



## استفاده از مارکرهای میکروستلایتی در تشخیص تنوع ژنتیکی جمعیت های ماهی سوف سفید حوضه جنوب غربی دریای خزر

مهتاب قریب خانی<sup>۱\*</sup>، محمد پورکاظمی<sup>۲</sup> و سهراب رضوانی گیل کلانی<sup>۳</sup>

۱- باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی - واحد آستارا، ۲- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، ۳- موسسه تحقیقات شیلات ایران

\* نویسنده مسئول: مهتاب قریب خانی، استادیار و عضو استعدادهای درخشان باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی - واحد آستارا

m.gharibkhani@iau-astara.ac.ir

### چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت ماهیان سوف سفید حوضه جنوب غربی دریای خزر تعداد ۱۵۰ عدد نمونه بالغ ماهی سوف سفید صید شده از حوضه جنوب غربی دریای خزر شامل تالاب انزلی (۵۰ عدد)، سواحل چابکسر (۵۰ عدد) و سواحل تالش (۵۰ عدد) جمع آوری گردید. از هر ماهی حدود ۲ گرم از بافت نرم باله پشتی جدا و سپس در الکل ۹۶ درصد نگهداری گردید. DNA ژنومی هر یک از نمونه ها استخراج و سپس واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر میکروستلایت انجام گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که از ۱۵ جفت آغازگر مورد استفاده ۶ جفت تولید باند های چند شکلی (پلی مورف) و ۷ جفت تولید باندهای تک شکل (مونومورف) نمودند. ۲ جفت از آغازگرها نیز هیچگونه تکثیری انجام ندادند. میانگین آللی برای کلیه لوکوس ها در تمامی مناطق نمونه برداری  $3/1 \pm 0/6$  و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار که از فاکتورهای اندازه گیری تنوع ژنتیکی هستند به ترتیب  $0/53 \pm 0/20$  و  $0/51 \pm 0/14$  محاسبه شد. بر اساس تست AMOVA حداکثر تمایز ژنتیکی (Fst) معنی دار ( $P < 0/01$ ) بین نمونه های مناطق سواحل چابکسر و تالاب انزلی و به میزان  $0/064$  با جریان ژنی  $3/63$  دیده شد. حداقل تمایز ژنتیکی بین نمونه های منطقه تالش و چابکسر به میزان  $0/022$  با جریان ژنی  $11/27$  دیده شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که حداقل دو جمعیت متمایز از این گونه ماهی در دریای خزر و تالاب انزلی وجود دارند. واژگان کلیدی: میکروستلایت، تنوع ژنتیکی، سوف سفید، دریای خزر.

### مقدمه

کاربرد نشانگرهای مولکولی منجر به پیشرفت سریع در مطالعات مربوط به تشخیص تنوع ژنتیکی گونه های آبزیان شده است (Liu and Cordes, 2004). میکروستلایت ها از جمله مهمترین نشانگرهای مولکولی هستند که به طور گسترده ای در ژنوم موجودات زنده پراکنده شده اند. این نشانگرها به دلیل داشتن سطوح بالای پلی مورفیسم، اندازه نسبتا کوچک و روشهای تشخیصی سریع بطور گسترده ای به منظور تشخیص ذخایر ژنتیکی، انتخاب مولدین، بازسازی نقشه های خویشاوندی متراکم، تعیین نقشه ژنی صفات مهم اقتصادی و کاربرد آنها در برنامه های تولید مثلی بکار می رود (Chistiakov et al., 2006). ماهی سوف سفید (*Sander lucioperca*) یکی از ماهیان با ارزش اقتصادی حوضه دریای خزر محسوب می شود. لذا گسترش برنامه های مدیریتی و انجام فعالیت های بازسازی ذخایر سوف ماهیان هنگامی می تواند مفید باشد که تنوع ژنتیکی جمعیت این گونه به خوبی درک شود زیرا این اطلاعات در انتخاب جمعیت های دهنده ژن در تکثیر مصنوعی در خصوص ساختار جمعیت و در امر بازسازی ذخایر ضروری به نظر می رسد.



## مواد و روش‌ها

تعداد ۱۵۰ عدد نمونه بالغ ماهی سوف سفید صید شده از حوضه جنوب غربی دریای خزر شامل تالاب انزلی (۵۰ عدد)، سواحل چابکسر (۵۰ عدد) و سواحل تالش (۵۰ عدد) جمع آوری گردید. از هر ماهی حدود ۲ گرم از بافت نرم باله پشتی جدا و سپس در الکل ۹۶ درصد نگهداری گردید. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان واقع در جوار سد سنگر رشت منتقل شد. DNA ژنومی هر یک از نمونه‌ها به روش اسنات آمونیوم استخراج گردید و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر میکروستلایت انجام گردید. محصول تکثیر شده با ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد الکتروفورز و با محلول نیترات نقره رنگ آمیزی شد. پس از رتبه دهی به ال‌ها بر مبنای اندازه و طول هر باند بر حسب جفت باز (bp) محاسبات ژنتیکی از جمله فراوانی الی، تنوع ژنتیکی بر اساس میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و قابل انتظار (He)، مقدار تمایز ژنتیکی (Fst) و جریان ژنی بر اساس تست AMOVA با استفاده از نرم افزار Biocapt و GenAlex محاسبه گردید.

## نتایج و بحث

در بررسی الی برای تعیین پلی مورفیسم بیشترین تعداد ال مشاهده شده ۴ ال در لوکوس YP13 متعلق به نمونه‌های چابکسر و تالش، ۴ ال در لوکوس YP60 متعلق به نمونه‌های تالش و ۴ ال در لوکوس Pfla L8 می‌باشد. کمترین تعداد ال مشاهده شده ۲ ال در لوکوس‌های YP60 و YP111 در نمونه‌های تالاب انزلی و چابکسر می‌باشد. در مقایسه مناطق مورد مطالعه بیشترین تعداد ال مشاهده شده مربوط به منطقه تالش با  $3/5 \pm 0/5$  کمترین ال مشاهده شده مربوط به تالاب انزلی با  $2/7 \pm 0/5$  ال می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱- تعداد ال واقعی (Na) و موثر (Ne) در شش لوکوس میکروستلایت در ماهی سوف سفید در مناطق مختلف

میانگین	تالش	چابکسر	تالاب انزلی	لوکوس
$3/5 \pm 0/6$	۴/۰	۴/۰	۳/۰	YP13
$3/3 \pm 0/1$	۴/۰	۲/۰	۲/۰	YP60
$2/2 \pm 0/5$	۳/۰	۲/۰	۲/۰	YP110
$3/0 \pm 0/0$	۳/۰	۳/۰	۳/۰	Pfla L2
$3/3 \pm 0/1$	۴/۰	۴/۰	۳/۰	Pfla L8
$3/0 \pm 0/0$	۳/۰	۳/۰	۳/۰	Pfla L9
$3/0 \pm 0/6$	$3/5 \pm 0/5$	$3/0 \pm 0/9$	$2/7 \pm 0/5$	میانگین

در بررسی و مطالعات ژنتیک جمعیت یک گونه از معیارهایی نظیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) برای هر منطقه در هر جایگاه و به ازاء هر جایگاه در تمامی مناطق مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این بررسی دامنه Ho بین مناطق نمونه برداری در تمامی لوکوس‌ها  $0/93 - 0/24$  بود که کمترین مقدار در لوکوس YP110 در منطقه تالش و بیشترین مقدار در لوکوس Pfla L9 در سد ارس مشاهده شد (جدول ۲).



جدول ۲- مقادیر هتروزیگوسیت مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) در شش لوکوس میکروستلایت در ماهی سوف سفید در مناطق مختلف.

	میانگین	تالش	چابکسر	تالاب انزلی	لوکوس
Ho (He)	۰/۵۱±۰/۰۴(۰/۶۲±۰/۰۵)	۰/۵۶(۰/۶۸)	۰/۴۸(۰/۵۸)	۰/۵۲(۰/۶۲)	YP13
	۰/۴۴±۰/۰۴(۰/۴۸±۰/۱۰)	۰/۳۸(۰/۶۱)	۰/۴۶(۰/۳۷)	۰/۴۸(۰/۴۶)	YP60
	۰/۲۹±۰/۰۳(۰/۲۴±۰/۰۳)	۰/۲۴(۰/۲۱)	۰/۳۲(۰/۲۷)	۰/۳۰(۰/۲۵)	YP110
	۰/۵۲±۰/۰۶(۰/۴۹±۰/۰۲)	۰/۵۰(۰/۵۰)	۰/۴۶(۰/۵۱)	۰/۶۰(۰/۴۷)	Pfla L2
	۰/۴۹±۰/۱۷(۰/۵۴±۰/۱۲)	۰/۶۲(۰/۶۱)	۰/۳۰(۰/۶۴)	۰/۶۶(۰/۵۵)	Pfla L8
	۰/۸۸±۰/۰۶(۰/۶۲±۰/۰۳)	۰/۸۸(۰/۶۵)	۰/۹۲(۰/۶۳)	۰/۸۰(۰/۶۳)	Pfla L9
	۰/۵۲±۰/۲۱(۰/۵۰±۰/۱۴)	۰/۵۳±۰/۲۲(۰/۵۴±۰/۱۳)	۰/۴۹±۰/۲۲(۰/۵۰±۰/۱۴)	۰/۵۶±۰/۱۷(۰/۵۰±۰/۱۵)	میانگین

بر اساس تست AMOVA حداکثر تمایز ژنتیکی (Fst) معنی دار ( $P < 0.01$ ) بین نمونه های مناطق سواحل چابکسر و تالاب انزلی و به میزان ۰/۰۶۶ با جریان ژنی ۳/۶۳ دیده شد. حداقل تمایز ژنتیکی بین نمونه های منطقه تالش و چابکسر به میزان ۰/۰۲۲ با جریان ژنی ۱۱/۲۷ دیده شد.

### نتیجه گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد که تفاوت آماری معنی داری از لحاظ تعداد الل بین نمونه های مناطق مختلف نمونه برداری وجود دارد ( $P \leq 0.05$ ) اما از لحاظ میزان هتروزیگوسیتی تفاوت آماری معنی داری بین نمونه های مناطق مختلف نمونه برداری وجود ندارد ( $P \geq 0.05$ ). در این بررسی وجود تنوع ژنتیکی پایین در نمونه های ماهی سوف سفید مناطق مورد مطالعه به روشنی قابل ملاحظه است. با توجه به اینکه یکی از مهمترین منابع برای بازسازی ذخایر ماهی سوف سفید تالاب انزلی و دریای خزر در حقیقت مولدین صید شده از دریاچه سد ارس می باشند و تکثیر این ماهیان در مراکز تکثیر با استفاده از مولدین کم انجام گرفته و معمولاً مولدین بصورت غیر تصادفی انتخاب می شوند لذا احتمال انجام آمیزش های خویشاوندی در ماهیان مولد امری اجتناب ناپذیر است که خود منجر به کاهش تنوع ژنتیکی و پایین آمدن تعداد اللهای مشاهده شده می گردد. از اینرو وجود اثر موسس و پیرو آن کم شدن تنوع ژنتیکی در این گونه نیز به روشنی قابل توجیه است. نتایج حاصل بیانگر آن است که حداقل دو جمعیت متمایز از ماهی سوف سفید در مناطق مورد بررسی وجود دارند که شامل جمعیت سوف سفید تالاب انزلی و جمعیت سوف سفید دریای خزر می باشند.

### منابع

1. Chistiakov, D.A., Helleman, B. and Volckaert, F.A.M., 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1-29.
2. Liu, Z.J. and Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.



## Microsatellite markers for determination of genetic diversity in populations of pikeperch in the southwest Caspian Sea

Mahtab Gharibkhani<sup>1\*</sup>, Mohammad Pourkazemi<sup>2</sup>, Sohrab Rezvani Gilkolai

1- Islamic Azad University, Young Researchers Club, Islamic Azad University- Astar Branch

2- International Sturgeon Research Institute, Rasht, Iran

3- Iranian Fisheries Research Organization, P. O. Box 14155-6116, Tehran, Iran

\* Corresponding E-mail address: [m.gharibkhani@iau-astara.ac.ir](mailto:m.gharibkhani@iau-astara.ac.ir)

### Abstract

The genetic diversity of pikeperch (*Sander lucioperca*) in the southwest Caspian Sea was studied collecting a total of 150 specimens of adult pikeperch from Anzali wetland (50 specimens), Talesh (50 specimens) and Chaboksar (50 specimens) coasts. About 2 g of each specimen's dorsal fin was removed, stored in 96% ethyl alcohol. Genomic DNA was extracted and Polymerase Chain Reaction (PCR) was conducted on the target DNA using 15 pairs of microsatellite primers. The results showed that from 15 pair of primers that were examined 6 polymorphic and 7 monomorphic loci were produced, while 2 loci didn't produce any DNA bands. Mean allele number was  $3.1 \pm 0.6$  and mean observed and expected heterozygosity was  $0.53 \pm 0.20$  and  $0.51 \pm 0.14$  respectively. Highest  $F_{st}$  (0.064) with  $N_m = 3.63$  was observed between Anzali wetland and Chaboksar coasts and the lowest  $F_{st}$  (0.022) with  $N_m = 11.27$  was observed between Talesh and Chaboksar coasts. The results of this study suggest that there are at least two genetically different populations of this species in Anzali Wetland and Caspian Sea.

**Keywords:** pikeperch, genetic variation, microsatellite, Caspian Sea.