فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال اول/ پیش‌شماره اول / بهار ۹۲/ صفحات ۴۰-۳۵

بررسی تنوع ژنتیکی اردک ماهیان تالاب‌های مازندران و گیلان بر اساس توالی یابی نوکلوئتیدی mtDNA

اوشا جوادیان[۱]، کیوان حضایی[۲]، مهدی یوسفیان[۳]، فرامرز لالوئی[۴]

چکیده:

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی اردک ماهیان (*Esox lucius*) ، تعداد ۳۰ اردک ماهی از دو ایستگاه مازندران و گیلان جمع‌آوری گردید. سپس حدود ۵-۳ گرم از بافت نرم‌باله از انتهای باله سینه‌ای جدا و در الکل اتیلیک خالص (۹۶ درصد) فیکس گردید. DNA ژنومی نمونه‌ها به روش فنل- کلروفرم استخراج و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسط دستگاه ترموسایکلر با استفاده از جفت پرایمر sequencing، CDL-D و PIDL پلی مورفی را نشان داد. بخشی از منطقه کنترل mtDNA با اندازه ای حدود ۵۰۰ bp به کمک یک جفت آغازگر و روش چینش یابی نوکلئوتیدی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج ۹ هاپلو تایپ در نمونه‌های گیلان و ۵ هاپلوتایپ در نمونه‌های مازندران مشاهده شد. بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی ۰/۰۲۷ – ۰/۰۰۴ محاسبه شد. بیشترین اختلاف ژنتیکی(Fst=۰/۲۷) بین نمونه‌های ایستگاه مازندران و ایستگاه گیلان به دست آمد. نتایج نشان داد، در ایستگاه‌های مختلف نمونه برداری اردک ماهی از لحاظ ژنتیکی دارای گروه ژنتیکی متفاوت بود اما این تمایز ژنتیکی دارای اختلاف معنی-داری نبود. (p>۰/۰۵)

کلید واژه: اردک ماهی، تنوع ژنتیکی، هتروزیگوسیتی، چینش یابی نوکلئوتیدی mtDNA

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر

۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر kaivanh@hotmail.com

۳- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر

۴- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

مواد ژنتیکی اعم از کروموزومی یا خارج کروموزومی در معرض تغییرات و جهش‌های دائمی قرار دارند و عوامل فیزیکی و شیمیایی از درون سلول یا برون از ارگانیسم، هنگام همانند سازی سبب جابجایی در ترتیب نوکلئوتیدهای DNA می‌شوند. به همین دلیل در گونه‌های جانوری یا گیاهی، جمعیت‌ها و نژادهای متفاوتی ایجاد می‌گردند که شناسایی آنان از طریق صفات ظاهری مشکل و در بعضی مواقع غیر ممکن است. از اینرو، علم ژنتیک و نشانگرهای ژنتیکی و به ویژه نشانگرهای DNA به ابزاری قابل اعتماد و مناسب در مطالعات ژنتیکی و ژنتیک جمعیت تبدیل گردیده است(lin et al, 2002).

اردک ماهیان یکی از با ارزش‌ترین ماهی‌های خوراکی که بومی ساکن برخی از منبع آب شیرین در اطراف دریای خزر می باشد. بررسی های ژنتیک دریای خزر نسبتاً محدود و نیازمند گسترش هستند زیرا دقیق ترین روش تشخیص تفاوت های جمعیتی، در صورت وجود می‌باشند. چینش‌های نوکلئوتیدهای mtDNA یکی از کاربردی‌ترین ابزارهای ارزیابی روابط دودمانی میان جمعیت‌های یک گونه و حتی بین افراد می‌باشد. در این میان منطقه کنترل یا D-Loop با توجه به ویژگی‌هایی که دارد در پژوهش‌های ژنتیک مولکولی دارای اهمیت ویژه‌ای است.

با توجه به مطالب بیان شده در این مطالعه به بررسی تنوع ژنتیکی اردک ماهی در حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از روش چینش یابی نوکلوئتیدی می‌پردازیم.

۲- روش‌ها

۳۰ اردک ماهی در خرداد ماه ۱۳۹۰ با استفاده از تور در مناطق بندر انزلی و تالاب مازندران در حوزه جنوبی دریای خزر نمونه‌برداری شد. سپس ۵۰ میلی گرم از بافت باله سینه‌ای و دمی جدا کرده و در تیوب‌های اپندرف ۱/۵ میلی لیتری حاوی اتانل ۹۶٪ نگهداری و جهت انجام مطالعات به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده دریای خزر واقع در شهر ساری منتقل شدDNA استخراجی پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه در فریزر ۲۰- نگهداری شدند. کیفیت و کمیت DNA استخراجی، با استفاده از روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین گردید (Sambrok et al, 1989).

جهت تعیین تنوع ژنتیکی در اردک ماهی خزری با استفاده از توالی جفت پرایمری که در تحقیق Brzuzan و همکاران (۱۹۹۸) بر روی اردک ماهی شمالی اروپا به کار رفته بود، استفاده شد.

توالی جفت پرایمر مورد نظر عبارت است از:

L: 5′ CCACTAGCTCCCAAAGCTA3′

Archive of SID

www.SID.ir

H: 5′ ACTTTCTAGGGTCCATC3′

واکنش PCR توسط دستگاه ترمو سایکلر ساخت شرکت Eppendorf با استفاده از ۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، dNTP با غلظت ۲۰۰ میکرومول،۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، $MgCl_2$ با غلظت ۲/۵ میکرومول، ۲۰ نانوگرم DNA هدف و آب مقطر به اندازه ای که حجم نهایی محلول واکنش به ۲۵ میکرولیتر برسد، انجام شد. برنامه دستگاه ترموسایکلر (PCR) به ترتیب: مرحله اول واسرشته شدن(Denaturation) ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دوم اتصال پرایمرها به هدف (Annealing) ۶۴- ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله سوم بسط پرایمر (Extension) ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۰ چرخه برای همه‌ی جفت پرایمرها تنظیم گردید. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید۸ درصد به همراه شناساگر DNA ۵۰۰ bp، به مدت سه ساعت با ولتاژ ۱۵۰ئروی ژل PCR وات الکتروفورز شد و قطعات حاصل ازئبا استفاده از نیترات نقره رنگ شد.

دندروگرام فاصله ژنتیکی با استفاده نرم‌افزار Arlequin 3.11 ترسیم گردید .درخت موضع شناسی تکاملی بر اساس فاصله ژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) با استفاده از نرم‌افزار (MEGA) software version 4.0 version 4 MEGA)) ترسیم گردید (Tamura *et al.*, 2007). فاصله ژنتیکی بر اساس (Nei 1972, 1978) مقادیر F_{ST}، بر اساس تست AMOVA در نرم افزار Arlequin 3.11 محاسبه گردید.

۳- یافته‌ها

تعداد و فراوانی هاپلوتیپ در نمونه‌های مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱: تعداد و فراوانی هاپلوتیپ‌های بدست آمده از نمونه های مورد بررسی

هاپلوتیپ	مازندران		گیلان	
	تعداد	فراوانی	تعداد	فراوانی
Hap-1	۵	۱	۵	۰/۵۵
Hap-2	۰	۰	۴	۰/۴۴

توالی هر یک از هاپلوتیپ های مختلف در مناطق نمونه برداری شده از اردک ماهی به صورت زیر بود:

Hap_1 ---CTGATTT-AATACATGCCACTTTTCAA-
Hap_2 ---CTGATT--AATACATGCCACTTTTCAAACAAACCAGC-

بر اساس تست Fst نمونه‌های مناطق نمونه برداری، اختلاف معنی‌داری را با هم نشان دادند

Archive of SID

www.SID.ir

($P\leq ۰/۰۵$) که حاکی از وجود جمعیت‌های متفاوت این گونه در مناطق نمونه برداری شده است. بیشترین اختلاف ژنتیکی ($Fst= ۰/۲۷$) به دست آمد.

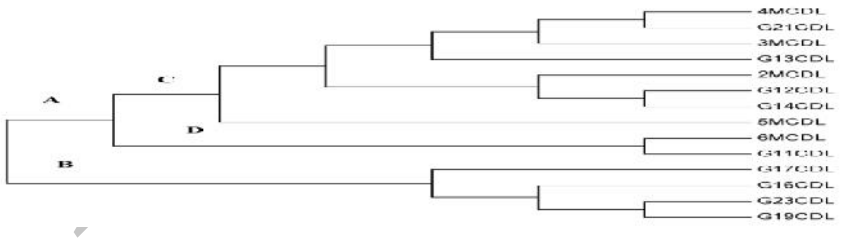
ماتریس فواصل و شباهت ژنتیکی با استفاده از معیار فاصله ژنتیکی Nei (1972) بوسیله نرم افزار Mega4 محاسبه شد. در این بررسی بیشترین فاصله ژنتیکی میان نمونه‌ها (۰/۰۲۷) وکمترین فاصله ژنتیکی میان نمونه‌ها (۰/۰۰۴) بوده است.

شکل ۱ فاصله ژنتیکی حاصل از معیار Nei (1972, 1978) که با استفاده از روش (MP) Maximum parsimony با کمک نرم افزار Mega4 که با ۱۰۰۰ بار تکرار ترسیم گردیده است را نشان می‌دهد.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

جهت مقایسه توالی‌های گونه مورد مطالعه و مشخص نمودن نوکلئوتیدهای حفاظت شده و جهش‌یافته با استفاده از نرم افزار BioEdit، نوکلئوتیدهای تمامی نمونه‌ها باهم مقایسه گردید از میان توالی‌ها در مجموع ۱۴ هاپلوتایپ متغیر بدست آمد. از بین هاپلوتیپ‌های بدست آمد. ۹ هاپلوتایپ مربوط به نمونه‌های گیلان و ۵ هاپلوتایپ مربوط به نمونه‌های مازندران می‌باشد.

ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها ممکن است به طور قابل ملاحظه‌ای بین گونه‌ها بسته به رانش (drift)، جریان ژنی(gene flow) و مهاجرت همسو با حوادث تاریخی بلندمدت همچون گرد هم آمدن بعد از عصر یخبندان و انتخاب (Selection) تغییر کند. در میان ماهیان، ماهیان دریایی تنوع ژنتیکی بالاتر و تمایز ژنتیکی پایین‌تری را نسبت به ماهیان آب شیرین نشان می‌دهند (Brigtte et al., 2005). بر طبق دندروگرام MP (شکل ۱) شاخه اصلی به دو شاخه B و A تقسیم گردیده که در شاخه B فقط نمونه گیلان وجود دارد و شاخه A نیز به دو زیر شاخه C و D تقسیم گردیده است. که در هر دو شاخه نمونه گیلان و مازندران موجود می‌باشد که اکثر نمونه‌ها در شاخه A قرار دارند.



شکل۱: درخت فایلوژنی نمونه‌های اردک ماهی که با روش MP و بر اساس فاصله ژنتیکی ترسیم شده است

Archive of SID

www.SID.ir

در تحقیق حاضر جمعیت‌های اردک ماهی در دو ایستگاه مورد بررسی قرار گرفت با توجه به ارزیابی مقادیر بدست آمده از F_{st} و تست AMOVA نتیجه گرفته شد که گروههای ژنتیکی متفاوتی از اردک ماهی در ایستگاه‌های نمونه‌گیری شده وجود داشته اما این تفاوت در سطح پایینی قرار داشت.

با توجه به حضور اردک ماهی درتالاب‌های پیوسته به دریای خزر و عدم ارتباط آن با آبهای آزاد و با توجه به داده‌های حاصل از این بررسی، به نظرمی رسد، این گونه در معرض تنگنای ژنتیکی قرار دارد.

با وجود این به نظر می‌رسد درون‌آمیزی اجباری این گونه در طی سال‌های حضور در آبهای بسته دریای خزر موجب کاهش شدیدی تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها شده است.

فهرست منابع

1- Brighitte, J., Hansen, M., Loeschcker, V. 2005. Microsatellite DNA analysis of northern pike (*Esox lucius*) populations: insights into the genetic structure and demographic history of a genetically depauperatee specious. Biology Journal of Linnaean Society. 84, 1-11.

2- Bruzan, P., Luczynski, M., Kuznlar, PA., 1998, Mitochondrial DNA in two samples of northern pike, *Esox lucius*, Aqualther Reasearch, 29, 521-526.

3- Lin, Y. S., Y.P. Poh, S.M. Lin, and C.S. Tzeng. 2002. Molecular techniques to identify freshwater eels. Zoological Studies. 41(4):421-430.\

4- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist. 106: 283- 92.

5- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

6- Sambrok, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Electrophoresis of RNA through gelscontaining formaldehyde: Molecular Cloning, 2nd edn. Cold

Archive of SID

www.SID.ir

Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press. 743-745.

Archive of SID

www.SID.ir