذج التفريد الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام ثمانية بادئات عشوائية و الأوزان الجزيئية لها مقدرة بأزواج القواعد الأزوتية bp .

الوزن الجزيئي للكشّافات الوراثية الجزيئية (bp) و عددها		رمز البادئ
(T.z) في المشط الزيلي	(O.a) في المشط الأوريا	
2 (926** , 302)	1 (323)	OPA03
1 (722)	2 (336 , 273)	OPA04
2 (539** , 285)	2 (640** , 240)	OPA10
0	4 (109 , 895 , 746 ,	OPA19
6 (1548 , 1288 , 664 , 389 , 269 , 228)	3 (843 , 728 , 301)	OPB08
2 (1706 , 1411)	2 (1236 , 403)	OPC12
8 (1887 , 1708 , 1266 , 1003 , 822 , 719** ,	0	OPC13
1 (739**)	1 (1320**)	OPC20

المناقشة :

بينما حصلنا على قيم مرتفعة للتشابه الوراثي المقدر بين المشط الأوريا و المشط الزيلي استنادا على البروتينات الذوابة و المشابهات الأنزيمية و التي بلغت حوالي 0.84 ، وجدنا أن هذه القيمة كانت منخفضة (0.37) استنادا للبيانات المستخلصة من نماذج التفريد الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئات عشوائية (RAPD-PCR) و هذا يشير إلى أن التقنيات المعتمدة على المادة الوراثية (DNA) كانت أكفأ في كشف التباينات الوراثية .

إن ارتفاع قيمة التشابه بين النوعين اعتمادا على الطرق البيوكيماوية بالمقارنة مع الانخفاض الواضح مقارنة مع الطرق الجزيئية يعتبر مشوشا بسبب الفرق الكبير و لكن يمكن تفسير ذلك على أنه انعكاس للتعبير الجيني المتشابه بين مجموعات المورثات العاملة بالزمان و المكان في كلا النوعين و المستحثة بنفس الظروف البيئية (تشابه في المتطلبات الحياتية و تعرض لمؤثرات حيوية و غير حيوية متشابهة جدا) و بالتالي هذه المجاميع من المورثات سوف تعطي نواتج تعبير جيني متشابهة جدا في الأنواع القريبة من بعضها بشدة .

القيم المتوسطة للتشابه الوراثي داخل الأنواع المدروسة و تراوحت بين 0.67 ± 0.14 إلى 0.81 ± 0.09 للمشط الأوريا و بين 0.86 ± 0.06 إلى 0.87 ± 0.04 للمشط الزيلي (جدول 3). وهذه القيم تعكس تشابه كبير (تماثل) بين أفراد النوع الواحد و تشير لدرجة عالية من التربية الداخلية غير المقصودة و التي تشكل خطراً على هذه الأنواع و تقود لمستوى متدني من المقدرة على التكيف مع التغيرات المتزايدة في الظروف البيئية والمستجدة بشكل طارئ . و لذلك نقترح تشكيل عشيرة كبيرة تعتبر كقاعدة لهذه الأنواع التي تترك فيها للتزاوج العشوائي و الحر و بالتالي تخدم هذه العشائر كمستودع جيني يحوي متنوع كبير من الأليلات و مستوى عالي من التباين الوراثي .

في هذه الدراسة تم اكتشاف كثافات وراثية بيوكيماوية و جزيئية و هامة و قيمة للمربين لاستخدامها في برامج الانتخاب المُساعد بالكثافات الوراثية (marker-assisted selection programs) . و هذا إضافة لدورهم الهام في إدارة تجمعات الزراعات المائية . و الكثافات البيوكيماوية هامة جدا و يعول عليها في التمييز بين الأنواع القريبة من بعضها بشدة كا الأنواع المدروسة في هذا البحث .

الخلاصة :

تمّ تقدير التباينات البيوكيماوية و الوراثية الجزيئية لنوعي أسماك المشط السورية المعروفة بالمشط الزيلي (*Tilapia zillii*) و الأوريا (*Oreochromis aureus*) و المرمزة O.a و T.z على الترتيب و كذلك البحث عن كثافات وراثية بيوكيماوية و جزيئية . و لهذا الغرض أخذت عينات من عشرة أفراد من كل نوع و استخلصت البروتينات الذوابة في الكحول و التريس و الماء المقطر من العضلات الهيكلية و فُرِدت باستخدام تقنية التفريد الكهربائي للبروتينات الذوابة على جل من البولي أكريلاميد (SDS-PAGE) و استخلصت الأنزيمات في محلول خاص من التريس و فُرِدت باستخدام تقنية التفريد الكهربائي للمشابهات الأنزيمية (native-PAGE) و استخلصت المادة الوراثية (DNA) من عشرة أفراد و جُمِعت في إنبوبة واحدة (Bulk) لكل نوع و استُخدمت من أجل الإكثار العشوائي

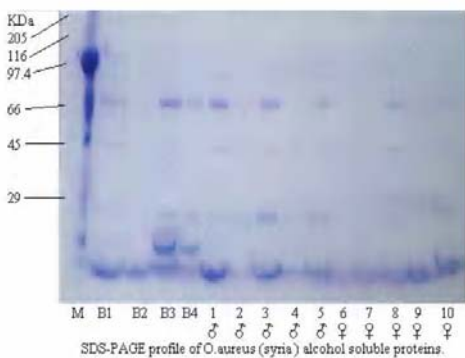
لمواقع متعددة المظهر من المادة الوراثية بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (RAPD assay).

تم الحصول على نماذج التفريد الكهربائي للبروتينات الذوابة (في الكحول و التريس و الماء المقطر) ، و المشابهات الأنزيمية (α -إستريز و β -إستريز مع أربعة مواد تفاعل صناعية هي α -نفتايل أسيتات و α -نفتايل بروبيونات و α -نفتايل بيوتيرات و β -نفتايل أسيتات) ، ولنواتج الإكثار العشوائي لمواقع متعددة المظهر من المادة الوراثية بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (مع عشرة بادئات عشوائية القواعد الأزوتية) و صوّرت هذه النماذج و حُلّت باستخدام اثنين من البرامج المتخصصة بذلك (TotalLab v2.01 and SPSS software 15) . و قد قاد تحليل البيانات إلى النتائج الآتية :

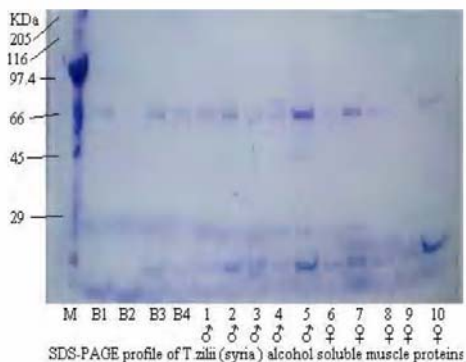
بينت الدراسة الحالية أن التقنيات المعتمدة على المادة الوراثية (DNA) كانت أكفأ في كشف التباينات الوراثية (أعطت قيمة تشابه منخفضة 0.37) من الطرق لبيوكيماوية (أعطت قيمة عالية للتشابه 0.84).

درجة التشابه الوراثي داخل الأنواع المدروسة كانت عالية وهي تعكس تشابه كبير (تمائل) بين أفراد النوع الواحد و تشير لدرجة عالية من التربية الداخلية غير المقصودة و التي تشكل خطراً على هذه الأنواع و تقود لمستوى متدني من المقدرة على التكيف مع التغيرات المتزايدة في الظروف البيئية والمستجدة بشكل طارئ . و لذلك نقترح تشكيل عشيرة كبيرة تعتبر كقاعدة لهذه الأنواع التي تترك فيها للتراوح العشوائي الحر و بالتالي تخدم هذه العشائر كمستودع جيني يحوي متنوع كبير من الأليلات و مستوى عالي من التباين الوراثي .

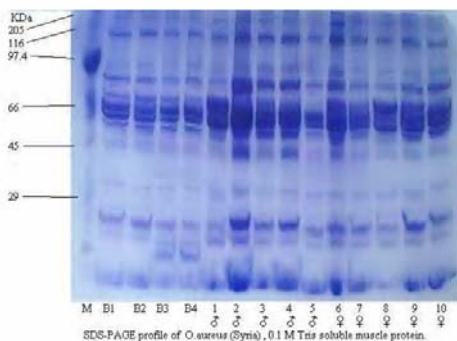
تم اكتشاف تواجد كشّافات وراثية بيوكيماوية (protein markers) على مستوى البروتينات الذوابة في الكحول و التريس متخصصة على النوع الزيالي (إيجابية) و غائبة في النوع الأوريا (سلبية). كذلك اكتشفت الكشّافات الجزيئية الوراثية (molecular genetic markers) المستمدة من نماذج التفريد الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئات عشوائية مؤلفة من عشرة قواعد آزوتية (RAPD-PCR) و هي قِيمة لمساعدة المربي ببرامج الإنتخاب المُساعد بالكشّافات (marker-assisted selection) .



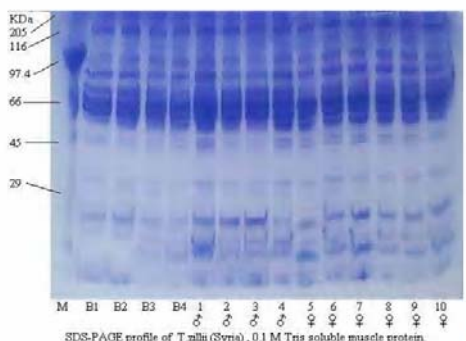
a



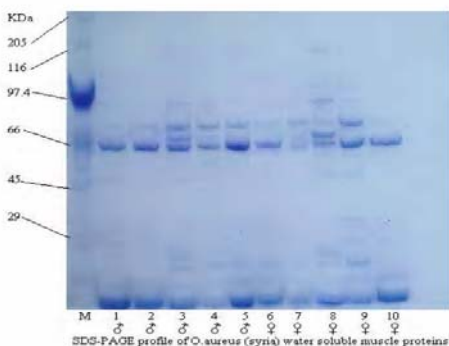
b



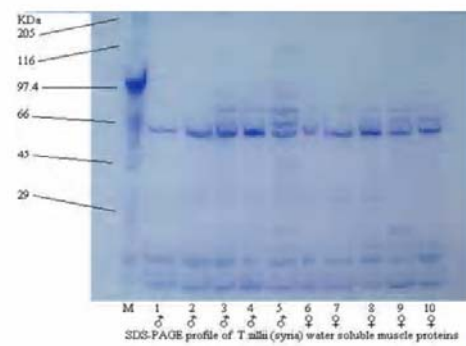
c



d

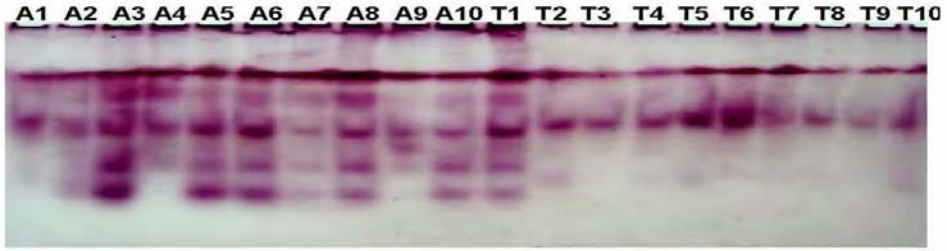


e

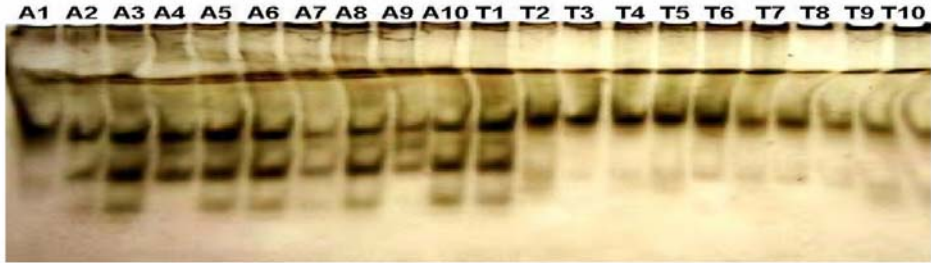


f

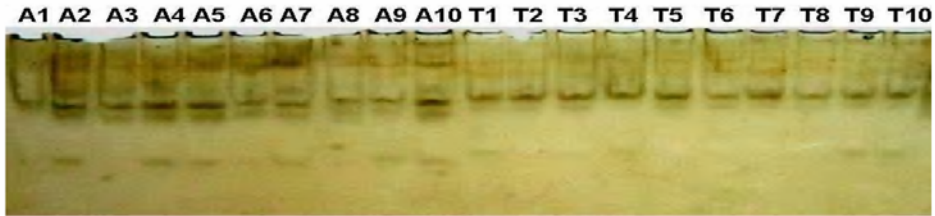
الصورة رقم (1) : نماذج التفريد الكهربائي للبروتينات الذوابة في الكحول (a و b) و التريس (c و d) والماء المقطر (e و f) في كل من المشط الأوريا و المشط الزيلي. و B1 و B2 هي عينات تجميعية لخمسة ذكور و خمسة إناث من المشط الأوريا و B3 و B4 هي عينات تجميعية لخمسة ذكور و خمسة إناث من المشط الزيلي على الترتيب. M : هي تسلسل لحزم من البروتينات القياسية المعروفة الوزن الجزيئي.



β – Naphthylacetate



α – Naphthylacetate

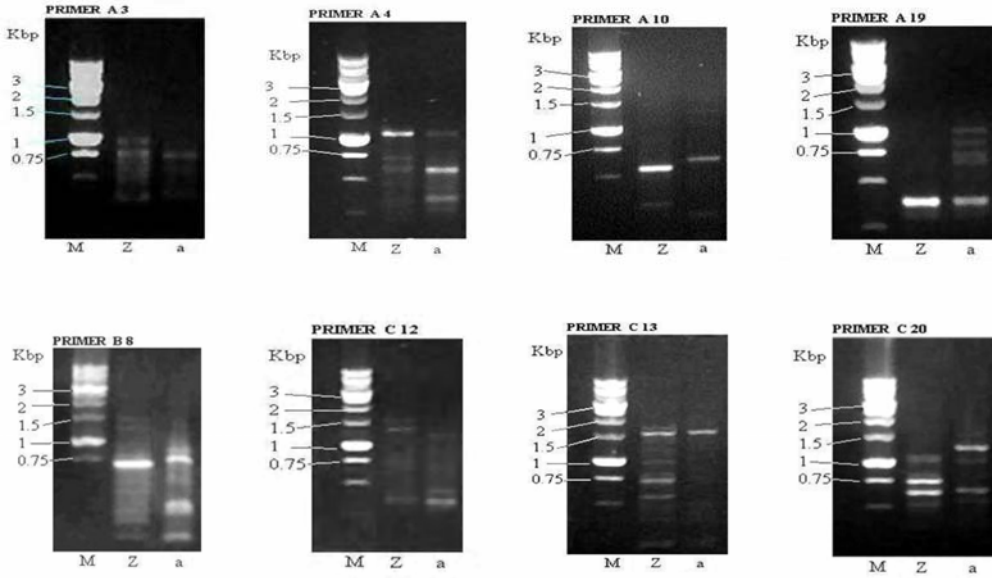


α – Naphthylbuterate



α – Naphthylpropionate

الصورة رقم (2) : نماذج التفريد الكهربائي للمشابهات الأنزيمية للإستريز في كل من المشط الأوريا و المشط الزيتي ناتجة عن استخدام أربعة مواد صناعية متخصصة بالتفاعل مع الإستريزو هي : α -إستريز و β -إستريز مع أربعة مواد تفاعل صناعية هي α -نفتايل أسيتات و α -نفتايل بروبيونات و α -نفتايل بيوتيرات و β -نفتايل أسيتات . و A1 إلى A10 هي أرقام أفراد عينات المشط الأوريا و T1 إلى T10 هي أرقام أفراد عينات المشط الزيتي.



الصورة رقم (3) : نماذج التفريد الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل المنفذ مع بادئات عشوائية هي : (OPA3, OPA4, OPA10, OPA19, OPB8, OPC12 و OPC13 , OPC20. و المطبق كلا نوعي المشط الأوربا و الزيلي و المرمزة a و z على الترتيب. M: هي تسلسل لحزم من الـ DNA القياسية المعروفة الوزن الجزيئي.

المراجع

REFERENCES

- Abban, f. K (1988). Taxonomy and biochemical genetics of some african freshwater fish species. Ph.d. Thesis. University of wales.
- Appleyard, s. A. And mather, p. B (2000). Investigation into the mode of inheritance of allozyme and random amplified polymorphic dna markers in tilapia oreochromis mossambicus (peters). Aquaculture research, 31, 435-445
- Bardakci. F and skibinski d.o.f (1994). Application of the rapid technique in tilapia fish: species and subspecies identification. Heridity 73, 11 7- 123.
- Fryer, g and iles. T. D (1972). The cichlid fishes of the great lakes of africa. Oliver and boyd. Edinburgh.

- Hadrys, h., balick, m and schierwater, b (1992). Application of random amplified polymorphic dna (rapd) in molecular ecology. *Mol.ecol*, 1, 55-63.
- Kornfield, I. L., ritte, u., richler, c. And wahrman, j (1979). Biochemical and cytological differentiation among cichlid fishes of the sea of galilee. *Evolu-tion*, 33, 1-14.
- Ladewing-de, p and schwantes, I. L (1984). Loci that encode the lactate dehydrogenase in species of fish belonging to the orders cypriniformes, siluriformes, and perciformes: adaptive features. *Comp.-biochem. - physiol.*77b. (4):867-876.
- Laemmli, u. K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227:680-258.
- Li, s. F., zhao, j.l., dey, m and dunham, r (2001). Isozyme variation of nile tilapia *oreochromis niloticus* in china. *Asian fisheries science* 14: 411-416
- Macaranas, j. M., agustin, I. Q and eknath, a. E (1996). Multiple haemoglobins in three tilapiine species of the genus *oreochromis* and in eight strains of *O. Nilo-ticus* (l.). *Aquaculture research*, 27, 597-601.
- Macaranas, j. M., taniguchi, n., pante. M. J. R., capili, j. B and pullin, r. S. V (1986). Electrophoretic evidence for extensive hybrid gene introgression into commercial *O. Niloticus* (l.) Stocks in the philippines. *Aqua. Fish manag.* 17, 249-268.
- Mcandrew, b. J. And majumdar, k. C (1983). Tilapia stock identification using electrophoretic markers. *aquaculture*, 30, 249-261.
- Mcandrew, b. J. And majumdar, k. C (1984). Evolutionary relationships within three tilapiine genera (pisces: cichlidae). *Zool. J. Linn. Soc.*, 80, 421- 435.
- Puerto, g., salomao, m., theakston, r., thorpe, r., warrell, d and wuster, w (2001). Combining mitochondrial dna sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the brasilian atlantic forest, and the status of bothrops pradoi (squamata:serpentes: viperidae).*j.evol.biol.*(14) 527-538.

- Rashed m. A., a. A. El-gamal, t. M. A., tantawi and y. M. Saad (1998). De-tection of oreochromis niloticus lines by isozyme organs distribution and rapid-pcr dna markers. 3rd arab conference modern biotech. And area of application in the arab world, 14 -1 dec., cairo, egypt. 127-146.
- Rognon, x., andriamanga, m., mcandrew, b and guyomard, r (1996). Allozyme variation in natural and cultured populations in to tilapia species: oreochromis niloticus and tilapia zillii. Heredity. 76, 640-650
- Seyoum, s (1989). Stock identification and the evolutionary relationships of the tilapia fishes of the genera oreochromis, sarotherodon and tilapia (pisces: cichlidae) using an allozyme analysis and restriction endonuclease analysis of mitochondrial dna. Ph.d. Thesis, university of waterloo, ontario, canada.
- Tanksley, s. D and rick, c (1980). Genetics of esterases in species of lycopersicon. Theor. Appl. Genetic.(56) 209-219.
- Tanksley, s. D and orton, t (1983). Isozymes in plant genetic and breeding. Part (b). Elsevier science publishers b.v. amsterdam.
- Trewavas, e (1983). Tilapiine fishes of the genera oreochromis sarotherodon and danakilia. British museum of natural history, london.
- Welsh, j. And mccl flland, m (1990). Fingerprinting genomes using pcr with arbitrary primers. Nuc/eic acids res., 18, 72 13-7218.
- Williams, j. G. K., kubelik, a. R., livak, k. J., rafalski, j. A and tingey, s. V (1990). Dna polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids res., 18, 6531-6535.
- Williams, j. G. K., hanafey, m. K., rafalski, j. A. And tingey, s. V (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic dna marker. Methods enzy mol., 218,704 -740.

التباينات البيوكيماوية و الوراثة الجزيئية لنوعين من أسماك المشط السورية المُستزرعة

محمود ابراهيم¹ ، حمدي الصفوري²

(1). الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية (GCSAR) ، مركز بحوث طرطوس ، طريق عمريت
(2). الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية (GCSAR) ، ادارة بحوث القطن .

نفذت هذه الدراسة خلال الفترة الممتدة من العام 2003 الى العام 2005 في مخبر الوراثة التابع لكلية الزراعة بجامعة عين شمس ، القاهرة. وتمّ تقدير التباينات البيوكيماوية و الوراثة الجزيئية لنوعي أسماك المشط السورية المعروفة بالمشط الزيلي (*Tilapia zillii*) و الأوريا (*Oreochromis aureus*). وذلك باستخدام ثلاث تقنيات هي : التفريد الكهربائي للبروتينات الذوابة على جل (هلام) من البولي أكريلاميد (SDS-PAGE) والتفريد الكهربائي للمشابهات الأنزيمية (Native-PAGE) و الإكثار العشوائي لمواقع متعددة المظهر من المادة الوراثية بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (RAPD - PCR). الحزم الناتجة من نماذج التفريد الكهربائي لبروتينات العضلات الهيكلية الذوابة و المشابهات الأنزيمية دلت على وجود مستوى عالي من التشابه الوراثي (Genetic similarity) بين نوعي المشط : الزيلي و الأوريا (0.84) و على النقيض من ذلك فإن مستوى التشابه الوراثي كان منخفضاً عندما قُدِّر اعتماداً على القطع المستمدة من المادة الوراثية (0.37). إن نسبة التماثل الوراثي أي التشابه داخل النوع (Homogeneity) المقدرّة اعتماداً على بروتينات العضلات الذوابة و على المشابهات الأنزيمية (Isozymes) و على كليهما معا كانت منخفضة في المشط الأوريا عنه في الزيلي و هي: 0.14 ± 0.67 و 0.09 ± 0.81 و 0.09 ± 0.75 و 0.04 ± 0.87 و 0.11 ± 0.85 و 0.06 ± 0.86 على الترتيب . تم اكتشاف حزم وراثية بيوكيماوية (Protein specific markers) على مستوى البروتينات الذوابة في الكحول و التريس متخصصة على النوع المشط الزيلي و غائبة في النوع الأوريا . كذلك اكتشفت قطع من مادة الوراثة (Molecular specific markers) المستمدة من نماذج التفريد الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئات عشوائية (-RAPD PCR) . أستخلص من هذه الدراسة أن التقنيات المعتمدة على المادة الوراثية في كشف التباينات أكفاً من تلك المعتمدة على المنتجات البيوكيماوية (بروتينات ذوابة و أنزيمات) .

كلمات مفتاحية : SDS-PAGE و Native-PAGE و RAPD-PCR و Genetic similarity و Molecular markers و Biochemical markers و Electrophoresis و Isozymes .