فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال اول/ پیش‌شماره اول / بهار ۹۲/ صفحات۴۸-۴۱

بررسی تنوع ژنتیکی اردک ماهی (*Esox lucius*) تالاب انزلی با استفاده از روش مولکولی میکروستلایت

محمدهادی سمیعی اردکانی[۱]، مهرنوش نوروزی[۲]، علی ناظمی[۳]، مریم بقائی بهمبری[۴]، آمنه امیرجنتی[۵]، محمد اسکندری[۶]

چکیده:

اردک ماهی(*Esox Lucius*) ساکن آبهای شیرین است که دارای پراکنش و دامنه‌ی تغذیه‌ای متنوعی است. دوره‌ی تخم‌ریزی این ماهی در تالاب انزلی از اواخر بهمن لغایت اوایل فروردین در دمای ۱۲- ۸ درجه سانتیگراد شروع می‌شود. مطالعات اندکی درباره‌ی ساختار ژنتیکی جمعیت این گونه در سواحل دریای خزر صورت گرفته است. طی فصل‌های زمستان و بهار تعداد ۶۰ نمونه اردک ماهی‌های بالغ از تالاب انزلی جمع‌آوری شد. ۵ جفت پرایمر میکروستلایت بر روی DNA ژنومی به کار گرفته شد. نتایج نشان داد که میانگین اللی به ازای هر لوکوس ۱۰/۸ در جایگاه‌ها (دامنه اللی ۹ ال ۱۳ الل در هر جایگاه) بود. هر فصل دارای الل‌های اختصاصی بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار به ترتیب ۰/۹۰۷ و ۰/۸۸۵ بود. انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ در بیشتر نمونه‌ها مشاهده شد. بر اساس تست AMOVA میزان F_{ST} و R_{ST} بین دو فصل نمونه برداری دارای تفاوت معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$). نتایج نشان‌دهنده وجود جمعیت‌های مختلف اردک ماهی در فصول مختلف تخم‌ریزی در تالاب انزلی است.

کلید واژه: تنوع ژنتیکی، اردک ماهی، تالاب انزلی، میکروستلایت

۱- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن hadisamie@gmail.com
۲- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۳ - گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۴ - گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۵- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۶- گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

اردک ماهی از ماهیان بومی تالاب انزلی است. این ماهی با توجه به رشد نسبتاً خوبی که دارد یکی از ماهیان با ارزش می‌باشد و به لحاظ صید ورزشی با قلاب طرفداران بسیاری دارد اما در سالهای اخیر به علت صید بی‌رویه خصوصاً در مناطق حفاظت شده، آلودگی زیست محیطی و تخریب زیستگاه اصلی (تالاب انزلی) و کاهش منابع غذایی اردک ماهی در سالهای اخیر منجر به کاهش شدید ذخایر آن در تالاب انزلی شده است ولی با این حال همچنان مهمترین و اقتصادی‌ترین ماهی تالاب انزلی است (۱، ۲، ۳، ۴). استفاده از نشانگرهای مولکولی منجر به پیشرفت سریع مطالعات مربوط به تشخیص تنوع ژنتیکی گونه-های آبزیان شده است(۱۲). میکروستلایتها از جمله مهمترین نشانگرهای مولکولی می‌باشد که به طور گسترده و فراوان در ژنوم موجودات زنده پراکنده شده‌اند. از این نشانگرها به دلیل دارابودن سطوح بالای پلی مورفیسم، اندازه نسبتاً کوچک و روشهای تشخیصی سریع به طور گسترده‌ای به منظور تشخیص ذخایر ژنتیکی، انتخاب مولدین و تعیین نقشه ژنی صفات مهم اقتصادی بکار می‌روند(۷). از جمله مطالعات انجام گرفته بر روی خانواده اردک ماهیان می‌توان (۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۶) اشاره کرد. این مطالعه با هدف تعین تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت اردک ماهی تالاب انزلی به عنوان یکی از گونه های با ارزش تالاب انزلی با استفاده از نشانگرهای میکروستلایت انجام می‌گیرد تا تنوع ژنتیکی و جمعیت‌های احتمالی شناسایی گردد.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- نمونه برداری

نمونه گیری از منطقه تالاب انزلی در دو فصل بهار و تابستان و در هر فصل ۳۰ نمونه، از قسمت باله‌ی دمی انجام گرفت. سپس نمونه‌ها در الکل ۹۶٪ فیکس گردید و در نهایت به آزمایشگاه ژنتیک انتقال یافت و در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد، تا شروع مرحله‌ی استخراج نگهداری شدند.

۲-۲- استخراج DNA

استخراج DNA از بافت باله‌ی دمی اردک ماهی به روش کیت و از شرکت روچ آلمان با با کت نامبر ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱ انجام گردید. به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده گردید.

۲-۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از ۵ جفت پرایمر میکروستلایت با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و دامنه مواد مصرفی در پرایمرها شامل: dNTPs ۰/۲، میلی مولار؛ پرایمر

Archive of SID

www.SID.ir

۱میکرولیتر؛ DNA ، ۱۰۰ نانوگرم؛ تگ DNA پلی مراز هات استارت ۰/۴ – ۰/۳ یونیت، PCR بافر هات استارت، 1x؛ کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مولار، آب مقطر دیونیزه برای رساندن به حجم مورد نظر در pH : ۸/۷ انجام گرفت. شرایط چرخه دمایی و مشخصات داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به ترتیب مرحله جداسازی ۹۵ درجه سانتیگراد از ۴۵ ثانیه تا ۲ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها به هدف از ۵۷ تا ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه تا ۲ دقیقه و ۳۰ تا ۳۵ چرخه، مرحله بسط پرایمر ۷۲ – ۷۰ درجه سانتیگراد ، ۴۵ ثانیه تا ۲ دقیقه بهینه سازی گردید (جدول ۱). محصولات تکثیر شده با استفاده از ژل پلی آکریل آماید ۸ درصد الکتروفورز و با نیترات نقره رنگ آمیزی شد و تصویر ژلها تهیه گردید و با استفاده از نرم افزار uvitec بررسی شد.

۳- آنالیز آماری

پس از رتبه دهی به الل‌ها بر مبنای اندازه و طول هر باند بر حسب جفت باز(bp) محاسبات ژنتیکی از جمله فراوانی اللی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) و قابل انتظار (He)، شاخص تمایز ژنتیکی F_{ST} و R_{ST} بر اساس فراوانی و بر اساس تست AMOVA، جریان ژنی، شباهت و فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار GenAlex (۱۴) محاسبه گردید.

۴- یافته‌ها

به منظور بررسی ژنتیک جمعیت نمونه‌های اردک ماهی در تالاب انزلی از ۵ جفت پرایمر میکروستلایت استفاده شد که پس از (PCR) و الکترفورز ژل پلی آکریل آمید همه ۵ جفت پرایمر تولید باندهای پلی مورفیک نمودند. در مجموع تعداد ۶۴ الل شناسایی شد. میانگین تعداد کل الل واقعی ۱۰/۸ بدست آمد. مجموعا ۱۳ الل اختصاصی که ۹ الل اختصاصی در فصل بهار و ۴ الل اختصاصی در فصل زمستان یافت شد. در این بررسی دامنه Ho بین دو فصل نمونه برداری در تمامی لوکوس‌ها ۰/۷۳۳ تا ۱ و متوسط ۰/۹۰۷ بود که کمترین مقدار ۰/۷۳۳ در جایگاه Eluc004 در نمونه‌های جمع آوری شده از زمستان و بیشترین مقدار ۱ در جایگاه Eluc041 مربوط به نمونه‌های جمع آوری شده از بهار می‌باشد. دامنه He نیز بین ۰/۹۱۴– ۰/۸۵۵ و متوسط آن ۰/۸۸۳ است که کمترین مقدار در جایگاه Eluc045 مربوط به نمونه‌های زمستان و بیشترین آن در لوکوس Eluc027 در نمونه‌های بهار می‌باشد. در بررسی تعادل هاردی واینبرگ (H-W) اکثر لوکوس‌ها خارج از تعادل بودند($P<0/001$). فقط در لوکوس Eluc027 در فصل بهار انحراف از تعادل دیده نشد(جدول ۱). میزان F_{ST} بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۲۳ بدست آمد که نشان دهنده تمایز ژنتیکی کم می‌باشد (۶). میزان F_{ST} و R_{ST} بر اساس تست AMOVA معنی‌دار بود($P<0/01$). میزان جریان ژنی ۱/۱۹۱ محاسبه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

۵- بحث و نتیجه گیری

با توجه به آمار میزان صید اردک ماهی از تالاب انزلی در سالهای گذشته مشخص می‌گردد که حجم توده زنده این گونه‌های با ارزش به علت صید بی‌رویه، آلودگی زیست محیطی و تخریب زیستگاه دارای کاهش بوده است(۲، ۴). به همین علت نیاز به آگاهی از ذخایر این ماهیان ضروری به نظر می‌رسد. در این بررسی به منظورشناسایی جمعیت‌های مختلف اردک ماهی از ۵ جفت پرایمر اختصاصی میکروستلایت استفاده گردید. باندهای حاصله همگی پلی مورفیک بودند. در این مطالعه میانگین اللی بدست آمده (۱۰/۸±۰/۴۹) با مقدار اعلام شده (۹/۱/±۶/۱) جهت ماهیان آب شیرین در یک راستا بود (۹) ولی بیشتر از میزان اعلام شده توسط سایر محققین بر روی اردک ماهی بوده (۱۰،۱۵،۱۶). با توجه به اینکه وضعیت جمعیت این گونه تا حدی بهبود یافته اما شرایط نامساعد تالاب انزلی و تغیرات کیفیت آب رودخانه‌ها در پایین دست در اثر ساخت سدهای متعدد و برداشت بیش از حد آب برای کشاورزی، شرب و صنعت، باعث شده تا این گونه در طبقه نیازمند حفاظت قرار بگیرد (۲). در این بررسی تعداد زیادی الل با فراوانی پایین دیده شد که ممکن است علت این امر به تاریخچه تالاب انزلی برگردد که ذخایر بزرگی از این ماهی در سالیان گذشته در آن زندگی می‌کردند که امروزه به دلیل صید بی‌رویه و آلودگیهای زیست محیطی و کاهش تکثیر طبیعی کم شده‌اند اما به کلی نابود نگردیده‌اند که نیازمند به حفاظت دارند. یکی از روش‌های مؤثر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف محاسبه میزان هتروزایگوسیتی می‌باشد. زیرا هر هتروزیگوت، ناقل الل‌های متفاوتی که نشان دهنده تنوع و سازش پذیری نسبت به شرایط متغییر محیطی بوده و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل: رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری تحت تأثیر آن است (۸). در بررسی حاضر در دو فصل نمونه برداری شده میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزایگوسیتی قابل انتظار بیشتر بود که نتایج بدست آمده با بررسی دیگر محققین در سایر مطالعات در یک راستا می‌باشد (۱۰،۱۵). احتمالاً در بررسی حاضر، افزایش هتروزایگوسیتی در برخی جایگاههابه علت وجود اللهای نول می‌باشد که به اشتباه رتبه دهی شده‌اند. از آنجایی که در این بررسی همه نمونه ها از تالاب صید شده بودند احتمالاً افزایش میزان هتروزایگوسیتی به علت وجود افراد نا مرتبط از دیگر مناطق باشد. در بررسی حاضر بر روی اردک ماهی، هر دو فصل نمونه برداری در اکثر لوکوسها خارج از تعادل بودند و فقط یک لوکوس در تعادل بود($P<۰/۰۰۱$). چنین نتیجه‌ای می‌تواند ناشی وجود الل‌های نول یا خنثی باشد. با توجه به اینکه وجود اللهای نول در ماهیان پدیده‌ای معمول است و بسیاری از محققین وجود الل‌های نول را در توارث میکروستلایت در اردک ماهیان تأیید کرده‌اند (۱۱، ۱۳،۱۶). در این بررسی میزان F_{ST} بر اساس فراوانی اللی ۰/۰۲۳ بدست آمد که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی کم می-باشد(۶). بر اساس تست AMOVA میزان F_{ST} و R_{ST} بین دو فصل نمونه برداری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$). از این رو به نظر می‌رسد که حداقل دو جمعیت مختلف ژنتیکی در تالاب انزلی وجود داشته

Archive of SID

www.SID.ir

باشد. علت کم بودن شاخص تمایز در این بررسی را چنین می‌توان تفسیر کرد که در ماهیان بین مقدار F_{ST} و قابلیت پراکنش همبستگی منفی وجود دارد (۱۷). با توجه به این فرضیه و وجود پراکنش بالا برای این ماهی در تالاب انزلی، در هنگام مهاجرت در زیر جمعیت‌ها ارتباط زیاد ایجاد می‌شود که علت وجود ساختار جمعیتی کم این گونه است. این بررسی دلایل و نتایج اولیه را برای مجزا بودن جمعیت اردک ماهیان در تالاب انزلی در فصلهای مختلف تخم ریزی و وجود تنگناهای ژنتیکی بر آنها رانشان می‌دهد و طبق واقعیت‌های موجود، هر سال میزان صید اردک ماهیان بر اثر صید بی‌رویه و آلودگی‌های موجود در تالاب کاهش می‌یابد. به همین دلیل برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی آن ضروری است بررسی و تحقیقات مناسبتر و بیشتری در جهت بهره برداری پایدار و حفاظت از ذخایر ژنتیکی آن صورت بگیرد.

جدول۱- دمای اتصال(^{o}C) ، دامنه اللی (bp)، تعداد اللی (Na)، الل های مؤثر (Ne)، اللهای اختصاصی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزایگوسیتی مورد انتظار (He)، تعادل هاردی وینبرگ (معنی دار نیست = ns ؛ ***۰/۰۰۱> p ؛۰/۰۱> p؛ *۰/۰۵> p) برای فصلهای نمونه برداری شده در۵ لوکوس میکروستلایت در اردک ماهی**

دامنه االی / دمای اتصال	بهار	زمستان	لوکوس
			Eluc002
۲۴۴-۲۸۴	۹(۷/۲۷۸)	۱۰(۹/۰۴۵)	Na(Ne)
۵۸	۰/۸۶۷(۰/۸۶۳)**	۱(۰/۸۸۹)**	Ho(He)
			Eluc004
۲۳۸_۲۷۲	۱۱(۹/۷۳۰)	۱۱(۷/۲۲۹)	Na(Ne)
۵۷	۰/۹۶۷(۰/۸۹۷)**	۰/۷۳۳ (۰/۸۶۲)***	Ho(He)
			Eluc027
۱۴۲-۱۶۸	۱۳(۱۱/۶۸۸)	۹(۷/۶۲۷)	Na(Ne)
۵۹	۰/۹۳۳(۰/۹۱۴)ns	۰/۸۳۳(۰/۸۶۹)***	Ho(He)
			Eluc041
۲۱۰ -۲۳۶	۱۲(۱۰/۱۶۵)	۱۱(۹/۲۳۱)	Na(Ne)
۵۹	۱(۰/۸۹۲)***	۱(۰/۹۰۲)***	Ho(He)
			Eluc045
۱۷۰ -۲۰۴	۱۳(۹)	۹(۶/۸۹۷)	Na(Ne)
۶۱	۰/۸۰۰(۰/۸۸۹)**	۰/۹۳۳(۰/۸۵۵)***	Ho(He)
	۹	۴	الل اختصاصی
	۱۱/۶ (۹/۵۷۵)	۱۰ (۸/۰۰۶)	میانگین Na(Ne)

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع

۱- جمال‌زاده فلاح، ف.، خارا، ح.، دقیق روحی، ح.، صیاد بورانی، م. ۱۳۹۰. بررسی مقایسه‌ای میزان شیوع و شدت آلودگی اردک ماهی (*Esox lucius* Linnaeus, 1978) در مناطق چهار گانه تالاب انزلی. مجله تالاب، دانشگاه آزاد اسلامی اهواز، سال دوم ف شماره هشتم، صفحات۵۶-۵۳.

۲- عبدلی، الف، نادری، ۱۳۷۸، تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. انتشارات علمی آبزیان.

۳- عباسی، ک، صیاد رحیم، م.۱۳۸۷. بررسی همپوشانی تغذیه‌ای ماهیان شکاری مهم تالاب انزلی. نخستین همایش ملی منابع شیلاتی دریای خزر.دانشگاه گرگان صفحه ۸۷.

۴- کریم پور، م.، ۱۳۷۷. ماهیان تالاب انزلی. مجله شیلات ایران. شماره ۲ سال هفتم. صفحات ۹۴-۸۳ .

5- Aguilar, A. , Banks, J.D. , Levine, K.F. , Wayne, R. K. 2005. Population genetics of northern pike (*Esox lucius*) introduced into Lake Davis, California. Can. J. Fish. Sci. Aquaculture. 62: 1589-1599.

6- Balloux, F. ,Lugon-Moulin, N. 2002. The estimate of population diffrention with microsatellite markers. Molecular Ecology. 11: 155-165.

7- Chistiakov, D.A. , Hellemans, B. , Haley, C.S. , Law, A.S. , Tsigenopoulos, C.S. , Kotoulas, G. , Bertotto, D. , Libertini, A. and Volckaert, F.A. 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass Dicentrarchus labrax L. Genetics. 170: 1821–1826.

8- Ciftci, Y. and Okumus, I. 2002. Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic. Science. 2: 145-155.

Archive of SID

www.SID.ir

9-Dewoody, J. A. and Avise, J. C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadramous fishes compared with other animals. Jornal of Fish Biology.56:461-473.

10- Jacobsen, B.H. , Hansen M.M. , Loeschcke, V. 2005. MicrosatelliteDNA analysis of northern pike (*Esox lucius* L) populations:Insights into the genetic STructure & demographichiSTory of a genetically depauperate species. Biolgical Journal of the Linnean Soc. 84:91-101.

11- Launey, S. , Krieg, F. , Morin, J. , Laroche J. 2003. Five newmicrosatellite markers for Northern pike (*Esox lucius*). Molecular Ecology Notes. 3:366-368.

12- Liu, Z.J. and Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture. 238: 1-37.

13- Lucentini, L. , Palomba, A. , Lancioni, H. , Gigharelli, L. , Natali, M. , Panara, F. 2006. Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius* L). Fisheris Resarch. 80:251-262.

14- Peakall, R. , Smouse, P.E. 2009. GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian National University. Canberra. Australia. Available at: http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/.

15- Reading , b.j., Wills, P. S.2003. development of microsatellait markers for muskallang (esox masquinongy) & croos- species amplification two other esoside. Molecular ecology.3: 447-449.

Archive of SID

www.SID.ir

16- Wang J, Chenghui W, Long Q, Yuqing Ma, Xinxin Y, Zsigmond J, Sifa Li. 2011.Genetic characterization of 18 novel microsatellaite loci in northern pike(Esox lucius). Genetic and Molecular Biology.34:169-172.

17- Waples, R.S. 1987. A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. Evolution. 41. 385– 400.

Archive of SID

www.SID.ir