

मात्स्यगंधा

2003



मात्स्यिकी और जीविकोपार्जन



केंद्रीय समुद्री मात्स्यिकी अनुसंधान संस्थान
(भारतीय कृषि अनुसंधान परिषद)
कोचीन - 682018



समुद्री स्तनियों की आण्विक वर्गिकी

पी. जयशंकर

केंद्रीय समुद्री मात्स्यिकी अनुसंधान संस्थान, कोचीन, केरल

आण्विक वर्गिकी जीवों की आकृतिक विशेषताओं की अपेक्षा आण्विक विशेषताओं के आधार पर नमूनों को पहचानने की विधा है। पीसीआर (PCR) के आगमन से मत्स्यविज्ञानियों को जाति स्तर से ऊपर के परीक्षणों के लिए आण्विक तकनीक बेहतर उपाय बन गया। यह उपाय जातीय और जीवसंख्या स्तर के वर्गिकीय समस्याओं के समाधान के लिए मात्स्यिकी जीववैज्ञानिकों के लिए भी उपयोगी हो जाएंगे। आण्विक वर्गिकी केवल आकृति पर आधारित वर्गिकी की आलोचनापरक तकनीक नहीं होनी चाहिए बल्कि परंपरागत वर्गिकी की जानकारी, अवधारणाएं, तकनीक तथा अवसंरचनाओं पर अटल रहते हुए भी होनी चाहिए।

समुद्री स्तनियाँ समुद्री पर्यावरण के जीवीय घटकों में प्रमुख जीव है। भौगोलिक रूप से लगभग 87 तिमि जातियों की रिकार्ड की गई है। समुद्री स्तनियों की जाति निश्चित रूप से पहचानने के लिए डी एन ए स्तर अंकक उपयुक्त किया जाता है। यह अवैद्य तिमि पकड पर पता लगाकर सूचना देने के लिए हैं जिसके द्वारा राजनीति क्षेत्र में विवाद न जगाए जाए।

बाजारों में तिमिगणीय (सीटेशियन) उत्पादों की पहचान

यू एस सरकार के दक्षिण पश्चिम मात्स्यिकी विज्ञान केंद्र (एस डब्ल्यू एफ एस सी), ला जोल्ला, कालिफोर्निया में 14-16 जून, 1999 को आयोजित वैज्ञानिक कार्यशाला में तिमिगणीय जीवों की पहचान के लिए, आण्विक तरीका प्रयोगों, एशियन बाजारों से आने वाले तिमिगणीय उत्पादों के कानूनी अध्ययनों और सीटेशियनों की आनुवंशिक सूचनाओं के डाटाबेसों का, पुनरीक्षण किया गया। तिमिगणीय उत्पादों का प्रमुख खंड मिक

ह्वेल (बलीनोप्टीरा जाति) होता है और डोलफिन, पोरपोइसस, बीकड ह्वेल, फिन ह्वेल और अन्य बलीन ह्वेल भी इनमें प्रमुख हैं। जापान और कोरिया के लोगों ने अंतर्राष्ट्रीय तिमि आयोग (आइ डब्ल्यू सी) द्वारा तिमि विपणन पर लगाए गए विल्म्बन के शर्तों का अतिक्रमण करके व्याज रूप से खतरे में पड़ी हुई और अवैद्य जाति तिमि मांस वैद्य जाति तिमियों के स्थान पर विपणन करना शुरू किया है। एर्थ ट्रस्ट जैसे लाभेतर अंतर्राष्ट्रीय संगठन ने जापान से खरीदे गए तिमि मांस के नमूने का अध्ययन किया। इन नमूनों का आनुवंशिक विश्लेषण करने पर प्राप्त परिणाम चौंकनेवाला था, जो तिमि विपणन क्षेत्र में जापान लोगों की कपटता पर होने वाले दोषारोपों को पक्का कर देते हैं। तिमियों के सोलह नमूनों में केवल 7 दक्षिण पसफिक मिक वैल (कानूनी रूप से अनुमत्य) के थे और बाकी कम प्रमुखता वाली तिमि जातियाँ थी।

आनुवंशिक अंकक (जेनेटिक मार्कर)

बाजारों में किए जानेवाले सर्वेक्षणों में, बाजार नमूने ('टेस्ट') के माइटोकोन्ड्रियल डी एन ए (mt DNA) जीनों और जीन बैंक, ई एम बी एल (EMBL) आदि में संग्रहित मूल जाति या 'टाइप' नमूनों से प्राप्त अनुरूप जीनों की आनुवंशिक समानता का आकलन करके जातियों की पहचान की जाती है। अधिकांश बाजार नमूनों में यह आकलन अच्छी तरह किया गया है लेकिन कुछ स्थितियों में एक एक नमूने को जाति स्तर तक पहचान नहीं किया जा सका (उदा: डोलफिन, पोरपोइस और बीकड ह्वेल)। फिर भी अंतर जातीय विभिन्नता की अपेक्षा अंतरा जातीय आनुवंशिक विभिन्नताएं कुछ विशेष प्रकार के आण्विक तरीके से प्रतिपादित किया जा सकता है।

तिमिगण में जाति पहचान के लिए सामान्यतः mt DNA के अति परिवर्तनशील (हाइपरवेरियबिल) 5' के अंत भाग के

पत्रव्यवहार : डॉ. पी. जयशंकर, वरिष्ठ वैज्ञानिक, सेंट्रल मरीन फिशरीज़ रिसर्च इंस्टिट्यूट, कोचीन-18, केरल।



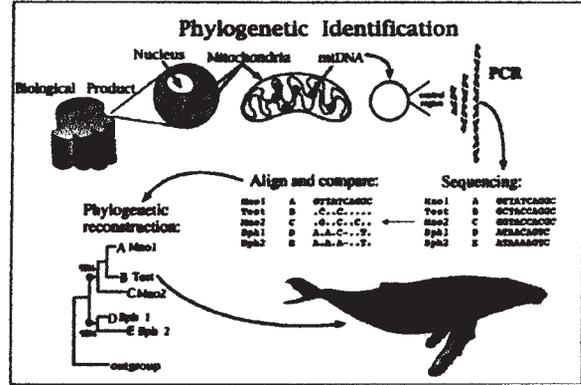
नियंत्रण क्षेत्र (control region) को श्रेष्ठ अंकक माना जाता है क्योंकि इस भाग में द्रुतगति में विकास हो जाता है। उसी कोशिकांग (ओर्गनल्ले) का साइटोक्रोम बी क्षेत्र भी कभी कभी अंकक के रूप में उपयुक्त किया जाता है। यह क्षेत्र प्रोटीन कोडिंग अनुक्रमांग होने की वजह से नियंत्रण क्षेत्र की अपेक्षा कम परिवर्तनशील है। अतः इसके विकास में होने वाली कठिनाई यह है कि इसमें एक अभिलक्षणिक अणु (फंक्शनल मोलिक्यूल) के उत्पादन की ज़रूरत है। फिर भी प्रोब्लेमाटिक डेल्फिनिड्स (स्टेनेल्ला, टर्सियोप्स और डेलफिनस) के लिए साइटोक्रोम बी क्षेत्र अत्यंत प्रभावकारी है जिसमें नियंत्रण क्षेत्र को जाति विभेदकारिता को छिपाने की क्षमता है क्योंकि इस लोकस में उच्च अंतरजातीय परिवर्तन और कम अंतर जातीय परिवर्तन दिखाया पड़ता है। साइटोक्रोम बी में नियंत्रण क्षेत्र की अपेक्षा अधिकतर अंतर जातीय परिवर्तनशीलता है और इनके सूचनाप्रद साइट अधिकतर व्यापक एवं समान रूप से वितरण किया हुआ है।

तिमि जातियों की पहचान की विश्वास्यता टाइप अनुक्रमों के संग्रह (लाइब्ररी) की पर्याप्तता पर आश्रित है। अधिकतर जातियों के आनुवंशिक अनुक्रम सम्मिलित करके और अनुक्रम जोड़ दी गई जातियों में अधिकतर अनुक्रम जोड़ देकर संग्रह का विस्तार करने की ज़रूरत है। इसके उपरांत, प्रतिचयन के पहले किस प्रकार फील्ड पहचान करने के आधार पर प्रलेखों को मज़बूत करने और अन्वेषकों को अन्य संग्रहों से ज्यादातर नमूनों की सामान्य उपलब्धता बढ़ाई जाने की ज़रूरत है।

पहचान के जातिवृत्तीय (फाइलोजेनेटिक) तरीके, विश्वास्यता और अनुरूपता

वाणिज्यिक बाज़ारों के तिमिगण उत्पादों की जाति पहचान प्राथमिक तौर पर डी एन ए अनुक्रमों की जातिवृत्तीय पुनः संरचना (phylogenetic reconstruction) से की जाती है। रीति में 'टेस्ट' डी एन ए अनुक्रमों (नियंत्रण क्षेत्रों या mt DNA के साइटोक्रोम बी क्षेत्र) की तुलना अच्छी तरह प्रलेखित नमूनों के अनुक्रमों के संग्रह के 'टाइप' अनुक्रम के साथ की जाती है।

तिमिगण आकृति विज्ञान के एक विशेषज्ञ द्वारा तिमि की जांच के बाद इसके डी एन ए अनुक्रम (रफरन्स) को अंतर्राष्ट्रीय



चित्र-1. बाज़ारों के तिमिगण उत्पादों की जातिवृत्तीय पहचान के प्राथमिक कदम

आनुवंशिक डाटाबेस (उदा : जीन बैंक) में निक्षिप्त किया जाता है। पहले परीक्षाधीन उत्पाद से डी एन ए का सार निचोड़ना है और पी सी आर में नियंत्रण क्षेत्र या साइटोक्रोम बी क्षेत्र का प्रवर्धन (एमप्लिफाइ) करना है। ओटोमेटेड सीक्वेंसर के ज़रिए एमप्लिकोन का न्यूक्लियोटाइड अनुक्रम निर्धारित किया जाना है। उत्पाद के अनुक्रम, जिसे अब 'टेस्ट' कहा जाता है, को रफरन्स नमूने के अनुक्रम के साथ अनुयोजन (align) और तुलना किए जाते हैं। अंत में, उत्पाद से प्राप्त अनुक्रम को जातिवृत्तीय पुनःसंरचना द्वारा अत्यधिक संबंध रखने वाले रफरन्स अनुक्रम के साथ वर्गीकृत किया जाता है। इस पुनः संरचना का सामान्यतः 'वृक्ष' की तरह प्रस्तुत किया जाता है जिसमें अत्यंत संबंध रखने वाले अनुक्रमों को निकटस्थ शाखाओं के समान व्यक्त किया गया है। इस रीति में बहुसंख्यक जातियों से प्राप्त कम संख्यक रफरन्स अनुक्रमों को उपयुक्त करके जीव का उपगण और कुटुम्ब का निर्वचन किया जा सकता है। 'टेस्ट' अनुक्रम का रफरन्स अनुक्रम के साथ सबसे निकट संबंध होने पर उत्पाद की जाति की पहचान का सबूत हो जाता है। एक या अधिक "आउट ग्रुप" (याने दूरस्थ संबंध की जाति) को वर्गीकरण गलती जैसे त्रुटियों के विरुद्ध उपयुक्त किया जाता है। रफरन्स एवं टेस्ट अनुक्रमों के ग्रूपिंग की विश्वास्यता या अनुरूपता की सापेक्ष मात्रा सूचित करने के लिए पुनः प्रतिचयन (बूटस्ट्राप) प्रक्रिया उपयुक्त की जाती है।

'टेस्ट' नमूने की जाति पहचान की पुष्टि के लिए दो तरीके प्रस्तावित हैं, एक डेलफिनिड्स को छोड़कर बाकी सभी



तिमिगण के लिए और दूसरा केवल डेलफिनिड्स के लिए। पहले तरीके में 'टेस्ट' अनुक्रम को पुष्टि के लिए दिए गए वर्गक (टाक्सोन) (याने जाति) के टाइप अनुक्रमों की श्रेणी के साथ समावेश किया जाना चाहिए। अगर टेस्ट अनुक्रम का समावेश नहीं होता, बल्कि दो टैक्सा गुच्छों के बीच के स्थान में मध्यवर्ती होता है तो यह दोनों वर्गकों के बाहरी का प्रतिनिधित्व करता है या टाइप नमूने में सम्मिलित नहीं होने वाले किसी मध्यवर्ती वर्गक होता है। यह तरीका बलीन या बीकड ह्वेल की पहचान के लिए सफल रूप से उपयुक्त किया जाता है। जाति पहचान की दृढ़ता की पुष्टि के लिए उच्च बूटस्ट्राप मूल्य (70% से अधिक) निर्देशित किया जाता है।

डेलफिनिड्स में अंतरा जातीय आनुवांशिक विभिन्नता सबसे अधिक होने की वजह से जाति पहचान जटिल होता है। इस अन्वेषण के लिए जातिवृत्तीय पुनःसंरचना आवश्यक होने वाले सभी टेस्ट और रफरन्स जीवों के अनुयोजित टेस्ट फाइल की ज़रूरत नहीं है। बल्कि इस में दिए गए टेस्ट अनुक्रम और संग्रह में उपलब्ध एक रफरन्स अनुक्रम का एक साथ युगलतः अनुयोजन होता है और सभी उपलब्ध रफरन्सों का अलग रूप से खोज करके सबसे श्रेष्ठ अनुरूपता की रिपोर्ट की जाती है। इस तरीके को निकट यथार्थ सुमेल (नियर एक्साक्ट मैच) (NEM) कहा जाता है और डोलफिन वर्गकों की पहचान के लिए यह तरीका उपयुक्त किया जाता है। युगलतः अनुयोजन और समंकन (स्कोरिंग) दक्षिण पश्चिम मात्स्यिकी विज्ञान केंद्र (SWFSC), ला जोला, कालिफोर्निया में विकसित है जो कि एक कंप्यूटर कार्यक्रम द्वारा कार्यान्वित किया जाता है। यह ई एम बी एल जैसे अंतर्राष्ट्रीय अनुक्रम डाटाबेस, जीन बैंक आदि समान की रीति है। डेलफिनिड्स के संदर्भ में यह मान लिया जाता है कि अंतर-जातीय तथा अंतरा जातीय विभिन्नताओं के व्यापक परस्पर व्यापन (overlapping) होने पर एक परीक्षित पहचान (attempted identification) के लिए विस्तृत डाटासेट्स की ज़रूरत है।

भारत में समुद्री स्तनी जातियों पर अध्ययन के लिए प्रयास

कुमारन (2002) ने भारतीय समुद्र की समुद्री स्तनियों पर अनुसंधानपरक मूल्यांकन की है। उन्होंने जाति वैविध्यता एवं प्रचुरता, मात्स्यिकी पर आपसी विनियम, निशान लगाना और

ग्रूप के वर्गीकरण में होने वाली कठिनाइयाँ जैसे पहलुओं पर प्रकाश डाला है जो कि अत्यंत महत्वपूर्ण है। भारत में समुद्री स्तनियों पर अध्ययन करने के लिए स्वीकृत अनुसंधान तरीकों में रिक्रियाएँ हैं और समुद्री स्तनियों पर बेहतर जानकारी प्राप्त होने और उनके परिरक्षण के लिए इन तरीकों में सुधार लाना आवश्यक है।

परम्परागत वर्गीकरण विज्ञान

समुद्री स्तनियों को पहचानने के लिए मामूली रूप से अरित्र (फिलप्पर) के बाहरी उपांत से कुल शरीर की लंबाई का अनुपात, रंग का प्रतिमान, दांतों की संख्या, तुलनात्मक अस्थि विज्ञान (ओस्टियोलजी) आदि जैसी विशेषताओं को उपयुक्त किया जाता था। अब तक यह बात व्यक्त नहीं है कि भारतीय अनन्य आर्थिक मेखला (EEZ) और निकटस्थ समुद्रों में तिमि, डोलफिन और समुद्री गाय की कितनी जातियाँ मौजूद हैं। भारतीय समुद्रों से समुद्री स्तनियों की 26 जातियों की उपस्थिति की रिपोर्ट की गई है फिर भी इससे ज्यादा होने की संभावना है।

फोटो पहचान

समुद्री स्तनियों को अलग रूप से पहचानने के लिए पृष्ठ पख और पर्णाभ के फोटो चित्र सहायक होते हैं। समूहन और जाति मिश्रण अध्ययन के लिए यह तरीका उपयुक्त किया जाता है। एक ही भौगोलिक स्थान से दीर्घकालिक अवधि के दौरान खींचे गए फोटो-चित्रों की सहायता से आवासी और प्रवासी समुद्री स्तनियों और पुनरुत्पादन सफलता जानना आसान होता है।

डी एन ए पर आधारित तरीका

नमूना स्रोत

निम्नलिखित समुद्री स्तनियों के नमूनों से ऊतक के नमूने निकाले जा सकते हैं (1) मृत जीव (2) मृतप्राय जीव और (3) समुद्र के जीवंत जीव। डी एन ए सार निचोड़ने के लिए पहले दो स्रोतों से त्वचा की बयोप्सी की जा सकती है बल्कि वन्य समुद्री स्तनियों के सड़ी हुई त्वचा के संग्रहण के लिए बयोप्सी डार्ट (biopsy dart) प्रयुक्त किया जाता है। हर जीव से लगभग 3 ग्राम त्वचा नमूना संग्रहित किया जाता है।



उत्तक को 95% एतनोल में या शीतीकृत अवस्था में रखा जा सकता है।

डी एन ए का निचोड

प्रोटीनेस K पाचन रीति और इसके बाद मानक तरीके से त्वचा के नमूनों से कुल जीनोमिक डी एन ए का सार निचोड किया जा सकता है। संग्रहालय में 5-10% फोर्मलिन में परिरक्षित नमूनों के लिए एकरमान और वाल्श (1997) का चलेक्स 100 तरीका (Eckerman & Walsh) उपयुक्त किया जा सकता है।

अंकक (मार्केर्स)

आर ए पी डी : एक लघु ओलिगोन्यूक्लियोटाइड प्राइमर जो सामान्यतः एक यादृच्छिक अनुक्रम का डेकामेर होता है, के साथ पी सी आर (पोलिमरेस चेइन रियाक्शन) आमापन करने से आर ए पी डी की पहचान की जा सकती है। ऐसे लघु न्यूक्लियोटाइड एक यूकारियोटिक जीनोम के कई क्षेत्रों के लिए पूरक भी हो जाएगा। अगर जीनोमिक अनुक्रम ऐसे उपास्थित है जैसे डी एन ए टेम्प्लेट के विपरीत स्ट्रान्डों के दो विभिन्न क्षेत्रों में प्रतिलोम प्रतिस्थापन (inverted orientation) के रूप में प्राइमर को बंध किया जा सकता है और अगर दोनों क्षेत्र परस्पर निकट है तो पी सी आर चक्र के दौरान मध्यवर्ती डी एन ए का प्रवर्धन होकर एक डी एन ए खंड बन जाता है, जो एथिडियम से अभिरंजित (stained) एगरोस जेल पर दृश्यमान होता है। जीनोटाइपों के बीच की बहुरूपता (polymorphism) दो कारणों से होती है, एक तो न्यूक्लियोटाइड पर आधारित परिवर्तन, जो प्राइमर की तापानुशीलन (अनील) से डी एन ए टेम्प्लेट की क्षमता में बदलाव कराता है और दूसरा कारण प्रवर्धित डी एन ए खंड में कुछ जोड़ना या निकालना है। अतः एक निश्चित आर ए पी डी उत्पाद की उपस्थिति या अनुपस्थिति के रूप में बहुरूपता को देखा जाता है। आर ए पी डी लोसी पूरे जीनोम में यादृच्छिक रूप से वितरित किया जाता है। द्रुतता, सरलता, तुलनात्मक रूप से कम खर्चीला आमापन आदि आर ए पी डी लोसी (loci) के गुण हैं और किसी भी लोसी की फटाफट पहचान की जा सकती है और आमापन स्वतः नियंत्रित भी होता है।

डेकामेर आर्बिट्ररी प्राइमरों की बैटरी को समुद्री स्तनी जातियों, जिनको आकृति विज्ञान विशेषताओं के आधार पर प्राथमिक रूप से पहचान किया जाता है, के डी एन ए परिच्छेद के स्क्रीनिंग के लिए उपयुक्त किया जा सकता है।

माइटोकोन्ड्रियल डी एन ए : नियंत्रण क्षेत्र और साइटोक्रोम बी जीन दोनों को पी सी आर में विशेष प्रारंभकों (primers) को उपयुक्त करके ए बी आई 377 ओटोमेटड सीक्वेन्सर में प्रवर्धन किया जा सकता है लेकिन ओटोमेटड सीक्वेन्सर अत्यंत खर्चीला होने की वजह से पी सी आर उत्पाद अन्य संस्थानों, जहाँ भुगतान देने पर अनुक्रम कर देते हैं, को दिया जाना वांछनीय है।

पहले बताए गए तरीके के द्वारा समुद्री स्तनी की जातियों की जातिवृत्तीय पहचान की जा सकती है। जाति की पहचान की गाढ़ता (consistency) 1000 बूटस्ट्रेप उद्दीपकों को उपयुक्त करके आकलित की जाती है। वेब साइट www.dna-surveillance.auckland.ac.nz जाति पहचान के क्षेत्र के उपयोक्ताओं के लिए अत्यंत अनुयोज्य ढंग से विश्लेषणात्मक कार्यक्रमों समझने के लिए सहायक है।

निष्कर्ष

भारतीय समुद्र की समुद्री स्तनियों पर बहुत कम अध्ययन किया गया है। जीव वैविध्यता परिरक्षण पर वर्तमान जानकारी के आधार पर इन जीवों को अपने आवास स्थान में ही परिरक्षा देने के लिए विशेष रूप से विचार किया गया है। लेकिन, समुद्री स्तनियों के अनुसंधान के विभिन्न पहलुओं पर अब उपलब्ध डाटा इनके परिरक्षण के यथार्थ उपायों के कार्यान्वयन के लिए बिलकुल अपर्याप्त है। इस प्रसंग में जाति की सही रूप से पहचान करना अनिवार्य है। असन्दिग्ध रूप से जाति पहचान के लिए डी एन ए स्तर के अनुसंधान की सहारे से परंपरागत आकृति विज्ञान तरीका प्रमाणित किया जाना चाहिए। विश्वव्यापक तौर पर कई जीव जातियों के डी एन ए अनुक्रमों की सूचनाएं प्राप्त होने में सफलता सिद्ध हुई है। भारत में, यहाँ उपलब्ध जातियों के डी एन ए डाटा बेस हमें बनवाना चाहिए। तिमि, डोलफिन और समुद्री गाय की अंतर एवं अंतरा जातीय विभिन्नताएं समझने के लिए mt DNA फिंगरप्रिंटिंग जैसे उपस्कर अत्यंत उपयोगी बन जाएंगे।



मुख्य शब्द - Keywords

- आण्विक वर्गीकी - molecular taxonomy
PCR - Polymerised chain reaction
समुद्री स्तनियों - marine mammals
जीवीय घटक - biotic constituents
डॉलफिन, पोरपोइस, ह्वेल - Marine mammals of the group Dolphin, Porpoise and Whales
ह्वेल/तिमि - whale
तिमिगणनीय उत्पाद - cetacean product
एस डब्लू एफ एस सी - South West Fisheries Science Centre (SWFSC)
मिंक/बीकड/फिन/बालीन ह्वेल - minke/beaked/fin/balaen whale
अन्तराष्ट्रीय तिमि आयोग - International whale Commission (IWC)
आनुवंशिक अंकक - genetic marker
कोशिकांग - organella
आनुवंशिक अनुक्रम - genetic sequence
जातिवृत्तीय पहचान - phylogenetic identification
उपगण - suborder
कुटुम्ब - family
पुनःप्रतिचयन - boot strap/resampling
वर्गक - taxon (species)
निकटयथार्थ सुमेल - Near Exact Match (NEM)
युगलतः अनुयोजन - pairwise alignment
जातिवृत्तीय - phylogenetic
अरित्र के बाहरी उपांत - outer margin of flipper
अस्थि विज्ञान - osteology
अनन्य आर्थिक मेखला - Exclusive Economic Zone (EEZ)
समुद्री गाय - Seacow - (a marine mammal of the species *Dugong dugong*)
पृष्ठ पख और पर्णाभ - dorsal fins and flukes
समूहन - schooling
तापानुशीलन - anneal
मृतप्राय - stranded/moribund
प्रोटीनेस k पाचन - protinase k digestion
आर ए पी डी - RAPD (Randomised amplified polymorphic DNA)
बहुरूपता - polymorphism

