Archive of SID

استفاده ازنشانگرهای ریزماهواره پیوسته با صفت وزن بدن در غربالگری جمعیت مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

ندا قوتی[1]، حمید فرحمند*[2]، غلامرضا رفیعی[3]، علیرضا میرواقفی[2]، مژده محمدطاهری[1] و بیتا خلیلی[4]

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[2] استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[3] دانشیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

[4] کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، ایران

(تاریخ دریافت: ٨٧/١٠/٢٨، تاریخ تصویب: ٨٨/٣/١١)

چکیده

به منظور بررسی ساختار و غربالگری جمعیت مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان کارگاه شهید باهنر کلاردشت (به عنوان یکی از کارگاه‌های اصلی تامین کننده مولدین پرورشی کشور) براساس حضور یا عدم حضور نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با صفت وزن بدن تعداد۹۲ نمونه از بافت باله دمی مولدین در فصل تکثیر (١٣٨٦/١١/١٧) تهیه و پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر این جایگاه‌های ریزماهواره‌ای بر اساس سه پرایمر OmyRGT14TUF، OmyRGT4TUF و OmyRGT1TUF صورت گرفت. در نهایت جمعیت مذکور بر اساس هاپلوتیپ‌های تولید شده برای هر نشانگر مورد غربالگری قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش حضور نشانگرهای OmyRGT14TUF، OmyRGT4TUF و OmyRGT1TUF را در این جمعیت به ترتیب ٩٢.٤، ٧٨.٨ و ٩٦.٩٧ درصد و تعداد هاپلوتیپ‌های تولید شده برای این سه نشانگر را نیز به ترتیب ٦ ، ٤ و ٦ هاپلوتیپ نشان داد. بررسی ارتباط حضور یا عدم حضور این نشانگرها با صفت وزن بدن در ٢٥ درصد از افراد جمعیت با وزن بالا، حاکی از تاثیر معنی‌دار ($P<0.05$) نشانگر OmyRGT4TUF وارتباط ١٠٠ درصدی نشانگر OmyRGT14TUF با صفت وزن بدن ,در جنس ماده و نیز ارتباط ١٠٠ درصدی نشانگرهای OmyRGT1TUF و OmyRGT14TUF با صفت وزن بدن در جنس نر بود.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، نشانگرهای ریزماهواره، وزن بدن، غربالگری ژنتیکی، انتخاب مبتنی بر نشانگرها

نویسنده مسئول: * تلفن: ٠٢٦١-٢٢٤٥٩٠٨ فاکس: ٠٢٦١-٢٢٤٥٩٠٨ E-mail: hfarahmand@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

طبق اطلاعات موجود حداقل ۱۱ جمعیت مختلف از قزل‌آلای رنگین کمان طی سال های ۱۹۹۶-۱۹۹۰ وارد ایران شده است که متاسفانه تلاشی برای نگهداری جداگانه‌این جمعیت وارداتی صورت نگرفته و تقریبا تمامی این جمعیت به طور وسیعی با هم آمیخته شده‌اند(Abdolhay, 2005). به دلیل این آمیخته گری تصور اولیه بر این است که ذخایر مولدین قزل‌آلای رنگین کمان موجود در کشور دارای یک پایه ژنی وسیع بوده و از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار می باشند.از سوی دیگر گزارشات متعددی از بروز ناهنجاری های ظاهری مانند تغییر شکل ظاهری ماهیان پرواری و کاهش بازارپسندی آنها در کشور وجود دارد (Mousavi *et al.*, 2000; Yousefiyan *et al.*, 2007). افزایش تلفات تخم و بچه ماهی، کاهش نرخ رشد، طولانی شدن دوره پرورش، افزایش مصرف غذا و کاهش تولید، باعث افزایش هزینه‌های تولید و کاهش اقتصادی صنعت تکثیر وپرورش قزل‌آلای رنگین کمان در کشور شده است. علت این امر را می‌توان به تاثیر مسائل ژنتیکی و به طور خاص کاستی ناشی از همخونی نسبت داد (Kincaid, 1983; Gall *et al.*, 1991; Bentsen& Gjerde, 1994).

با توجه به وضعیت موجود، راهکار اساسی حل مشکلات ژنتیکی تکثیر وپرورش ماهی قزل‌آلا در کشور، ایجاد و توسعه برنامه‌های علمی بهگزینی و اصلاح نژاد مولدین بومی قزل‌آلا در سطح ملی است. روش‌های مختلفی برای اصلاح نژاد در آبزیان وجود دارد که کاربرد هر یک از این روش‌ها به نوع صفات مورد نظر، تخمین میزان توارث پذیری این صفات، زیست شناسی گونه و منابع در دسترس وابسته است (Brown, 2003). در حال حاضر به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از روش‌های بهگزینی ژنوتیپی (MAS) که یک رویکرد برعکس است در طی زمان کوتاهی (۲ نسل) می‌توان اقدام به تثبیت لاین‌های مورد نظر نمود(Welz & Geiger, 2000; Sonneson, 2007). اما اجرای برنامه MAS، نیازمند دسترسی به خانواده‌های شناسنامه دار، تولید نقشه‌های پیوستگی با وضوح بالا، درک تعداد QTLهای موثر بر عملکرد و ایجاد صفات، روش وراثت آنها، تعیین پیوستگی و روابط QTLهای مختلف و تخمین اهمیت اقتصادی هر صفت می‌باشد (Chistiakov *et al.*, 2006) بنابراین یکی از موانع اجرای چنین برنامه اصلاح نژاد در کشور ما، عدم وجود خانواده‌های شناسنامه دار و نقشه‌های پیوستگی برای این خانواده‌هاست. به دلیل واردات مولدین قزل‌آلای رنگین کمان، ایران از کشورهای واجد این جمعیت می‌باشد. به نظر می‌رسد بتوان با یک برنامه غربالگری ژنتیکی در جمعیت مولدین موجود در کشور در مدت زمان کوتاهتری به‌این هدف دست یافت.

در این راستا لزوم بهگزینی جمعیت مولدین موجود در کشور بر اساس صفاتی مانند وزن بدن طی دوره پرورش به علت کاهش هزینه‌های تولید و نیز کاهش احتمال خطر ابتلا به انواع عوامل بیماریزای عفونی بیش از پیش احساس می‌گردد. لذا تلاش‌های اولیه براین اساس، بایستی بر شناسایی انواع نشانگرهای ژنتیکی پیوسته با جایگاه‌های ژنی کنترل کننده وزن بدن در جمعیت‌های مولدین موجود در کشور بر اساس نقشه‌های ژنتیکی موجود برای خانواده‌های اجدادی آنها متمرکز گردد. در این راستا غربالگری ژنتیکی جمعیت مولدین موجود ضروری خواهد بود تا با آگاهی از ساختار و شمای کلی جمعیت حاضر بتوان برنامه‌های اصلاح نژاد مبتنی بر نشانگرهای ژنتیکی را برای این گونه تجاری – پرورشی در ایران پایه گذاری نمود. لذا در این تحقیق با توجه به نقشه‌های ژنتیکی موجود برای قزل‌آلای رنگین کمان و بررسی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با جایگاه‌های ژنی کنترل کننده وزن بدن در این نقشه‌ها ، به انتخاب سه جایگاه ژنی ریزماهواره پرداخته و بر این اساس جمعیت مولدین موجود در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت (به عنوان یکی از کارگاه‌های اصلی تامین کننده مولدین قزل‌آلای رنگین کمان در کشور) مورد غربالگری ژنتیکی قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

- تهیه نمونه

به منظور غربالگری و انتخاب مولدین واجد نشانگرهای پیوسته با QTL کنترل کننده وزن بدن، تعداد۹۲ نمونه از بافت باله دمی مولدین مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت در فصل تکثیر (١٣٨٦/١١/١٧) تهیه و پس از تثبیت در اتانول ۹۶ درصد و یکبار تعویض الکل، به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه شیلات و محیط زیست دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل گردید.لازم به ذکر است که قبل از تهیه بافت باله دمی، مولدین مورد زیست سنجی قرار گرفتند. صفات مورد بررسی در زیست سنجی این مولدین شامل طول کل، طول استاندارد، طول سر، عرض و وزن بدن بودند.

- استخراج DNA و تعیین کیفیت و کمیت آن

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، استخراج DNA از آنها به دو روش کیلاکس و فنل- کلروفرم (Sambrook & Russell, 2001; Estoup *et al.*, 1996) صورت پذیرفت. سنجش کیفیت DNA استخراج شده از بافت ، به کمک الکتروفورز در ژل آگارز ۰.۸درصد انجام گرفت. همچنین سنجش کمیت DNA استخراج شده از بافت به کمک الکتروفورز در ژل آگارز ۰.۸ درصد با غلظت‌های متفاوت DNA فاژ λ و روش اسپکتروفتومتری صورت پذیرفت.

- پرایمرهای مورد استفاده

پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش بر اساس مکاتبات شخصی با دکتر رکسرود (مرکزUSDA امریکا) و مطالعه مارتینیوک و همکاران در سال ۲۰۰۳، بر اساس نقشه پیوستگی قزل‌آلای رنگین کمان (Sakamoto *et al.*, 2000) انتخاب شدند. توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با جایگاههای ژنی کنترل کننده وزن بدن، دمای اتصال و نیز شماره ثبت این پرایمرها در بانک ژن در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱- توالی ، گروه پیوستگی، دمای اتصال و شماره ثبت در بانک ژن پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با جایگاههای ژنی کنترل کننده وزن بدن(F :پرایمر پیشرو،R:پرایمر پسرو)

نام جایگاه ریزماهواره	گروه پیوستگی	توالی(5′-3′)	دمای اتصال پرایمر	شماره ثبت در بانک ژن(NCBI)	منبع
OmyRGT1 TUF (N1)	5	F:AGT TTT GAT TGA ACG GGG C R:CAG GGG ACG CCA CCT ATA C	۵۸	AB087586	Mrtyniuk,2003
OmyRGT4TUF (N2)	Oi	F :GGA ACA CTG AGA A T T CCT CCC R :TCG CTC AGC CAC l'AC AAG TG	۶۰	AB087589	Mrtyniuk,2003
OmyRGT14TUF (N3)	N	F:CCT GGC TCT GTT ACC TGT CTG R:ATC AAT AAA CCG CAA ATG GG	۵۸	UB087593	Mrtyniuk,2003

www.SID.ir

Archive of SID

- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر ریزماهواره‌های پیوسته با صفت وزن بدن در مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و به منظور بررسی حضور یا عدم حضور این نشانگرها بر اساس سه پرایمر (N3) OmyRGT14TUF، (N2) OmyRGT4TUF و (N1) OmyRGT1TUF انجام گرفت. ترکیبات مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای شامل: ۵۰ نانو گرم DNA ژنومی، 2.5 µl بافر PCR(X ۱۰،سیناژن-ایران)، 0.5 µl کلرید منیزیم (50 Mm، سیناژن-ایران)، 0.5 µl اولیگونوکلئوتید (10 Mm، سیناژن-ایران)، 0.25 µlاز هر یک از پرایمرهای پیشرو وپسرو، ۰،۵ µl DNA پلیمراز (5U/µl ، سیناژن-ایران) و آب مقطر دیونیزه دو بار تقطیر به مقدار مورد نیاز تا حجم۲۵ µl. شرایط این واکنش به شرح زیر است:

مرحله واسرشت سازی اولیه : ۹۵ درجه سانتی گراد ، 7 دقیقه و پس از آن ۳۰ چرخه. مرحله واسرشت سازی : ۹۳ درجه سانتی گراد ،یک دقیقه. مرحله اتصال پرایمر:۵۸،۶۰ و ۵۸درجه سانتی گراد به ترتیب برای سه نشانگر. مرحله بسط : ۷۲ درجه سانتی گراد، ۳۰، ۶۰ و ۴۵ثانیه به ترتیب برای سه نشانگر.در نهایت ۷دقیقه برای بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد زمان داده شد.

- توالی یابی نشانگرهای مورد بررسی

برای اطمینان از اختصاصی بودن باندهای تولید شده، علاوه بر استفاده از واکنش PCR با سختی بالا، چند نمونه از محصولات PCR نیز جهت توالی یابی از طریق شرکت فزاپژوه به کشور آلمان ارسال گردید. نتایج توالی یابی نشانگرN2 نشان داد که توالی آن دی نوکلئوتیدی و از نوع GT می‌باشد.

- ارزیابی جمعیت مورد بررسی

برای بررسی محصولات تولید شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ، الکتروفورز ژل آگارز 1.5 درصد به کمک نشانگر ۱۰۰ bp (سیناژن-ایران) به منظور تعیین وزن مولکولی و موقعیت این محصولات انجام شد. برای رنگ آمیزی ژل آگارز از اتیدیوم برماید (در حجم نهایی ۴۰µg/ml) استفاده می شد. سپس از روی تولید یا عدم تولید باند، وضعیت و تعداد باندهای تولید شده و اندازه آنها و نیز مقایسه نتایج حاصله با هاپلوتیپ‌های گزارش شده برای این نشانگرها (Mrtyniuk, 2001) ، ساختار جمعیت مولدین قزل‌آلای رنگین کمان به لحاظ حضور یا عدم حضور این نشانگرها مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

- محاسبات آماری

پس از شناسایی باندها برای هر نمونه و گروه بندی افراد براساس نوع باند (چند شکلی) تولید شده، ارتباط هر یک از این هاپلوتیپ‌ها با میزان وزن بدن در جمعیت فوق برای هر نشانگر و به تفکیک جنسیت با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه(نرم‌افزار SPSS 12) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای بررسی ارتباط حضور یا عدم حضور باند با میزان وزن بدن برای هر نشانگر به تفکیک جنسیت در کل افراد جمعیت و نیز در ۲۵ درصد از افراد جمعیت که وزن بالایی داشتند از آزمون t مستقل (نرم‌افزار SPSS 12) استفاده شد.

نتایج

- نتایج زیست سنجی مولدین

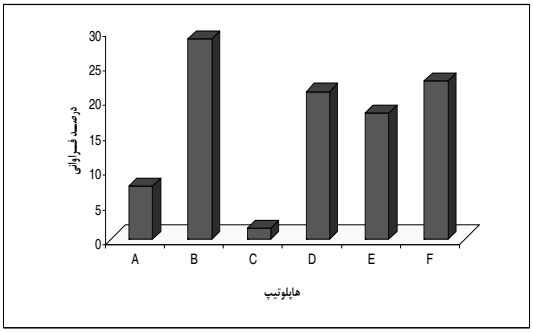
بر اساس زیست سنجی های انجام شده در حین نمونه برداری ، ۶۱.۷۴ درصد از این جمعیت را مولدین ماده و ۳۸.۲۶ درصد را مولدین نر تشکیل می‌دادند. همچنین میانگین طول کل و وزن بدن در مولدین نر و ماده در این جمعیت به ترتیب برابر با ۴۴.۳۲ سانتی‌متر، ۱۱۰۲.۲۱ گرم و ۴۷.۷۳ سانتی‌متر، ۱۴۹۲.۶۳ گرم می‌باشد.

www.SID.ir

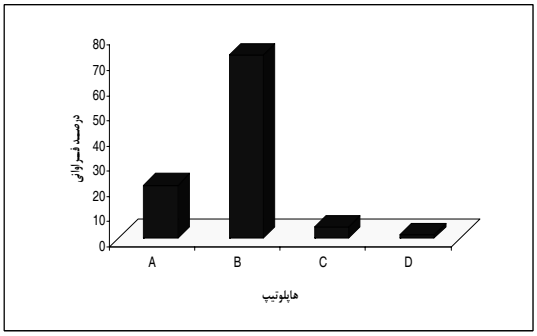
Archive of SID

- غربالگری جمعیت مولدین

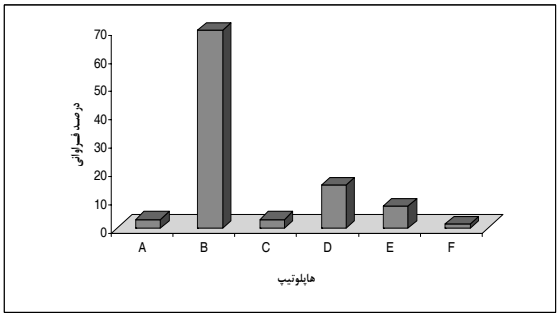
نتایج حاصل از غربالگری جمعیت مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بر اساس حضور یا عدم حضور سه جایگاه ریزماهواره پیوسته با صفت وزن بدن نشان داد که درصد فراوانی سه نشانگرN2,N3،N1 به ترتیب برابر با ۹۲.۴، ۷۸.۸ و ۹۶.۹۷ درصد بود.شکل ۲ درصد فراوانی هاپلوتیپ‌های تولید شده به تفکیک هر نشانگر را نشان می دهد. همانطور که در شکل نیز مشاهده می شود بیشترین درصد فراوانی در مورد هر سه نشانگر مر بوط به‌هاپلوتیپ B است. در حالیکه کمترین درصد فراوانی در بین هاپلوتیپ‌های موجود، به ترتیب مربوط به هاپلوتیپ‌های D,C وF می‌باشد.



الف



ب



ج

شکل ۲- درصد فراوانی هاپلوتیپ‌های تولید شده به تفکیک هر نشانگر

الف: هاپلوتیپ‌های تولید شده برای نشانگرN1 :A: بدون باند,B : یک باند در محدودهbp ۲۰۰-۱۰۰،C: دو باند بسیار نزدیک به هم در محدودهbp ۲۰۰-۱۰۰،D: یک باند در محدودهbp ۲۰۰-۱۰۰و یک باند در محدودهbp ۲۰۰،E: یک باند درbp ۱۰۰و یک باند در محدودهbp ۳۰۰-۲۰۰،F: یک باند درbp ۱۰۰و دو باند بسیار نزدیک در محدودهbp ۳۰۰-۲۰۰. ب: هاپلوتیپ‌های تولید شده برای نشانگرN2 :A: بدون باند,B : یک باند در محدودهbp ۲۰۰-۱۰۰،C: دو باند بسیار نزدیک به هم در محدودهbp ۲۰۰-۱۰۰،D: سه باند بسیار نزدیک به هم در محدوده bp ۲۰۰-۱۰۰. ج: هاپلوتیپ‌های تولید شده برای نشانگرN3:A: بدون باند,B : یک باند در محدودهbp ۲۰۰-۱۰۰،C: دو باند بسیار نزدیک به هم در محدودهbp ۲۰۰-۱۰۰،D: یک باند در محدودهbp ۲۰۰-۱۰۰و یک باند در محدودهbp 300-200،E: دو باند بسیار نزدیک به هم در محدودهbp ۳۰۰-۲۰۰،F: یک باند درbp ۱۰۰و دو باند بسیار نزدیک در محدودهbp۳۰۰-۲۰۰.

www.SID.ir

Archive of SID

- غربالگری جمعیت مولدین به تفکیک جنسیت

جدول ۲ حضور یا عدم حضور سه جایگاه ریزماهواره پیوسته با صفت وزن بدن را به تفکیک جنسیت برای هر نشانگر بیان می کند. همانطور که در این جدول نیز مشاهده می شود در مورد هر سه نشانگر مورد استفاده در این مطالعه ، درصد حضور نشانگرها در جنس نر بیشتر از جنس ماده است. در هر دو جنس در مورد نشانگر های N2 و N3 به ترتیب کمترین و بیشترین درصد حضور نسبت به سایر نشانگرها وجود داشت.

جدول ۲ - درصد حضور یا عدم حضور جایگاههای ریزماهواره پیوسته با صفت وزن بدن به تفکیک جنسیت برای هر نشانگر

نشانگر	جنسیت	حضور (درصد)	عدم حضور (درصد)
N1	نر	96.15	3.85
	ماده	۹۰	۱۰
N2	نر	84.62	15.38
	ماده	77.5	22.5
N3	نر	۱۰۰	۰
	ماده	۹۵	۵

- ارزیابی ارتباط هاپلوتیپ‌های تولید شده با صفت وزن بدن در جمعیت مورد مطالعه

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش ارتباط هاپلوتیپ‌های تولید شده با میزان وزن بدن با گروه بدون باند، تنها در نشانگر N1 (هاپلوتیپ Eنسبت به‌هاپلوتیپA) معنی‌دار بود. ($p<0.05$) از سوی دیگر بررسی ارتباط هاپلوتیپ‌های تولید شده با صفت وزن بدن در۲۵ درصد افراد با وزن بالا حاکی از تاثیر معنی‌دار ($P<0.05$) نشانگر N2 وارتباط ۱۰۰ درصدی نشانگر N3 با این صفت در جنس ماده و نیز ارتباط ۱۰۰ درصدی نشانگرهای N1 و N3 با صفت وزن بدن در جنس نر بود.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از وجود درصد بالایی از حضور ۳ نشانگر ریزماهواره پیوسته با صفت وزن بدن (با میانگین ۸۹.۳۹ درصد) در جمعیت مولدین قزل‌آلای رنگین کمان کارگاه تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت(به عنوان یکی از کارگاه‌های اصلی تامین کننده مولدین قزل‌آلای رنگین کمان در کشور) می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد همانطور که انتظار می‌رفت آمیخته‌گری ۱۱ نوع جمعیت وارداتی قزل‌آلای رنگین کمان در داخل کشور، احتمالا سبب ایجاد همخونی برای جایگاه‌های ژنی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با صفت وزن بدن در این جمعیت‌ها شده باشد که به نوعی موید سایر گزارشاتی است که وجود همخونی درماهیان قزل‌آلای رنگین کمان کشور را تایید می کنند (Mousavi *et al.*, 2000, Yousefiyan *et al.*, 2007). بر اساس نتایج این پژوهش، جمعیت مولدین قزل‌آلای رنگین کمان کارگاه کلاردشت به عنوان یکی از جمعیت‌های عمده فعلی موجود در کشور، از لحاظ حضور یا عدم حضور نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی از تنوع کمی برخوردار می‌باشد. از طرفی حضور درصد بالایی از نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با صفت وزن بدن در جمعیت فعلی، حاکی از حضور بعضی از همان افراد جمعیت‌های شناسنامه دار وارداتی در جمعیت فعلی موجود در ایران می‌باشد که موید کارایی بالای نشانگرهای نقشه یابی شده در آن جمعیت‌ها (مانند نشانگرهای مورد استفاده در این مطالعه) به عنوان یک

www.SID.ir

Archive of SID

روش میانبر در برنامه‌های غربالگری ژنتیکی و اصلاح نژاد مبتنی بر نشانگرها (MAS) در ایران خواهد بود.

از سوی دیگر تنوع هاپلوتیپی ایجاد شده در هر سه نشانگر ریزماهواره مورد بررسی که با جمعیت‌های شناسنامه دار مرجع (Mrtyniuk, 2001) نیز متفاوت است، نشان دهنده وقوع کراسینگ اورهای متعدد(مانند کراسینگ اورهای نابرابر) بین جایگاه ژنی نشانگرهای مورد بررسی و QTL کنترل کننده وزن بدن در طی چند نسل است. همچنین وضعیت توجه به فرضیه تتراپلوئید بودن آزادماهیان (1984, Allendorf & Thorgaard) ازاهمیت بیشتری برخوردار است. زیرا تعداد کپی های بیشتری از این نشانگرها در ژنوم آنها وجود دارد.اما کاربرد هر یک ازاین کپی ها در برنامه‌های MAS منوط به مکانیابی آنها بر روی ژنوم و بررسی پیوستگی آنها با QTL مورد نظر در جمعیت موجود در ایران است. با این حال بیشترین درصد فراوانی در بین هاپلوتیپ‌های تولید شده برای هر سه نشانگر، با هاپلوتیپ‌های تولید شده در جمعیت مرجع (Mrtyniuk, 2001) مطابقت دارد.

در مطالعه مارتینیوک و همکاران در سال ۲۰۰۱ (Mrtyniuk *et al.*, 2001)، قوی ترین احتمال برای حضور QTL کنترل کننده وزن بدن در قزل‌آلای رنگین کمان در گروه پیوستگی 5 و در مجاورت نشانگر OmyRGT1TUF بدست آمده است.در پژوهش حاضر نیز درصد فراوانی حضور این نشانگر در جمعیت مولدین مورد بررسی بالا (۹۲.۴درصد) بود. همچنین یک احتمال قوی برای حضور یک QTL وزن بدن در گروه پیوستگی Oi بدست آمده است. ساکاموتو و همکاران در سال ۲۰۰۰ (Sakamoto *et al.*, 2000) ژن هورمون رشد (GH) را بر روی این گروه پیوستگی و نزدیک به سانترومر نقشه یابی نمودند. در این گروه پیوستگی نشانگر OmyRGT4TUF به دلیل موقعیت خود که در نزدیکی سانترومر (ژن هورمون رشد) قرار دارد بیشترین پیوستگی را با QTL وزن بدن نشان داده است. نشانگر ۱۴TUF OmyRGT نیز که در گروه پیوستگی N قرار گرفته است ، نزدیکترین نشانگر ریزماهواره مورد بررسی در این گروه پیوستگی به سانترومر می‌باشد که یکی از مکان های احتمالی برای حضور QTL وزن بدن گزارش شده است و در مطالعه حاضر نیز درصد حضور این نشانگر در جمعیت بالا (۹۶.۹۷ درصد) بود.

پیوستگی بین نشانگر و جایگاه ژنی کنترل کننده صفت مورد نظر باعث خواهد شد تا مطمئن باشیم با جستجوی این نشانگر در افراد یک جمعیت و سپس انتخاب (بهگزینی) آن نشانگر ، صفت مورد نظر را نیز مورد بهگزینی قرار داده‌ایم. این امر در اجرای برنامه‌های اصلاح نژاد مبتنی بر نشانگرها بسیار حائز اهمیت خواهد بود. از آنجا که وقوع کراسینگ اور در جنس نر آزادماهیان محدود به نواحی انتهایی (تلومریک) کروموزوم می‌باشد، بنابراین نشانگرهای مولکولی و QTLهای واقع در نزدیکی سانترومر در این جنس باعث حفظ "عدم تعادل پیوستگی" می‌شوند (Beaumont & Hoare, 2003). لذا انتخاب نشانگرهای مولکولی نزدیک به سانترومر در جنس نر آزاد ماهیان در برنامه‌های MAS کارایی بیشتری خواهد داشت (Allendorf and Damann, 1977). از طرفی در جنس ماده آزاد ماهیان وقوع کراسینگ اور در طول کروموزوم پراکنش یافته است. بنابراین در انتخاب نشانگر جهت برنامه‌های MAS در این جنس، نیازمند اطلاعات والد پدری خواهیم بود (Sakamoto *et al.*, 2000). لذا نشانگرهای N2و N3 بر مبنای پیوستگی با QTL کنترل کننده وزن بدن و نزدیکی به سانترومر و با توجه به درصد فراوانی بالای حضور در افراد جمعیت کارگاه کلاردشت از کارایی بالایی در اجرای برنامه‌های MAS در ایران برخوردار هستند. زیرا به نظر می‌رسد علی رغم آمیخته‌گری‌های صورت پذیرفته، نرخ وقوع کراسینگ اور در این نشانگرها طی چندین نسل کم بوده است و می‌توان انتظار داشت آنها با حفظ جایگاه و پیوستگی خود نسبت به QTL کنترل کننده وزن بدن، نشانگرهای مناسبی برای انجام برنامه‌های اصلاح نژاد آتی این جمعیت محسوب شوند.

www.SID.ir

Archive of SID

این مسئله به خصوص در زمینه نشانگر N2 که در نزدیکی ژن رشد قرار گرفته است (Sakamoto *et al*.,2000) از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد.

از آنجا که صفت مورد بررسی یک صفت کمی بوده و تحت تاثیر همزمان عامل محیط و ژنوتیپ می‌باشد، برای بررسی دقیق‌تر ارتباط این نشانگر ها با صفت وزن بدن نیازمند اطلاعات فنوتیپی جمعیت فوق نیز خواهیم بود که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفتند. در واقع اطلاعات فنوتیپی به همراه مطالعه ژنتیکی جمعیت، می‌تواند تصویر دقیق تری از وضعیت جمعیت مورد نظر و ارتباط نشانگرهای مورد بررسی با صفت وزن بدن ایجاد نماید و پایه گذار برنامه‌های اصلاح نژاد MAS برای جمعیت مذکور باشد. از آنجا که‌این بررسی در یک جمعیت از مولدین با شرایط پرورشی ناشناخته صورت پذیرفته است نمی‌توان برآورد دقیقی از ارتباط این گروه‌ها با وزن بدن انجام داد.لذا علی رغم وجود ارتباط ۱۰۰ درصدی حضور نشانگرهای N1 و N3 با صفت وزن بدن در جنس نر و نیز ارتباط معنی‌دار ($P<0.05$) و ۱۰۰ درصدی حضور نشانگرهای N2 و N3 در جنس ماده، برای بررسی‌های بیشتر باید نتاج این مولدین در همه گروه‌ها مورد آزمون فنوتیپی قرار بگیرند تا میزان ارتباط گروه‌های تشکیل شده با وزن بدن در شرایط محیطی مشخص و یکسان تعیین گردد. به عبارت دیگر سرعت وزن گیری نتاج این مولدین در گروه‌های مختلف می‌تواند ارتباط دقیق تر این گروه‌ها را با میزان وزن بدن مشخص نماید.

لذا نتایج این پژوهش تنها نشان‌دهنده قابلیت مولدین موجود در کشور برای حضور نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با صفت وزن بدن و انتقال آن به نتاج خود می‌باشد. بنابراین برای تعیین ارتباط دقیق حضور یا عدم حضور این نشانگرها و نیز هاپلوتیپ‌های مختلف تشکیل شده برای هر نشانگر انجام آزمایش‌های فنوتیپی الزامی است.

منابع

- Abdolhay,H.2005. Comprehensive study of molecular genetic and selective breeding in coldwater fish of Iran, Iranian Fisheries Research Organization, project number:796.
- Allendorf F.W., and R.G. Danzman, 1997. Secondary tetrasomic segregation of MDH-B and preferential pairing of homeologues in rainbow trout. Genetics145: 1083-1092.
- Allendorf, F. W& G. H. Thorgaard, 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes, Evolutionary Genetics of Fishes, edited by B. J. Turner. Plenum Press, New York, pp. 1–46.
4- Beaumont,A.R.,K,Hoare,2003. Biotechnology and genetic in fisheries and aquaculture, Blackwell Science.pp:153.
- Bentsen, H.B., Gjerde, B. 1994; Designs of fish breeding programs. Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Edinburgh, Scotland, vol. XVI, pp. 149-158.
- Chistiakov D.A, B.Hellemanas& F.A.M.Volckaert, 2006. Microsatellites and their genomic distribution function and applications; A review with special references to fish genetics. Aquacultuer 255 1–29.
- Estoup,A,Rodolfo,L,Perrot & E,Chourrout,D.1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes, Molecular marine biology and biotechnology 5(4)295-298.
- Fjalestad, K.T.,T.Moen&L.Gomez-Raya,2003. Prospects for salmon breeding programs. Aquacultuer research in genetic technology 34,397-406.
- Gall, G.A.E., Bakar, Y., famula, T., 1993; Estimating genetic change from selection. In: Gall, G.A.E., Chen, H. (Eds.), Genetics in aquaculture IV. Proceeding of the fourth international

www.SID.ir

Archive of SID

symposium, 29 April – 3 May 1991, Wuhan, China. Aquaculture, vol. 111, pp. 75-88, Amsterdam.

- Guyomard,R, Mauger,S, Tabet-Canale,K, Martineau,S, Genet,C, Krieg,F & Quillet,E. A Type I and Type II microsatellite linkage map of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) with presumptive coverage of all chromosome arms.2006. BMC Genomics(7:302).

- Hayes ,B., M ,Baranski., M.E ,Goddard&N, Robinson.,2007. Optimisation of marker assisted selection for abalone breeding programs. Aquaculture 265,61-69.

- Johnson, KR., Wright, LE., and B. May, 1987. Linkage relationships reflecting ancestral tetraploidy in salmonid fish. Genetics 1 16: 579-59 1.

- Kincaid, H.L., 1983; Inbreeding in fish populations used for aquaculture. Aquaculture 33, 215-227.

- Kochers,T.D,Kole,G.2008, Genome mapping & genomics in fishes and aquatic animals, Springer,USA,pp.195.

- Liu, Z.J & J.F, Cordes, 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238.

- Martinuk,CH.J,2001. Microsatellite DNA analysis examining the relationship between growth and maturation rate genes in rainbow trout, A Thesis presented to the faculty of graduate studies of the University of Guelph, National library of Canada.

- Martinuk,CH.J, G. M. L. perry، H. K Moghadam ، M. M. Ferguson & R. G. Danzmman, The genetic architecture of correlations among growth-related traits and male age at maturation in rainbow trout, Journal of Fish Biology (2003) 63, 746–764.

- Mousavi,M., M. Yousefian and A. Saeedi.2000. Study of rainbow trout malformation in Iranian rainbow trout farming pond. Caspian Ecology Academy.

- Nichols,K.M, J,Bartholommew & G.H,Thorgaard ,2003. Mapping multiple genetic loci associated with Ceratomyxa Shasta resistance in oncorhynchus mykiss, Disease of Aquatic Organisms(56) 145-154.

- O'Connell,M & J.M ,Wright,1997. Microsatellite DNA in fishes, Fish Biology and Fisheries 7, 331-363.

- Rexroad,C.E& Y, Palti,2002. Development of ninety-seven polymorphic microsatellite markers for rainbow trout, The American Fisheries Society 132:1214–1221.

- Sakamoto.S, R,G, Danzmann, K, Gharbi, P, Howard, A,Ozaki, S.K ,Khoo, A, Woram, N,Okamoto, M, Ferguson, L.E, Holm, R, Guyomard& B, Hoyheim, 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates, Genetics 155: 1331–1345.

- Sonesson,A.K,2007. Within-family marker-assisted selection for aquaculture species, Genet. Sel. Evol. (39) 301–317.

- Welz,H.G & Geiger,H.H.2000. Principles of marker-assisted selection I. Qualitative traits, ICRISAT 502,63-66.

- Young,W.P,P.A,Wheeler,V.H,Coryrll,P,Keim& G.H,Thorgaard,1998. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids, Genetics 148:839-850.

- Yousefiyan,M and S.Rezvani. 2007, Effect of genetic and environmental factors on malformation in rainbow trout (oncorhynchus mykiss). Pajouhesh & Sazandegi: No 74 pp: 78-85.

www.SID.ir

Archive of SID

Use of microsatellite associated with body weight in screening of rainbow trout brood stock population (oncorhynchus mykiss)

N. Ghovati[1], H. Farahmand*[2],Gh. Rafiee[3], A. Mirvaghefi[2], M. Mohammadtaheri[1] and B. Khalili[4]

[1] M. Sc. graduated of fisheries, Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, University of Tehran, I.R.Iran

[2] Assistant Prof., Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, University of Tehran, I.R.Iran

[3] Associate Prof., Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, University of Tehran, I.R.Iran

[4] M. Sc. of cell and molecular biology, I.R.Iran

(Received: 17 January 2009, Accepted: 01 June 2009)

Abstract

The aim of present study was to screen rainbow trout broodstock population of Kelardasht reproduction and rearing center, with emphasis on presence and non-presence of microsatellite markers associated with body weight. For this purpose, 92 samples of caudal fin tissue from Kelardasht rainbow trout broodstock population were obtained and genomic DNA of these samples were extracted. Three microsatellite loci include omyRGT1TUF (linkage group 5), omyRGT4TUF (linkage group Oi) and omyRGT14TUF (linkage group N) were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) with their specific primers. This study showed that presence of these microsatellite markers in this broodstock population were 92.4%, 78.8% and 96.97% and the number of polymorph for those were 6, 4 and 6 respectively. In 25% of high weight broodstocks there was significant relationship between presence of omyRGT4TUF ($p<0.05$) and complete association between omyRGT14TUF with body weight in females as well as complete association between omyRGT1TUF and omyRGT14TUF with body weight in males.

Keyword: Rainbow trout, Microsatellite, Body weight, Oligoscreening, Marker assisted selection (MAS).

*Corresponding author: Tel: +98 261 2245908 , Fax: +98 261 2245908 , E-mail: hfarahmand@ut.ac.ir

www.SID.ir