Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره چهارم ، شماره۱ ، بهار ۱۳۸۸
صفحه٤٦-٤١

بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus caspicus*) در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD

سعید کیوان شکوه[۱]، محمد رضا کلباسی[۲]
۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی نور، دانشگاه تربیت مدرس

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : keyvan56@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۶/۱۴)

چکیده

ماهی کلمه *Rutilus rutilus caspicus* یکی از گونه‌های ارزشمند و اقتصادی دریای خزر از نظر مصارف انسانی می‌باشد. در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای RAPD، شباهت و فاصله ژنتیکی ماهی کلمه در سواحل ایرانی دریای خزر (در دو منطقه گرگان و بندر انزلی) مورد مقایسه قرار گرفت. با کاربرد ده آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی، در مجموع ۹٤ باند واضح و مشخص در هر دو جمعیت ثبت گردید. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، تعداد باندهای پلی مورف در هر دو جمعیت تقریبا مساوی بود که نشان دهنده وجود سطوح یکسانی از میزان پلی مورفیسم در جمعیت کلمه گرگان و جمعیت تالاب انزلی می‌باشد. میزان فاصله ژنتیکی (۰/۰٤) دو جمعیت با وجود فاصله جغرافیایی زیاد بین دو منطقه ناچیز بود.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
ماهی کلمه دریای خزر،
***Rutilus rutilus caspicus*،**
RAPD

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

شیلات ایران در جهت بازسازی ذخایر و ازدیاد نسل برخی از گونه‌های ماهیان اقتصادی دریای خزر، تلاش‌های قابل توجهی نموده است. احداث کارگاه‌های متعدد جهت تکثیر و رهاسازی میلیونها عدد بچه ماهی انگشت قد در دریا از جمله این اقدامات محسوب می‌شود (۱). آگاهی از وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های یک گونه از دیدگاه آبزی پروری و انتخاب مولدین شایسته جهت تکثیر در کارگاه‌ها و همچنین بهره برداری از ذخایر طبیعی و تعیین سیاست‌های حمایتی برای حفاظت از گونه‌های در معرض خطر انقراض حائز اهمیت است (۱۱).

یک گونه از ماهیان با ارزش اقتصادی شمال ایران، ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus caspicus*) می‌باشد که همه ساله مقدار زیادی از آن در جنوب دریای خزر صید می‌شود (۲). این گونه در اوایل دوره زیستی خود پلانکتون خوار بوده و سپس از گیاهان و جانوران کفزی به ویژه نرمتنان تغذیه می‌نماید. ماهی کلمه زیستگاه‌های نزدیک به آب‌های شیرین را ترجیح داده و عمدتا به صورت گله‌ای زندگی می‌نماید (۲). از نظر اکولوژیکی، این گونه نقش مهمی در زنجیره غذایی فیل‌ماهی دریای خزر دارد. مطالعات گذشته حاکی از وجود دو جمعیت از این ماهی در بخش جنوبی دریای خزر است که از آنها تحت عنوان کلمه انزلی (جنوب غربی دریای خزر) و کلمه گرگان (جنوب شرقی دریای خزر) یاد می‌شود (۷). تفاوت بارز کلمه انزلی با کلمه گرگان از لحاظ مورفومتریک و مریستیک، در پهنای بیشتر بدن، چشم کوچکتر و رشد بیشتر آن است (۲).

از آنجا که مطالعات پیشین جهت شناسایی جمعیت‌های این گونه عمدتاً مبتنی بر شاخص‌های مریستیک و مورفومتریک بوده است (۲و۷)، لذا اطلاعات بسیار محدودی در مورد تنوع این گونه در سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد. مطالعه ژنتیکی جمعیت‌های ماهی کلمه در انزلی و گرگان با استفاده از روش PCR-RFLP حاکی از عدم وجود تمایز ژنتیکی معنی‌دار بین جمعیت‌های این دو منطقه می‌باشد (۳).

یکی از روش‌های مبتنی بر PCR که امروزه جهت بررسی تنوع و روابط ژنتیکی میان جمعیت‌ها بکار می‌رود، روش RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) می‌باشد. از جمله مزایای این روش که در آن از آغازگرهای کوتاه دارای توالی تصادفی جهت تکثیر بخشهای مجزایی از ژنوم یک موجود استفاده می‌شود، سهولت و سرعت انجام آزمایشهای مربوط به آن و مهمتر از آن عدم نیاز به وجود اطلاعات در مورد پیشینه ژنتیکی موجود مورد نظر می‌باشد (۱۰). از این روش جهت بررسی روابط و تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلفی از ماهیان نظیر قزل آلای قهوه‌ای و ماهی آزاد اقیانوس اطلس (۹)، باس دهان بزرگ (۱۹)، کپور معمولی (٦)، کپورماهیان هندی (۵) و تیلاپیا (۱۱) استفاده شده است.

با توجه به ارزش اقتصادی ماهی کلمه و لزوم انتخاب مولدین مناسب جهت بازسازی ذخایر و همچنین با توجه به اهمیت اکولوژیکی این گونه به عنوان یکی از منابع غذایی فیل‌ماهی دریای خزر، هدف از انجام این تحقیق ارائه اطلاعات بیشتر در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این گونه بود. به همین منظور، با استفاده از روش PCR-RAPD شباهت و فاصله ژنتیکی ماهی کلمه در دو منطقه گرگان و بندر انزلی با فاصله جغرافیایی نسبتاً زیاد، مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه برداری و استخراج DNA

جمع آوری نمونه‌ها بصورت تصادفی و از ماهیان صید شده از دو منطقه خلیج گرگان (عرض جغرافیایی ″۲٦/۳۵ ′٤۹ °۳٦ و طول جغرافیایی ″٤۵/۳۲ ′٤۵ °۵۳) و تالاب انزلی (عرض جغرافیایی″٤٦/٦۳ ′۲٦ °۳۷ و طول جغرافیایی ″۲۳/۰۲ ′۲۲ °٤۹) انجام شد. در هنگام نمونه‌برداری از عضله بیست قطعه ماهی کلمه در هر منطقه نمونه بافت برداشته و پس از تثبیت آنها در اتانول ۹٦ درصد به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور منتقل گردید.

استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفورم همراه با تغییراتی جزئی انجام شد (۱۳). ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراجی با الکتروفورز آن بر روی ژل آگاروز یک درصد و مشاهده وضوح و شدت باندهای تولید شده انجام شد (٤).

Archive of SID

۲-۲-آزمایشهای PCR و الکتروفورز

در این تحقیق از ده عدد آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی با توالی‌های مختلف استفاده شد (جدول ۱). در هر واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ مایکرو لیتر از ۱۵ نانوگرمDNA، X1 بافر PCR، ٤۰۰ مایکرومولار از هرdNTP، ۰/۵ مایکرومولار آغازگر، ۱ واحد آنزیم تک پلیمراز و ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم استفاده شد. در هر سری از آزمایش‌ها از یک کنترل منفی نیز استفاده گردید. به غیر از آغازگرها (IBA، آلمان)، سایر مواد مورد استفاده در واکنش‌های PCR ساخت شرکت سیناژن بود. واکنش PCR در تیوب‌های ۰/۲ مایکرو لیتری انجام شد. تنظیم درجه حرارت دستگاه ترموسایکلر (Palm Cycler, Corbett Research, Australia) به صورت ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه برای واسرشته سازی اولیه، همراه با ۳۵ چرخه حرارتی به صورت ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۳٦ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه جهت اتصال آغازگر و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه انجام شد. پس از آن نیز به منظور بسط نهایی واکنش از درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید.

جدول۱- کد و توالی آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه دریای خزر *Rutilus rutilus caspicus*

کد آغازگر	توالی آغازگر
P-01	GTAGCACTCC
P-02	TCGGCACGCA
P-03	CTGATACGCC
P-04	GTGTCTCAGG
P-05	CCCCGGTAAC
P-06	GTGGGCTGAC
P-07	GTCCATGCCA
P-08	ACATCGCCCA
P-09	GTGGTCCGCA
P-10	TCCCGCCTAC

به منظور ظاهرسازی و بررسی الگوی باندی نمونه‌ها ۵ مایکرو لیتر از هر محصول PCR بر روی ژل پلی‌آکریلامید ٦ درصد رانده شد و پس از انجام الکتروفورز (۱۵۰ ولت به مدت ٤ ساعت)، ژل‌های مورد نظر با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید (٤).

۲-۳- تجزیه و تحلیل داده ها

ژنوتیپ هر فرد با مشاهده الگوی باندی مربوط به آن تعیین گردید. امتیازدهی باندها با ثبت عدد یک در صورت وجود باند و ثبت عدد صفر در صورت عدم وجود باند مورد نظر در الگوی باندی هر فرد انجام شد (۸). در تعیین ژنوتیپ افراد تنها باندهای تکرارپذیر و با وضوح زیاد ثبت گردید و از ثبت باندهای ضعیف و تکرارناپذیر صرفنظر گردید. جهت حصول اطمینان از حضور باندها و تکرارپذیری آنها، آزمایشهای PCR دو بار تکرار گردید.

مقایسه و تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به دو جمعیت مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار POPGENE انجام شد که در این برنامه شباهت ژنتیکی میان افراد بر اساس رابطه ۱ محاسبه می‌گردد(۱۲).

رابطه۱: $SAB = 2NAB / (NA + NB)$

که در آن SAB شباهت ژنتیکی دو فرد A وB، NAB تعداد باندهای مشترک میان دو فرد A و B و NA و NB به ترتیب تعداد کل باندهای فرد A و B می‌باشد. فاصله ژنتیکی (D) نیز از طریق رابطه ۲ محاسبه شد(۱۲).

رابطه۲ : $D=1-SAB$

نتایج

در این تحقیق با استفاده از ده آغازگر در مجموع ۹٤ باند واضح و تکرارپذیر ثبت گردید که ٤۳ عدد (٤۵/۷ درصد) از این باندها پلی مورف و ۵۱ عدد از آنها مونومورف بودند (جدول۲). هیچکدام از باندهای تولید شده وابسته به یک جمعیت نبود. هر آغازگر بطور متوسط ۹/٤ باند تولید نمود که اندازه تقریبی باندهای مذکور بین ۲۰۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز بود.

آغازگر P-07 بیشترین تعداد باند (۱۷ باند) و آغازگر P-01 کمترین تعداد باند (۵ باند) را تولید نمود. در میان آغازگرهایی که باندهای پلی‌مورف تولید نمودند، آغازگر P-01 و آغازگر P-07 به ترتیب بیشترین (۸۰ درصد) و کمترین (۱۷/۶۴) تعداد باند را در جمعیت‌های مورد مطالعه نشان دادند. بطور متوسط، هر آغازگر در جمعیت انزلی ۳/۹ باند پلی‌مورف و در جمعیت گرگان ۴/۱ باند پلی‌مورف تولید نمود (جدول۳). در مجموع با توجه به ۹۴

www.SID.ir

باند تولید شده، میزان پلی‌مورفیسم در جمعیت گرگان ۴۳/۶۱ درصد و در جمعیت تالاب انزلی ۴۱/۴۸ درصد بود. میزان شباهت ژنتیکی و فاصله ژنتیکی دو جمعیت کلمه گرگان و بندر انزلی به ترتیب ۰/۹۶ و ۰/۰۴ محاسبه گردید

جدول ۲- تعداد کل باندها، تعداد باندهای پلی‌مورف و میزان پلی‌مورفیسم تولید شده در آزمایشات RAPD توسط هر آغازگر در ماهی کلمه دریای خزر *Rutilus rutilus caspicus* بدون توجه به موقعیت نمونه‌برداری

کد آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای پلی مورف	درصد پلی مورفیسم
P-01	٥	٤	٨٠
P-02	٩	٤	٤٤/٤٤
P-03	٦	٣	٥٠
P-04	٧	٤	٥٧/١٤
P-05	٩	٤	٤٤/٤٤
P-06	٨	٥	٦٢/٥٠
P-07	١٧	٣	١٧/٦٤
P-08	١١	٦	٥٤/٥٤
P-09	٩	٤	٤٤/٤٤
P-10	١٣	٦	٤٦/١٥
مجموع ١٠آغازگر	٩٤	٤٣	٤٥/٧٠

جدول ۳- نسبت تعداد باندهای پلی‌مورف به باندهای تولید شده توسط آغازگرها، درصد پلی‌مورفیسم و تعداد متوسط باندهای پلی‌مورف به ازای هر آغازگر در هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه ماهی کلمه دریای خزر

	جمعیت ها	
	گرگان	تالاب انزلی
	تعداد کل باندها / تعداد باندهای پلی مورف	
آغازگر		
P-01	٤/٥	٣/٥
P-02	٤/٩	٤/٩
P-03	٣/٦	٢/٦
P-04	٣/٧	٤/٧
P-05	٤/٩	٣/٩
P-06	٥/٨	٥/٨
P-07	٣/١٧	٣/١٧
P-08	٦/١١	٥/١١
P-09	٤/٩	٤/٩
P-10	٥/١٣	٦/١٣
درصد پلی مورفیسم		
	٤٣/٦١	٤١/٤٨
تعداد متوسط باندهای پلی مورف به ازای هر آغازگر		
	٤/١	٣/٩

Archive of SID

بحث

در حال حاضر با توجه به ارزش اقتصادی و همچنین اکولوژیکی ماهی کلمه دریای خزر، اطلاعات زیادی در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت‌های آن وجود ندارد. در این تحقیق برای اولین بار از نشانگرهای RAPD جهت بررسی تشابه و تفاوت ژنتیکی دو جمعیت از این گونه در دو ناحیه شرق و غرب دریای خزر استفاده گردید.

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، تعداد باندهای پلی‌مورف در هر دو جمعیت تقریبا مساوی می‌باشد که نشان دهنده وجود سطوح یکسانی از پلی‌مورفیسم در جمعیت کلمه گرگان (۴۳/۶۱ در صد) و جمعیت تالاب انزلی (۴۱/۴۸ درصد) می‌باشد. نظر به اینکه این ماهی در حال حاضر تکثیر و جهت بازسازی ذخایر به دریای خزر رهاسازی می‌گردد، سیاست‌های مدیریتی باید به شکلی باشد که تنوع ژنتیکی میان نتاج حاصل از تکثیر بطور مداوم مورد پایش قرار گیرد و با انتخاب تعداد مناسبی از مولدین از کاهش تنوع ژنتیکی موجود به دلیل پدیده آمیزش خویشاوندی (Inbreeding) و رانش ژنتیکی (Genetic drift) جلوگیری شود.

دو منطقه خلیج گرگان و بندر انزلی بیش از چهارصد کیلومتر با یکدیگر فاصله دارند و تماس میان این دو جمعیت از طریق پدیده مهاجرت بعید به نظر می‌رسد که تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از روش PCR-RAPD نیز حاکی از وجود تمایز ژنتیکی کم میان ماهیان این دو منطقه می‌باشد. همچنین مطالعات ژنتیکی انجام شده بر روی جمعیت‌های ماهی کلمه در انزلی و گرگان با استفاده از روش PCR-RFLP نشان می‌دهد که تفاوت جمعیت‌های ماهی مذکور معنی‌دار نیست (۳). در این تحقیق، فاصله ژنتیکی دو جمعیت گرگان و انزلی ۰/۰۴ محاسبه گردید. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که میزان متوسط فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های همگونه (Conspecific populations) ۰/۰۵ (دامنه: ۰/۰۷–۰/۰۰۲) و بین گونه‌های هم جنس (Congeneric species) ۰/۳۰ (۰/۶۱–۰/۰۳) می‌باشد (۱۴ و ۱۶). مقدار فاصله ژنتیکی دو جمعیت کلمه گرگان و انزلی کمتر از مقدار متوسط فاصله ژنتیکی جمعیتهای همگونه می‌باشد که حاکی از تشابه زیاد این دو جمعیت می‌باشد. نتایج مشابهی در خصوص فاصله ژنتیکی کم میان جمعیت‌های طبیعی برخی از آبزیان نظیر تیلاپیا (۱۱)، میگوی ببری سیاه (۱۵) و *Mytilus chilensis* (۱۷) مشاهده شده است.

روش RAPD کاربرد وسیعی در مطالعات رده‌بندی و سیستماتیک موجودات مختلف دارد (۶). اما با وجود مزایای نسبی این روش، یکی از نقاط ضعف مهم آن این است که با استفاده از نشانگرهای RAPD امکان تمایز میان افراد هموزایگوس و هتروزایگوس وجود ندارد (۱۸). بنابراین، استفاده از روش‌های مولکولی دیگر نظیر مایکروساتلایت جهت تشخیص بهتر تفاوت و تشابه ژنتیکی این دو جمعیت و تائید نتایج حاصل از این تحقیق ضروری بنظر می‌رسد. همچنین، امکان کشف نشانگرهای اختصاصی این دو جمعیت از جمله زمینه‌های پژوهشی مفید می‌باشد تا امکان شناسایی و تفکیک بهتر این جمعیت‌ها میسر گردد.

منابع

(۱) پرافکنده حقیقی ف، و رضوانی س (۱۳۸۴) استفاده از تراکم عناصر کمیاب در اتولیت جهت مطالعه جمعیتی ماهی کلمه دریای خزر (*Rutilus rutilus*). مجله علمی شیلات ایران، ج۱۴، ش ۳– ۱۹–۳۶.

(۲) عبدلی ا (۱۳۷۸) ماهیان آبهای داخلی ایران، انتشارات موزه طبیعت و حیات وحش ایران.

(۳) عقیلی ر (۱۳۸۲) بررسی تنوع ژنتیکی در خانواده کپورماهیان دریای خزر به روش RFLP. پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار.

(۴) کیوان شکوه س، پورکاظمی م، و کلباسی م (۱۳۸۳) بررسی امکان تشخیص جنسیت فیل ماهی *Huso huso* با استفاده از روش PCR-RAPD. مجله علمی شیلات ایران، ج۱۳، ش ۱– ۱۴۹–۱۶۲.

(5) Barman H, Barat A, Bharat M, Banerjee Y, Meher P, Reddy P and Jana R (2003) Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. Aquaculture 217: 115-123.

(6) Bartfai R, Egedi S, Yue G H, Kovacs B, Urbanyi B, Tamas G, Horvath L and Orban L (2003) Genetic analysis of two common carp brood stocks by RAPD and microsatellite markers. Aquaculture 219: 157-167.

www.SID.ir

(7) Berg S L (1964) Fresh water fishes of USSR and adjacent countries. Izdatelstvo Academic Nauk USSR, Moscow, 1510 pp.
(8) Das P, Prasad H, Meher P K, Barat A and Jana R K (2005) Evaluation of genetic relationship among six Labeo species using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Aquaculture Research 36: 564-569.
(9) Elo K, Ivanoff S, Jukka A, Vuorinen J and Piironen J (1997) Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. Aquaculture 152: 55-56.
(10) Hadrys H, Balick M and Schierwater B (1992) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Molecular Ecology 1: 55-63.
(11) Hassanien H A, Elnady M, Obeida A and Itriby H (2004) Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Aquaculture Research. 35: 587-593.
(12) Nei M (1972) Genetic distances between populations. American Naturalist 106: 283-292.
(13) Pourkazemi M, Skibinski, D O F, Beardmore J A (1999) Application of mtDNA d-loop region for the study of Russian sturgeon population structure from Iranian coastline of the Caspian Sea. Journal of Applied Ichthyology 15: 23-28.
(14) Shaklee J B, Tamaru C S and Waples R S (1982) Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoretic analysis of proteins. Pacific Science 36: 141-157.
(15) Tassanakajon A, Pongsomboon S, Rimphanitchayakit V, Jarayabhand P and boonsaeng V (1997) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. Molecular Marine Biology and Biotechnology 6: 110-115.
(16) Thorpe J P and Sol-Cave A M (1994) The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. Zoologica Scripta 23: 3-18.
(17) Toro J E, Ojeda J A and Vergara A M (2004) The genetic structure of *Mytilus chilensis* (Hupe 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis. Aquaculture Research 35: 1466-1471.
(18) Weising K, Nybom H, Wolff K and Meyer W (1995) DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press, Boca Roton, FL.
(19) Williams D J, Kazianis S and Walter R B (1998) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of largemouth bass subspecies and their intergrades. Transaction of the American Fisheries Society 127: 825-832.